

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Desenvolvimentos Metodológicos em
Microextração em Fase Sólida acoplada
a Cromatografias Gasosa e Líquida.**

Tese de doutorado apresentada por
Adilson Sartoratto ao Programa de Pós-
graduação em Química do Departamento de
Química Analítica da Universidade Estadual
de Campinas, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Campinas, dezembro de 2006.

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

Sa77d Sartoratto, Adilson.
Desenvolvimentos metodológicos em microextração
em fase sólida acoplada a cromatografias gasosa e
líquida / Adilson Sartoratto. -- Campinas, SP: [s.n],
2006.

Orientador: Fabio Augusto.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. SPME. 2. Óleos essenciais. 3. Cromatografia
gasosa. 4. Cromatografia líquida. I. Augusto, Fabio.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: Methodological developments for solid-phase microextraction coupled to gas and liquid chromatography

Palavras-chaves em inglês: SPME (Solid-Phase Micro Extration), Essential oils, Gas chromatography, Liquid chromatography

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Fabio Augusto (orientador), Elina Bastos Caramão (IQ-UFRGS), Marili Villa Nova Rodrigues (CPQBA-UNICAMP), Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-UNICAMP), Ronei Jesus Poppi (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 07/12/2006

Aos meus pais
pela formação que me proporcionaram,

Ao meu filho e
grande amigo Victor,

À Paula minha grande companheira,
dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Professor Dr. Fabio Augusto pela orientação e amizade,

À Professora Dra. Susanne Rath pelo empréstimo dos padrões de pesticidas,

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

À Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte da Divisão de Microbiologia, pela amizade e realização dos ensaios antimicrobianos,

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

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

À Raquel Gomes da Costa Silva pela produção das fibras sol-gel.

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

Aos amigos do CPQBA, Carmen, Rita, Lídia, Sinésio, Marcos, André, Rodney, Maurício, Waldir e tantos outros que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho,

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro,

A todos, muito obrigado.

CURRICULUM VITAE

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: Adilson Sartoratto

Endereço: Rua Mata da Tijuca, nº 119

Bosque de Barão Geraldo - Barão Geraldo - Campinas/SP

CEP 13082-752

RG - 9.056.278 (SSP-SP)

CIC - 042.809.608-52

CRQ - 04221162 (4ª região)

2. FORMAÇÃO

Doutorado (2002-2006)

Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química

Área de concentração: Química Analítica

Título: Desenvolvimentos Metodológicos em Microextração em Fase Sólida acoplada a Cromatografias Gasosa e Líquida.

Mestrado (1999-2001)

Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química

Área de concentração: Química Analítica

Título: Análise de constituintes voláteis de plantas aromáticas por microextração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME/CG).

Ensino Superior (1983-1987)

Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química

Curso: Química modalidade: Bacharel com Atribuições Tecnológicas

3. TRABALHOS PUBLICADOS

3.1. Duarte, M.C.T.; Serzedello, A.; Serra, G.E.; Oliveira, M.C.F.; Ponezi, A.N.; **Sartoratto, A.**, "Effect of lecithin and soy oil on the fermentative performance of *Saccharomyces uvarum* IZ 1904", *Journal of Brazilian Society for Microbiology*, **27**: 255-262, 1996.

3.2. Pedro Melillo de Magalhães; Nicolas Delabays; **Adilson Sartoratto**; "New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. guarantee its growth in Brazil", *Revista Ciência e Cultura*, **49** (5/6): 413-415, 1997.

3.3. De Magalhães P., Pereira B., Debrunner N., **Sartoratto A.**, De Oliveira J.; "New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L." in *Proceedings of the Second World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, WOCMAP-2. Acta Horticulturae*, **502**, 377-381, 1999.

- 3.4. Marchese, J.A.; Rehder, V.L.G.; **Sartoratto, A.**; “Quantificação de artemisinina em *Artemisia annua* L. – Uma comparação entre as técnicas cromatografia em camada delgada com detecção densitométrica e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta”, *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **4** (1): 81-87, 2001.
- 3.5. Figueira, Glyn Mara, **Sartoratto, Adilson**; Rehder, Vera L.G.; Santos, Adriana S. “Investigação sobre alteração no teor e composição do óleo essencial de algumas espécies aromáticas após secagem”, *Horticultura Brasileira*, Brasília, **19** (2): 243, 2001.
- 3.6. Rodney A.F. Rodrigues, Carmen L. Queiroga, Marili V.N. Rodrigues, Mary A. Foglio, **Adilson Sartoratto**, Ílio Montanari Jr., “Study of the variation of the composition of the essential oil of leaves and flowers of *Achyrocline alata* (D.C.) along a period of the day”, *Journal of Essential Oil Research*, **14**: 280-281, 2002.
- 3.7. Vera Lúcia Garcia Rehder, Marili Villa Nova Rodrigues, **Adilson Sartoratto**, Mary Ann Foglio, “Dosagem de artemisinina em *Artemisia annua* L. por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **12**: 116-118, 2002.
- 3.8. F.C. Groppo, J.C. Ramacciato, R.P. Simões, F.M. Flório, **A. Sartoratto**, “Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms”, *International Dental Journal*, **52**: 433-437, 2002.
- 3.9. Roberta Pessoa Simões, Francisco Carlos Groppo, **Adilson Sartoratto**, Fernando de Sá Del Fiol, Thales Rocha de Mattos Filho, Juliana Cama Ramacciato, Marili Villa Nova Rodrigues, “Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica”, *Revista Lecta*, **20** (2): 143-152, 2002.
- 3.10. **A. Sartoratto**, F. Augusto, “Application of headspace solid phase microextraction and gas chromatography to the screening of volatile compounds from some Brazilian aromatic plants”, *Chromatographia*, **57** (5/6): 351-356, 2003.
- 3.11. De Magalhães, P.M., Pereira, B. and **Sartoratto, A.**, “Yields of antimalarial *Artemisia annua* L. species”, *Acta Horticulturae*. (ISHS), **629**: 421-424, 2004.
- 3.12. Rehder, V.L.G.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C.; **Sartoratto, A.**; Figueira, G.M.; Duarte, M.C.T.; “Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applanatum* e *Origanum vulgare*”, *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **6** (2), 67-71, 2004.

- 3.13. **Adilson Sartoratto**, Ana Lúcia M. Machado, Camila Delarmelina, Glyn Mara Figueira, Marta Cristina Teixeira Duarte, Vera Lúcia Garcia Rehder; "Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil", *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**, 275-280, 2004.
- 3.14. Marta Cristina Teixeira Duarte, Glyn Mara Figueira, **Adilson Sartoratto**, Vera Lúcia Garcia Rehder, Camila Delarmelina; "Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants", *Journal of Ethnopharmacology*, **97** (2), 305-311, 2005.
- 3.15. Duarte, S.; Rosalen, P.L.; Hayacibara, M.F.; Cury, J.A.; Bowen, W.H.; Marquis, R.E.; Rehder, V.L.G.; **Sartoratto, A**; Ikegaki, M.; Koo, H.; "The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats", *Archives of Oral Biology*, Oxford, **51** (1), 15-22, 2006.
- 3.16. Ana Paula Artimonte Vaz, Ciro Scaranari, Luiz Alberto Rocha Batista, Glyn Mara Figueira, **Adilson Sartoratto**, Pedro Melillo de Magalhães, "Biomassa e composição química de genótipos melhorados de espécies medicinais cultivadas em quatro municípios paulistas", *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (5), 869-872, 2006.
- 3.17. Figueira, G.M., De Magalhães, P.M., Rehder, V.L.G., **Sartoratto, A.**, Vaz, A.P.A., "Chemical preliminary evaluation of selected genotype of *Phyllanthus amarus* grown in different counties of São Paulo State", *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **8**, 43-45, 2006.
- 3.18. Queiroga, C.L., **Sartoratto, A.**, Souza, W.P., Honório, S.L., "Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* (L.) Huds durante o período diurno em cultivo hidropônico", *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **8**, 108-111, 2006.
- 3.19. Rehder, V.L.G., **Sartoratto, A.**, Rodrigues, M.V.N., "Essential oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker and *Mikania glomerata* Sprengel", *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **8**, 116-118, 2006.
- 3.20. Duarte, M.C.T., Leme, E.E., Delarmelina, C., Figueira, G.M., **Sartoratto, A.**, Rehder, V.L.G., "Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*", *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **8**, 139-143, 2006.
- 3.21. De Magalhães, P.M., Figueira, G.M., Rehder, V.L.G., **Sartoratto, A.**, Vaz, A.P.A., "Agronomic and chemical evaluation of a hybrid of the antimalarial species *Artemisia annua* L. for São Paulo state regions", *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **8**, 199-200, 2006.

- 3.22. Marcos Nopper Alves, Adilson Sartoratto, José Roberto Trigo, “Scopolamine in *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae): defense, allocation, costs and induced response”, *Journal of Chemical Ecology*, 33, 297-309, 2007.

4. PATENTE

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

5. Trabalhos apresentados em Congressos Internacionais: 23

6. Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais: 51

7. Cursos e palestras ministradas: 19

RESUMO

DESENVOLVIMENTOS METODOLÓGICOS EM MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ACOPLADA A CROMATOGRAFIAS GASOSA E LÍQUIDA.

Autor: Adilson Sartoratto

Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto

O trabalho que teve como objetivo desenvolver metodologias em Microextração em Fase Sólida para utilização em cromatografia líquida e gasosa será apresentado em dois capítulos: no primeiro capítulo a análise de pesticidas organofosforados (OPP) em amostras aquosas e infusão de plantas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência/detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) utilizando uma interface de dessorção para SPME e uma fibra sol-gel Carbowax 20M ormosil, produzidas em nosso laboratório. Após avaliação de desempenho da interface e eficiência da fibra sol-gel, uma metodologia de análise foi desenvolvida, avaliando-se os principais parâmetros de validação: sensibilidade, linearidade, faixa linear, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação. No segundo capítulo, tentamos relacionar a composição química de voláteis de plantas analisados por SPME-GC-MS com a atividade antimicrobiana de óleos essenciais. A avaliação dos voláteis foi feita utilizando-se dois tipos de fibras comerciais: PDMS e PDMS/DVB e também pela análise do óleo essencial obtido por métodos tradicionais. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi realizada pelo método da concentração mínima inibitória (MIC) com a finalidade de selecionar óleos com potencial terapêutico, em substituição às drogas existentes no mercado.

ABSTRACT

METHODOLOGICAL DEVELOPMENTS FOR SOLID PHASE MICROEXTRACTION COUPLED TO GAS AND LIQUID CHROMATOGRAPHY.

Author: Adilson Sartoratto

Supervisor: Prof. Dr. Fabio Augusto

The present work is presented in two chapters that had the scope of developing methodologies for solid phase microextraction coupled to gas and liquid chromatography. The first chapter discusses analysis of organophosphorous pesticides in water soluble samples and plant infusions by High Performance Liquid Chromatography coupled to photodiode array detector (HPLC-DAD) using a SPME desorption interface and Carbowax 20M sol-gel fiber, both produced in lab. After interface and sol-gel fiber efficiency evaluation an analysis method was developed that considered validation parameters: sensibility, linearity, linear range, accuracy, precision, detection limit, and quantification limit. In the second chapter we proposed to establish a relationship among plant's chemical volatile composition analyzed by SPME-GC-MS and antimicrobial activity of essential oils. Two commercial fibers: PDMS and PDMS-DVB were employed for essential oil analysis. Essential oils with potential therapeutic properties in substitution to known commercial drugs were chosen by minimum inhibition concentration experimental model.

ÍNDICE

Lista Abreviaturas.....	xv
Índice de Figuras.....	xvii
Índice de Tabelas.....	xix
Capítulo I – Utilização de nova interface de dessorção na análise de Pesticidas Organofosforados por SPME-HPLC com fibra sol-gel Carbowax 20M ormosil.....	1
I.1. Introdução.....	2
I.1.1. Recobrimentos sorventes para fibras de SPME baseados na tecnologia sol-gel.....	12
I.1.2. Pesticidas Organofosforados.....	13
I.1.3. Validação de Método Analítico.....	16
I.1.3.1. Exatidão.....	16
I.1.3.2. Precisão.....	17
I.1.3.3. Seletividade.....	18
I.1.3.4. Limites de detecção e quantificação.....	18
I.1.3.5. Linearidade.....	19
I.1.3.6. Sensibilidade.....	19
I.1.3.7. Faixa Linear.....	20
I.2. Objetivos.....	21
I.2.1. Desenvolvimento de uma interface de dessorção para SPME-HPLC alternativa a interface comercial.....	21
I.2.2. Avaliação de fibras sol-gel para uso em SPME-HPLC.....	21
I.2.3. Desenvolvimento de metodologia para análise de pesticidas organofosforados em amostras aquosas e infusões vegetais por SPME-HPLC.....	21
I.3. Materiais.....	22
I.3.1. Padrões.....	22
I.3.2. Reagentes.....	23

I.3.3. Outros materiais.....	23
I.3.4. Interface.....	23
I.3.5. Cromatógrafo.....	24
I.3.6. Material vegetal.....	25
I.3.7. Preparo das soluções padrão.....	25
I.3.8. Preparo da fibra sol-gel Carbowax 20M.....	25
I.3.9. Preparo da infusão.....	26
I.3.10. Software.....	26
I.4. Resultados e Discussão.....	27
I.4.1. Otimização.....	27
I.4.1.1. Estabelecimento das condições cromatográficas para separação dos OPP.....	27
I.4.1.2. Avaliação da interface de dessorção.....	28
I.4.1.3. Seleção da fibra sol-gel.....	28
I.4.1.4. Otimização das condições operacionais para aplicação de SPME na análise de pesticidas organofosforados.....	28
I.4.1.5. Estudo da dessorção dos analitos.....	36
I.4.2. Validação.....	39
I.4.2.1. Estudo da Linearidade.....	39
I.4.2.2. Estudo da Precisão (repetibilidade).....	41
I.4.2.3. Estudo da exatidão.....	42
I.4.2.4. Limites de detecção e quantificação.....	42
I.4.2.5. Massas extraídas de OPP.....	43
I.4.3. Aplicação.....	44
I.4.3.1. Linearidade.....	45
I.4.3.2. Precisão.....	46
I.4.3.3. Exatidão.....	47
I.4.3.4. Limites de detecção e quantificação.....	48
I.5. Conclusões.....	49

CAPÍTULO II - Uso de HS-SPME-GC-MS na análise de voláteis de plantas com possível atividade antimicrobiana.....	50
II.1. Introdução.....	51
II.2. Objetivo.....	56
II.3. Materiais.....	57
II.3.1. Material vegetal.....	57
II.3.2. Outros Materiais.....	58
II.3.3. Cromatografia Gasosa Espectrometria de massas (GC/MS).....	58
II.3.4. Microrganismos.....	58
II.3.5. Obtenção dos óleos essenciais.....	58
II.3.6. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC).....	59
II.3.7. Análise dos voláteis por SPME.....	60
II.4. Resultados e Discussão.....	61
II.4.1. Composição química dos óleos essenciais.....	61
II.4.2. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	82
II.4.3. Composição química X atividade antimicrobiana.....	85
II.5. Conclusões.....	87
III. Referências Bibliográficas.....	88
Anexo 1.....	93
Espectros de massa dos analitos não identificados.....	94
Anexo 2.....	104
Cromatogramas (GC/MSD) das espécies estudadas.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

- BVOC – Biogenic volatile organic compounds
- CARB – Carbofenotion
- COU – Coumafos
- CW-TPR – Carbowax-template resin
- DL₅₀ - Dose letal 50
- FI – Força iônica
- FM – Fase móvel
- GC - Cromatografia gasosa
- GC-MS – Cromatografia gasosa – Detetor seletivo de massas
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
- HS-SPME-GC-MS - Headspace - Microextração em fase sólida - Cromatografia gasosa – Detetor seletivo de massas
- IR – Índice de retenção
- LD – Limite de detecção
- LLE – Extração líquido-líquido (liquid-liquid extraction)
- LQ – Limite de quantificação
- MAL – Malation
- MET – Metil paration
- MIC – Concentração mínima inibitória (minimal inhibitory concentration)
- M – Massa molar
- MQ_{erro puro} - Média quadrática do erro puro
- MQ_{falta de ajuste} – Média quadrática da falta de ajuste
- MQ_{regressão} – Média quadrática da regressão
- MQ_{resíduo} – Média quadrática do resíduo
- OE – Óleo essencial
- OPP – pesticidas organofosforados (organophosphorus pesticides)
- PA – Poliacrilato
- PAH – Hidrocarbonetos poliaromáticos (polyaromatic hydrocarbons)
- PDMS – Polidimetilsiloxano
- PDMS-DVB – Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno

- s – desvio padrão
- SPE – Extração em fase sólida (solid phase extraction)
- SPME - Microextração em fase sólida (Solid phase microextraction)
- SPME-GC - Microextração em fase sólida - Cromatografia gasosa
- SPME-HPLC - Microextração em fase sólida - Cromatografia líquida
- SPME-HPLC-DAD - Microextração em fase sólida - Cromatografia líquida - Detetor de arranjo de diodos
- SPME-HPLC-UV - Microextração em fase sólida - Cromatografia líquida - Detetor ultravioleta
- s_R – estimativa do desvio padrão relativo
- T – Temperatura
- t_{ext} – Tempo de exposição da fibra
- t_R – Tempo de retenção
- TTC - Cloreto de trifenil tetrazólio (triphenyl tetrazolium chloride)
- UFC – unidades formadoras de colônias
- USP 29 – United States Pharmacopeia 29th edition

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 - Dispositivo para SPME. Vista geral em corte (esquerda): 1 - fibra extratora; 2 - agulha de aço; 3 - corpo do aplicador; 4 - septo de silicone; 5 - guia do aplicador; 6 – guia do êmbolo e 7 – êmbolo; e Detalhe da extremidade fibra / agulha (direita): a - fibra extratora; b - tubo capilar de aço e c - agulha.....	3
Figura I.2 – Representação do uso de SPME em cromatografia gasosa e líquida.....	6
Figura I.3 - Interface de dessorção Supelco (A) e representação esquemática do funcionamento (B).....	7
Figura I.4 - Representação esquemática e foto da interface de dessorção construída.....	23
Figura I.5 - Representação esquemática do funcionamento da interface de dessorção construída.....	24
Figura I.6 – Cromatograma da mistura teste dos OPP (1- metil paration, 2- malation, 3- coumafós, 4- carbofenotion). Condições cromatográficas descritas no item I.4.1.1.....	27
Figura I.7 – Superfícies de resposta quadrática para o Metil paration (A: $T \times t_{exp}$; B: $FI \times T$; C: $FI \times t_{exp}$).....	31
Figura I.8 – Superfícies de resposta quadrática para o Malation (A: $T \times t_{exp}$; B: $FI \times T$; C: $FI \times t_{exp}$).....	32
Figura I.9 – Superfícies de resposta quadrática para o Coumafós (A: $T \times t_{exp}$; B: $FI \times T$; C: $FI \times t_{exp}$).....	33
Figura I.10 – Superfícies de resposta quadrática para o Carbofenotion (A: $T \times t_{exp}$; B: $FI \times T$; C: $FI \times t_{exp}$).....	34

Figura I.11 – Quantidade extraída de cada OPP em função dos solventes usados.....	37
Figura I.12 – Variação da área do pico de Metil paration (A), Malation (B), Coumafós (C) e Carbofenotion (D) com o tempo de dessorção.....	38
Figura I.13 – Esquema de diluição das soluções padrão dos OPP para os testes de validação.....	39
Figura I.14 - Curvas analíticas do estudo de linearidade para Metil paration, Malation, Coumafós e Carbofenotion.....	40
Figura I.15 – Cromatograma de uma amostra de infusão fortificada com OPP (1- Metil paration, 2- Malation, 3- Coumafós, 4- Carbofenotion). Condições cromatográficas descritas no item I.4.1.1.....	44
Figura I.16 - Curvas analíticas do estudo de linearidade em infusão de <i>Artemisia annua</i> para Metil paration, Malation, Coumafós e Carbofenotion..	45
Figura II.1 – Avaliação da Concentração Mínima Inibitória.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1 – Fibras para SPME comercialmente disponíveis.....	12
Tabela I.2 – Tipos de organofosforados.....	14
Tabela I.3 – Estruturas químicas, sinonímia e massas molares dos pesticidas organofosforados.....	22
Tabela I.4 – Condições utilizadas para as extrações previstas pelo planejamento experimental do tipo composto central 2^3 com triplicata no ponto central.....	29
Tabela I.5 – Respostas em área dos OPP, obtidas no planejamento experimental tipo composto central 2^3	30
Tabela I.6 – Resultados ANOVA para o Metil paration.....	31
Tabela I.7 – Resultados ANOVA para o Malation.....	32
Tabela I.8 – Resultados ANOVA para o Coumafos.....	33
Tabela I.9 – Resultados ANOVA para o Carbofenotion.....	34
Tabela I.10 – Concentração ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) dos OPP.....	40
Tabela I.11 – Equações da reta, coeficientes de correlação e resíduos das curvas.....	41
Tabela I.12 – Desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (s_R) dos OPP estudados.....	41
Tabela I.13 - Cálculo da exatidão (%) obtida para os OPP estudados.....	43
Tabela I.14 - Limites de detecção e quantificação para os OPP estudados..	42
Tabela I.15 – Massa extraída (%) dos analitos estudados.....	43
Tabela I.16 – Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dos OPP.....	45

Tabela I.17 – Equações da reta, coeficientes de correlação e resíduos das curvas para as análises em infusão de <i>Artemisia annua</i>	46
Tabela I.18 – Desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (s _R) dos OPP estudados.....	47
Tabela I.19 – Cálculo da exatidão (%) obtida para os OPP estudados.....	47
Tabela I.20 – Limites de detecção e quantificação para os OPP estudados em infusão.....	48
Tabela II.1 - Plantas medicinais da coleção de culturas do CPQBA/UNICAMP estudadas no presente projeto. (N = Nativa; E = Exótica).....	57
Tabela II.2 – Compostos voláteis identificados em <i>Achyrocline satureoides</i> .	61
Tabela II.3 – Compostos voláteis identificados em <i>Achillea millefolium</i>	62
Tabela II.4 – Compostos voláteis identificados em <i>Aloysia gratissima</i>	63
Tabela II.5 – Compostos voláteis identificados em <i>Aloysia triphylla</i>	64
Tabela II.6 – Compostos voláteis identificados em <i>Ammi visnaga</i>	65
Tabela II.7 – Compostos voláteis identificados em <i>Anthemis nobilis</i>	66
Tabela II.8 – Compostos voláteis identificados em <i>Baccharis trimera</i>	67
Tabela II.9 – Compostos voláteis identificados em <i>Cordia verbenacea</i>	68
Tabela II.10 – Compostos voláteis identificados em <i>Cymbopogum martinii</i> ..	69
Tabela II.11 – Compostos voláteis identificados em <i>Cymbopogum winterianus</i>	70
Tabela II.12 – Compostos voláteis identificados em <i>Mentha arvensis</i>	71
Tabela II.13 – Compostos voláteis identificados em <i>Mentha piperita</i>	72
Tabela II.14 – Compostos voláteis identificados em <i>Mentha sp</i>	73

Tabela II.15 – Compostos voláteis identificados em <i>Mentha spicata</i>	74
Tabela II.16 – Compostos voláteis identificados em <i>Mikania glomerata</i>	75
Tabela II.17 – Compostos voláteis identificados em <i>Mikania laevigata</i>	76
Tabela II.18 – Compostos voláteis identificados em <i>Ocimum basilicum</i>	77
Tabela II.19 – Compostos voláteis identificados em <i>Ocimum gratissimum</i> ...	78
Tabela II.20 – Compostos voláteis identificados em <i>Origanum applii</i>	79
Tabela II.21 – Compostos voláteis identificados em <i>Origanum vulgare</i>	80
Tabela II.22 – Compostos voláteis identificados em <i>Piper aduncum</i>	81
Tabela II.23 – Concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais. Valores expressos em mg· mL ⁻¹	82
Tabela II.24 – Principais constituintes dos óleos essenciais com atividade antimicrobiana.....	84
Tabela II.25 – Matriz gerada para avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais.....	86

CAPÍTULO I

**Utilização de nova interface de dessorção na análise
de Pesticidas Organofosforados por SPME-HPLC
com fibra sol-gel Carbowax 20M ormosil**

I.1. INTRODUÇÃO

A Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*) é uma técnica de extração e concentração rápida, simples e que dispensa o uso de solventes extratores e manipulação excessiva de amostra, descrita por ARTHUR *et al.* (1992) no início da década de 90 e que tem sido extensivamente estudada e aplicada a diversas matrizes como alternativa às metodologias tradicionais. O seu princípio básico é simples: uma fibra de sílica recoberta com um filme de material sorvente (polímeros ou adsorventes sólidos), é exposta à amostra ou ao seu espaço confinante (*headspace*). Os analitos contidos na amostra ou no *headspace* são sorvidos na camada de recobrimento da fibra; os materiais extraídos podem ser então transferidos da fibra para um instrumento analítico adequado para a sua separação, identificação e quantificação.

Antes da introdução da SPME, a extração em fase sólida (SPE) era a técnica de extração por sorção mais usada. Porém a SPE apresenta algumas limitações como a obstrução do cartucho ou bloqueio dos poros do material sorbente por sólidos, proteínas e espécies assimiladas, resultando em baixa capacidade de sorção além do cartucho poder ser usado uma única vez.

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

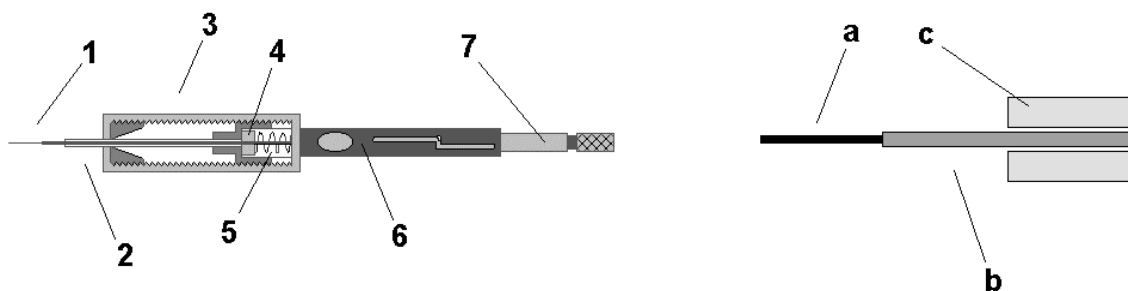


Figura I.1 - Dispositivo para SPME. Vista geral em corte (esquerda): 1 - fibra extratora; 2 - agulha de aço; 3 - corpo do aplicador; 4 - septo de silicone; 5 - guia do aplicador; 6 – guia do êmbolo e 7 – êmbolo; e Detalhe da extremidade fibra / agulha (direita): a - fibra extratora; b - tubo capilar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

As fibras para SPME para uso com este dispositivo são fornecidas montadas em uma agulha, sendo que este conjunto é rosqueado no aplicador. Desta forma o aplicador é reutilizável, bastando trocar o conjunto (fibra + agulha) quando necessário.

O processo envolvido na SPME baseia-se na distribuição dos analitos entre a amostra e o recobrimento de uma fibra ótica. Como consequência, os analitos são extraídos de acordo com seu coeficiente de partição ou absorção e a recuperação nunca atinge 100%, pois a SPME não é um processo de extração exaustivo, e sim um processo de equilíbrio entre o analito na amostra e no recobrimento da fibra.

Os modelos teóricos de SPME baseiam-se nas relações de equilíbrio dos processos envolvidos. Na forma de extração mais simples, a fibra recoberta por um filme sorvente é imersa diretamente na solução-amostra sob agitação. A equação 1 mostra a massa n de um analito extraído, atingindo o equilíbrio entre as concentrações do mesmo na amostra e na fibra (ZHANG *et al.*, 1994).

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

Equação 1

onde, V_f – volume de recobrimento polimérico da fibra
 V_s – volume da amostra
 K_{fs} – coeficiente de partição do analito entre a matriz e o recobrimento polimérico da fibra
 C_0 – concentração inicial do analito na matriz

Como o volume do recobrimento da fibra é muito pequeno em relação ao volume de amostra, $V_s \gg (K_{fs} \cdot V_f)$, a equação 1 pode ser reduzida a:

$$n \approx K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0$$

Equação 2

Assim, a quantidade de analito extraído é uma função linear da concentração inicial do analito na amostra, C_0 . De acordo com a equação 2, a massa extraída aumenta com o volume de recobrimento da fibra, que é função da espessura do filme, assim, o uso de filmes espessos resultaria em aumento de sensibilidade. Como o tempo para o sistema atingir o equilíbrio é incrementado com o aumento da espessura do filme, esse parâmetro é limitado na prática à cerca de 100 μm - nos quais se pode atingir o equilíbrio em alguns minutos de exposição da fibra à amostra (MOTLAGH e PAWLISZYN, 1993). Já o coeficiente de partição K_{fs} é característico para cada par analito/material de recobrimento, com isso, a eficiência de extração está diretamente ligada a escolha correta do tipo de fibra.

Nas extrações realizadas por SPME, a Cromatografia Gasosa (GC) é geralmente a técnica instrumental empregada para as etapas de separação, identificação e quantificação dos analitos. Contudo, muitos compostos orgânicos de interesse não são voláteis e/ou termicamente lábeis: muitos fármacos e drogas, peptídeos, proteínas, alguns pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de alta massa molar e explosivos. Estes compostos são geralmente analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). A utilização de HPLC associada à SPME poderia resolver uma série destes problemas. Essa associação foi feita pela primeira vez por CHEN e PAWLISZYN em 1995, quando desenvolveram uma nova

interface para unir as duas técnicas, avaliando a extração de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) em amostras de água utilizando uma fibra recoberta com 7 μ m PDMS, obtendo boa reprodutibilidade para os tempos de retenção e área dos picos, indicando que a técnica pode ser usada para análises qualitativas e quantitativas.

Na combinação SPME-HPLC, a etapa de extração é semelhante à usada para análises por GC. A diferença entre SPME-GC e SPME-HPLC está na etapa de dessorção. Enquanto na SPME-GC a dessorção ocorre no ambiente aquecido do injetor de um cromatógrafo a gás, na SPME-HPLC esta dessorção deve ser realizada em uma interface apropriada pela exposição da fibra à fase móvel do sistema cromatográfico ou por outra mistura de solventes. A dessorção na fase móvel é a solução mais adequada e pode ser feita *on-line* na fase móvel em fluxo (modo dinâmico), se o processo for rápido. Entretanto, solventes com força cromatográfica elevada, diferentes da fase móvel, são necessários para obter uma dessorção eficiente. Nestes casos, o canal de dessorção é preenchido com a mistura de solventes apropriados e a dessorção ocorre no modo estático, com o solvente estagnado, antes de a injeção ser realizada pela mudança de posição da válvula de injeção do sistema cromatográfico. A dessorção pode ser realizada ainda em um frasco separado com solvente de dessorção (*off-line*). Em contraste com a SPME-GC, a otimização das condições de dessorção é provavelmente a etapa mais crítica da SPME-HPLC, dado o número limitado de fibras disponíveis comercialmente e resistentes a exposição direta a solventes, sendo um fator determinante no desenvolvimento da técnica (ZAMBONIN, 2003).

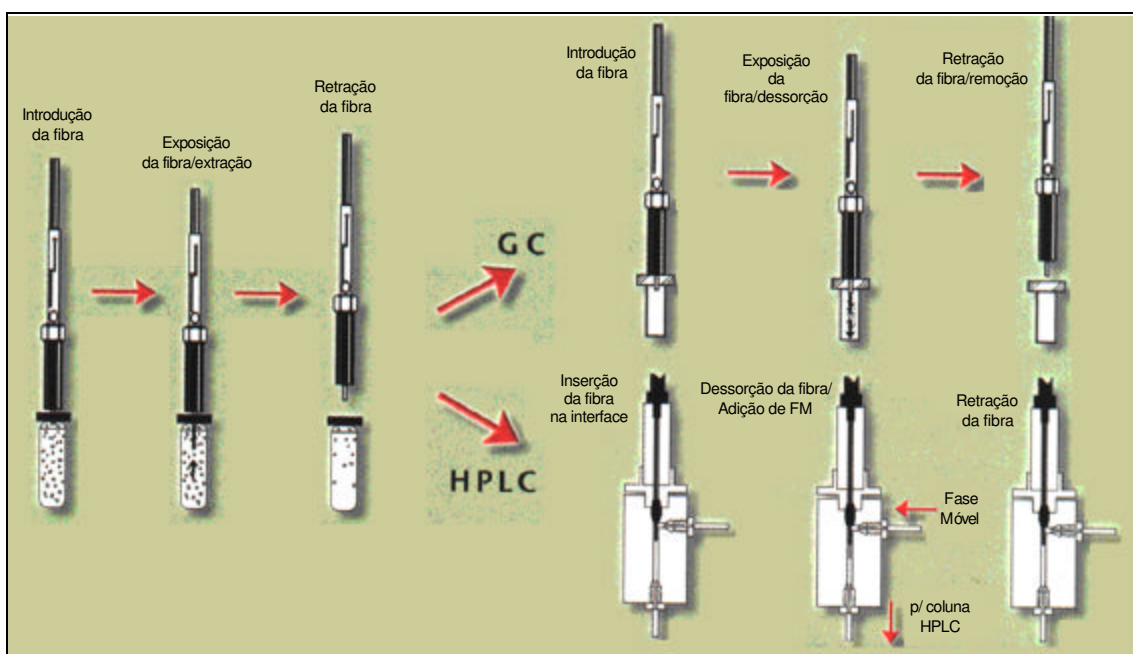


Figura I.2 – Representação do uso de SPME em cromatografia gasosa e líquida

A partir do desenvolvimento da interface por CHEN e PAWLISZYN, a associação SPME-HPLC passou a ser eventualmente usada para análise de uma grande variedade de compostos em diversas matrizes. JINNO *et al.* (1996) avaliaram o desempenho de um sistema SPME-HPLC, analisando dez pesticidas em amostras de água. Os principais parâmetros (velocidade de agitação, temperatura e tempo de extração, força iônica do meio e tempo de dessorção) foram estudados para se otimizar a quantificação dos pesticidas. NEGRÃO e ALPENDURADA (1998) determinaram a presença de seis hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) em amostras de água. Para isso, utilizaram uma interface SPME-HPLC comercial (Supelco, figura I.3), introduzida em 1996 obtendo boa recuperação e bons limites de detecção para os PAH estudados. Outra vantagem apresentada pelos autores foi a utilização da mesma fibra de PDMS em mais de 50 extrações sem degradação.

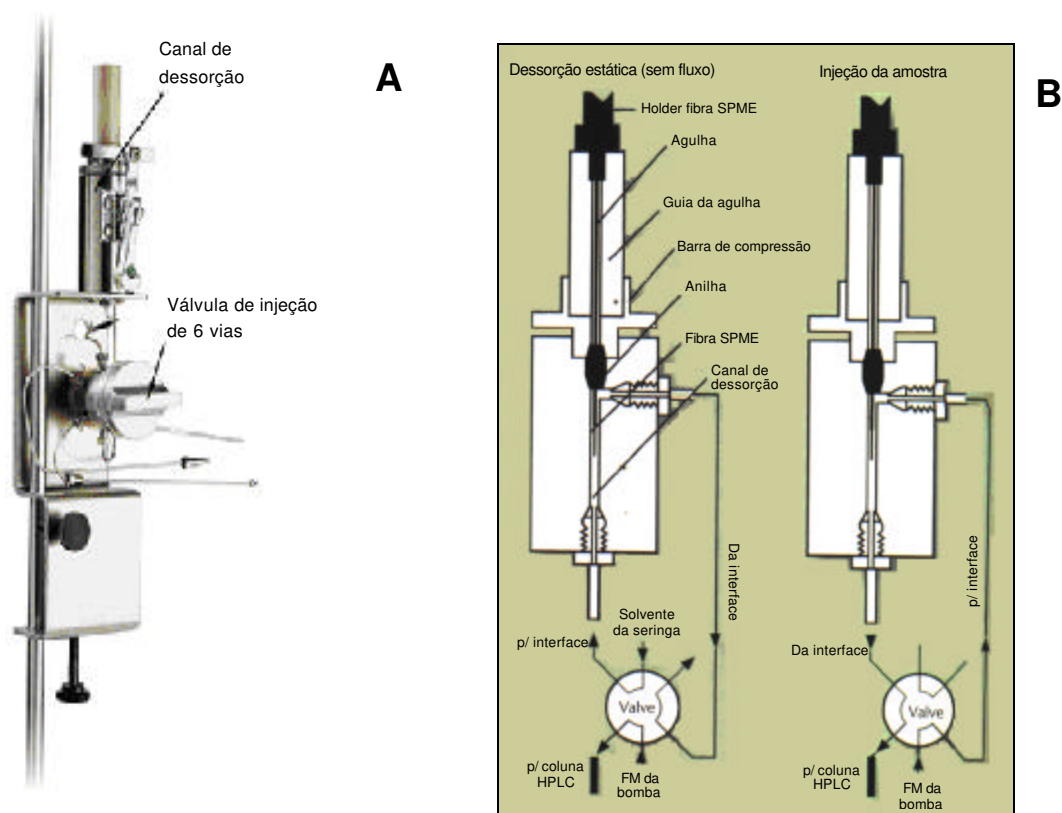


Figura I.3 – Interface de dessorção Supelco (A) e representação esquemática do funcionamento (B).

A interface comercial (figura I.3A), consiste em um bloco com um canal interno conectado a uma válvula de injeção de 6 vias, no local do *loop* de injeção do sistema de HPLC. A fibra de SPME é introduzida no canal de dessorção com a válvula de injeção na posição “load”. Um pistão (barra de compressão) é movimentado comprimindo a anilha contra a agulha de SPME, isolando a fibra no interior do canal de dessorção. Todas as superfícies em contato com a fibra ou com a fase móvel são produzidas em aço inox ou vespel. Os analitos podem ser removidos sob um fluxo de fase móvel (dessorção dinâmica). Quando os analitos são fortemente adsorvidos a fibra, esta pode ser exposta à fase móvel estática antes do material ser injetado na coluna (dessorção estática) (figura I.3B).

Em 1999, WU *et al.* usaram a SPME-HPLC para análise de uma mistura de explosivos. Foi usada uma interface modificada, sendo que após a dessorção dos

analitos no canal da interface, o solvente enriquecido foi eluído em uma pré-coluna para concentração dos analitos desorvidos antes da injeção na coluna analítica. Esta etapa foi realizada para eliminar o problema de dispersão extra-coluna causada pelo grande volume de solvente usado para encher o canal de desorção (200 µL). O uso de bombas separadas para desorção e separação conferiu estabilidade à linha de base do cromatograma. A interface modificada possibilitou a separação da mistura com resultados satisfatórios.

TOLEDO *et al.* (2001) usaram SPME-HPLC para determinação de nove compostos fenólicos em água. Foram testadas duas fibras com recobrimentos mistos (CW-TPR 50 µm e PDMS-DVB 60 µm), os efeitos da força iônica e tempo de equilíbrio no processo de adsorção foram avaliados e os parâmetros que afetam o processo de desorção foram otimizados. A fibra CW-TPR apresentou maior eficiência de extração que a fibra PDMS-DVB, porém, apenas 1 a 16% dos fenóis foram extraídos sob as condições otimizadas. CAO *et al.* (2001), determinaram resíduos de pesticidas (carbendazim, dietofencarb, azoxistrobina, napropamida e bupirimato) em morangos, por SPME-HPLC precedida por extração assistida por microondas. Inicialmente os pesticidas foram processados no microondas por 7 min a 30 W. Uma alíquota do extrato aquoso resultante foi extraída por 45 min em temperatura ambiente e sob agitação constante, utilizando-se uma fibra de PDMS-DVB 60 µm. A fibra foi exposta no canal de desorção por 1 min com o injetor na posição “load” sendo em seguida transferida para a coluna alterando-se a posição do injetor para “inject”.

A análise de delorazepan (benzodiazepínico), em amostras de urina por SPME-HPLC foi realizada por ARESTA *et al.* (2002). Foram testados dois tipos de fibra: Carbowax/resina moldada (CW-TPR-100) e PDMS-DVB 60 µm, que foi mais apropriada para as análises. Para as amostras de urina foi utilizado o modo de desorção estático com o canal de desorção da interface preenchido com 500 µL de uma mistura acetonitrila/água (40:60, v/v). Em seguida, a fibra foi introduzida e exposta ao solvente durante 3 min. A válvula foi então posicionada na posição “inject”, permanecendo apenas 4 segundos, e retornando a posição “load”, para

retirada da fibra. A fibra foi lavada com água por aproximadamente 1 minuto e seca antes da próxima extração.

ZAMBONIN *et al.* (2002), determinaram a presença da micotoxina ácido micofenólico em queijos. Foram realizados testes apenas no modo dinâmico de dessorção. As recuperações foram quantitativas, porém ocorreu alargamento nos picos cromatográficos. Sendo assim, as análises posteriores foram feitas com dessorção estática. As condições otimizadas permitiram uma recuperação de 87% de ácido micofenólico.

CHANG *et al.* (2003) usaram a associação SPME-HPLC para analisar aminas aromáticas carcinogênicas em amostras de água. O método mostrou-se eficiente, sendo a fibra PDMS-DVB a mais indicada para tal. Quanto ao efeito de *carryover*, um simples jato de fase móvel no canal de dessorção é suficiente para eliminar os interferentes da fibra. Herbicidas da classe das feniluréias foram analisados por SPME-HPLC-UV. Foram avaliadas as fibras CW-TPR, PDMS-DVB, PDMS e PA 85µm, sendo as duas primeiras as fibras com melhores resultados. Os parâmetros de extração e dessorção foram otimizados. O tempo necessário para extração foi avaliado até 60 min, sendo que não foi observado um equilíbrio para alguns herbicidas após este tempo, porém como a SPME não é um processo de extração exaustiva, menores tempos de extração podem ser usados, desde que uma sensibilidade suficiente seja conseguida e as condições experimentais sejam controladas. O modo de dessorção estático mostrou-se mais eficiente que o dinâmico para todos os analitos (LIN *et al.*, 2003).

MILLÁN *et al.* (2003) avaliaram a presença de 6 fungicidas organoclorados em amostras de vinho por SPME-HPLC-DAD. Foi usada uma fibra de PDMS-DVB para a extração dos analitos e os fatores que afetam a extração e dessorção foram otimizados. O efeito da matriz foi avaliado e como o etanol é o principal constituinte do vinho, foram realizados ensaios com amostras padrão contendo entre zero e 15% de etanol (concentração máxima encontrada nos vinhos). Observou-se uma diminuição na quantidade extraída dos analitos com o aumento da concentração de etanol, principalmente entre zero e 10%. Acima deste valor, a quantidade extraída

permaneceu praticamente constante. Este ensaio, quando comparado com amostras verdadeiras de vinho, mostrou que os outros constituintes do vinho não interferem na quantidade extraída dos analitos.

Triazinas (herbicidas altamente tóxicos e resistentes) foram determinados em amostras de água por SPME-HPLC-UV (HUANG *et al.*, 2004). Os autores avaliaram os principais parâmetros que influenciam a extração e dessorção dos analitos pela fibra, observando que um aumento da temperatura ocasiona um decréscimo na quantidade extraída, devido à diminuição da constante de distribuição dos analitos na solução. Na avaliação do tempo de dessorção, um fator importante a ser observado é a razão de dessorção do analito. Quando esta taxa é pequena, o aumento do tempo de dessorção aumenta a recuperação do analito. Para as triazinas estudadas não houve variação significativa da quantidade extraída no intervalo entre um e cinco minutos. Por fim, o modo de dessorção estático mostrou-se mais eficiente que o dinâmico. THEODORIDIS *et al.* (2004) analisaram cinco compostos farmacêuticos utilizando SPME-HPLC com dessorção *off-line*. O estudo demonstrou que várias extrações por alguns minutos aumentam a eficiência de extração pela fibra quando comparado com uma única pelo mesmo tempo.

A SPME-HPLC-DAD também foi utilizada para análise de nove aminas heterocíclicas aromáticas biologicamente ativas em amostras de extrato de carne. A técnica permitiu a detecção das aminas em níveis de $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (CÁRDENES *et al.*, 2004).

Ibuprofeno, uma droga antiinflamatória não esteroide, usada no tratamento de dor e inflamação em doenças reumáticas é produzida, com exceção de Áustria e Suíça, como um racemato. Contudo, sua ação antiinflamatória é associada principalmente com o (+)-(S)-enantiômero. O ibuprofeno sofre metabolismo estereosseletivo, resultando em altas concentrações do (+)-(S)-isômero no plasma e na urina. Além disso, o isômero (-)-(R)-ibuprofeno sofre biotransformação com inversão de configuração de seu centro quiral, originando no (+)-(S)-enantiômero. Sendo assim, métodos enantiosseletivos são necessários para análise de ibuprofeno em amostras biológicas, a fim de avaliar a contribuição desses processos

estereosseletivos. OLIVEIRA *et al.* (2005) determinaram os enantiômeros de ibuprofeno por SPME-HPLC-UV com imersão direta da fibra em amostras de urina e separação em coluna quiral, com dessorção *off-line*. A média de recuperação do SPME para os enantiômeros foi de aproximadamente 20%, com uma faixa linear de detecção entre 0,25-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

AULAKH *et al.* (2005) analisaram os pesticidas nabam, thiran e azametifós em amostras de água utilizando fibra PDMS. A dessorção estática apresentou melhores resultados de recuperação e o método permitiu a determinação dos pesticidas com baixos níveis de concentração (1-10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Kayali *et al.* (2006) determinaram a presença de dietilhexilftalatos em amostras de água utilizando uma fibra PDMS/DVB com detecção por HPLC-DAD, conseguindo limites de detecção da ordem de 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

O uso de SPME-HPLC para análise das mais variadas substâncias em amostras cada vez mais diversificadas tem se intensificado nos últimos anos. Rial-Otero e colaboradores (2006) analisaram a presença de pesticidas em amostras de mel, um problema de saúde pública, devido ao alto consumo deste produto em todo mundo. Prosen *et al.* (2007) determinaram a presença de poluentes ambientais (PCB's, inseticidas organoclorados, triazinas e herbicidas) em amostras de ácido húmico, solo e substâncias minerais.

Novas ferramentas estão melhorando o uso da SPME-HPLC. RODRIGUES *et al.* (2006), desenvolveram uma interface aquecida para utilização em SPME-HPLC. Como o aumento na temperatura reduz a viscosidade e aumenta o coeficiente de difusão, a taxa de transferência de massa entre o recobrimento e o solvente de dessorção aumenta. Esta elevada velocidade de transferência de massa diminui a largura da banda e aumenta a eficiência cromatográfica, além de prevenir *carryover*.

I.1.1. Recobrimentos sorventes para fibras de SPME baseados na tecnologia sol-gel.

Nas primeiras aplicações de SPME, as fibras eram produzidas em laboratório e se baseavam exclusivamente em recobrimentos de polímeros puros (polidimetilsiloxano, poliacrilato e poliimida). No presente, as fibras disponíveis comercialmente são produzidas com diferentes recobrimentos (tabela I.1). Entretanto, muitas destas fibras comerciais apresentam restrições com relação ao uso em temperaturas elevadas e seus recobrimentos não são estáveis à exposição direta a solventes orgânicos, o que é especialmente relevante na combinação SPME-HPLC.

Tabela I.1 – Fibras para SPME comercialmente disponíveis

Fase estacionária e espessura do filme	Abreviação	Aplicação geral (tipo de analito)
Polidimetilsiloxano (100 µm)	PDMS	Não polar, volátil
Polidimetilsiloxano (30 µm)	PDMS	Não polar, volátil e semi-volátil
Polidimetilsiloxano (7 µm)	PDMS	Não polar, semi-volátil e não volátil
Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (65 µm)	PDMS-DVB	Polar
Poliacrilato (85 µm)	PA	Polar, uso geral
Carboxen-polidimetilsiloxano (75 µm, 85 µm)	CAR- PDMS	Volátil, gasosos e análise de traços
Carbowax-divinilbenzeno (65 µm, 75 µm)	CW-DVB	Polar, volátil (limite de temperatura baixo)
Carbowax-templated resin (50 µm)	CW-TPR	Polar, HPLC
Divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano (50/30 µm)	DVB-CAR-PDMS	Faixa de polaridade larga (C ₃ à C ₂₀)

Uma alternativa interessante aos materiais comerciais podem ser recobrimentos produzidos por tecnologia sol-gel. A química sol-gel oferece uma rota relativamente simples para a síntese de novos materiais pela incorporação de compostos orgânicos em estruturas poliméricas inorgânicas, os quais podem ser

depositados como filmes sobre diversos tipos de superfícies, tais como fibras de sílica fundida para a produção do dispositivo de SPME. A rota sol-gel é baseada na hidrólise e simultânea condensação de alcóxidos metálicos, produzindo sois agregados de polímeros reticulados (no caso de precursores alcóxido-silanos). Compostos hidroxiorgânicos podem ser quimicamente ligados aos polissilicatos agregados, produzindo sílicas organicamente modificadas (ormosils). Se o processo é realizado em presença de sílica fundida ativada, ormosil é quimicamente ligado como um filme a superfície da sílica pela reação com os grupos hidroxila. As principais vantagens das reações sol-gel são a sua simplicidade e o uso de materiais superficiais relativamente baratos (SILVA e AUGUSTO, 2005).

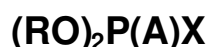
I.1.2. Pesticidas Organofosforados

Uma grande variedade de produtos químicos destinados a prevenir, destruir ou controlar pragas, diferindo entre si quanto ao modo de ação, absorção, metabolismo e toxicidade são ou foram usados como pesticidas. Dependendo da finalidade para a qual são empregados, são classificados como inseticidas, herbicidas, fungicidas, entre outros. Devido ao seu uso indiscriminado, inúmeros problemas ambientais têm surgido gerando sérios riscos à flora e a fauna. Por exemplo, a principal causa da poluição em lençóis freáticos nos países europeus são os produtos químicos usados na agricultura (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2005). Dessa forma, um número crescente de métodos analíticos têm sido desenvolvidos para detectar estes compostos e seus produtos de degradação, que muitas vezes são mais tóxicos que os pesticidas originais. Em geral, estes métodos exigem que se efetue previamente a extração e concentração dos analitos. Os métodos oficiais utilizam principalmente a Extração Líquido-Líquido (LLE) e Extração por Fase Sólida (SPE).

Outra classificação pode ser feita baseada na estrutura química e composição dos pesticidas. Os pesticidas organofosforados (OPP) constituem uma sub-classe importante, sendo usados no combate a diversos tipos de pragas na agricultura. Sua

utilização é menos danosa do que aquela dos pesticidas organoclorados, por serem mais facilmente degradados. A aplicação indiscriminada no campo tem ainda assim originado graves problemas no ambiente, como a contaminação dos mananciais usados no abastecimento de água potável das cidades. Embora estes pesticidas se degradem rapidamente em água, quase sempre permanecem resíduos e subprodutos em níveis potencialmente nocivos para o consumo humano (SILVA *et al.*, 1999).

Os pesticidas organofosforados apresentam fórmula geral:



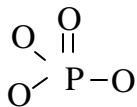
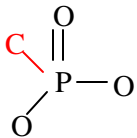
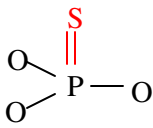
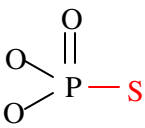
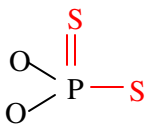
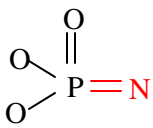
Onde: **R** = CH₃ ou CH₂CH₃

A = S ou O

X = H, Cl, F, etc

Dependendo do substituinte ligado ao fósforo, os OPP podem ter a seguinte classificação:

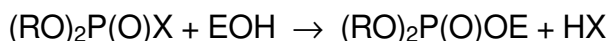
Tabela I.2 – Tipos de organofosforados.

 Fosfato	 fosfonato	 fosforotionato
 fosforotiolato	 fosforoditioato	 fosforoamidato

Os OPP apresentam uma alta toxicidade, com valores de DL₅₀ (Dose Letal 50, que representa a dose capaz de matar 50% dos animais testados) entre 10-50 mg.Kg⁻¹. Sua ação tóxica no organismo se processa pela inibição da enzima colinesterase com conseqüente acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas,

impedindo a transmissão de impulsos nervosos e gerando uma série de efeitos no organismo (convulsões, parada respiratória e coma). Esta inibição ocorre quando o organofosforado se liga ao grupo -OH de uma molécula de serina da enzima colinesterase. Este fragmento de serina envolvido é o sítio ativo da colinesterase, sendo essencial para sua atividade enzimática.

A reação envolvendo o organofosforado $(RO)_2P(O)X$, onde X é o grupo abandonador e a enzima colinesterase EOH é:



A reação acima ocorre independente da natureza do grupo abandonador (X).

A maioria dos OPP é considerada inibidor fraco da colinesterase quando testado “*in vitro*”. Porém, a inibição é forte “*in vivo*”, já que muitos organofosforados são considerados inibidores latentes, isto é, necessitam ser ativados “*in vivo*” para que manifestem sua atividade inibidora de colinesterase. Assim, estes OPP são considerados inibidores indiretos. A mais comum ativação é a metabolização de fosfotionatos ($P=S$) em fosfatos ($P=O$). Essa conversão muitas vezes é chamada de oxidação, mas o termo correto é desulfuração, uma vez que não envolve mudanças de valência. Compostos que já possuem o grupo $P=O$, como o diclorvos, não necessitam de ativação e são considerados inibidores diretos. Existem outros tipos de ativação, como a hidroxilação de um grupo metilamina, porém, a mais importante ativação ocorre com os tioéteres, que são ativados por oxidação do enxofre do tioéter para o sulfóxido e também para a sulfona, como no caso do forato.

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta, principalmente, quando a água é usada para o consumo humano. A Comunidade Econômica Européia estabeleceu em $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a concentração máxima admissível de qualquer pesticida em águas destinadas para consumo humano e em $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o total de resíduos, sem deixar claro se deve-se, ou não, considerar também produtos de transformação (HATRÍK e TEKEL, 1996; BARCELÓ, 1993). Este limite tem sido motivo de questionamento uma vez que não considera a toxicidade de cada

produto. Por outro lado, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e a Organização Mundial da Saúde estabelecem níveis máximos para pesticidas individuais em água destinada ao consumo humano, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos (OMS, 1995). No Brasil, a Resolução nº 357/CONAMA, de 17 de março de 2005, estabelece limites máximos de contaminantes em águas dependendo de seu destino; sendo que, dentre estes, estão alguns pesticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos (CONAMA, 2005).

I.1.3. Validação de Método Analítico

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de comparação, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra, ele deve passar por uma série de avaliações denominado validação (RIBANI *et al.*, 2004).

Estes estudos laboratoriais têm o objetivo de garantir a exatidão, seletividade, reprodutibilidade e robustez de um método dentro de uma faixa específica na qual o analito será analisado. Os principais parâmetros avaliados são exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, sensibilidade e faixa linear.

I.1.3.1. Exatidão

A exatidão mede a proximidade entre o valor obtido na análise e o valor esperado presente na amostra. Pode ser determinada: **a)** através da análise de materiais certificados; **b)** fazendo-se a comparação entre dois métodos, sendo um deles o método oficial ou de referência, e **c)** através de testes de recuperação, onde quantidades conhecidas do analito são adicionadas à matriz amostra (processo

conhecido como fortificação). Neste último caso, a **recuperação**, expressa em porcentagem, é definida como a relação entre a concentração determinada para uma amostra fortificada e a concentração adicionada na fortificação, expressa pela equação:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\text{concentração encontrada na amostra fortificada } (\mu\text{g g}^{-1})}{\text{concentração adicionada na amostra } (\mu\text{g g}^{-1})} \times 100$$

Para análise de resíduos de pesticidas, recuperações entre 80% e 120% são consideradas aceitáveis (USP 29, 2006).

I.1.3.2. Precisão

A precisão representa o grau de dispersão entre resultados obtidos para uma mesma amostra analisada repetidas vezes em condições idênticas. Ela pode ser expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (s_R).

$$s_R = 100 \times \frac{s}{X}$$

onde: s_R = estimativa do desvio padrão relativo

s = desvio padrão

X = média dos valores

Os valores aceitáveis para a precisão podem ser estimados em função da concentração do analito na matriz, de acordo com a equação de Horwitz:

$$s_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

onde: C – concentração

s_R – estimativa do desvio padrão relativo

Por exemplo, para níveis de concentração na faixa de $1000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, o valor máximo para S_R é 16% (European Commission Decision 2002/657/EC, 2002).

I.1.3.3. Seletividade

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir com sua determinação em uma amostra complexa, como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, e outros compostos de propriedades similares eventualmente presentes. A seletividade garante que a resposta (em análises cromatográficas, o pico atribuído ao analito) seja originada exclusivamente pelo composto de interesse. Quando um procedimento cromatográfico é utilizado, deve-se apresentar cromatogramas representativos a fim de demonstrar o grau de seletividade. Testes de pureza de pico (quando do uso de detetores espectrométricos) podem ser úteis para mostrar que o pico cromatográfico do analito não contém mais de um composto co-eluído.

I.1.3.4. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser percebida, mas não necessariamente quantificada, com certo nível de confiança, utilizando um determinado método analítico. A forma mais conveniente para o cálculo do LD é através da relação sinal/ruído (S/R). Este método pode ser aplicado somente em procedimentos onde o ruído da linha de base é mensurável e é feito pela comparação entre os sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do composto de interesse com um branco destas amostras. O LD é definido como a concentração de analito a partir da qual $S/R \geq 3$, sendo o resultado expresso como a concentração do analito na amostra.

O limite de quantificação (LQ) de um método representa a menor concentração de um analito que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis. Como o LD, pode ser avaliado através da relação sinal/ruído, sendo usualmente considerado como a concentração a partir da qual $S/R \geq 10$.

I.1.3.5. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em exame, dentro de uma determinada faixa de concentração. A correlação entre o sinal medido e a concentração (ou massa) da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maioria dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração (ou massa) da espécie deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para amostras com concentrações (ou massas) conhecidas dessa espécie. Idealmente, esta relação pode ser expressa por uma reta chamada curva analítica. Matematicamente, a estimativa dos coeficientes descritivos dessas retas a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser feita usando o método conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes angular **a** e linear **b**, também é possível definir o coeficiente de correlação **r**. Este parâmetro permite estimar a qualidade da curva obtida. Quanto mais próximo da unidade, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (ANVISA, 2003).

I.1.3.6. Sensibilidade

A sensibilidade depende da variação da resposta em função da variação da concentração do analito. Pode ser expressa pelo coeficiente angular das retas obtidas por regressão linear quando da construção das curvas analíticas. Quanto maior a sensibilidade, maior o incremento no sinal com pequenos incrementos na concentração e maior a capacidade do método discernir amostras com concentrações próximas, mas diferentes.

I.1.3.7. Faixa linear

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de concentração (ou massa) da espécie analisada. Este intervalo no qual se pode construir uma curva analítica linear é chamada de *faixa linear dinâmica*, que é a faixa de concentração onde a sensibilidade do método pode ser mantida constante.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Desenvolvimento de uma interface de dessorção para SPME-HPLC alternativa a interface comercial.

Projeto e construção de uma interface de dessorção para SPME-HPLC de baixo custo utilizando componentes de injetores de cromatógrafos a gás. Avaliação dos parâmetros para utilização desta interface.

I.2.2. Avaliação de fibras sol-gel para uso em SPME-HPLC

Avaliação de fibras sol-gel com recobrimento baseado em ormosil modificado com polietilenoglicol (Carbowax 20M) para análises de pesticidas organofosforados por SPME-HPLC.

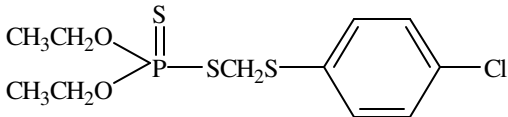
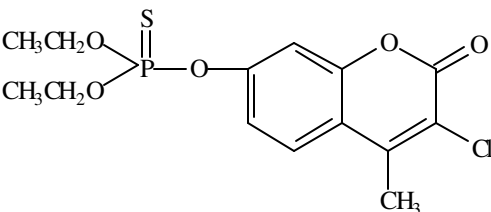
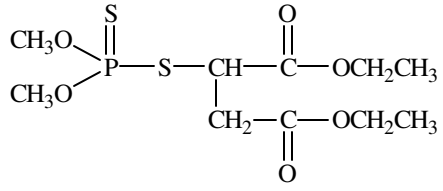
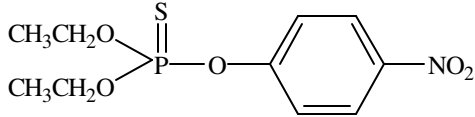
I.2.3. Desenvolvimento de metodologia para análise de pesticidas organofosforados em amostras aquosas e infusões vegetais por SPME-HPLC.

Estabelecidas as condições de utilização da interface e a aplicabilidade da fibra sol-gel, desenvolver uma metodologia de análise de OPP em água e infusões vegetais. Avaliar os principais parâmetros de validação do método: seletividade, sensibilidade, linearidade, faixa linear, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação.

I.3. MATERIAIS

I.3.1. Padrões. Foram usados padrões analíticos de pesticidas organofosforados da Chem Service (West Chester, PA, EUA): metil paration 99,5%, malation 99,5%, coumafos 98% e carbofenotion 97,6% de pureza. A estrutura química destes compostos pode ser visualizada na tabela I.3.

Tabela I.3 – Estruturas químicas, sinonímia e massas molares dos pesticidas organofosforados.

Nome comum	Sinonímia	Estrutura	M
Carbofenotion	Acarithion Hexathion Trithion		342
Coumafos	Coral meldane Azunthol Baymix		362
Malation	Carbofos Cythion Fosfotion Sumitox		330
Metil paration	Azofos Metaphos Nitrox		263

I.3.2. Reagentes. Acetonitrila grau HPLC da Tedia (Fairfield, OH, EUA); água purificada por sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA); cloreto de sódio P.A. Labsynth (Diadema, SP, Brasil).

I.3.3. Outros Materiais. Foram utilizadas fibras recobertas com as fases poliacrilato (85 μm , Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) e Carbowax 20M (produzida pelo processo sol-gel, de acordo com SILVA e AUGUSTO, 2005), conectadas a um aplicador manual para SPME modelo 57330-U (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). Para as extrações, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro de 25 mL lacrados com septos de teflon/silicone e anéis de alumínio (Pierce, Rockford, IL - EUA) contendo barras para agitação magnética.

I.3.4. Interface. Construída na oficina de mecânica do IQ-Unicamp a partir de tarugo de aço sextavado, utilizando septo 11 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) e retentor de septo (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA).

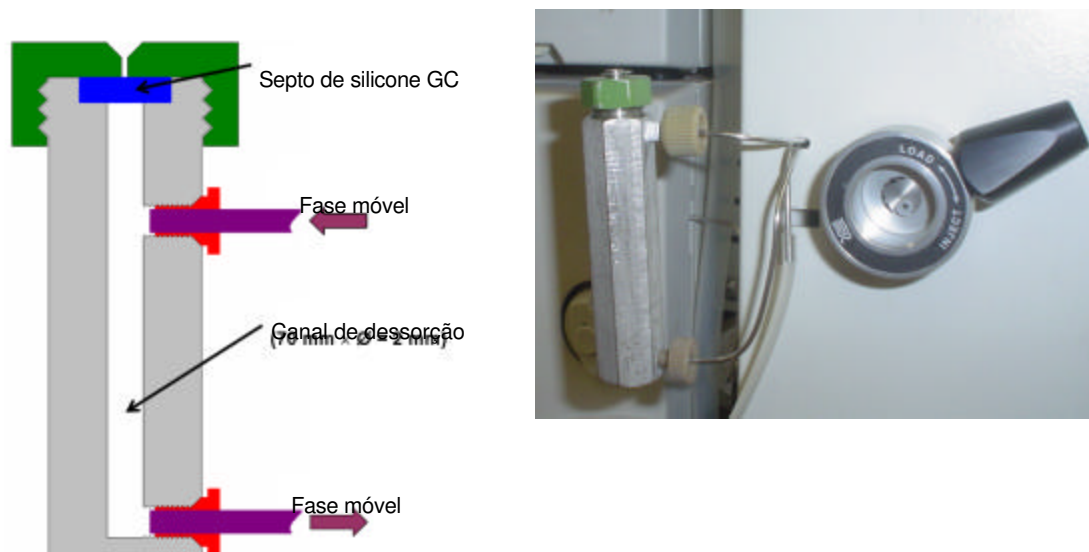


Figura I.4 - Representação esquemática e foto da interface de dessorção construída

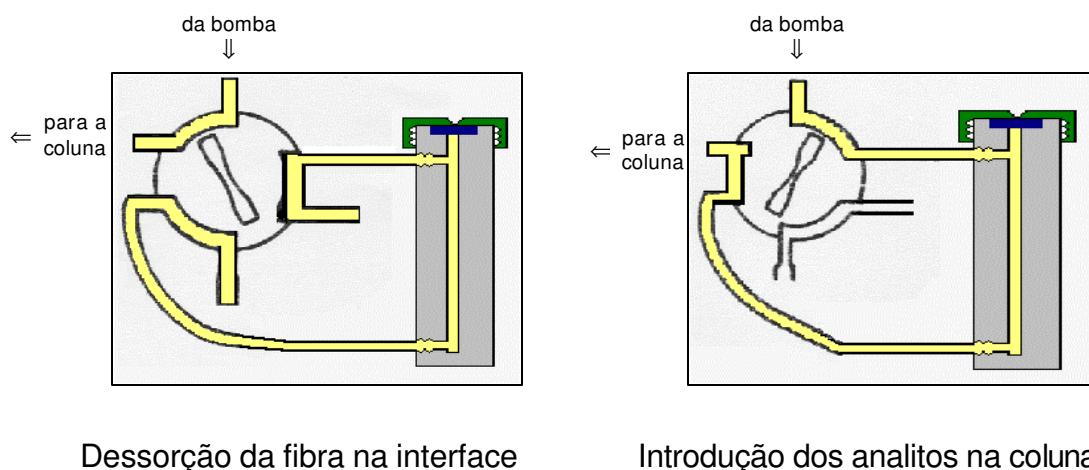


Figura I.5 - Representação esquemática do funcionamento da interface de dessorção construída.

I.3.5. Cromatógrafo. As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido com detetor espectrofotométrico de arranjo de diodos (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão), constituído pelos módulos: bomba quaternária LC-10AT, detetor DAD SPD-M10A, interface SCL-10A, forno para coluna CTO 10AS e software CLASS-VP (versão 6.13). As separações foram realizadas em uma coluna Nova-Pak C18 (150 x 3,9 mm; 4 μ m; Waters Corporation, Milford, MA, EUA); temperatura do forno para colunas de 30 °C; faixa de leitura no DAD – 190-500 nm ($\lambda_{\text{análise}}$ – 215 nm). A programação de vazão e gradiente de fase móvel água/acetonitrila utilizada é descrita abaixo:

Tempo (min)	Vazão FM (mL.min ⁻¹)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	0,1	40	60
3	0,1	40	60
4	0,6	40	60
10	0,6	40	60
15	0,6	20	80
25	0,6	20	80
28	0,6	40	60
40	0,6	40	60
41	0,1	40	60

I.3.6. Material vegetal. Devido ao crescente uso de plantas como alternativa a medicina tradicional, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias que atestem a qualidade do material a ser utilizado para esta finalidade. De *Artemisia annua* (planta originária da China) é extraída uma substância usada como antimalárico, doença que afeta anualmente 500.000 pessoas no Brasil. Amostra de *Artemisia annua* foi obtida na Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP para produção de infusão utilizada neste ensaio.

I.3.7. Preparo das soluções padrão. As soluções estoque dos padrões analíticos de OPP foram preparadas em mistura $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (40:60, v/v) e armazenadas em freezer ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) até uso.

I.3.8. Preparo da fibra sol-gel Carbowax 20M. Pedacos de fibra ótica de sílica de 2 cm foram mergulhadas em H_2SO_4 concentrado por 3 h para remoção de camada protetora. Em seguida foram lavadas com água destilada e imersas em $\text{NaOH } 1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por 1 h, para ativação da superfície. O excesso de base foi removido pela exposição da fibra em solução de $\text{HCl } 0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por 30 minutos. A fibra ativada foi lavada com água destilada, seca a $120\text{ }^\circ\text{C}$ e guardada em dessecador por no máximo 12 horas. Um sol foi preparado pela mistura de 400 μL de metiltrimetoxissilano (MTMS), 800 mg de Carbowax 20M e 0,5 mL de solução aquosa 95% de ácido trifluoroacético (catalisador), em um tubo de vidro silanizado. Uma porção de 1,0 cm da fibra de vidro ativada foi imersa nesta solução por um período de 1 h. Em seguida a fibra foi lavada com água destilada e metanol e seca a $110\text{ }^\circ\text{C}$ durante a noite. O processo foi repetido durante cinco dias consecutivos, sendo a solução preparada diariamente.

I.3.9. Preparo da infusão. Uma infusão de *Artemisia annua* foi preparada a partir de 20 g de planta seca e moída em 1 litro de água fervente, com agitação magnética e abafamento por 1 h (CHERNOVIZ, 1996). Depois de atingir a temperatura ambiente, o infuso foi filtrado em funil de placa sinterizada.

I.3.10. Softwares.

- ✓ Programa Statistica (Statsoft Inc., Tulsa – OK, EUA) v. 5.5.
- ✓ Programa GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc) v. 2.01

I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.4.1. OTIMIZAÇÃO

I.4.1.1. Estabelecimento das condições cromatográficas para separação dos OPP.

Usando soluções contendo entre 350 e 1600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OPP, foram estabelecidas as melhores condições de separação dos mesmos, que foram definidas como:

- ✓ Coluna – Nova-Pak C18 (150 x 3,9 mm, 4 μm)
- ✓ Eluente – gradiente água/acetonitrila (item I.3.5.)
- ✓ Temperatura do forno para coluna – 30 °C
- ✓ Vazão da fase móvel – programada de 0,1 a 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (item I.3.5.)
- ✓ Detecção (comprimento de onda) – 215 nm
- ✓ Volume injetado – 20 μL

A figura I.6 mostra um cromatograma típico obtido nas condições otimizadas.

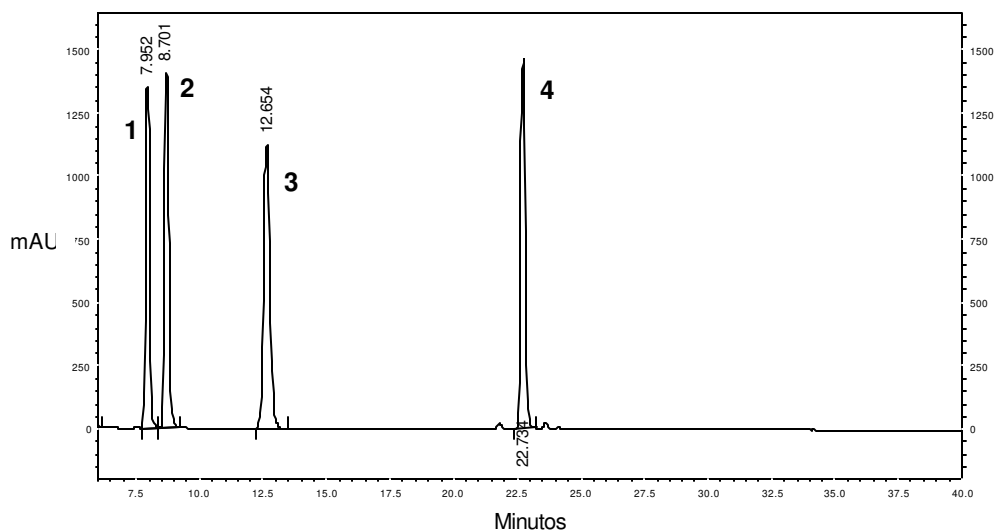


Figura I.6 – Cromatograma da mistura teste dos OPP (1- Metil paration, 2- Malation, 3- Coumafós, 4- Carbófenotio). Condições cromatográficas descritas no item I.4.1.1.

I.4.1.2. Avaliação da interface de dessorção.

Foram realizados ensaios para verificar quais seriam as condições de utilização da interface construída. Após vários testes observou-se que a vazão máxima suportada pela mesma é de $0,15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o que confere, dependendo da fase móvel usada, uma pressão de aproximadamente 280 psi. Acima destes valores ocorre vazamento de FM pelo septo de silicone (figura I.4). Informações obtidas da literatura indicam que a interface comercial também opera com estes valores, o que demonstra a viabilidade de utilização de nossa interface.

I.4.1.3. Seleção da fibra sol-gel.

Inicialmente foram realizados ensaios utilizando-se uma fibra de poliacrilato (PA, 85 μm) para extração dos OPP. Porém esta fibra apresentou tempo de vida útil limitado; com menos de 40 ciclos de extração/dessorção a fibra perdeu a capacidade de extração. A fibra Carbowax 20M ormosil produzida em nosso laboratório mostrou maior durabilidade, sendo utilizada em mais de 100 ciclos. Um dos motivos para este desempenho deve-se ao filme ser quimicamente ligado à superfície da fibra de sílica fundida, o que confere maior estabilidade a mesma. Dessa forma, esta fibra foi utilizada para todos os desenvolvimentos seguintes.

I.4.1.4. Otimização das condições operacionais para aplicação de SPME na análise de pesticidas organofosforados.

Através de ensaios conduzidos de acordo com a sistemática de planejamento experimental do tipo composto central 2^3 (NETO *et al.*, 1995), foi realizada a otimização dos principais parâmetros operacionais para extrações por SPME de soluções aquosas de OPP. As variáveis estudadas foram o tempo de exposição da fibra na solução (t_{exp}), a temperatura de extração (T) e a força iônica da solução-

amostra (**FI**) expressa pela concentração de NaCl no meio. A tabela I.4 mostra os valores adotados para as variáveis estudadas em cada experimento.

Para cada uma das extrações necessárias, 20 μL da solução estoque de OPP e 20 mL de solução aquosa foram adicionados em um frasco de vidro de 25 mL, resultando em concentrações de 369 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de metil paration, 1433 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de malation, 323 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de coumafós e 52,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbofenotion, que foi lacrado com septo de Teflon/silicone e anel de alumínio. O frasco foi introduzido em um banho termostaticado a temperatura **T**. A fibra de SPME foi então imersa na solução por t_{exp} min, sob agitação magnética constante. A seguir, a fibra foi retirada do frasco e imediatamente introduzida na interface adaptada ao injetor Rheodyne[®] do cromatógrafo para dessorção dos analitos extraídos.

Os dados foram processados pelo programa Statistica (Statsoft Inc., Tulsa – OK, EUA) v. 5.5.

Tabela I.4 – Condições utilizadas para as extrações previstas pelo planejamento experimental do tipo composto central 2^3 com triplicata no ponto central.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Força iônica ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	20,0	30,0	10,0
2	20,0	30,0	40,0
3	20,0	60,0	10,0
4	20,0	60,0	40,0
5	60,0	30,0	10,0
6	60,0	30,0	40,0
7	60,0	60,0	10,0
8	60,0	60,0	40,0
9	6,4	45,0	25,0
10	73,6	45,0	25,0
11	40,0	19,8	25,0
12	40,0	70,2	25,0
13	40,0	45,0	0,0
14	40,0	45,0	50,2
15	40,0	45,0	25,0
16	40,0	45,0	25,0
17	40,0	45,0	25,0

A tabela I.5 mostra os resultados obtidos para os ensaios efetuados. As tabelas I.6 a I.9 mostram os coeficientes de ajuste e ANOVA para as superfícies de resposta quadráticas ajustadas aos dados. As figuras I.7.a I.10 representam estas superfícies.

Tabela I.5 – Respostas em área dos OPP, obtidas no planejamento experimental tipo composto central 2^3 .

Ensaio	Metil paration	Malation	Coumafos	Carbofenotion
1	17255	12036	92469	206819
2	20000	20022	122589	100860
3	17262	15863	113517	196811
4	17031	19432	139972	173053
5	19353	12366	115210	205524
6	20101	15933	151961	230618
7	12018	12547	116384	367382
8	12653	19274	132589	330688
9	14764	12813	82189	102967
10	11091	12848	124395	346752
11	20506	14088	80463	235304
12	18359	19369	101410	377872
13	11799	13341	119091	222380
14	14311	19418	171551	190556
15	22549	18294	139402	236601
16	22698	16266	123871	298819
17	21395	16267	128012	280276
Conc. ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	410	1593	359	525
μg adicionado	8,20	31,86	7,18	10,5

Tabela I.6 – Resultados ANOVA para o Metil paration

METIL PARATION	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.}
Regressão	211143	9	23460,33	6,14	3,69
Resíduo	26761	7	3823		
Falta de ajuste	25744	5	5148,8	10,13	19,30
Erro Puro	1017	2	508,5		
Total	237904	16			

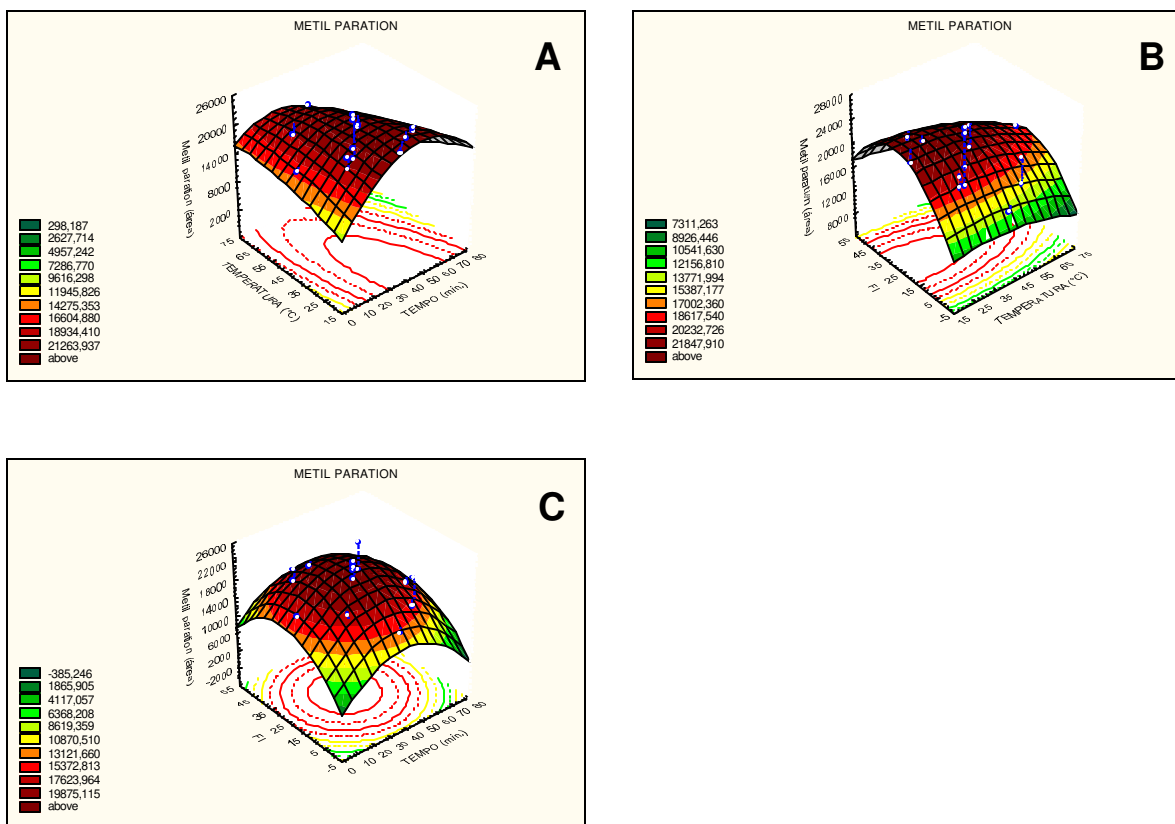


Figura I.7 – Superfícies de resposta quadrática para o Metil paration (**A**: $T \times t_{exp}$; **B**: $FI \times T$; **C**: $FI \times t_{exp}$).

Tabela I.7 – Resultados ANOVA para o Malation

MALATION	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.}
Regressão	119683	9	13298,11	4,92	3,69
Resíduo	18916	7	2702,286		
Falta de ajuste	16175	5	3235	2,36	19,30
Erro Puro	2741	2	1370,5		
Total	138599	16			

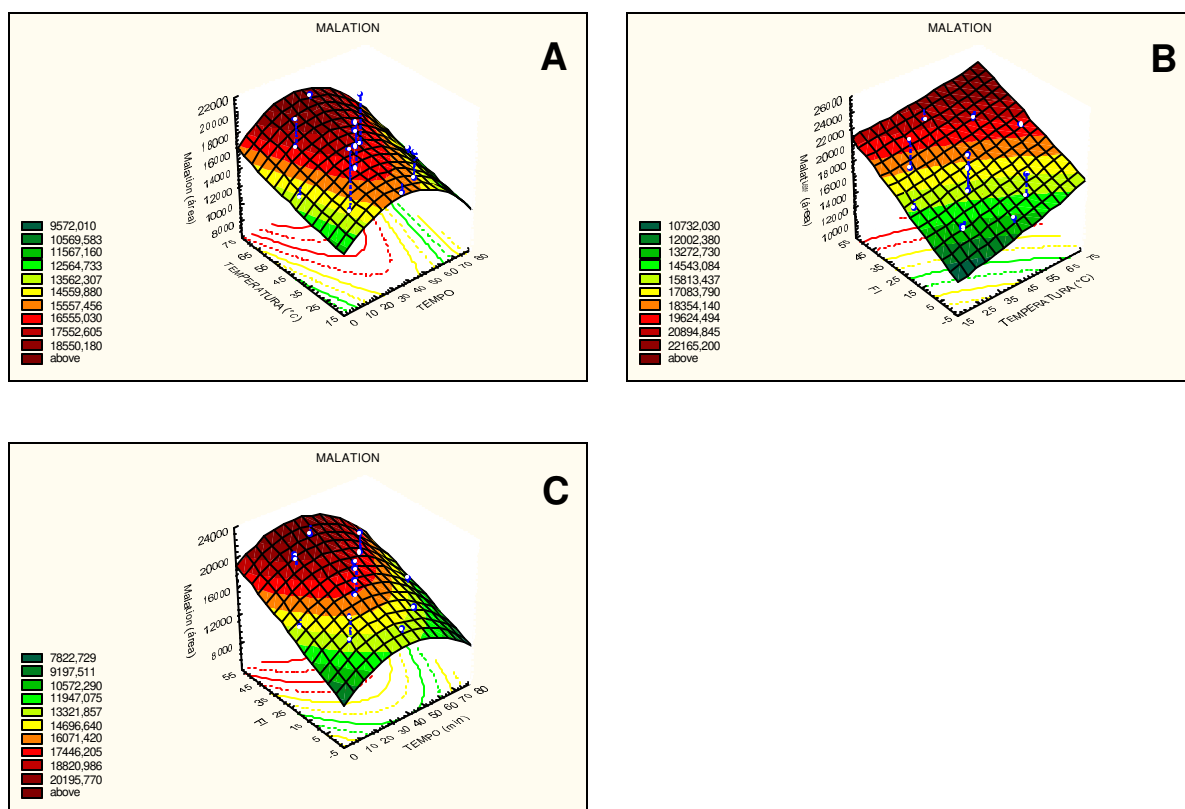


Figura I.8 – Superfícies de resposta quadrática para o Malation (A: T x t_{exp} ; B: FI x T; C: FI x t_{exp}).

Tabela I.8 – Resultados ANOVA para o Coumafós

COUMAFOS	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.}
Regressão	813117	9	90346,33	8,45	3,69
Resíduo	74874	7	10696,29		
Falta de ajuste	61938	5	12387,6	1,92	19,30
Erro Puro	12936	2	6468		
Total	887991	16			

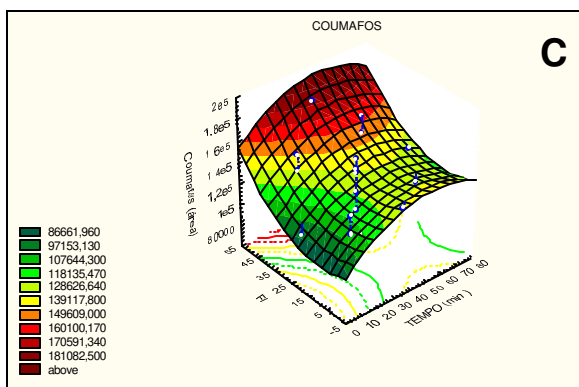
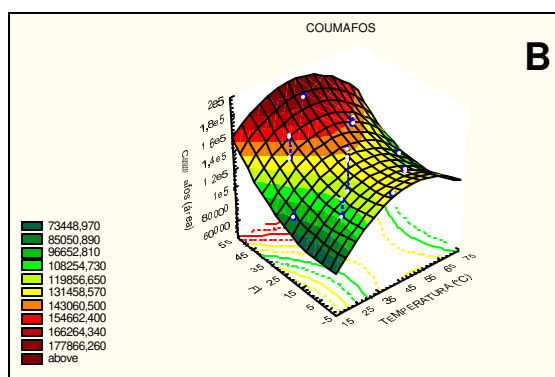
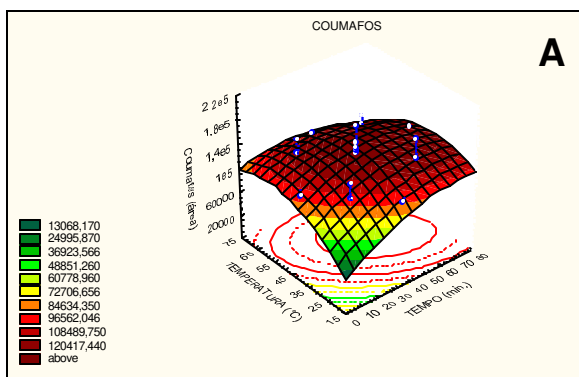


Figura I.9 – Superfícies de resposta quadrática para o Coumafós (A: T x t_{exp} ; B: FI x T; C: FI x t_{exp}).

Tabela I.9 – Resultados ANOVA para o Carbofenotion

CARBOFENOTION	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.}
Regressão	102881	9	11431,22	11,99	3,69
Resíduo	6676	7	953,7143		
Falta de ajuste	4636	5	927,2	0,91	19,30
Erro Puro	2040	2	1020		
Total	109557	16			

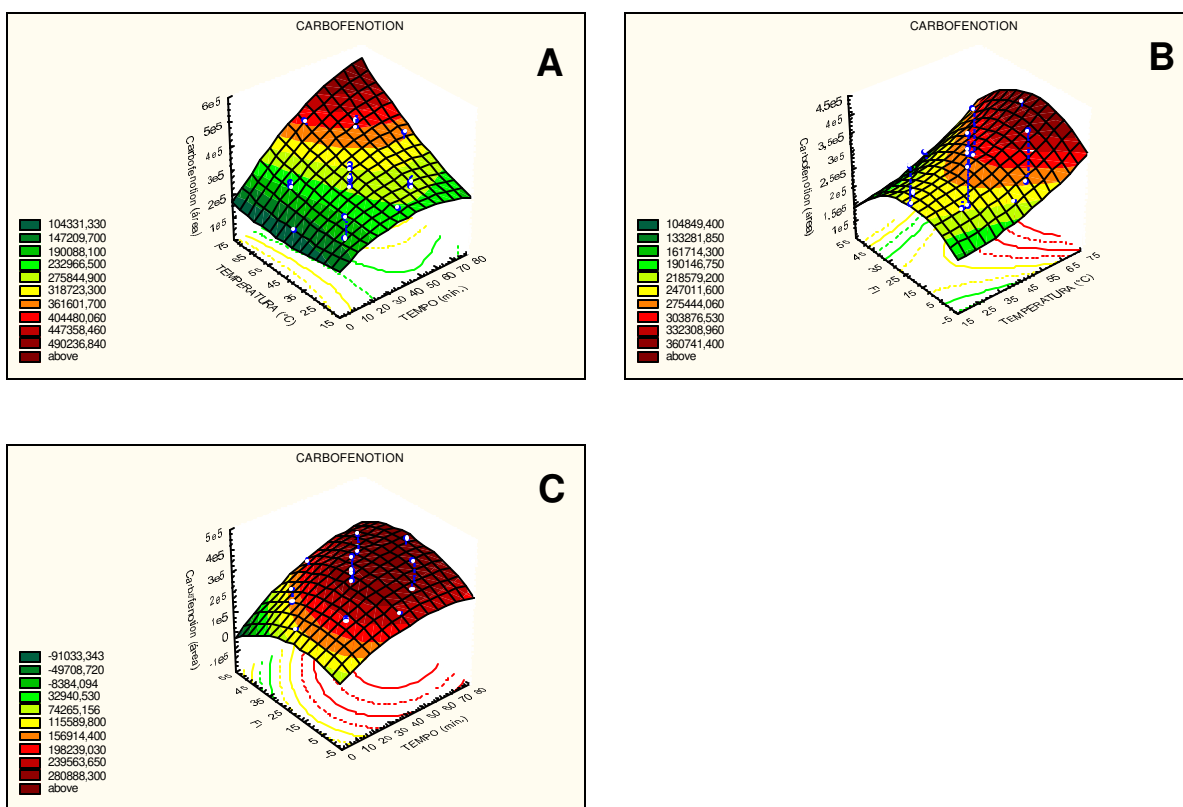


Figura I.10 – Superfícies de resposta quadrática para o Carbofenotion (A: T x t_{exp}; B: FI x T; C: FI x t_{exp}).

Avaliando-se os resultados das tabelas de ANOVA para os quatro OPP estudados observa-se que não há falta de ajuste do modelo, pois:

$$F_{\text{calc.}} (\text{MQ}_{\text{ falta de ajuste}} / \text{MQ}_{\text{ erro puro}}) < F_{\text{tab.}}$$

Como a amostra é complexa não foi possível encontrar valores otimizados para as variáveis estudadas para todos os OPP. Sendo assim, foram feitas as seguintes considerações:

Tempo de exposição – como a SPME não é um processo de extração exaustivo, mas sim um equilíbrio entre a concentração do analito na solução e no recobrimento da fibra, períodos maiores de exposição da fibra colaboram para que este equilíbrio seja alcançado de forma mais adequada.

Temperatura da solução – como a adsorção é geralmente um processo exotérmico, um aumento na temperatura da solução causa um decréscimo na quantidade extraída dos analitos, pois ocorre diminuição na constante de distribuição dos mesmos na solução.

Força iônica – concentrações maiores de NaCl na solução favorecem o efeito de “*salting out*”, o que facilita a adsorção dos analitos pela fibra. Esta variável deve ser analisada com cautela, pois grandes concentrações de NaCl poderiam favorecer a transferência dos analitos da fase líquida para a fase de *headspace* do frasco, devido ao aumento da pressão de vapor dos OPP.

Após estas observações e pela análise das superfícies de resposta geradas, decidiu-se adotar o tempo de exposição da fibra em 60 min e temperatura de 30 °C em uma solução contendo 40 g·L⁻¹ de NaCl (força iônica do meio).

I.4.1.5. Estudo da dessorção dos analitos na interface SPME-HPLC

Foram estudados o modo de dessorção (*on-line* estático ou dinâmico), a natureza do solvente de dessorção e o tempo de dessorção dos analitos.

a) Modo de dessorção

Para o modo dinâmico a fibra foi introduzida no canal de dessorção com o injetor do cromatógrafo na posição “load”. Este foi imediatamente movimentado para a posição “inject”, pressurizando o canal e iniciando o fluxo de fase móvel por ele, de modo que os analitos fossem dessorvidos. A pressão no canal de dessorção foi de aproximadamente 200 psi (vazão de FM - 0,1 mL·min⁻¹) porém, nestas condições ocorreu vazamento de FM através do tubo capilar de aço do dispositivo de SPME. As análises não foram reprodutíveis e os analitos apresentaram alargamento de picos. Assim, o modo dinâmico foi desconsiderado para os ensaios restantes.

Para o modo estático a fibra foi introduzida no canal de dessorção com o injetor na posição “load”, e exposta a FM estagnada por 5 min. Em seguida a fibra foi recolhida e retirada do canal de dessorção e o injetor movimentado para a posição “inject” por 3 min para a transferência dos analitos dessorvidos para a coluna cromatográfica. Finalmente, retornou-se o injetor para a posição “load”. Como os resultados foram satisfatórios, devido a melhor repetibilidade dos resultados e sem apresentar vazamento de FM, optou-se pelo modo de dessorção estático para realização do trabalho.

Observou-se também que no modo estático a fibra devia ser novamente introduzida no canal de dessorção e lavada com 500 µL de fase móvel para evitar o efeito de memória entre as análises.

b) Solvente de extração - Foram realizados ensaios avaliando os solventes orgânicos de dessorção: metanol, acetonitrila e a uma mistura água/acetonitrila (40:60, v/v), similar a FM. Os melhores resultados foram obtidos quando do uso da mistura água/acetonitrila. Isto pode ser verificado pela figura I.11.

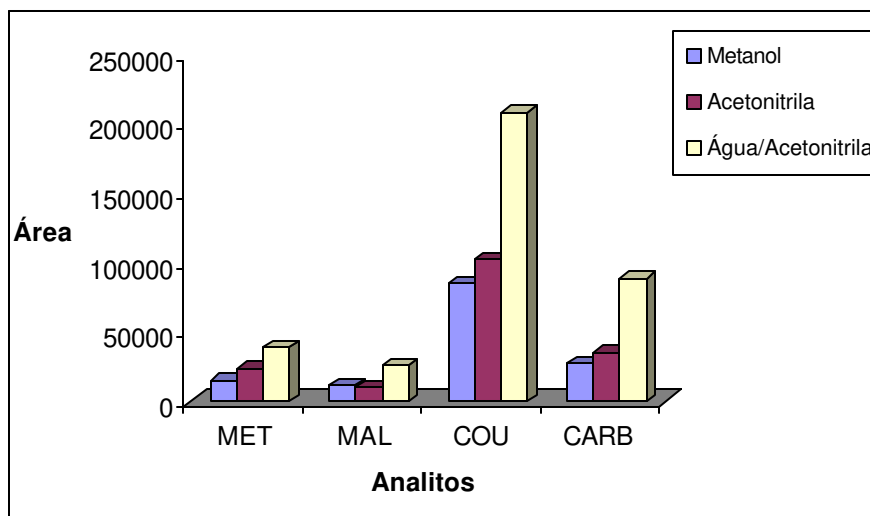


Figura I.11 – Quantidade extraída de cada OPP em função dos solventes usados.

c) Tempo de dessorção – Ensaios com tempos de exposição da fibra ao solvente no canal de dessorção, variando entre 0,5 min e 30 min, foram realizados para se verificar qual o tempo necessário para a dessorção dos analitos da fibra. Os resultados são apresentados nas figuras I.12A a I.12D. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

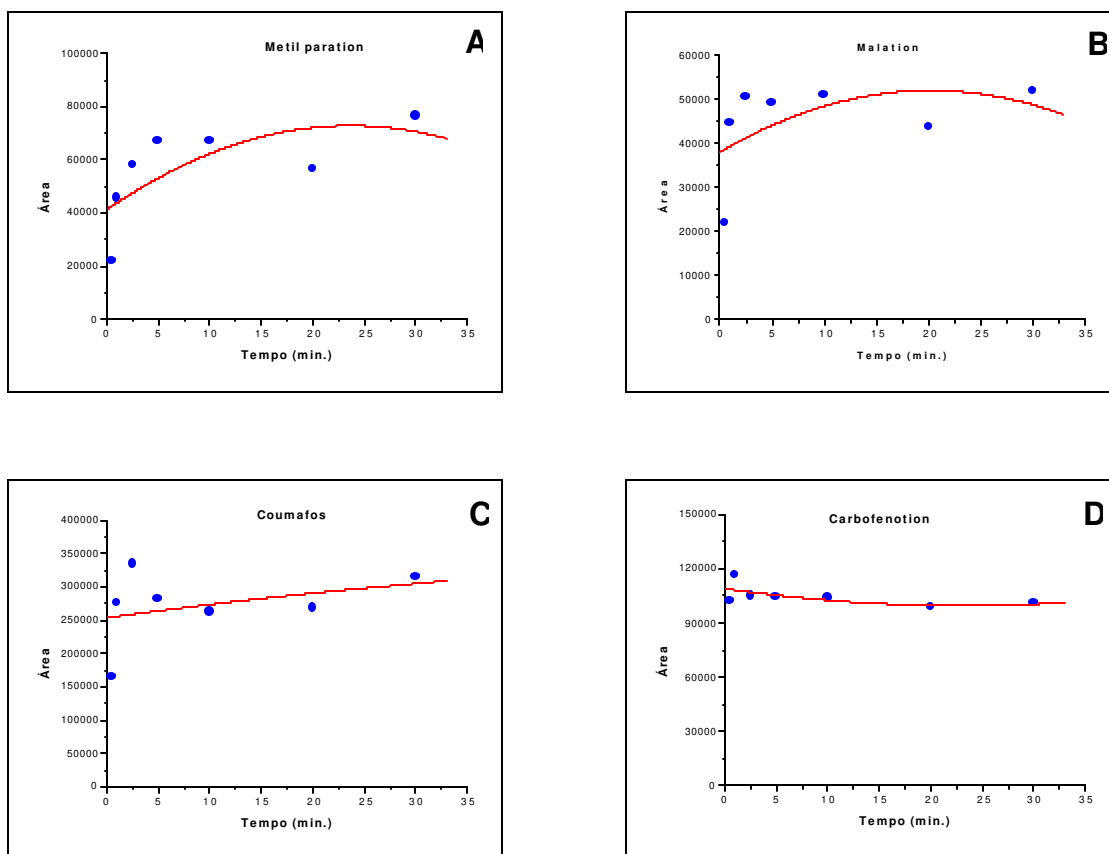


Figura I.12 – Variação da área do pico de Metil paration (A), Malation (B), Coumafos (C) e Carbofenotion (D) com o tempo de dessorção.

Pode-se verificar que para os analitos metil paration, malation e coumafos o equilíbrio foi atingido com 5 min de exposição; as áreas dos picos permanecem aproximadamente constantes. Para o carbofenotion foi necessário apenas 0,5 min. Este tempo de dessorção reduzido pode ser explicado pela espessura do filme de recobrimento da fibra; filmes mais finos favorecem uma dessorção mais rápida. Dessa forma os demais ensaios foram conduzidos com 5 min de exposição da fibra.

I.4.2. VALIDAÇÃO

I.4.2.1. Estudo da Linearidade

Para a realização deste estudo, foi preparada uma solução estoque dos padrões de OPP em H₂O/CH₃CN (40:60, v/v) nas seguintes concentrações: metil paration (MET) 369 µg·mL⁻¹, malation (MAL) 1433,7 µg·mL⁻¹, coumafos (COU) 323,1 µg·mL⁻¹ e carbofenotion (CARB) 52,5 µg·mL⁻¹. A partir desta solução foram preparadas as demais soluções conforme esquema abaixo:

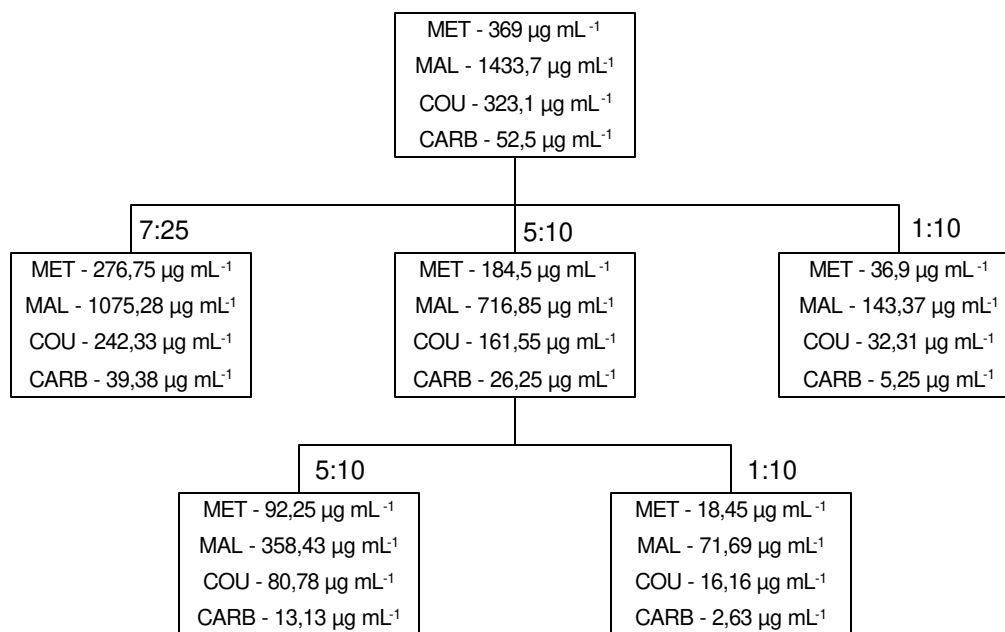


Figura I.13 – Esquema de diluição das soluções padrão dos OPP para os testes de validação.

Para cada uma das soluções padrão foram realizados ensaios em triplicata adicionando-se 20 µL de cada solução padrão a um frasco contendo 20 mL de solução de NaCl 40 g·L⁻¹. As concentrações de cada padrão de OPP estão descritas na tabela I.10.

Tabela I.10 – Concentração ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) dos OPP

Analito	Concentração ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
MET	18,45	36,90	92,25	184,50	276,75	369,00
MAL	71,69	143,37	358,43	716,85	1075,28	1433,70
COU	16,16	32,31	80,78	161,55	242,33	323,10
CARB	2,63	5,25	13,13	26,25	39,38	52,50

Os dados obtidos foram processados pelo programa GraphPad PRISM (v. 2.01) e são apresentados a seguir.

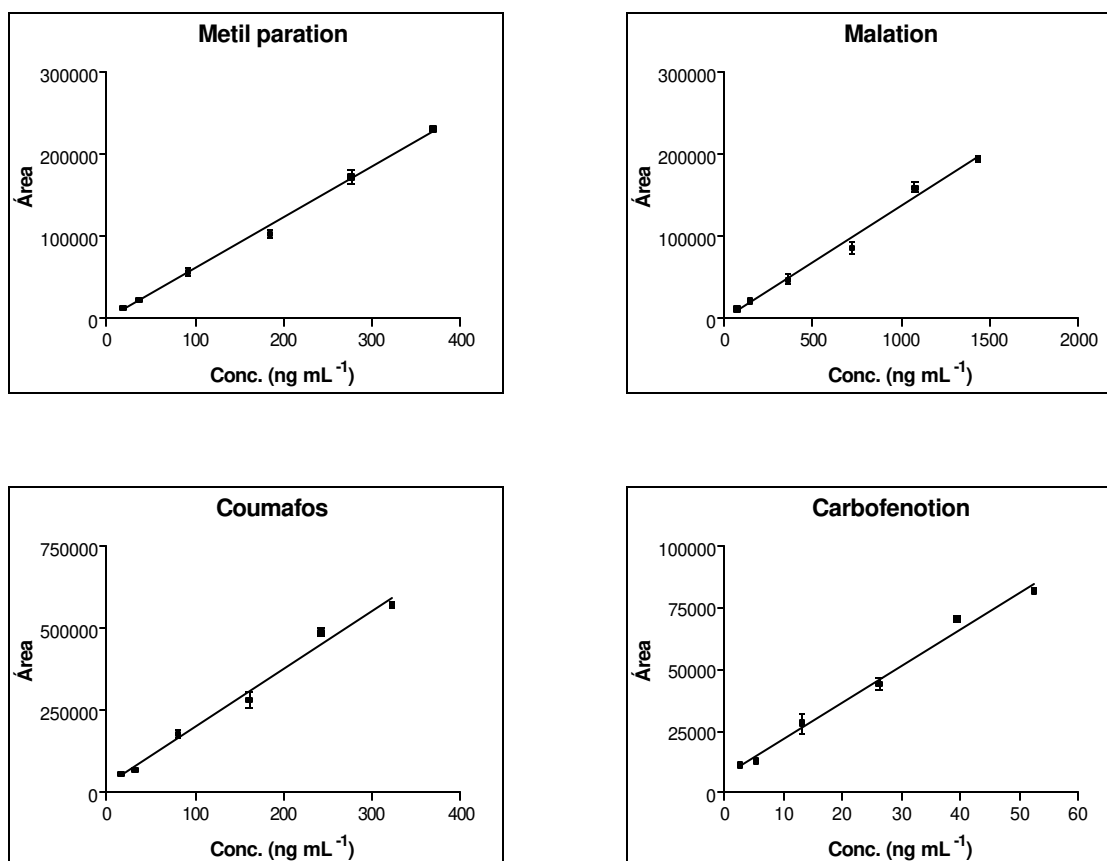


Figura I.14 – Curvas analíticas do estudo de linearidade para Metil paration, Malation, Coumafós e Carbofenotio.

A tabela I.11 apresenta as equações obtidas para os OPP, seus respectivos coeficientes de correlação e informação sobre os resíduos das curvas.

Tabela I.11 – Equações da reta, coeficientes de correlação e resíduos das curvas.

Analito	Equação da reta	Coeficiente de correlação (r)	Resíduos	
			Pontos acima da reta	Pontos abaixo da reta
MET	$Y = 621,6 \pm 16,1 X - 913,9 \pm 3332,0$	0,9947	11	7
MAL	$Y = 137,5 \pm 4,9 X + 104,1 \pm 3996,0$	0,9897	13	5
COU	$Y = 1749,0 \pm 64,2 X + 25720,0 \pm 11630,0$	0,9893	8	10
CARB	$Y = 1488,0 \pm 56,2 X + 7114,0 \pm 1654,0$	0,9888	7	11

A avaliação dos dados acima permite afirmar que a linearidade foi alcançada para todos os OPP, pois os valores encontrados de r estão próximos da unidade e a distribuição dos resíduos não indica uma tendência, isto é, estão distribuídos de forma aleatória acima e abaixo da curva analítica.

I.4.2.2. Estudo da Precisão (repetibilidade)

Foram realizados ensaios em replicata ($n = 4$) usando solução padrão contendo os padrões de OPP nas concentrações $410 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de metil paration, $1593 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de malation, $359 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de coumafós e $52,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de carbofenotion (concentrações intermediárias dentre as utilizadas para os estudos de linearidade). Os resultados são apresentados na tabela I.12.

Tabela I.12 – Desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (s_R) dos OPP estudados.

Replicata	Área dos picos			
	Metil paration	Malation	Coumafós	Carbofenotion
# 1	36713	32762	192998	57294
# 2	46255	30564	234490	64035
# 3	43036	31166	221102	64831
# 4	39649	26416	208733	60204
Média	41413	30227	214330	61591
s	4134	2704	17688	3505
s_R (%)	10,0	9,0	8,3	5,7

Como os valores para s_R ficaram abaixo de 10%, a repetibilidade foi considerada aceitável.

I.4.2.3. Estudo da exatidão

Para este estudo, foram utilizados os mesmos dados usados no ensaio de linearidade. Para cada analito, as equações das curvas analíticas foram recalculadas excluindo-se um dos pares área/concentração. Em seguida, a partir do valor excluído de área e da nova equação da reta, interpolava-se um valor de concentração. A exatidão foi calculada comparando-se as concentrações interpoladas e reais para o ponto testado.

Tabela I.13 – Cálculo da exatidão (%) obtida para os OPP estudados.

Analito	Valor esperado ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Valor calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Exatidão (%)
Metil paration	0,19	$0,17 \pm 0,01$	90 ± 5
Malation	0,72	$0,62 \pm 0,07$	86 ± 10
Coumafós	0,16	$0,15 \pm 0,01$	92 ± 7
Carbofenotion	0,26	$0,25 \pm 0,02$	96 ± 10

Em análises de resíduos de pesticidas, valores como os obtidos entre 80% e 120% são aceitos. Assim, a exatidão obtida é satisfatória (USP 29, 2006).

I.4.2.4. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados medindo a relação sinal/ruído na região do cromatograma próxima ao pico de interesse, e comparando-a com a altura do pico obtido para a menor concentração da curva analítica. Os resultados são apresentados na tabela I.14.

Tabela I.14 – Limites de detecção e quantificação para os OPP estudados

Analito	Limite de detecção ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Metil paration	0,021	0,070
Malation	0,086	0,285
Coumafós	0,017	0,057
Carbofenotion	0,005	0,017

I.4.2.5. Massas extraídas de OPP

Para a realização deste ensaio o fator de resposta do detetor para cada um dos OPP foi estimado pela injeção direta de 20 μL de mistura de padrões com concentrações variadas. Em seguida, foram realizadas extrações em triplicata de uma solução contendo 410 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de metil paration, 1593 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de malation, 359 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de coumafós e 52,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de carbofenotion nas condições otimizadas. A partir das áreas dos picos nos cromatogramas de SPME-HPLC e do fator de resposta do detetor, calcularam-se as massas extraídas para cada OPP.

Tabela I.15 – Massa extraída (%) dos analitos estudados

Analito	Massa adicionada (μg)	Massa extraída (ng)	% extraída média
Metil paration	8,2	$22,7 \pm 2,9$	$0,28 \pm 0,04$
Malation	31,9	$67,3 \pm 6,6$	$0,21 \pm 0,02$
Coumafós	7,2	$71,0 \pm 9,6$	$0,99 \pm 0,13$
Carbofenotion	1,1	$28,0 \pm 1,9$	$2,67 \pm 0,19$

As quantidades extraídas dos analitos são muito pequenas, comparadas com as massas totais presentes. Porém, como a SPME é um processo de equilíbrio entre o analito na solução e no recobrimento da fibra, a técnica pode ser utilizada para determinações quantitativas desde que as amostras e padrões usados para preparo da curva analítica tenham matrizes similares o que resultará em constantes de equilíbrio próximas. A limitação nas massas extraídas também limita a sensibilidade em SPME, porém, como a concentração da amostra antes e depois da extração fica aproximadamente constante durante a extração, isso permite o uso de SPME em estudos como os de *binding* entre fármacos e proteínas do sangue, já que o que é efetivamente medido é a concentração livre, não associada, dos analitos.

Quando uma droga é administrada a um paciente, parte dessa droga se liga as proteínas do sangue ou outros órgãos e parte permanece na sua forma livre. Na maioria das práticas analíticas os métodos de extração recuperam toda a droga contida no sangue, por consequência, em muitos protocolos a quantidade total

(droga livre e ligada) é extraída. Existe um grande interesse em se determinar apenas a concentração de droga livre da proteína no plasma, e o uso de SPME pode colaborar com a realização deste ensaio (THEODORIDIS, 2006).

I.4.3. APLICAÇÃO

Terminados os ensaios realizados em solução aquosa, iniciamos as análises com uma infusão de *Artemisia annua* (item I.3.9) para verificar o efeito da matriz no processo de extração pela fibra sol-gel Carbowax 20M. Foram utilizadas as mesmas condições definidas na primeira parte do trabalho e avaliados alguns parâmetros de validação. Uma quantidade de NaCl foi adicionada à infusão a fim de obtermos uma solução com concentração de $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ do sal.

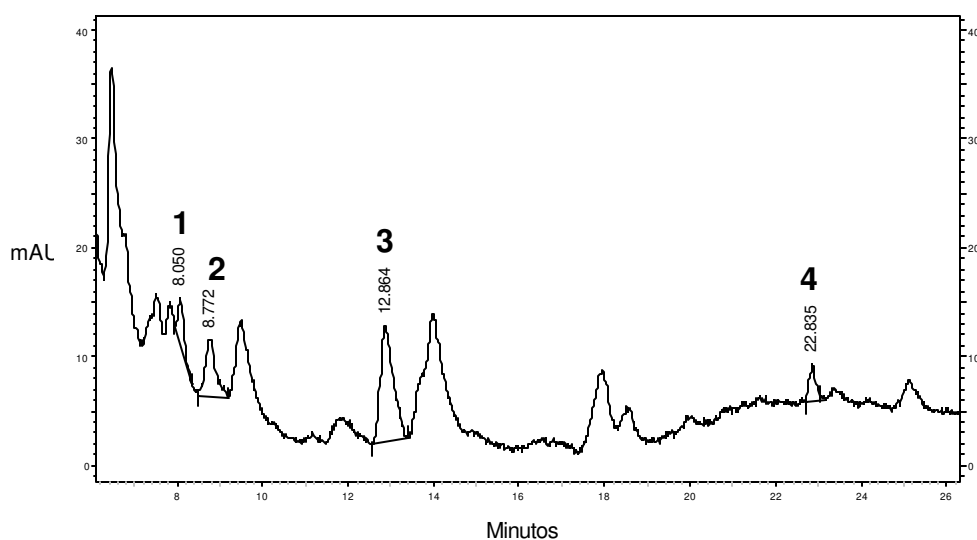


Figura I.15 – Cromatograma de uma amostra de infusão fortificada com OPP (1-Metil paration, 2-Malation, 3-Coumafos, 4-Carbofenotion). Condições cromatográficas descritas no item I.4.1.1.

I.4.3.1. Linearidade

Da mesma forma que nos ensaios com solução aquosa, em um frasco de 25 mL foram adicionados 20 mL de infusão e quantidades de solução padrão de forma a obter as concentrações dos OPP descritas na tabela I.16. As análises foram feitas em triplicata e os resultados apresentados na forma de gráficos.

Tabela I.16 – Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dos OPP

Analito	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
MET	0,11	0,22	0,32	0,43	0,65	0,86
MAL	0,16	0,31	0,47	0,63	0,94	1,25
COU	0,11	0,22	0,33	0,44	0,66	0,88
CARB	0,13	0,27	0,40	0,53	0,80	1,06

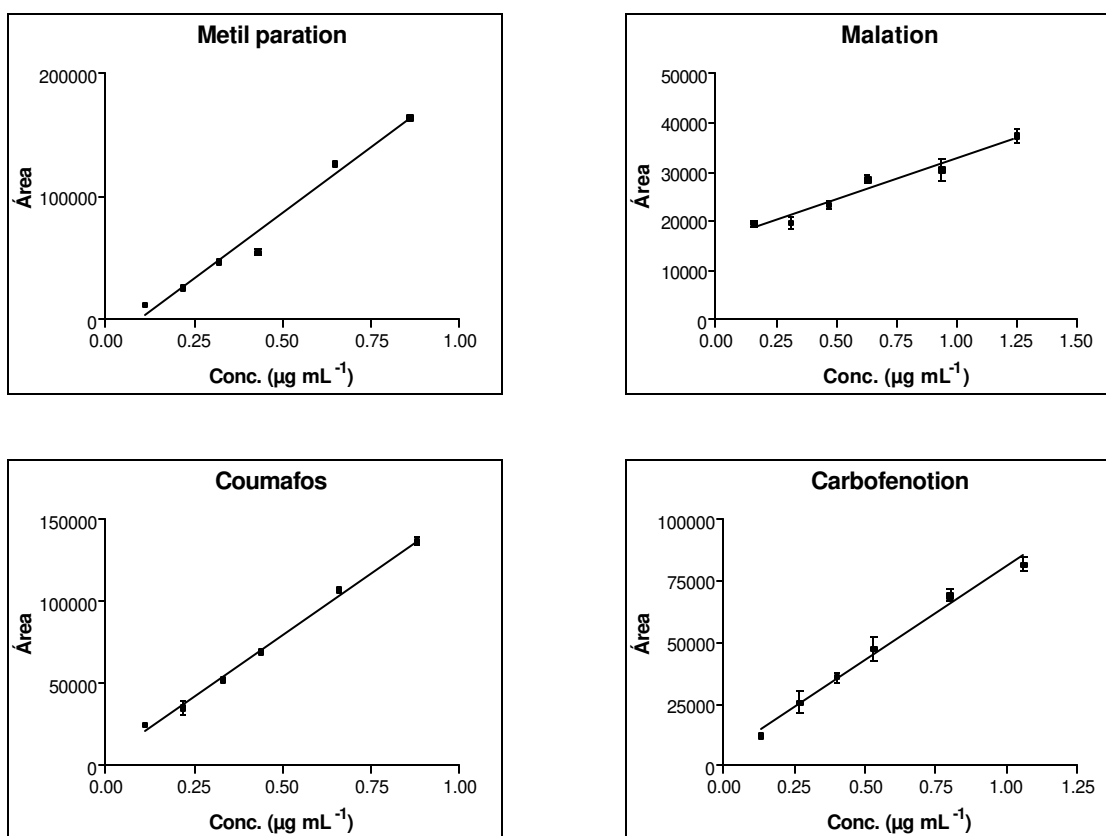


Figura I.16 – Curvas analíticas do estudo de linearidade em infusão de *Artemisia annua* para Metil paration, Malation, Coumafos e Carbofenotion.

Tabela I.17 – Equações da reta, coeficientes de correlação e resíduos das curvas para as análises em infusão de *Artemisia annua*.

Analito	Equação da reta	Coeficiente de correlação (r)	Resíduos	
			Pontos acima da reta	Pontos abaixo da reta
MET	$Y = 212000 \pm 8583 X - 19430 \pm 4305$	0,9872	10	8
MAL	$Y = 16720 \pm 1504 X + 16000 \pm 1096$	0,9410	9	9
COU	$Y = 150100 \pm 3556 X + 4982 \pm 1821$	0,9955	10	8
CARB	$Y = 75740 \pm 4088 X + 5062 \pm 2528$	0,9775	7	11

Assim como nos ensaios em solução aquosa a linearidade também foi observada nos estudos com infusão. Neste estudo, a massa extraída por SPME foi inferior àquela obtida em solução aquosa. Esta diferença pode ser explicada por dois fatores: **a)** nos ensaios utilizando infusão, alguns constituintes extraídos da planta também são adsorvidos pela fibra, diminuindo a capacidade da mesma em extrair os analitos de interesse; **b)** constituintes da infusão tem a capacidade de reter os OPP, dificultando a adsorção dos mesmos pela fibra. Outra observação a ser feita é a menor inclinação da reta obtida para o malation em relação aos demais analitos, indicando uma menor sensibilidade do método quando a análise é realizada em infusão.

I.4.3.2. Precisão

Os ensaios foram feitos em replicata (n = 6) utilizando-se 20 mL de infusão e 20 µL de solução padrão contendo os padrões de OPP nas concentrações 432 µg·mL⁻¹ de metil paration, 626 µg·mL⁻¹ de malation, 442 µg·mL⁻¹ de coumafós e 530 µg·mL⁻¹ de carbofenotion. Os resultados são apresentados na tabela I.18.

Tabela I.18 – Desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (s_R) dos OPP estudados.

Replicata	Resultados em área			
	Metil paration	Malation	Coumafós	Carbofenotion
# 1	49920	28669	52807	37895
# 2	46994	27817	53754	37908
# 3	46065	29871	51559	32170
# 4	44780	24018	55779	39989
# 5	46001	24142	54935	40320
# 6	44408	24086	55705	35708
Média	46361	26433	54089	37331
s	1979	2657	1693	3030
s_R (%)	4,3	10,0	3,1	8,1

Como nos ensaios com solução aquosa, os valores para s_R ficaram abaixo de 10%, sendo satisfatórios para a técnica de SPME.

I.4.3.3. Exatidão

Os resultados obtidos no ensaio de linearidade foram utilizados para o cálculo da exatidão. Os resultados são apresentados na tabela abaixo.

Tabela I.19 – Cálculo da exatidão (%) obtida para os OPP estudados.

Analito	Valor esperado ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Valor calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Exatidão (%)
Metil paration	0,32	$0,31 \pm 0,01$	98 ± 2
Malation	0,47	$0,43 \pm 0,05$	91 ± 10
Coumafós	0,33	$0,31 \pm 0,01$	97 ± 2
Carbofenotion	0,40	$0,41 \pm 0,04$	103 ± 9

Os valores de recuperação para todos os analitos estão entre 80 % e 120%, o que demonstra a viabilidade do uso da técnica para análise de infusões de plantas.

I.4.3.4. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através da relação sinal/ruído na região do cromatograma próxima ao pico de interesse, considerando-se a relação 3:1 para LD e 10:1 para LQ.

Tabela I.20 – Limites de detecção e quantificação para os OPP estudados em infusão.

Analito	Limite de detecção ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Metil paration	0,054	0,180
Malation	0,075	0,250
Coumafos	0,036	0,120
Carbofenotion	0,033	0,110

Os limites encontrados para o ensaio com infusão são superiores aos do ensaio em solução aquosa, porém a ordem de grandeza obtida é a mesma. No ensaio com infusão, existe por parte da fibra, a extração de outras substâncias presentes na amostra que competem com os analitos, diminuindo a quantidade extraída dos mesmos.

I.5. CONCLUSÕES

- ✓ O tempo de vida da fibra sol-gel Carbowax 20M ormosil foi notável, mais de 100 ciclos de extração e dessorção, o que é consideravelmente maior do que as fibras convencionais utilizadas sob as mesmas condições. Isto se deve ao filme ser quimicamente ligado à superfície da fibra de sílica fundida, conferindo maior estabilidade à mesma ;
- ✓ A interface de dessorção produzida em nosso laboratório mostrou-se adequada para o uso em SPME-HPLC-DAD. Numa comparação com a interface comercial os parâmetros de utilização são semelhantes tanto na forma como a dessorção é realizada (dessorção estática), quanto na vazão de fase móvel usada (0,10-0,15 mL·min⁻¹), não havendo restrições quanto a seu uso;
- ✓ Todos os parâmetros de validação estudados apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando que a técnica pode ser usada para determinação de pesticidas organofosforados em amostras de água e infusões de plantas.

CAPÍTULO II

Uso de HS-SPME-GC-MS na análise de voláteis de plantas com possível atividade antimicrobiana

II.1. INTRODUÇÃO

A atividade biológica de óleos essenciais de plantas tem sido objeto de intensa investigação científica. Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular, bem como para aumentar o prazo de validade dos alimentos, uma vez que apresentam amplo espectro de atividade, com inibição observada contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos (HULIN *et al.*, 1998). A maioria dessas propriedades são devidas a substâncias e óleos essenciais que as plantas contêm como produtos de seu metabolismo secundário, como pequenos terpenóides e compostos fenólicos, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana e antifúngica (ADAM *et al.*, 1998).

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de diversas espécies vegetais têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram cientificamente confirmadas apenas recentemente (JANSEN *et al.*, 1987). Usos práticos dessas atividades foram sugeridos em humanos e animais, e nos últimos anos verificou-se também que alguns óleos essenciais são capazes de inibir bactérias deteriorantes de alimentos processados (CONSENTINO *et al.*, 1999).

Óleos essenciais de várias espécies mostraram-se eficientes no controle do crescimento de fungos relacionados a infecções superficiais da pele (ADAM *et al.*, 1998), e sobre uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (GALLI *et al.*, 1985).

ALIGIANNIS *et al.* (2001) estudaram a atividade do óleo essencial de duas espécies de *Origanum* contra vários microrganismos, obtendo resultados significativos de inibição que foram atribuídos a monoterpenos oxigenados presentes nestes óleos. A atividade antimicrobiana de óleos essenciais de 24 espécies de plantas aromáticas, entre elas o *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, foi testada contra 30 linhagens de bactérias e de 68 leveduras. Os resultados mostraram que o óleo de *O. vulgare* inibiu 97% das leveduras e o de *T. vulgaris*, 93%. A concentração mínima inibitória (mínima concentração de um composto capaz de inibir o crescimento microbiano) para os dois óleos foi de 0,5 mg·mL⁻¹ contra *Candida*

albicans. A caracterização dos óleos evidencia que a alta atividade biológica deve-se a relevante quantidade de fenóis aromáticos, como o timol e o carvacrol, compostos típicos dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* (PICCAGLIA *et al.*).

O óleo essencial de *Mentha piperita* foi testado contra 21 microrganismos patogênicos (humanos e de plantas), apresentando forte inibição devido principalmente ao mentol, seu constituinte majoritário (ISCAN *et al.*, 2002). Estudos realizados por Dukic e colaboradores (2003) com três espécies de *Mentha* (*M. aquatica*, *M. piperita* e *M. longifolia*), observaram forte atividade antibactericida do óleo essencial de *M. piperita* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermides* e *Bacillus subtilis*, apresentando em alguns casos, atividade maior que a penicilina (antibiótico padrão). A atividade antifúngica contra *Candida albicans* dos óleos de *M. piperita* e *M. longifolia* também foi maior que o padrão de bifonazol (80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos óleos contra 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do padrão). Em ambos os ensaios, observam-se elevados teores de monoterpenos oxigenados (acima de 65%) para as espécies *M. piperita* e *M. longifolia*, enquanto para *M. aquatica* cuja atividade é inferior, o teor dos analitos também é menor (aproximadamente 30%). Isto sugere uma atividade antimicrobiana intimamente relacionada a esses teores (DUKIC *et al.*, 2003).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Achillea atrata* L. foi verificada contra 18 linhagens de fungos. A caracterização do óleo apresentou como constituinte majoritário o 1,8-cineol. Os resultados de concentração mínima inibitória (MIC) indicaram valores de 2-7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o óleo essencial e de 3-8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o 1,8-cineol, contra um MIC de 10-15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o bifonazol, um fungicida comercial. As diferentes atividades antifúngicas do óleo e do 1,8-cineol sugerem um efeito sinérgico dos diferentes constituintes deste óleo e/ou a presença de outros componentes que podem ter atividade, mesmo em pequenas concentrações (RISTIC *et al.*, 2004).

ARAÚJO *et al.* (2003) estudaram a atividade de óleos essenciais de duas espécies de Lamiaceae (*Melissa officinalis* e *Mentha piperita*) contra cinco leveduras presentes em alimentos. O óleo essencial de *M. officinalis* (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), assim como seu principal constituinte, o citral (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), foram ativos contra todos os

microrganismos testados, indicando ser este analito o responsável pela atividade. No ensaio com OE de *M. piperita* e seu principal constituinte, o mentol (42,8%), a inibição do crescimento foi maior para o OE do que para o analito. Esta observação pode explicar um efeito combinado de diferentes componentes do óleo, ou a presença de outros analitos ativos, mesmo em pequenas concentrações. Um efeito similar foi descrito por SARBHOY *et al* (1978). Um teste com OE de *M. piperita*, mentol e mentona concluiu que os compostos isolados não têm a mesma atividade que o óleo. Sua eficiência aumenta quando usados em combinação.

O óleo essencial de *Hyssopus officinalis*, cujos constituintes principais são pinocanfona e isopinocanfona tem atividade negligenciável contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Enterococcus spp*) e Gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas spp*, *Salmonella spp*), porém a variedade decumbens que tem como constituintes predominantes, o linalol, 1,8-cineol e limoneno apresentou atividade antimicrobiana maior, principalmente contra *E. spp* e *E. coli* (MAZZANTI *et al.*, 1998).

A associação do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* com diversos antibióticos contra variedades de *Shigella* (agente causador da diarreia), contribuiu para um aumento da atividade antimicrobiana dos antibióticos, demonstrando os benefícios clínicos do uso deste óleo (IWALOKUN *et al.*, 2003). Este óleo também foi testado por Nakamura e colaboradores (1999) contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp*, *Salmonella enteritis* e *Shigella flexineri*). O ensaio de MIC apresentou valor de 0,75 µg·mL⁻¹ para *S. aureus* e de 3-12 µg·mL⁻¹ para as bactérias Gram-negativas. Ensaio de bioautografia revelaram que o constituinte ativo é o eugenol.

SALGUEIRO *et al.* (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum virens* contra a levedura *Candida albicans* observando que a forte atividade deve-se principalmente ao carvacrol (seu principal constituinte). Outras espécies de *Origanum* reportadas na literatura, onde o teor de carvacrol é superior a 50% tem atividade semelhante.

Óleos essenciais de três espécies de *Thymus* (*T. vulgaris*, *T. zygis* e *T. mastichina*) foram avaliados contra várias culturas de *Candida albicans*. Os resultados obtidos para *T. vulgaris* e *T. zygis* foram semelhantes entre si e superiores a *T. mastichina*. A análise química dos óleos apresentou o carvacrol (70%) como constituinte majoritário do óleo essencial de *T. vulgaris* e timol (40%) como principal analito do óleo de *T. zygis*, enquanto para o óleo de *T. mastichina*, 1,8-cineol (67%) foi o principal componente, não apresentando os monoterpenos fenólicos. Estes resultados indicam uma atividade antifúngica fortemente ligada aos compostos fenólicos (PINA-VAZ *et al.*, 2004).

JAIN *et al.* (2002), utilizaram alguns terpenos (1,8-cineol, mentol, terpineol, mentona, pulegona e carvona) para estudar o efeito dos mesmos na permeação do cloreto de imipramina em pele de ratos. Todos os terpenos utilizados aumentaram a permeação. A ruptura das ligações entre os aminoácidos da parede celular pelos terpenos é o provável mecanismo para o aumento da permeação.

Há que se considerar ainda que, na atualidade, as bactérias que causam prejuízos à saúde humana possuem resistência à maioria dos antimicrobianos. O microrganismo *Streptococcus pneumoniae* é resistente a aminoglicosídeos, penicilina, cefalosporina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e trimetoprim. A linhagem de *Staphylococcus aureus* responsável pelas infecções hospitalares, desenvolveu resistência a todos os antimicrobianos, com exceção da vancomicina, podendo ser este fato um risco para a humanidade. A situação é ainda mais crítica uma vez que alguns enterococcus adquiriram resistência também a vancomicina (SOUZA, 1998). O surgimento de linhagens de *S. aureus* resistentes a esta droga significaria um retrocesso à era pré-antibiótica. Para SOUZA (1998) várias medidas tecnológicas são sugeridas para resolver o problema da resistência das bactérias, sendo uma delas a procura de novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais.

Várias referências sobre atividade antimicrobiana de óleos essenciais são reportadas na literatura, contudo, existem grandes diferenças na atividade registrada para óleos oriundos de plantas de mesma espécie. As razões para esta variação podem ser entendidas se avaliarmos todos os fatores que influenciam a composição

química dos óleos essenciais, como local de cultivo, época de colheita, características do solo, entre outros. Sendo assim, é de extrema importância o conhecimento desta composição química para podermos avaliar os resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana de óleos.

A Microextração em Fase Sólida tem sido aplicada com sucesso a amostras de origem extremamente variada. Dentre estas, o seu uso em diversos procedimentos com amostras de origem vegetal – incluindo extração, identificação e quantificação de compostos orgânicos voláteis biogênicos (BVOC, *biogenic volatile organic compounds*), óleos essenciais e contaminantes - têm recebido grande atenção. A Cromatografia Gasosa (GC) é a técnica instrumental empregada para as etapas de identificação e quantificação que se seguem à extração por SPME : a fibra pode ser introduzida diretamente no injetor aquecido do cromatógrafo, sendo os analitos coletados dessorvidos termicamente e arrastados pelo fluxo de gás de arraste para a coluna cromatográfica. Podem-se fazer extrações seletivas pela escolha adequada do tipo de material de recobrimento da fibra. O uso da SPME facilitaria a avaliação da composição química dos óleos essenciais, uma vez que os procedimentos de extração e análise são realizados em apenas 2 etapas.

II.2. OBJETIVO

Relacionar a composição química de voláteis de plantas com a possível atividade antimicrobiana dos mesmos.

- ✓ Avaliação do perfil cromatográfico dos voláteis utilizando-se dois tipos de fibras comerciais: polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB, 65 μm) e polidimetilsiloxano (PDMS, 100 μm) e comparação dos resultados desta avaliação com a análise de óleo essencial realizada pelos métodos tradicionais.

- ✓ Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pelo método da concentração mínima inibitória (MIC) com a finalidade de selecionar óleos com potencial terapêutico, em substituição às drogas existentes no mercado.

II.3. MATERIAIS

II.3.1. Material vegetal. Vinte e uma amostras da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP foram coletadas entre os meses de setembro e novembro de 2003 (tabela II.1). Parte das amostras de cada planta foi utilizada para avaliação da composição química dos voláteis por SPME e o restante utilizado para extração dos óleos essenciais a serem usados nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Tabela II.1 - Plantas medicinais da coleção de culturas do CPQBA/UNICAMP estudadas no presente projeto (N = Nativa; E = Exótica*).

Nome científico	Nome popular	Família	Origem
<i>Achyrocline satureoides</i> (DC.) Lam.	Macela	Asteraceae	N
<i>Achillea millefolium</i> L.	Mil-folhas	Asteraceae	E
<i>Aloysia gratissima</i> (Gill & Hook)	Alfazema do Brasil	Verbenaceae	N
<i>Aloysia triphylla</i> (L'hér.) Britten.	Aloysia	Verbenaceae	E
<i>Ammi visnaga</i> (L) LAM.	Visnaga	Apiaceae	E
<i>Anthemis nobilis</i> L.	Macelinha	Asteraceae	E
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) Dc.	Carqueja	Asteraceae	N
<i>Cordia verbenacea</i> (Jacq.) Roem.	Erva Baleeira	Boraginaceae	N
<i>Cymbopogon martinii</i> Motia.	Palmarosa	Poaceae	E
<i>Cymbopogon winterianus</i> L.	Citronela de Java	Poaceae	E
<i>Mentha arvensis</i> L. Var. Piperita	Hortelã	Lamiaceae	E
<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã	Lamiaceae	E
<i>Mentha sp</i>	Hortelã	Lamiaceae	E
<i>Mentha spicata</i> L.	Hortelã Vilhoça	Lamiaceae	E
<i>Mikania glomerata</i> Sprengel.	Guaco	Asteraceae	N
<i>Mikania laevigata</i> Sch. Bip. ex Baker	Guaco	Asteraceae	N
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Manjerição	Lamiaceae	E
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Alfavacão	Lamiaceae	N
<i>Origanum applii</i> (Domin) Boros	Orégano	Lamiaceae	E
<i>Origanum vulgare</i> L. Ssp Virens	Orégano	Lamiaceae	E
<i>Piper aduncum</i> L.	Piper	Piperaceae	N

* planta de ocorrência não espontânea no Brasil

II.3.2. Outros Materiais. Foram utilizadas fibras recobertas com 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS) e 65 μm de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), conectadas a um aplicador manual para SPME modelo 57330-U (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). Para as extrações, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro de 25 mL lacrados com septos de teflon/silicone e anéis de alumínio (Pierce, Rockford, IL - EUA) e contendo barras para agitação magnética.

II.3.3. Cromatografia Gasosa Espectrometria de massas (GC/MS). As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás HP-5890 acoplado a detetor seletivo de massas HP-5971. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) com hélio como gás de arraste (1,0 mL $\cdot$ min⁻¹). As temperaturas do injetor e detetor foram 220 °C e 250 °C respectivamente, com uma programação de temperatura para a coluna de 60 °C a 240 °C (3 °C $\cdot$ min⁻¹). O injetor foi mantido no modo *splitless* durante a dessorção. Uma mistura de nalcenos foi usada para o cálculo de índice de retenção (IR) dos analitos e a identificação dos mesmos foi feita pelo IR, comparação com as bibliotecas eletrônicas WILEY e NIST e com dados da literatura (ADAMS, 1995).

II.3.4. Microrganismos. Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (CCT 2740), *Streptococcus faecium* (ATCC 10541) e *Bacillus subtilis* (CCT 2576), a bactéria Gram-negativa *Salmonella choleraesuis* (CCT4296) e a levedura *Candida albicans* (CCT 776).

II.3.5. Obtenção dos óleos essenciais. O isolamento dos óleos foi realizado por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, pesando-se cerca de 100 g das partes aéreas da planta fresca em balão de fundo redondo de 1000 mL, adicionando-se 700 mL de água destilada e procedendo-se à destilação por 3 horas. Em seguida,

a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 50 mL) e a fase orgânica obtida submetida à secagem com sulfato de sódio anidro, filtrada sob algodão e o solvente evaporado à secura e em evaporador rotativo a 30 °C.

II.3.6. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC).

Os inóculos para os ensaios foram preparados pela diluição da massa celular em NaCl 0,85% e a solução ajustada para 0,5 na escala de McFarland, confirmada por leitura espectrofotométrica a 580 nm. As suspensões das células foram diluídas para 10^4 UFC· mL⁻¹ (UFC – unidades formadoras de colônias) para serem usadas nos ensaios de atividade. Os testes de MIC foram realizados de acordo com ELOFF (1998), usando placas de cultura de células (96 poços). As soluções estoque de óleo essencial foram diluídas e transferidas para o primeiro poço, sendo em seguida, feitas diluições sucessivas nos demais poços a fim de obter-se uma faixa de concentração de 0,03-2,00 mg· mL⁻¹. Cloranfenicol (bactérias) ou nistatina (*C. albicans*) foram usados como controle numa faixa de 0,005-0,062 mg· mL⁻¹ e 0,001-0,125 mg· mL⁻¹, respectivamente. Os inóculos foram adicionados em todos os poços e as placas foram incubadas a 36 °C por 48 horas. A atividade antimicrobiana foi detectada pela adição de 20 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazólio, Merck). A MIC foi definida como a menor concentração de óleo que visivelmente inibe o crescimento, como indicado pela mancha de TTC (células mortas não são tingidas pelo TTC). Um exemplo deste ensaio pode ser visto na figura II.1.

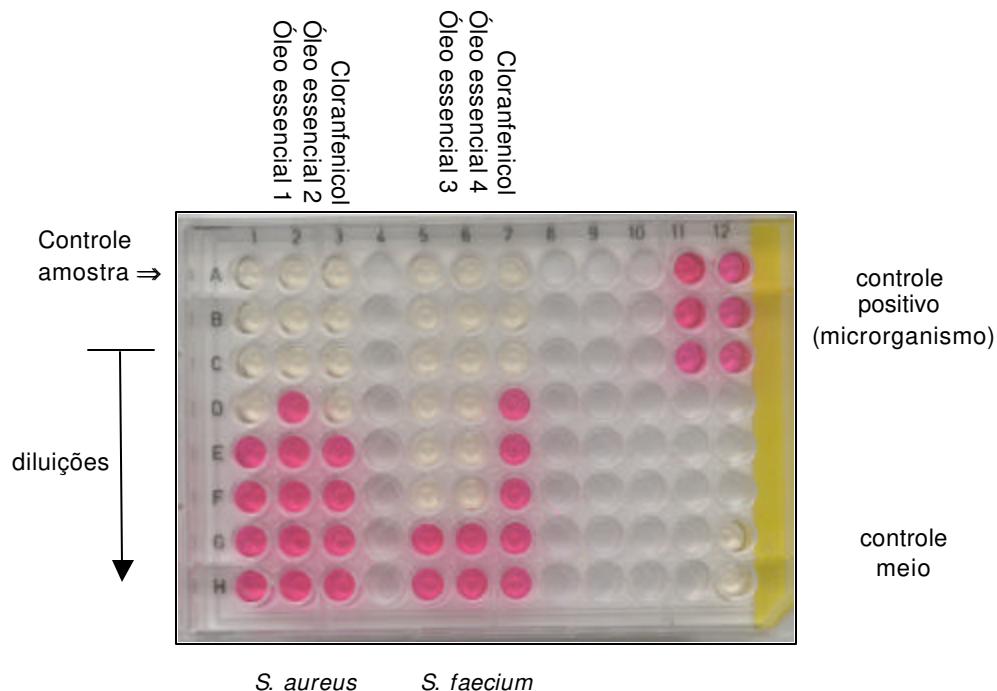


Figura II.1 – Avaliação da Concentração Mínima Inibitória

II.3.7. Análise dos voláteis por SPME. Em um frasco de 25 mL foram adicionados 15 mL de solução saturada de NaCl e 200,0 mg de amostra de planta fresca, finamente dividida e homogeneizada. Em seguida o frasco foi lacrado e colocado em um banho termostatzado a 65 °C, permanecendo 30 minutos sob agitação constante. Decorrido este tempo, a fibra de SPME foi introduzida no frasco e exposta ao seu *headspace* por um período de 30 minutos, sendo imediatamente retirada e introduzida no injetor do cromatógrafo a gás para dessorção dos analitos e análise por GC-MS.

II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1. Composição química dos óleos essenciais.

As análises dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação (Clevenger) e por Micro-extração em fase sólida (SPME) estão apresentadas nas tabelas II.2 a II.22.

Tabela II.2 – Compostos voláteis identificados em *Achyrocline satureoides*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
5,68	939	α -pineno	12,27	14,63	10,24
6,84	978	1-octen-3-ol	5,64	n.d. ^d	7,38
7,73	1006	acetato de 3 <E> hexenol	1,35	n.d.	1,58
8,64	1033	1,8-cineol	3,88	5,42	4,31
13,92	1164	borneol	4,16	n.d.	6,16
14,43	1176	n.i. ^c	0,64	n.d.	1,04
14,99	1189	α -terpineol	10,36	4,01	19,28
23,18	1375	α -copaeno	1,52	n.d.	1,21
25,06	1418	Trans-cariofileno	24,62	31,47	17,64
26,50	1454	α -humuleno	22,15	28,73	17,08
27,33	1472	n-dodecanol	6,40	9,99	3,37
29,45	1524	δ -cadineno	1,96	n.d.	2,98
31,32	1569	Álcool cariofileno	1,12	n.d.	1,52
32,57	1600	n.i.	2,19	5,75	3,71
33,22	1617	1,10-di-EPI-cubenol	1,73	n.d.	2,50

Notas: **a)** índice de retenção;

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

c) n.i. – não identificado;

d) n.d. – não detectado.

De modo geral a ordem de grandeza dos voláteis extraídos com as fibras de SPME não difere fortemente dos resultados obtidos para a análise do óleo extraído por Clevenger. Em algumas situações esta diferença pode ser atribuída a maior interação dos analitos com o tipo de fibra extratora, o que não inviabiliza o uso da técnica para realização de um *screening* desses voláteis.

Tabela II.3 – Compostos voláteis identificados em *Achillea millefolium*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB _b
5,26	976	sabineno	12,01	3,18	1,66
5,39	978	1-octen-3-ol	n.d. ^d	n.d.	1,06
6,84	1033	1,8-cineol	3,70	7,91	3,92
7,70	1054	γ-terpineno	0,83	n.d.	n.d.
11,62	1164	borneol	n.d.	2,00	5,07
12,10	1177	terpin-4-ol	9,79	n.d.	1,89
12,67	1189	α-terpineol	n.d.	n.d.	2,65
24,70	1472	n-dodecanol	n.d.	n.d.	0,54
24,84	1480	γ-muuroleno	26,86	66,21	51,06
25,57	1493	n.i. ^c	n.d.	n.d.	1,17
26,10	1506	β-bisaboleno	1,18	20,70	28,96
26,62	1524	δ-cadineno	n.d.	n.d.	2,03
28,91	1578	Hidrato de trans-sesquisabineno	6,80	n.d.	n.d.
30,02	1606	M = 222	7,36	n.d.	n.d.
30,90	1629	M = 222	27,99	n.d.	n.d.
30,97	1631	n.i.	0,78	n.d.	n.d.
34,27	1718	n.i.	0,92	n.d.	n.d.
36,16	1770	n.i.	1,00	n.d.	n.d.

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.4 – Compostos voláteis identificados em *Aloysia gratissima*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
4,38	939	α -pineno	0,21	0,36	n.d. ^d
5,27	976	Sabineno	0,14	n.d.	0,19
5,36	980	β -pineno	1,07	1,43	1,12
6,66	1026	p-cimeno	0,86	0,39	1,26
6,85	1033	1,8-cineol	26,48	23,59	32,35
7,73	1062	γ -terpineno	0,19	n.d.	0,31
8,01	1068	Hidrato de sabineno	0,78	0,21	1,36
9,08	1094	n.i. ^c	0,66	n.d.	0,89
9,16	1098	linalol	2,40	n.d.	3,88
12,12	1177	Terpin-4-ol	3,45	0,53	4,76
12,68	1189	α -terpineol	0,22	n.d.	0,48
14,01	1219	n.i.	0,15	n.d.	0,40
18,84	1340	Acetato de terpin-4-ol	0,12	0,59	n.d.
22,26	1418	Trans-cariofileno	16,39	15,71	6,49
23,65	1447	n.i.	0,39	1,17	0,42
24,86	1480	Germacreno D	17,54	21,89	10,53
25,49	1491	Biciclogermacreno	8,29	11,46	5,30
26,62	1519	n.i.	0,42	n.d.	0,50
28,77	1576	Espatulenol	4,13	3,59	5,70
28,93	1581	Óxido de cariofileno	9,88	10,82	13,23
29,31	1586	M = 204	8,22	7,56	10,29
29,58	1595	guaíol	0,30	0,30	0,55
32,98	1681	n.i.	n.d.	0,40	n.d.

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.5 – Compostos voláteis identificados em *Aloysia triphylla*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
5,59	985	6-metil-5-hepten-2-ona	0,79	1,33	0,47
6,77	1031	limoneno	3,06	2,52	1,39
9,23	1099	linalol	0,49	n.d. ^d	n.d.
9,96	1118	n.i. ^c	0,22	n.d.	n.d.
10,59	1139	Óxido de limoneno	0,50	n.d.	0,09
11,00	1144	n.i.	0,52	0,22	0,29
14,29	1228	nerol	2,89	0,23	0,92
14,85	1239	neral	26,24	24,88	25,93
15,00	1242	n.i.	n.d.	n.d.	0,11
15,44	1258	Trans-geraniol	2,65	0,22	1,51
16,17	1270	geranial	34,25	35,61	44,52
16,40	1275	n.i.	n.d.	n.d.	0,12
20,11	1362	n.i.	n.d.	n.d.	0,21
20,95	1383	Acetato de geranila	3,16	7,00	6,37
22,24	1418	Trans-cariofileno	5,23	4,49	3,68
24,82	1477	γ-muuroleno	0,57	0,51	0,59
25,00	1479	Curcumeno	3,44	4,56	3,59
25,47	1491	Biciclogermacreno	1,94	4,40	3,25
26,19	1508	M = 204	0,93	1,32	0,99
28,31	1561	n.i.	n.d.	0,73	0,35
28,74	1576	Espatulenol	5,48	4,30	2,51
28,91	1581	Óxido de cariofileno	5,93	6,61	2,68
31,24	1636	M = 204	1,32	1,08	0,44

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.6 – Compostos voláteis identificados em *Ammi visnaga*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
3,93	929	3-metil-4-heptanona	0,55	n.d. ^d	0,77
4,21	939	α -pineno	0,24	n.d.	0,39
5,26	976	Sabineno	0,60	0,77	0,88
6,00	999	n.i. ^c	0,38	0,70	0,56
6,38	1011	n.i.	1,76	2,76	2,07
7,37	1050	Trans-ocimeno	4,12	3,53	4,79
9,16	1098	linalol	14,47	7,98	18,88
9,29	1101	Isovalerato de isopentila	7,28	9,30	5,39
9,45	1105	n.i.	0,51	1,68	0,84
9,64	1110	n.i.	1,09	n.d.	1,51
12,67	1189	α -terpineol	1,95	n.d.	2,21
15,95	1265	n.i.	1,29	n.d.	1,95
20,98	1383	M = 204	2,24	n.d.	2,63
21,35	1392	n.i.	0,76	n.d.	1,05
22,60	1421	n.i.	1,39	1,06	1,82
23,97	1458	β -farneseno	1,11	0,73	1,34
24,83	1477	γ -muuroleno	32,18	41,78	20,86
25,08	1482	Isobutirato de citronelila	2,10	1,78	2,60
25,19	1484	n.i.	0,88	n.d.	1,40
26,17	1510	Isovalerato de lavandulila	1,95	1,52	2,60
26,26	1510	n.i.	0,46	n.d.	1,03
26,65	1525	β -sesquifelandreno	2,81	3,30	4,06
27,54	1542	n.i.	0,71	1,28	1,07
33,17	1686	n.i.	1,20	n.d.	1,54
33,86	1704	n.i.	3,47	3,87	2,95
34,06	1710	n.i.	4,22	4,72	4,56
35,17	1740	n.i.	10,25	13,25	10,28

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.7 – Compostos voláteis identificados em *Anthemis nobilis*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
3,93	929	3-metil-4-heptanona	2,02	10,77	6,66
4,26	925	n.i. ^c	0,24	n.d. ^d	0,67
4,44	932	α -pineno	1,94	12,40	9,68
4,46	934	n.i.	4,17	n.d.	n.d.
4,81	952	3-metil-ciclohexanona	1,09	2,32	2,87
5,35	973	n.i.	0,47	n.d.	n.d.
5,76	991	3-octanol	0,28	n.d.	n.d.
6,01	1000	n.i.	3,49	1,83	1,75
6,14	1004	n.i.	n.d.	n.d.	1,34
6,47	1014	n.i.	0,65	n.d.	0,44
6,85	1033	1,8-cineol	34,18	46,26	29,75
7,20	1037	n.i.	0,80	n.d.	0,31
7,50	1046	M = 156	31,23	4,50	5,51
8,00	1062	Artemísia cetona	3,67	1,12	2,07
9,27	1102	n.i.	0,80	n.d.	n.d.
9,89	1117	dehidro sabina cetona	n.d.	n.d.	1,00
11,20	1151	n.i.	2,09	n.d.	n.d.
11,51	1157	n.i.	0,42	n.d.	0,56
11,72	1162	n.i.	n.d.	n.d.	0,76
11,95	1168	n.i.	n.d.	n.d.	0,47
12,12	1177	Terpin-4-ol	0,48	n.d.	1,05
12,71	1189	α -terpineol	0,43	n.d.	n.d.
12,86	1194	mirtenol	n.d.	n.d.	1,03
15,47	1255	geraniol	3,77	n.d.	n.d.
20,82	1381	n.i.	0,48	n.d.	n.d.
23,97	1458	trans- β -farneseno	0,71	n.d.	1,68
24,86	1479	γ -curcumeno	0,96	5,07	8,56
24,96	1480	Germacreno D	3,25	n.d.	n.d.
26,13	1506	β -bisaboleno	1,14	15,73	23,84

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.8 – Compostos voláteis identificados em *Baccharis trimera*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
6,87	976	β-pineno	0,13	n.d. ^d	n.d.
7,24	991	β-mirceno	0,28	0,18	0,49
7,74	1007	Acetato de 3-hexenol	n.d.	0,25	1,66
8,03	1046	Trans-β-ocimeno	0,24	n.d.	n.d.
11,17	1098	linalol	0,28	n.d.	0,17
21,51	1339	δ-elemeno	n.d.	0,22	n.d.
23,19	1375	α-copaeno	0,47	0,65	0,44
23,83	1390	β-cubebeno	0,25	0,89	0,30
23,92	1392	β-elemeno	0,48	2,19	n.d.
25,10	1418	Trans-cariofileno	12,20	14,37	12,12
25,90	1438	α-guaieno	1,16	1,27	2,14
26,53	1454	α-humuleno	0,91	1,24	0,99
27,35	1472	Dodecanol	n.d.	n.d.	0,39
27,57	1477	γ-muuroleno	n.d.	0,16	0,70
27,78	1480	Germacreno D	30,94	44,41	43,05
28,41	1491	Biciclogermacreno	40,55	24,72	23,23
28,51	1499	α-muuroleno	n.d.	0,58	0,68
28,73	1505	Germacreno A	1,32	1,84	2,36
29,08	1513	γ-cadineno	0,52	n.d.	0,78
29,48	1524	δ-cadineno	4,18	4,68	7,20
30,83	1556	Germacreno B	0,31	0,60	0,54
31,57	1575	Germacreno D-4-ol	n.d.	0,57	n.d.
31,87	1583	globulol	1,74	n.d.	0,38
32,17	1590	viridiflorol	0,86	n.d.	n.d.
32,57	1600	n.i. ^c	0,56	n.d.	n.d.
33,02	1641	EPI-α-muurolol	0,83	n.d.	n.d.
34,31	1645	α-muurolol	0,29	n.d.	n.d.
34,68	1655	α-cadinol	1,16	0,12	0,74
36,07	1690	n.i.	0,33	1,04	1,63

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.9 – Compostos voláteis identificados em *Cordia verbenacea*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
5,67	939	α -pineno	2,14	8,54	7,56
6,42	973	sabineno	0,24	n.d. ^d	n.d.
8,63	1033	1,8-cineol	0,41	3,18	4,02
17,99	1282	Acetato de bornila	0,16	n.d.	n.d.
21,43	1335	M = 204	n.d.	1,56	n.d.
21,53	1339	δ -elemeno	42,34	48,60	23,88
23,30	1391	β -elemeno	1,60	n.d.	n.d.
23,91	1394	Cis-jasmona	n.d.	4,54	1,22
25,08	1418	Trans-cariofileno	27,95	8,16	10,41
25,42	1441	M = 204	0,33	n.d.	n.d.
26,46	1451	M = 204	n.d.	n.d.	1,16
26,53	1454	α -humuleno	3,08	1,95	3,23
27,36	1473	M = 204	0,59	1,03	3,60
27,50	1477	γ -muuroleno	n.d.	n.d.	3,24
27,71	1480	Germacreno D	1,66	1,08	2,88
27,79	1484	M = 204	0,60	n.d.	n.d.
28,03	1490	cis- β -guaiano	0,68	n.d.	1,09
28,13	1491	EPI-cubebol	n.d.	n.d.	1,34
28,18	1493	biciclogermacreno	0,89	n.d.	n.d.
28,29	1495	M = 204	n.d.	n.d.	0,88
28,36	1496	M = 204	n.d.	n.d.	1,21
28,55	1506	M = 204	3,33	n.d.	n.d.
29,44	1523	M = 204	7,71	5,72	11,48
30,19	1556	Germacreno B	0,40	n.d.	n.d.
32,26	1592	M = 220	0,37	n.d.	1,41
33,70	1629	M = 220	4,57	15,64	21,40

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.10 – Compostos voláteis identificados em *Cymbopogum martinii*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
5,72	987	n.i. ^c	0,12	0,03	0,04
7,08	1033	n.i.	0,23	0,02	n.d. ^d
7,40	1050	trans- β -ocimeno	0,98	0,11	n.d.
9,19	1098	Linalol	n.d.	0,84	0,64
14,81	1238	n.i.	n.d.	0,05	0,07
15,78	1258	trans-geraniol	63,46	45,88	91,28
16,16	1270	n.i.	n.d.	0,19	0,25
16,28	1273	n.i.	n.d.	0,02	n.d.
21,21	1383	acetato de geranila	28,83	47,18	6,35
22,35	1418	trans-cariofileno	2,15	4,17	0,08
34,44	1722	E,E-farnesol	1,57	0,34	0,49
34,61	1725	n.i.	n.d.	0,03	n.d.
35,62	1753	n.i.	1,39	0,83	0,50
38,73	1841	n.i.	0,34	0,17	0,13
42,41	1949	n.i.	0,24	0,14	0,17

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.11 – Compostos voláteis identificados em *Cymbopogum winterianus*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
8,54	1031	Limoneno	1,61	0,27	0,09
11,19	1098	Linalol	n.d. ^d	0,31	0,38
13,09	1145	Isopulegol	0,99	0,21	0,33
13,45	1152	Citronelal	36,24	11,79	9,45
13,55	1154	Mentona	n.d.	0,10	0,12
16,74	1229	Citronelol	18,43	19,19	27,49
17,25	1239	Neral (Z-citral)	0,27	0,35	0,61
17,91	1258	trans-geraniol	11,63	17,78	31,08
18,56	1270	Geranial (E-citral)	0,23	0,62	1,12
20,58	1316	n.i. ^c	n.d.	n.d.	0,19
21,27	1331	M = 154	n.d.	0,57	1,66
22,24	1353	acetato de citronelila	2,51	3,31	2,37
22,39	1356	Eugenol	1,04	1,53	3,81
23,57	1383	acetato de geranila	1,05	1,73	1,10
23,94	1392	β-elemeno	n.d.	1,69	0,08
26,55	1454	α-humuleno	n.d.	0,07	n.d.
27,54	1475	γ-muuroleno	1,80	n.d.	0,05
27,75	1480	Germacreno D	n.d.	5,87	2,15
28,28	1494	M = 204	n.d.	0,07	0,05
28,53	1499	α-muuroleno	n.d.	0,26	0,18
28,73	1503	Germacreno A	n.d.	1,02	0,53
29,10	1513	γ-cadineno	n.d.	0,63	0,93
29,50	1524	δ-cadineno	1,66	1,87	1,47
30,04	1538	α-cadineno	n.d.	n.d.	0,08
30,57	1549	elemol	7,15	8,81	2,76
31,65	1575	Germacreno D-4-ol	1,30	13,72	1,94
33,27	1618	n.i.	0,93	1,08	0,78
33,68	1629	n.i.	n.d.	0,28	n.d.
33,82	1632	M = 204	n.d.	0,55	1,08
34,23	1643	EPI-α-muurolol	2,58	1,80	2,00
34,39	1647	n.i.	1,12	0,34	0,27
34,54	1649	β-eudesmol	n.d.	0,29	1,22
34,74	1655	α-cadinol	4,77	2,96	3,90
35,27	1670	M = 204	n.d.	0,58	0,54
37,24	1722	n.i.	n.d.	0,19	0,14
38,01	1743	n.i.	n.d.	0,14	0,07

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.12 – Compostos voláteis identificados em *Mentha arvensis*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
5,67	939	α -pineno	0,17	n.d. ^d	n.d.
6,62	975	β -pineno	0,38	n.d.	n.d.
7,24	990	β -mirceno	0,32	n.d.	n.d.
8,54	1027	Limoneno	1,59	n.d.	n.d.
10,62	1139	M = 152	n.d.	0,19	0,55
10,88	1141	Isopulegol	0,61	0,19	0,20
11,20	1154	p-mentona	12,00	6,34	4,31
11,60	1164	Iso-mentona	4,72	3,23	2,26
12,10	1173	mentol	69,77	85,47	86,24
14,69	1235	n.i. ^c	0,47	n.d.	n.d.
15,31	1252	Piperitenona	1,39	2,06	3,34
16,34	1274	Acetato de isopulegol	0,26	n.d.	n.d.
17,06	1294	Acetato de mentila	6,98	0,57	0,28
22,05	1408	n.i.	n.d.	0,30	0,39
22,46	1418	Trans-cariofileno	0,42	n.d.	n.d.
22,85	1427	n.i.	n.d.	n.d.	0,25
23,62	1446	n.i.	n.d.	1,07	2,00
24,85	1476	γ -muuroleno	n.d.	0,59	0,19

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.13 – Compostos voláteis identificados em *Mentha piperita*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
6,77	1023	n.i. ^c	n.d. ^d	n.d.	0,06
6,85	1033	1,8-cineol	3,95	3,25	1,29
8,01	1068	hidrato de cis-sabineno	0,18	0,52	0,53
11,18	1154	p-mentona	10,60	10,88	9,89
11,57	1164	iso-mentona	1,40	n.d.	1,70
11,64	1165	neo-mentol	5,19	7,63	5,55
12,07	1173	mentol	71,88	70,43	75,00
12,17	1177	terpin-4-ol	1,30	0,75	1,05
12,39	1182	iso-mentol	0,50	0,70	0,71
12,62	1185	n.i.	0,11	0,21	0,27
15,28	1252	piperitenona	0,52	0,35	0,75
16,22	1271	n.i.	0,18	0,12	n.d.
17,04	1294	acetato de mentila	3,69	4,68	2,90
22,23	1418	trans-cariofileno	0,22	0,10	n.d.
24,84	1477	γ-muuroleno	0,25	0,40	0,18
29,27	1585	n.i.	n.d.	n.d.	0,11

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.14 – Compostos voláteis identificados em *Mentha sp.*

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
5,72	991	β-mirceno	0,33	0,41	n.d. ^d
6,15	1006	acetato de 3 <E> hexenol	0,54	0,46	0,27
9,27	1098	linalol	63,10	64,48	68,43
11,97	1173	mentol	0,17	n.d.	0,14
12,71	1189	α-terpineol	2,44	2,51	3,68
15,48	1257	Acetato de linalila	17,43	18,63	14,35
20,13	1363	n.i. ^c	n.d.	n.d.	0,15
20,95	1383	Acetato de geranila	0,68	0,39	0,44
21,32	1391	n.i.	0,18	n.d.	0,25
27,70	1549	elemol	5,43	7,56	2,33
29,32	1586	viridiflorol	4,21	3,67	3,58
30,90	1627	n.i.	0,31	n.d.	0,49
31,59	1649	β-eudesmol	1,55	n.d.	1,93
31,72	1652	α-eudesmol	1,98	n.d.	2,25
32,29	1663	M = 204	1,63	1,90	1,71

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.15 – Compostos voláteis identificados em *Mentha spicata*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
6,85	978	1-octen-3-ol	n.d. ^d	0,16	0,24
14,77	1183	p-cimen-8-ol	n.d.	n.d.	0,10
18,60	1271	M = 150	0,47	n.d.	0,15
19,34	1287	n.i. ^c	n.d.	1,35	1,80
23,00	1371	óxido de piperitenona	92,57	96,64	94,87
23,14	1374	n.i.	n.d.	n.d.	0,36
24,20	1398	Cis-jasmona	0,62	n.d.	0,39
24,28	1400	n.i.	n.d.	0,26	0,48
26,69	1458	β-farneseno	0,92	0,39	n.d.
27,70	1480	Germacreno D	1,35	0,95	0,24
28,77	1506	n.i.	n.d.	n.d.	0,20
29,95	1535	n.i.	n.d.	0,24	0,78
31,48	1573	M = 204	0,19	n.d.	0,40

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.16 – Compostos voláteis identificados em *Mikania glomerata*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
7,23	991	β-mirceno	n.d. ^d	n.d.	0,06
8,53	1026	Limoneno	0,47	n.d.	n.d.
9,02	1043	Benzeno acetaldeído	n.d.	n.d.	0,25
21,40	1333	n.i. ^c	n.d.	0,18	n.d.
21,52	1339	δ-elemeneno	2,24	5,30	1,53
23,19	1375	α-copaeno	0,88	1,64	1,76
23,82	1390	β-cubebeno	n.d.	0,30	0,35
23,90	1391	β-elemeneno	0,79	0,61	n.d.
25,10	1418	Trans-cariofileno	14,53	12,43	12,54
25,68	1433	γ-elemeneno	n.d.	0,40	n.d.
25,90	1437	n.i.	n.d.	n.d.	0,06
26,53	1454	α-humuleno	1,87	1,09	1,16
27,83	1480	Germacreno D	41,45	62,41	63,21
28,02	1487	M = 204	n.d.	n.d.	0,21
28,13	1490	M = 204	n.d.	n.d.	0,14
28,39	1491	Biciclogermacreno	9,81	8,43	7,99
28,50	1500	trans-β-guaieno	n.d.	n.d.	0,34
29,09	1513	γ-cadineno	n.d.	n.d.	0,61
29,47	1524	δ-cadineno	1,42	1,86	3,61
30,52	1549	elemol	1,97	0,10	n.d.
30,84	1556	Germacreno B	4,14	4,37	4,51
31,57	1575	Germacreno D-4-ol	n.d.	0,37	n.d.
31,67	1576	Espatulenol	2,97	n.d.	0,34
31,88	1582	Óxido de cariofileno	3,48	0,23	0,35
33,36	1619	n.i.	n.d.	0,13	0,14
33,70	1628	n.i.	n.d.	0,14	0,37
34,18	1640	M = 204	n.d.	n.d.	0,13
34,71	1654	α-cadinol	3,03	n.d.	0,34

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.17 – Compostos voláteis identificados em *Mikania laevigata*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
5,67	939	α -pineno	0,37	0,38	0,11
6,87	980	β -pineno	0,29	0,13	0,05
7,24	991	β -mirceno	0,36	0,38	0,12
21,53	1339	δ -elemeno	2,14	2,08	0,24
23,20	1375	α -copaeno	0,27	0,14	n.d. ^d
23,60	1384	β -bourboneno	0,21	0,25	0,07
23,84	1390	β -cubebeno	0,35	0,49	0,12
23,92	1391	n.i. ^c	0,19	0,32	n.d.
25,10	1418	Trans-cariofileno	9,45	5,91	2,09
25,82	1435	cumarina	23,18	15,53	62,49
26,54	1454	α -humuleno	0,55	0,64	0,20
27,56	1477	γ -muuroleno	0,16	n.d.	0,08
27,83	1480	Germacreno D	42,67	52,34	22,45
28,42	1491	Biciclogermacreno	14,38	16,55	7,42
29,09	1513	γ -cadineno	0,28	n.d.	0,23
29,48	1524	δ -cadineno	0,68	0,56	0,70
30,85	1556	Germacreno B	1,32	1,51	0,76
31,60	1575	Germacreno D-4-ol	0,48	0,51	n.d.
31,67	1576	Espatuleno	0,66	0,46	0,81
31,89	1582	n.i.	0,25	n.d.	0,09
33,70	1628	n.i.	n.d.	n.d.	0,10
34,15	1640	M = 204	0,21	n.d.	0,05
34,70	1654	M = 204	0,23	n.d.	0,18
44,57	1928	17-norkaur-15-ene, 13-metil-(8b,13b)	1,35	1,83	1,67

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.18 – Compostos voláteis identificados em *Ocimum basilicum*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
6,86	978	1-octen-3-ol	n.d. ^d	n.d.	0,29
8,64	1033	1,8-cineol	0,25	5,28	1,98
11,27	1098	Linalol	39,97	74,45	67,92
13,06	1143	Cânfora	6,14	1,85	1,48
14,01	1166	para-menta-1,5-dien-8-ol	0,30	n.d.	0,40
14,36	1174	Terpin-4-ol	0,48	n.d.	n.d.
15,03	1189	α -terpineol	n.d.	1,60	2,59
15,04	1190	α -terpinoleno	2,69	n.d.	n.d.
22,39	1356	eugenol	49,06	1,29	5,66
25,80	1436	α -trans-bergamoteno	n.d.	1,14	1,55
27,73	1477	γ -muuroleno	0,21	0,75	0,94
27,91	1486	n.i. ^c	n.d.	n.d.	0,46
28,77	1506	β -bisaboleno	n.d.	n.d.	1,86
29,11	1513	γ -cadineno	n.d.	n.d.	1,80
29,85	1533	n.i.	n.d.	n.d.	0,20
31,25	1566	Longipinanol	n.d.	n.d.	0,72
33,18	1617	1,10-di-EPI-cubenol	n.d.	n.d.	0,81
34,04	1638	EPI- α -cadinol	0,89	n.d.	n.d.
34,20	1642	cubenol	n.d.	13,64	10,54
34,46	1649	β -eudesmol	n.d.	n.d.	0,47
34,54	1652	α -eudesmol	n.d.	n.d.	0,33

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.19 – Compostos voláteis identificados em *Ocimum gratissimum*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
6,86	978	1-octen-3-ol	n.d. ^d	0,09	0,06
8,83	1035	n.i. ^c	n.d.	0,07	n.d.
9,22	1046	β-ocimeno	0,48	n.d.	n.d.
9,93	1068	Hidrato de cis-sabineno	n.d.	0,06	0,03
14,44	1177	terpin-4-ol	n.d.	0,07	0,04
22,70	1356	eugenol	94,26	99,45	99,87
23,23	1376	α-copaeno	0,51	n.d.	n.d.
25,09	1419	Trans-cariofileno	0,48	n.d.	n.d.
27,71	1480	Germacreno D	3,58	0,27	n.d.

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.20 – Compostos voláteis identificados em *Origanum applii*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
6,76	972	sabineno	n.d. ^d	n.d.	0,18
6,85	978	1-octen-3-ol	n.d.	n.d.	1,75
7,10	986	3-octanona	n.d.	1,26	1,03
7,24	991	β-mirceno	n.d.	n.d.	0,17
8,11	1018	α-terpineno	n.d.	1,11	0,54
8,38	1026	p-cimeno	0,39	2,28	1,14
8,82	1040	Cis-ocimeno	n.d.	1,41	0,99
9,61	1062	γ-terpineno	0,40	18,84	9,05
9,92	1068	hidrato de cis-sabineno	n.d.	3,04	3,32
10,75	1088	Terpinoleno	n.d.	n.d.	0,34
11,18	1098	linalol	8,05	13,07	14,74
14,43	1177	Terpin-4-ol	3,77	3,82	4,69
14,76	1183	p-cimen-8-ol	0,52	n.d.	0,28
15,00	1189	α-terpineol	0,52	n.d.	0,51
15,35	1195	Metil chavicol	n.d.	n.d.	0,63
16,95	1235	éter de metil timol	2,11	n.d.	0,42
17,61	1249	Timoquinona	8,23	n.d.	1,14
19,46	1294	timol	51,36	18,65	39,71
19,75	1298	carvacrol	1,00	n.d.	n.d.
23,57	1384	β-bourboneno	1,94	0,96	0,64
25,04	1432	β-gurjuneno	0,50	n.d.	n.d.
26,14	1458	seicheleno	0,34	n.d.	n.d.
27,34	1474	g-muuroleno	0,28	0,96	1,94
27,70	1480	Germacreno D	6,26	22,43	11,51
28,34	1491	Biciclogermacreno	1,06	3,45	2,20
28,93	1509	β-bisaboleno	2,41	n.d.	n.d.
29,07	1513	γ-cadineno	n.d.	n.d.	1,19
29,45	1524	δ-cadineno	1,15	n.d.	1,47
31,56	1575	Germacreno D-4-ol	n.d.	8,72	n.d.
31,68	1576	espatulenol	1,63	n.d.	n.d.
34,66	1655	α-cadinol	n.d.	n.d.	0,43

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.21 – Compostos voláteis identificados em *Origanum vulgare*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
5,49	926	Tricicleno	n.d. ^d	n.d.	0,18
6,77	976	Sabineno	n.d.	n.d.	0,44
6,86	978	1-octen-3-ol	0,25	n.d.	0,41
7,10	986	3-octanona	n.d.	0,77	0,80
7,75	1006	acetato de 3 <E> hexenol	n.d.	n.d.	0,49
8,12	1018	α -terpineno	n.d.	0,70	0,76
8,38	1021	p-cimeno	0,39	n.d.	n.d.
8,56	1031	β -felandreno	n.d.	n.d.	0,21
8,75	1054	Trans- β -ocimeno	1,21	n.d.	n.d.
9,62	1062	γ -terpineno	0,42	2,68	1,92
9,93	1068	hidrato de cis-sabineno	n.d.	1,91	1,61
11,15	1098	linalol	5,90	40,04	28,36
12,08	1121	Hidrato de cis-pineno	0,76	0,65	0,93
12,82	1140	Óxido de cis-limoneno	0,53	n.d.	0,45
13,94	1165	Borneol	1,47	0,78	0,60
14,46	1177	Terpin-4-ol	37,10	23,35	17,97
15,02	1189	α -terpineol	3,54	3,41	4,13
15,76	1205	Trans-piperitol	n.d.	n.d.	0,28
17,63	1249	Timoquinona	n.d.	n.d.	0,71
17,92	1257	Acetato de linalila	0,42	n.d.	0,40
19,48	1294	timol	40,98	23,00	37,77
25,10	1418	Trans-cariofileno	1,20	n.d.	n.d.
27,37	1472	n-dodecanol	n.d.	2,08	1,57
27,55	1477	γ -muuroleno	0,80	n.d.	n.d.
28,35	1491	Biciclogermacreno	1,33	0,62	n.d.

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

Tabela II.22 – Compostos voláteis identificados em *Piper aduncum*.

t _R (min)	IR ^a	Identificação	Clevenger ^b	PDMS ^b	PDMS-DVB ^b
4,90	904	n.i. ^c	2,47	n.d.	n.d.
6,76	972	sabineno	0,47	n.d.	n.d.
11,18	1098	linalol	3,44	2,62	4,40
11,30	1102	n.i.	1,05	n.d.	n.d.
15,02	1189	α -terpineol	1,54	n.d.	0,49
19,39	1285	safról	42,06	53,93	66,62
22,06	1351	α -cubebeno	n.d.	n.d.	0,68
25,55	1430	n.i.	3,50	n.d.	n.d.
27,38	1472	n-dodecanol	n.d.	n.d.	0,48
27,71	1480	Germacreno D	n.d.	n.d.	0,51
28,37	1496	M = 192	16,46	29,48	22,19
29,12	1514	cubebol	n.d.	6,58	0,75
29,48	1524	δ -cadineno	n.d.	n.d.	1,46
31,57	1575	Germacreno D-4-ol	n.d.	3,86	n.d.
31,66	1576	Espatulénol	7,40	n.d.	0,46
31,76	1580	M = 222	2,70	n.d.	n.d.
32,04	1587	M = 204	0,88	n.d.	n.d.
33,50	1624	M = 204	0,74	n.d.	n.d.
33,92	1635	M = 220	4,15	n.d.	n.d.
34,04	1638	n.i.	3,79	n.d.	n.d.
34,20	1642	n.i.	1,43	n.d.	n.d.
34,54	1651	M = 222	4,53	n.d.	n.d.
34,69	1655	α -cadinol	n.d.	n.d.	0,77
35,12	1666	n.i.	1,11	n.d.	n.d.
36,07	1691	n.i.	1,88	3,53	0,78

Notas: **a)** , **b)** , **c)** e **d)**: q.v. Tabela II.2.

O uso de dois tipos de fibra (PDMS-100 μ m e PDMS/DVB-65 μ m) na análise dos voláteis de plantas resultou em diferenças com relação aos valores das frações em porcentagem dos analitos, porém o perfil cromatográfico em termos gerais foi mantido. A fibra PDMS/DVB apresentou maior capacidade de extração, possibilitando a identificação de um número maior de analitos que a fibra PDMS. A análise dos voláteis das plantas utilizando a fibra de PDMS/DVB apresentou resultados semelhantes aos encontrados pela análise convencional da maior parte dos óleos essenciais, isto é, extração dos mesmos em sistema tipo Clevenger e posterior análise de uma solução contendo o óleo. Dessa forma, é viável a utilização

de SPME-GC com fibra PDMS/DVB para caracterização dos constituintes voláteis das plantas estudadas.

II.4.2. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.

Os resultados da concentração mínima inibitória (MIC) para os óleos essenciais das espécies estudadas são apresentados na tabela II.23. Os óleos que apresentaram forte atividade antimicrobiana estão em destaque na tabela.

Tabela II.23 – Concentração mínima inibitória (MIC) dos óleos essenciais. Valores expressos em mg· mL⁻¹.

Nome científico	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus faecium</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Achyrocline satureoides</i>	> 2,0	> 2,0	> 2,0	1,6	> 2,0
<i>Achillea millefolium</i>	1,0	0,5	> 2,0	1,0	0,25
<i>Aloysia gratissima</i>	> 2,0	> 2,0	> 2,0	0,7	> 2,0
<i>Aloysia triphylla</i>	0,8	0,05	0,6	0,5	0,8
<i>Ammi visnaga</i>	0,3	> 2,0	0,6	0,4	1,0
<i>Anthemis nobilis</i>	0,4	1,0	1,1	0,1	1,0
<i>Baccharis trimera</i>	0,1	> 2,0	> 2,0	0,3	> 2,0
<i>Cordia verbenacea</i>	0,6	> 2,0	> 2,0	0,4	> 2,0
<i>Cymbopogon martinii</i>	> 2,0	> 2,0	> 2,0	0,6	0,6
<i>Cymbopogon winterianus</i>	0,6	> 2,0	> 2,0	0,2	1,6
<i>Mentha arvensis</i>	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0	0,6
<i>Mentha piperita</i>	1,0	0,15	0,6	1,0	0,74
<i>Mentha sp</i>	1,0	> 2,0	1,2	0,9	1,0
<i>Mentha spicata</i>	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0
<i>Mikania glomerata</i>	0,25	0,12	0,5	0,25	0,25
<i>Mikania laevigata</i>	0,5	0,6	0,7	0,5	> 2,0
<i>Ocimum basilicum</i>	0,7	1,0	> 2,0	0,8	> 2,0
<i>Ocimum gratissimum</i>	1,0	0,3	0,6	1,1	> 2,0
<i>Origanum applii</i>	1,0	0,2	0,6	1,2	> 2,0
<i>Origanum vulgare</i>	1,0	0,4	0,6	1,0	2,0
<i>Piper aduncum</i>	0,6	> 2,0	> 2,0	0,1	> 2,0

Segundo ALIGIANNIS *et al.* (2001), as substâncias podem ser classificadas com relação a sua atividade antimicrobiana em três classes: forte atividade antimicrobiana ($MIC \leq 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), média atividade ($0,51\text{-}1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e fraca atividade ($MIC \geq 1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Avaliando-se os resultados da concentração mínima inibitória (tabela II.23) e relacionando-os com os constituintes majoritários dos óleos essenciais estudados (tabelas II.2 a II.22) observamos que de forma geral os analitos dos óleos essenciais que apresentam alta atividade antimicrobiana ($MIC \leq 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) são terpenos oxigenados (álcoois, cetonas e aldeídos) ou ainda alguns sesquiterpenos como: γ -muuroleno, trans-cariofileno, germacreno D e biciclogermacreno. Estes resultados são apresentados na tabela II.24 e são concordantes com dados da literatura (ISCAN *et al.*, 2002; DUKIC *et al.*, 2003, PICAGLIA *et al.*, 2004), que relacionam a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais principalmente a presença de monoterpenos oxigenados em sua constituição. O acúmulo dos compostos oxigenados na membrana plasmática ocasionaria perda de ATP pelos microrganismos, ocasionando o rompimento da membrana celular dos mesmos.

Tabela II.24 – Principais constituintes dos óleos essenciais com atividade antimicrobiana.

Planta	Microrganismo	Constituintes
<i>Achillea millefolium</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Streptococcus faecium</i>	γ -muuroleno – 27% PM 222 (IR 1629) – 28%
<i>Aloysia triphylla</i>	<i>Streptococcus faecium</i> <i>Bacillus subtilis</i>	neral – 26% geranial – 34%
<i>Ammi visnaga</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	linalol – 14% γ -muuroleno – 32%
<i>Antemisia nobilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	1,8-cineol – 34% PM 156 (IR 1046) – 31%
<i>Baccharis trimera</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	trans-cariofileno – 12% germacreno D – 30% biciclogermacreno – 40%
<i>Cordia verbenacea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	δ -elemeno – 42 % trans-cariofileno – 28%
<i>Cymbopogon martinii</i>	<i>Candida albicans</i>	trans-geraniol – 63% acetato de geranila – 28%
<i>Cymbopogon winterianus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	citronelal – 36% citronelol – 18% trans-geraniol – 11%
<i>Mentha arvensis</i>	<i>Candida albicans</i>	p-mentona – 12% mentol – 70%
<i>Mentha piperita</i>	<i>Streptococcus faecium</i>	p-mentona – 10% mentol – 71%
<i>Mikania glomerata</i>	<i>Streptococcus faecium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella choleraesuis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans</i>	trans-cariofileno – 14% germacreno D – 41% biciclogermacreno – 10%
<i>Mikania laevigata</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	cumarina – 23% germacreno D – 42% biciclogermacreno – 14%
<i>Ocimum gratissimum</i>	<i>Streptococcus faecium</i>	eugenol – 94%
<i>Origanum aegyptium</i>	<i>Streptococcus faecium</i>	linalol – 8% timoquinona – 8% timol – 51%
<i>Origanum vulgare</i>	<i>Streptococcus faecium</i>	terpin-4-ol – 37% timol – 41%
<i>Piper aduncum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	safrol – 42% PM 192 (IR 1496) – 16%

II.4.3. Composição química X atividade antimicrobiana.

A construção de um modelo matemático que relacionasse a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e sua composição através da análise cromatográfica (GC/MS) utilizando SPME, auxiliaria no estudo da atividade biológica destes óleos, pois facilitaria a identificação dos analitos com potencial atividade antimicrobiana, reduzindo o tempo de processamento das plantas e minimizando o consumo de solventes. Através da análise por SPME seria possível realizar um *screening* de plantas e utilizar os resultados obtidos no modelo matemático para identificar quais plantas teriam maiores possibilidades de produzir um óleo essencial com chances de ser utilizado terapeuticamente. Esta avaliação seria realizada sem a necessidade de coleta de grande quantidade de material vegetal e manipulação do mesmo para obtenção do óleo essencial.

As análises dos voláteis de 21 amostras da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP por SPME-GC utilizando uma fibra de PDMS/DVB (65 μm), forneceram os resultados apresentados nas tabelas II.2 a II.22. Os resultados de porcentagem relativa dos analitos e MIC dos óleos essenciais foram utilizados para elaboração do modelo.

A matriz gerada possui 152 colunas, sendo 147 referentes aos analitos identificados e 5 aos microrganismos, além de 21 linhas referentes às plantas estudadas. Ao se preencher a matriz muitos campos permanecem em branco, isto é, para uma determinada planta o analito correspondente não foi detectado. Devido a esta grande variabilidade de analitos encontrados não foi possível a geração do modelo proposto. A tabela II.25 é um exemplo de parte da matriz gerada onde se pode visualizar as porcentagens relativas dos analitos identificados e a MIC ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) dos óleos para cada microrganismo. Para efeito de construção da matriz, campos onde o analito não está presente foram preenchidos com o valor 0,001, e campos onde o valor de MIC foi superior a 2,0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ foram preenchidos com 3,000.

Tabela II.25 – Matriz gerada para avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Plantas	3-metil-4-heptanona	alfa-pineno	3-metil-ciclohexanona	sabineno	1-octen-3-ol	beta-pineno	6-metil-5-hepten-2-ona	3-octanona	<i>S. aureus</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. choterasuis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
	910	939	948	976	978	980	981	986					
<i>Achyrocline satureoides</i>	0,001	9,770	0,001	0,001	7,040	0,001	0,001	0,001	3,000	3,000	3,000	1,600	3,000
<i>Achillea millefolium</i>	0,001	0,001	0,001	1,660	1,060	0,001	0,001	0,001	1,000	0,500	3,000	1,000	0,250
<i>Aloysia gratissima</i>	0,001	0,001	0,001	0,190	0,001	1,250	0,001	0,001	3,000	3,000	3,000	0,700	3,000
<i>Aloysia triphylla</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,470	0,001	0,800	0,050	0,600	0,500	0,800
<i>Ammi visnaga</i>	0,750	0,380	0,001	0,860	0,001	0,001	0,001	0,001	0,300	3,000	0,600	0,400	1,000
<i>Anthemis nobilis</i>	6,560	9,540	2,830	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,400	1,000	1,100	0,100	1,000
<i>Baccharis trimera</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,100	3,000	3,000	0,300	3,000
<i>Cordia curassavica</i>	0,001	6,960	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,600	3,000	3,000	0,400	3,000
<i>Cymbopogon martinii</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	3,000	3,000	3,000	0,600	0,600
<i>Cymbopogon winterianus</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,600	3,000	3,000	0,200	1,600
<i>Mentha arvensis</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	3,000	3,000	3,000	3,000	0,600
<i>Mentha piperita</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	1,000	0,150	0,600	1,000	0,740
<i>Mentha sp</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	1,000	3,000	1,200	0,900	1,000
<i>Mentha spicata</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,240	0,001	0,001	0,001	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
<i>Mikania glomerata</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,250	0,120	0,500	0,250	0,250
<i>Mikania laevigata</i>	0,001	0,110	0,001	0,001	0,001	0,050	0,001	0,001	0,500	0,600	0,700	0,500	3,000
<i>Ocimum basilicum</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,290	0,001	0,001	0,001	0,700	1,000	3,000	0,800	3,000
<i>Ocimum gratissimum</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,060	0,001	0,001	0,001	1,000	0,300	0,600	1,100	3,000
<i>Origanum applii</i>	0,001	0,001	0,001	0,180	1,730	0,001	0,001	1,020	1,000	0,200	0,600	1,200	3,000
<i>Origanum vulgare</i>	0,001	0,001	0,001	0,440	0,400	0,001	0,001	0,790	1,000	0,400	0,600	1,000	2,000
<i>Piper aduncum</i>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,600	3,000	3,000	0,100	3,000

II.5. CONCLUSÕES

- ✓ A análise de voláteis de plantas através da técnica SPME-GC mostrou-se adequada quando comparada com a análise dos óleos essenciais obtidos por técnicas tradicionais (hidrodestilação em sistema Clevenger). A técnica oferece as vantagens do uso de pequena quantidade de amostra e eliminação do uso de solventes orgânicos.
- ✓ A fibra PDMS/DVB (65 μm) mostrou-se mais eficiente para extração dos voláteis em comparação com a fibra PDMS (100 μm).
- ✓ A avaliação da atividade antimicrobiana forneceu resultados promissores para alguns dos óleos essenciais estudados. Vários desses óleos apresentaram forte atividade ($\text{MIC} \leq 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), indicando uma continuidade dos trabalhos para identificação do(s) analito(s) responsável(is) pela atividade. No caso particular da levedura *Candida albicans*, os óleos essenciais de *Achillea millefolium* e *Mikania glomerata* são muito interessantes, pois este microrganismo em particular é muito resistente a drogas antifúngicas.
- ✓ Não foi possível relacionar diretamente a composição química dos óleos essenciais e das frações voláteis determinadas por HS-SPME-GC-MS com a atividade antimicrobiana dos mesmos devido a grande variabilidade na composição das amostras selecionadas, porém os constituintes oxigenados desses óleos parecem ser os responsáveis por tal atividade.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam, K.; Sivropoulou, A.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M.; "Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 1739-1745, 1998.

Adams, R.P.; "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy", Allured Publishing, 469 pag., (1995).

Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I.B.; "Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 4168-4170, 2001.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Araújo, C.; Sousa M.J.; Ferreira, M.F.; Leão, C., "Activity of essential oils from Mediterranean *Lamiaceae* species against food spoilage yeasts", *Journal Food Protection* **66**: 625-632, 2003.

Aresta, A.; Monaci, L.; Zambonin, C.G.; "Determination of delorazepan in urine by solid-phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography", *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **28**: 965-972, 2002.

Arthur, C.L.; Killam, L.M.; Buchholz, K.D.; Pawliszyn, J., "Automation and Optimization of Solid-phase microextraction", *Analytical Chemistry* **64**: 1960-1966, 1992.

Aulakh, J.S.; Malik, A.K.; Mahajan, R.K.; "Solid phase microextraction-high pressure liquid chromatographic determination of Nabam, Thiran and Azamethiphos in water samples with UV detection: preliminary data", *Talanta* **66**: 266-270, 2005.

Barceló, D.; "Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water", *Journal of Chromatography A* **643**: 117-143, 1993.

Cao, C.F.; Wang, Z.; Urruty, L.; Pommier, J.J.; Montury, M.; "Focused microwave assistance for extracting some pesticide residues from strawberries into water before their determination by SPME/HPLC/DAD", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 5092-5097, 2001.

Cárdenes, L.; Ayala, J.H.; Afonso, A.M.; González, V.; "Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines", *Journal of Chromatography A* **1030**: 87-93, 2004.

Chang, W.Y.; Sung, Y.H.; Huang, S.D.; "Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography", *Analytica Chimica Acta* **495**: 109-122, 2003.

Chen, J.; Pawliszyn, J.; "Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography", *Analytical Chemistry* **67** (15): 2530-2533, 1995.

Chernoviz, P.L.N.; "A grande Farmacopéia Brasileira: formulário e guia médico"; Belo Horizonte: Editora Itatiaia Ltda, v.2; 856-856, 1996.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes para o seu enquadramento. *Documento*, Brasília, p. 1-23, mar.2005.

Consentinio, S.; Tuberoso, C.I.G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E.; Palmas, F.; "In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils", *Letter in Applied Microbiology* **29**: 130-135, 1999.

Dukic, N.M.; Bozin, B.; Sokovic, M.; Mahajlovic, B.; Matavulj, M., "Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils", *Planta Medica* **69**: 413-419, 2003.

Ellof, J.N.; "A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria", *Planta Medica* **64**: 711-713, 1998.

Galli, A.; Franzetti, L.; Briguglio, D.; Attività antimicrobica in vitro di oli essenziali ed estratti di spezie di uso alimentare., *Industrie alimentari*, 463-466, 1985.

Hatrík, S.; Tekel, J.; "Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water", *Journal of Chromatography A* **733**: 217-233, 1996.

Huang, S.D.; Huang, H.I.; Sung, Y.H.; "Analysis of triazine in water by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography", *Talanta* **64**: 887-893, 2004.

Hulin, V.; Mathot, A.G.; Mafart, P.; Dufosse, L.; "Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes.", *Sciences des Aliments* **18**: 563-582, 1998.

Iscan, G.; Kirimer, N.; Kurkcuoglu, M.; Can Baser, K.H.; Demirci, F.; "Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 3943-3946, 2002.

Iwalokun, B.A.; Gbenle, G.O.; Adewole, T.A.; Smith, S.I.; Akinsinde, K.A.; Omonigbehin, E.O.; "Effects of *Ocimum gratissimum* L. essential oil at subinhibitory concentrations on virulent and multidrug-resistant *Shigella* strains from Lagos, Nigeria", *APMIS* **111**: 477-482, 2003.

Jain, A.K., Thomas, N.S., Panchagnula, R., "Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride. I. Effect of terpenes", *Journal of Controlled Release* **79**: 93-101, 2002.

Jansen, A.M., Scheffer, J.J.C.; Svendeaen, A.B.; "Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species", *Pharmazie* **45**: 70, 1987.

Jinno, K.; Muramatsu, T.; Saito, Y.; Kiso, Y.; Magdic, S.; Pawliszyn, J.; "Analysis of pesticides in environmental water samples by solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography A* **754**: 137-144, 1996.

Kayali, N.; Tamayo, F.G.; Polo-Diez, L.M.; "Determination of diethylhexyl phthalate in water by solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography", *Talanta* **69**: 1095-1099, 2006.

Lin, H.H.; Sung, Y.H.; Huang, S.D.; "Solid-phase microextraction coupled high-performance liquid chromatography for the determination of phenylurea herbicides in aqueous samples", *Journal of Chromatography A* **1012**: 57-66, 2003.

Louch, D.S.; Motlagh, S.; Pawliszyn, J.; *Journal of Analytical Chemistry* **64**: 1187-1194, 1992.

Mazzanti, G.; Battinelli, L.; Salvatore, G., "Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae)", *Flavour and Fragrance Journal* **13**: 289-294, 1998.

Millán, S.; Sampedro, M.C.; Unceta, N.; Goicolea, M.A.; Rodriguez, E.; Barrio, R.J.; "Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine", *Journal of Chromatography A* **995**: 135-142, 2003.

Motlagh, S.; Pawliszyn, J.; "On-line monitoring of flowing samples using solid phase microextraction-gas chromatography", *Analytica Chimica Acta* **284**: 265-273, 1993.

Nakamura, C.V.; Nakamura, T.U.; Bando, E.; Melo, A.F.N.; Cortez, A.G.; Dias Filho, B.P.; "Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil", *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**: 675-678, 1999.

Negrão, M.R.; Alpendurada, M.F.; "Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection", *Journal of Chromatography A* **823**: 211-218, 1998.

Neto, B.B.; Scarmínio, I.S.; Bruns, R.E.; “Planejamento e otimização de experimentos”, UNICAMP, Campinas/SP, 61-132, 1995.

Oliveira, A.R.M.; Cesarino, E.J.; Bonato, P.S.; “Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine”, *Journal of Chromatography B* **818**: 285-291, 2005.

OMS - Organização Mundial da Saúde - *Guías para la calidad del água potable*. V.1 Recomendaciones. 2^a ed., Genebra, 1995.

Piccaglia, R.; Biavati, B.; Marotti, I.; Marotti, M., “Characterization and biological activity of several essential oils from different species”, trabalho apresentado no 32^o Congresso Nazionale Società Italiana di Microbiologia, 26 -29/09/2004, Milão/IT.

Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A.G.; Pinto, E.; Oliveira, S.C.; Tavares, C.; Salgueiro, L.; Cavaleiro, C.; Gonçalves, M.J.; Oliveira, J.M., “Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds”, *JEADV* **18**: 73-78, 2004.

Prosen, H.; Fingler, S.; Zupancic-Kralj, L.; Drevenkar, V., “ Partitioning of selected environmental pollutants into organic matter as determined by solid-phase microextraction”, *Chemosphere* **66**: 1580-1589, 2007.

Rial_otero, R.; Gaspar, E.M.; Moura, I.; Capelo, J.L., “Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: A review”. *Talanta* (in press).

Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C.; “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos”, *Química Nova* **27**: 771-780, 2004.

Ristic, M.; Sokovic, M.; Grubisic, D.; Kovacevic, N., “Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Achillea atrata* L”, *Journal of Essential Oil Research* **16**: 75-78, 2004.

Rodrigues, J.C.; Santos Neto, A.J.; Fernandes, C.; Alves, C.; Contadori, A.S.; Lanças, F.M.; “Development of an improved heated interface for coupling solid-phase microextraction to high-performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A* **1105**: 208-212, 2006.

Salgueiro, L.R.; Cavaleiro, C.; Pinto, E.; Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A.G.; Palmeira, A.; Tavares, C.; OLIVEIRA, S.C.; Gonçalves, M.J.; OLIVEIRA, J.M.; “Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species”, *Planta Medica*, **69**: 871-874, 2003.

Sánchez-Ortega, A.; Sampedro, M.C.; Unceta, N.; Goicolea, M.A.; Barrio, R.J.; “Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and eletrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples”, *Journal of Chromatography A* **1094**: 70-76, 2005.

Sarbhoj, A.K.; Varshney, J.L.; Maheshwari, M.L.; Saxena, D.B.; "Efficacy of some essential oils and their constituents on few ubiquitous molds", *Zentralbl. Bakteriol. (Naturwiss.)* **133**: 723-725, 1978.

Silva, F.C.; Cardeal, Z.L.; Carvalho, C.R.; "Determinação de pesticidas organofosforados em água usando microextração em fase sólida e CGAR-EM", *Química Nova* **22** (2): 197-200, 1999.

Silva, R.G.C.; Augusto, F.; "Highly porous solid-phase microextraction fiber coating based on poly(ethylene glycol)-modified ormosils synthesized by sol-gel technology", *Journal of Chromatography A* **1072**: 7-12, 2005.

Souza, E.C.; "Bactérias ultrarresistentes: uma guerra quase perdida", *Ciência Hoje* **138**: 26-35, 1998.

Theodoridis, G.; "Application of solid phase microextraction in the investigation of protein binding of pharmaceuticals", *Journal of Chromatography B* **830**: 238-244, 2006.

Theodoridis, G.; Lontou, M.A.; Michopoulos, F.; Sucha, M.; Gondova, T.; "Study of multiple solid-phase microextraction combined off-line with high performance liquid chromatography application in the analysis of pharmaceuticals in urine", *Analytica Chimica Acta* **516**: 197-204, 2004.

Toledo, E.G.; Prat, M.D.; Alpendurada, M.F.; "Solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of phenolic compounds in water", *Journal of Chromatography A* **923**: 45-52, 2001.

USP – The United States Pharmacopeia. The National Formulary. 26^a ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

Wu, L.; Almirall, J.R.; Furton, K.G.; "An Improved interface for coupling solid-phase microextraction (SPME) to high performance liquid chromatography (HPLC) applied to the analysis of explosives", *Journal of High Resolution Chromatography* **22**(5): 279-282, 1999.

Zambonin, C.A.; "Coupling solid-phase microextraction to liquid chromatography. A review", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **375**: 73-80, 2003.

Zambonin, C.G.; Monaci, L.; Aresta, A.; "Solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography and diode array detection for the determination of mycophenolic acid in cheese", *Food Chemistry* **78**: 249-254, 2002.

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

ANEXO 1

ESPECTROS DE MASSA DOS ANALITOS NÃO IDENTIFICADOS

1. *Achillea millefolium*

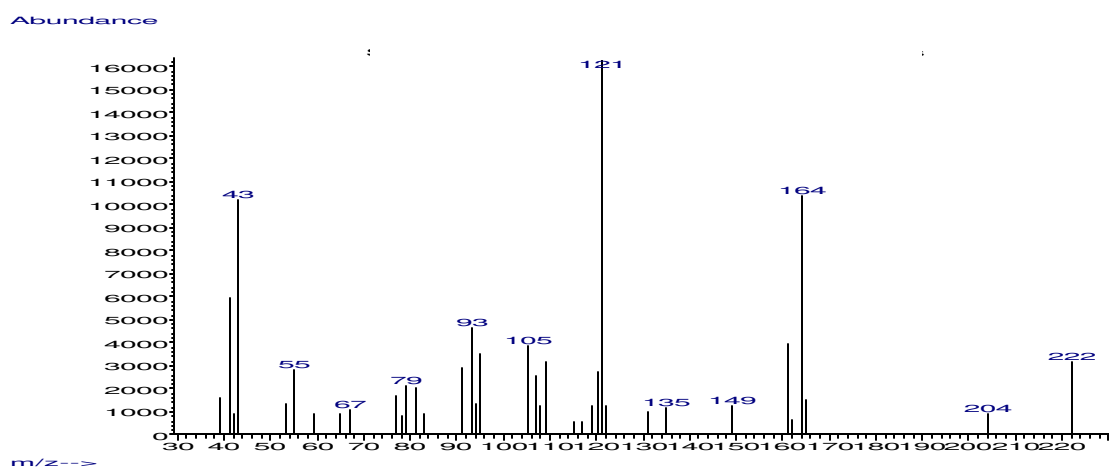


Figura 1 – Espectro de massas do analito com $t_R = 30,02$ min

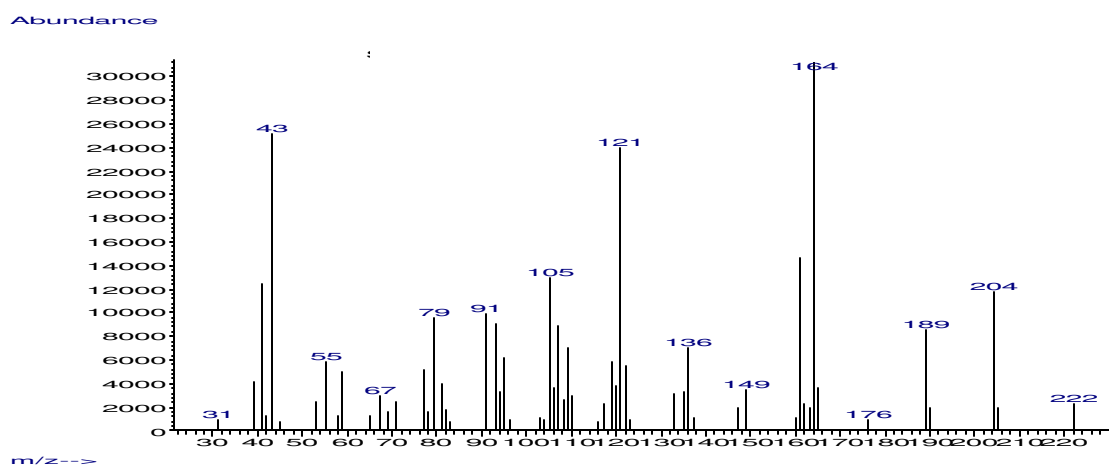


Figura 2 – Espectro de massas do analito com $t_R = 30,90$ min

2. *Aloysia gratissima*

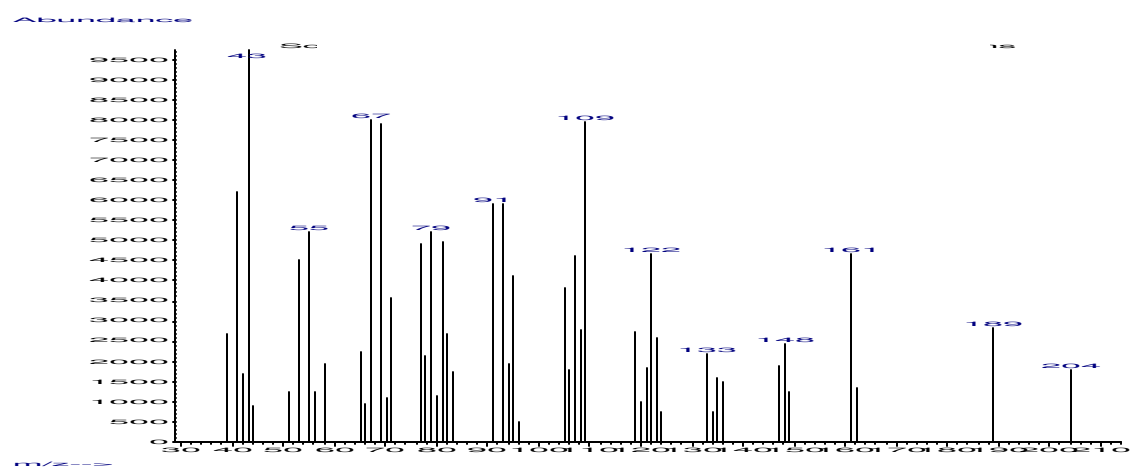


Figura 3 – Espectro de massas do analito com $t_R = 29.31$ min

3. *Aloysia triphylla*

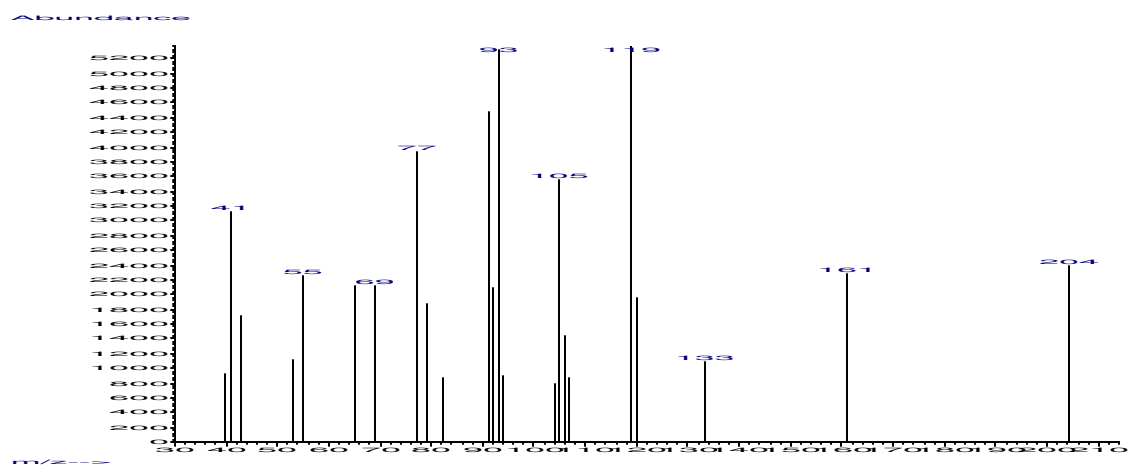


Figura 4 – Espectro de massas do analito com $t_R = 26,19$ min

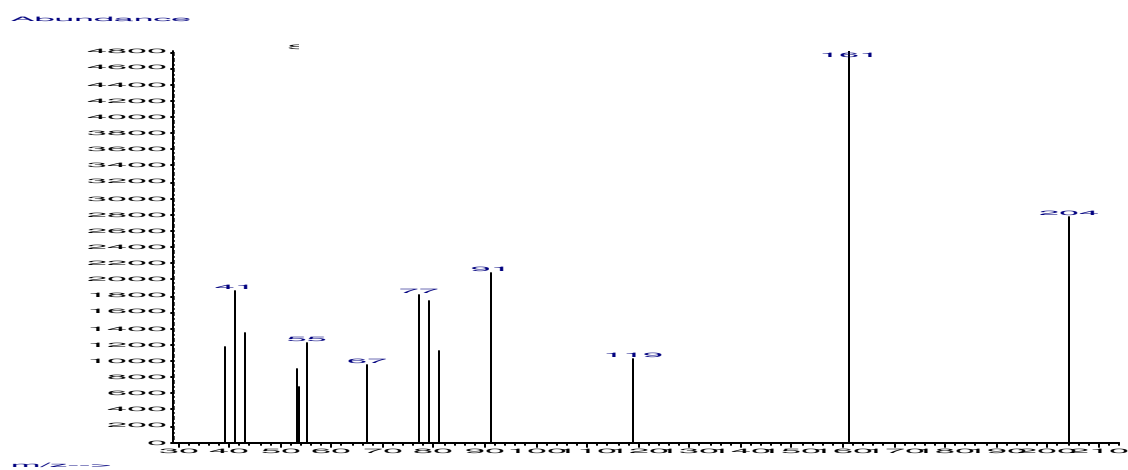


Figura 5 – Espectro de massas do analito com $t_R = 31,24$ min

4. *Anthemis nobilis*

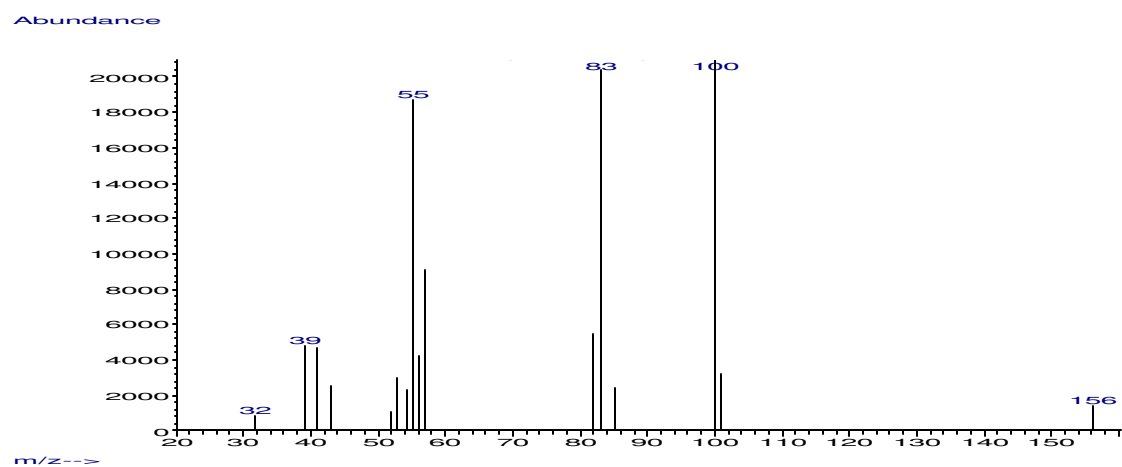


Figura 6 – Espectro de massas do analito com $t_R = 7,50$ min

5. *Cordia verbenacea*

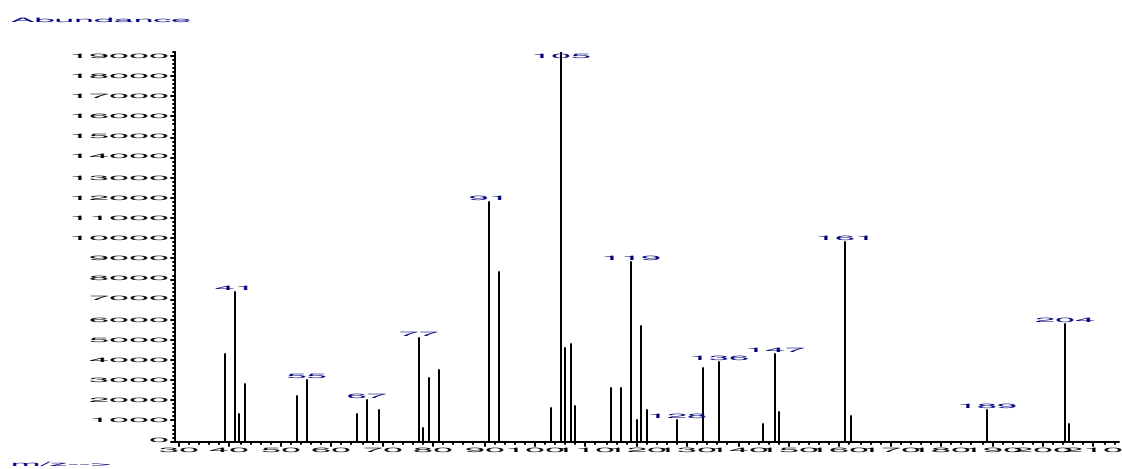


Figura 7 – Espectro de massas do analito com $t_R = 25.42$ min

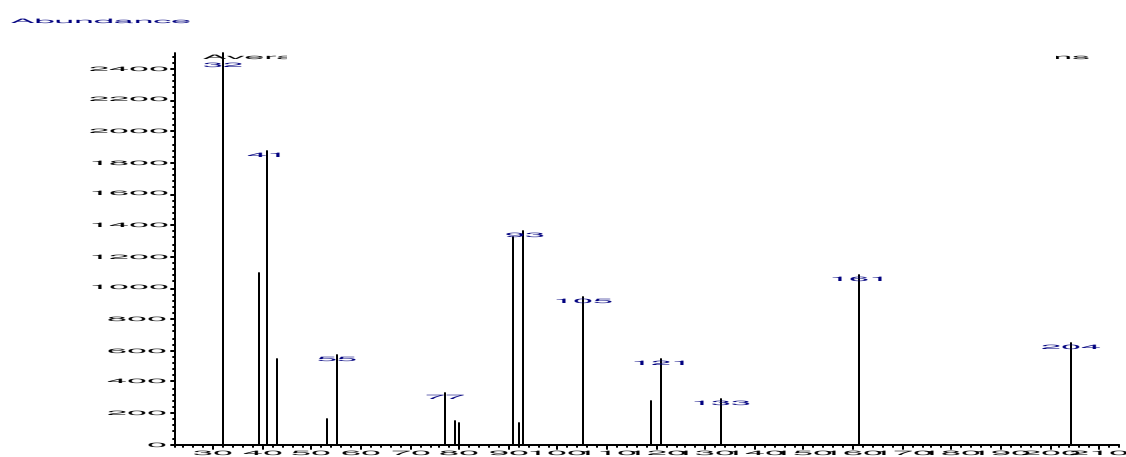


Figura 8 – Espectro de massas do analito com $t_R = 26.46$ min

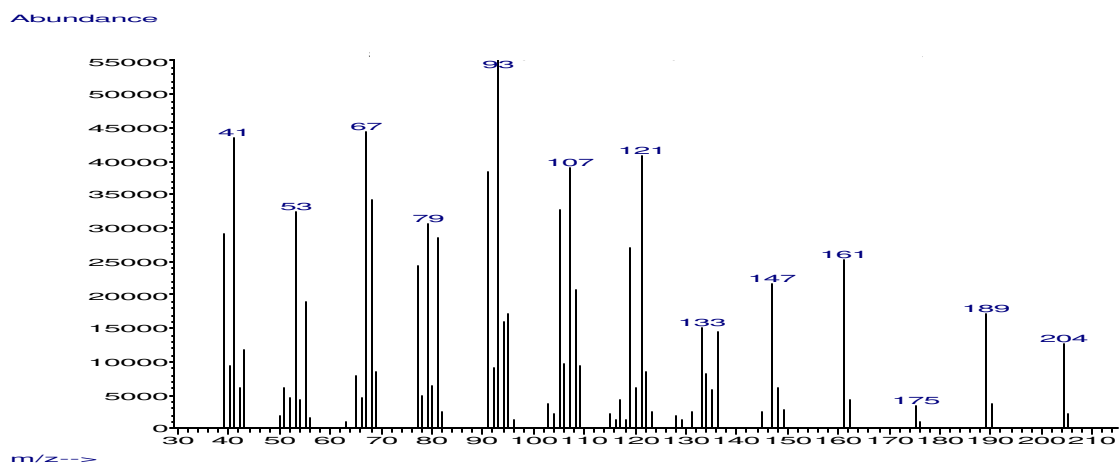


Figura 9 – Espectro de massas do analito com $t_R = 28,55$ min

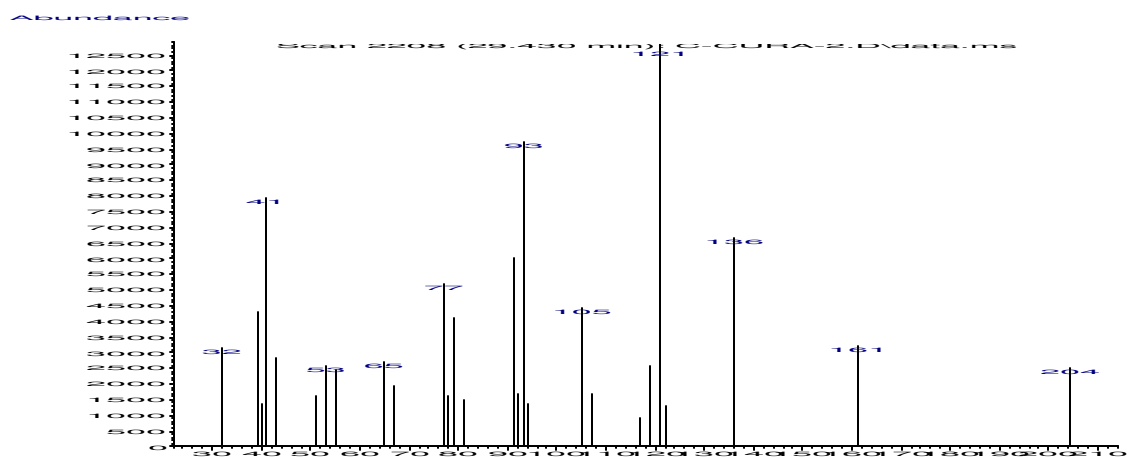


Figura 10 – Espectro de massas do analito com $t_R = 29,44$ min

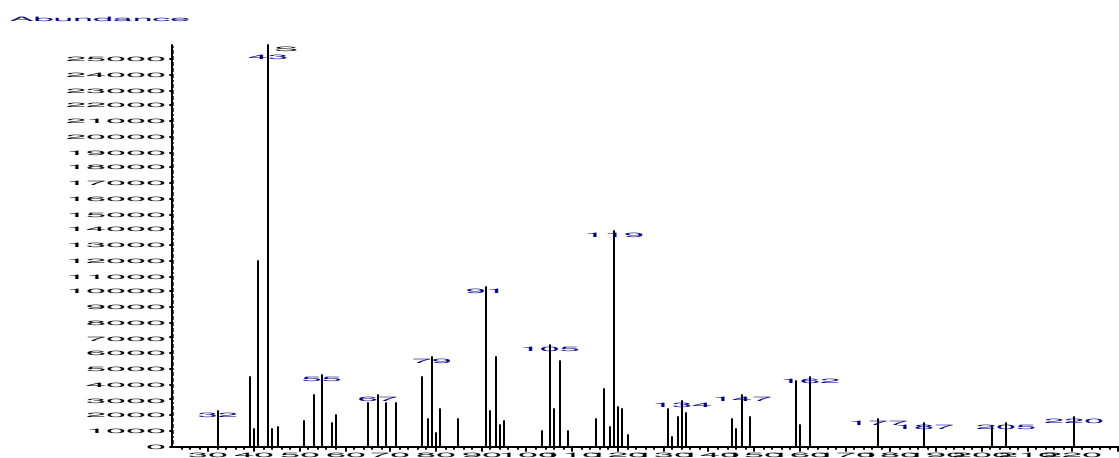


Figura 11 – Espectro de massas do analito com $t_R = 33,70$ min

6. *Cymbopogun winterianus*

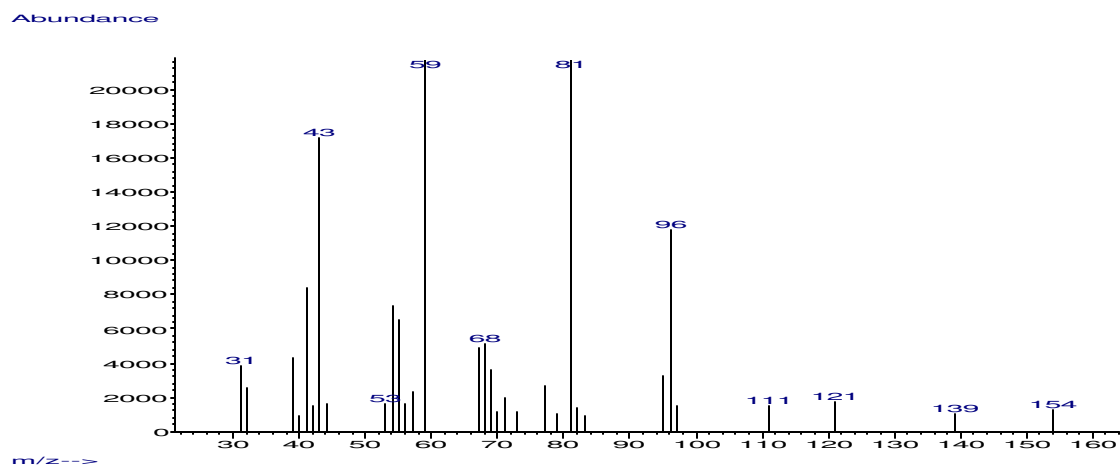


Figura 12 – Espectro de massas do analito com $t_R = 21,27$ min

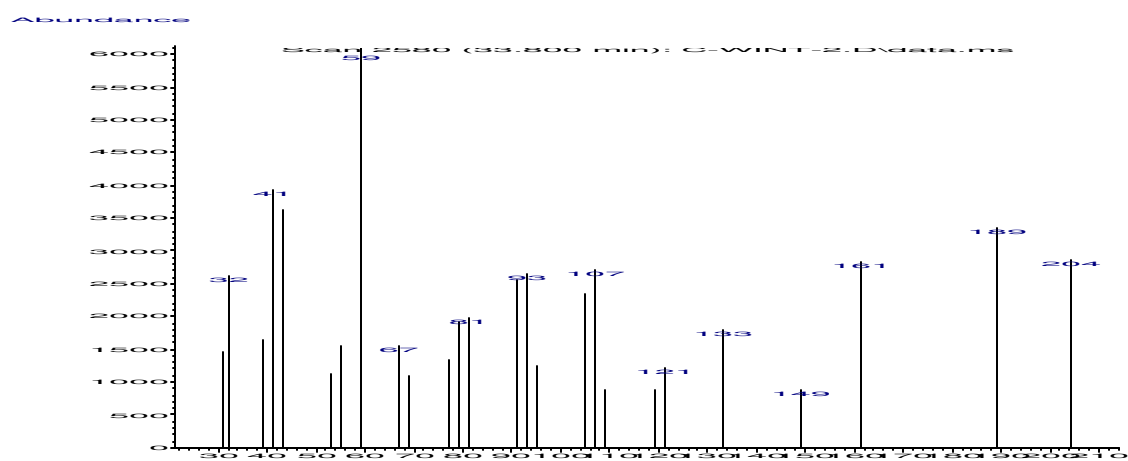


Figura 13 – Espectro de massas do analito com $t_R = 33,82$ min

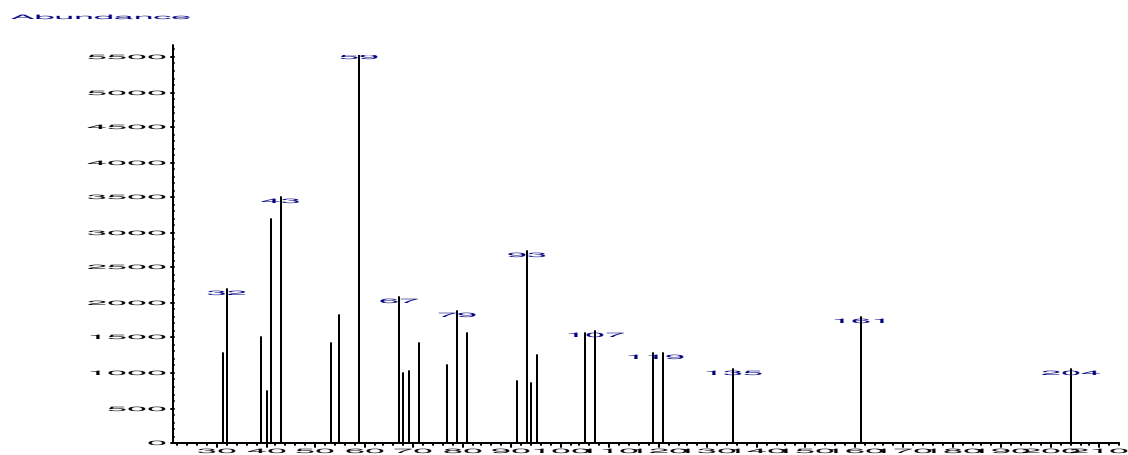


Figura 14 – Espectro de massas do analito com $t_R = 35,27$ min

7. *Mentha arvensis*

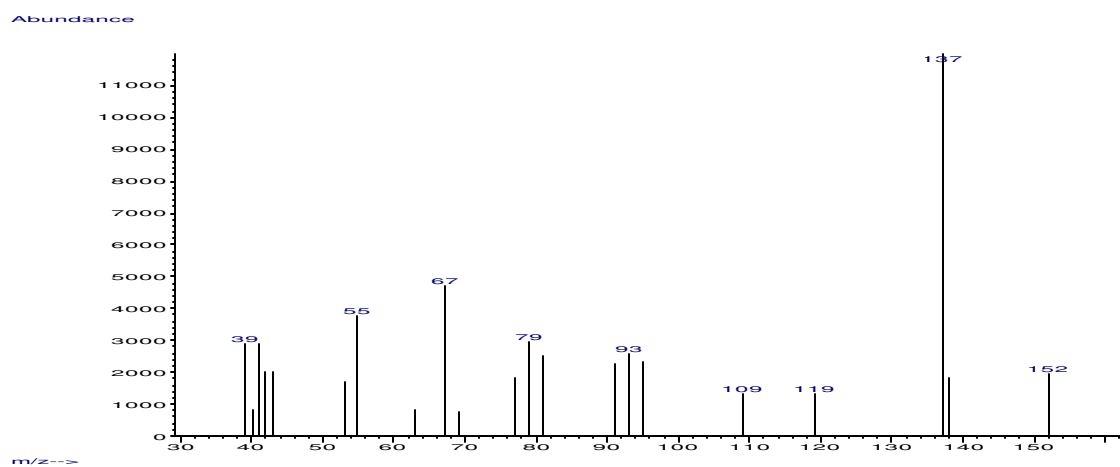


Figura 15 – Espectro de massas do analito com $t_R = 10.62$ min

8. *Mentha sp*

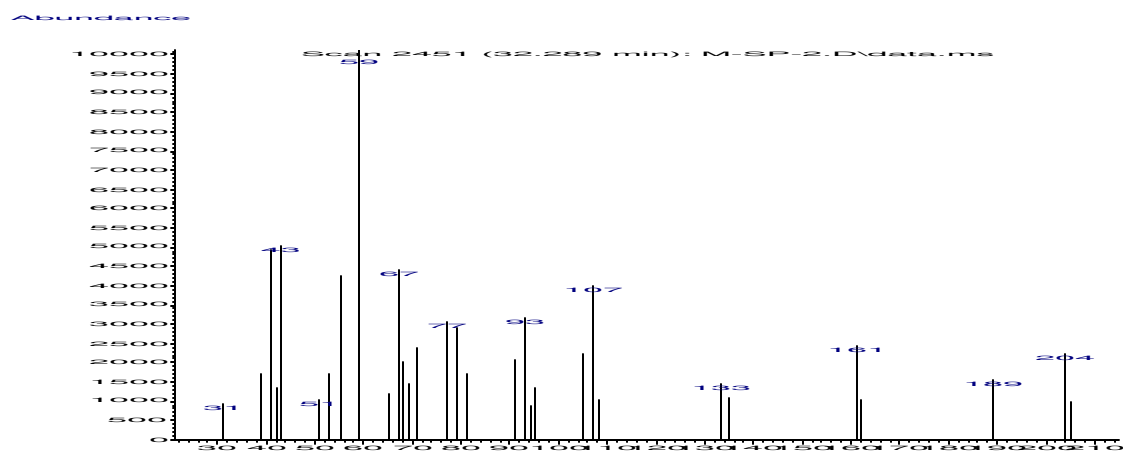


Figura 16 – Espectro de massas do analito ($t_R = 32.29$ min) de *Mentha sp*.

9. *Piper aduncum*

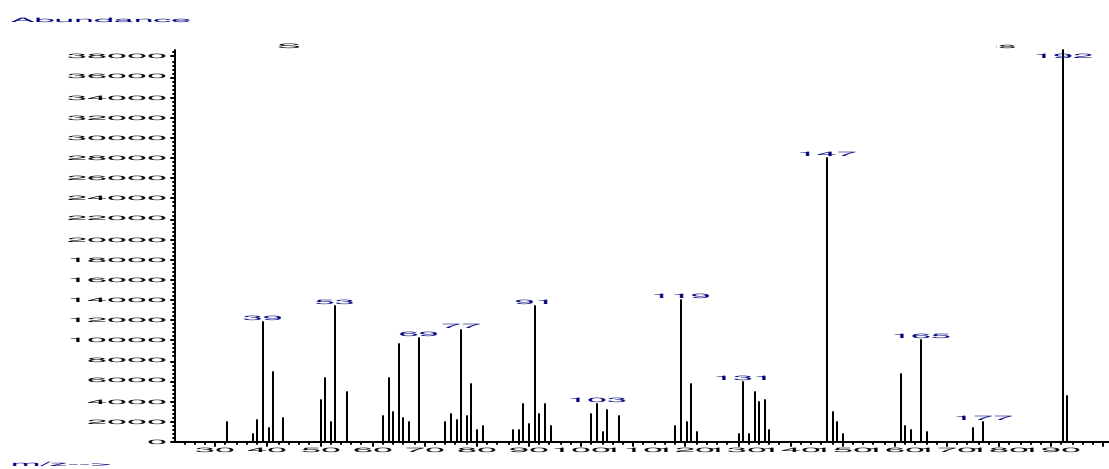


Figura 17 – Espectro de massas do analito com $t_R = 28,37$ min

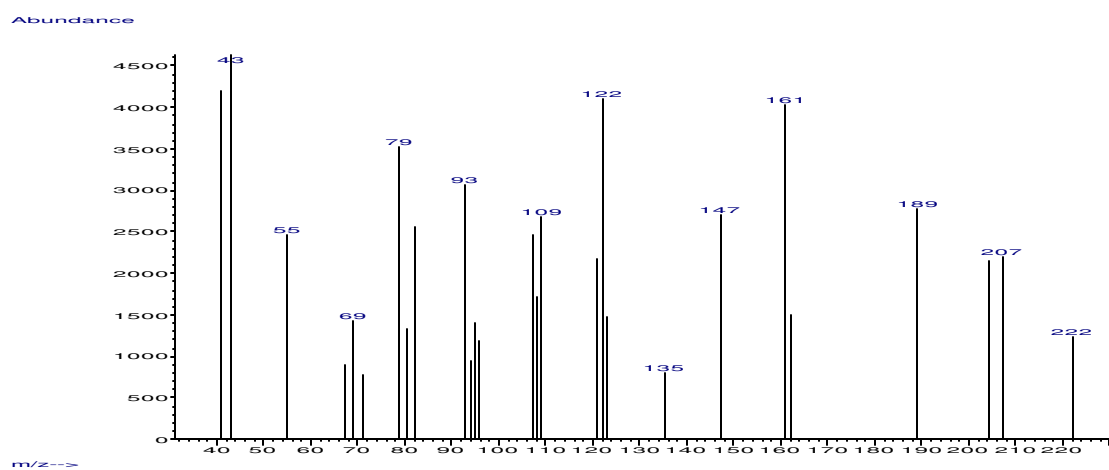


Figura 18 – Espectro de massas do analito com $t_R = 31,76$ min

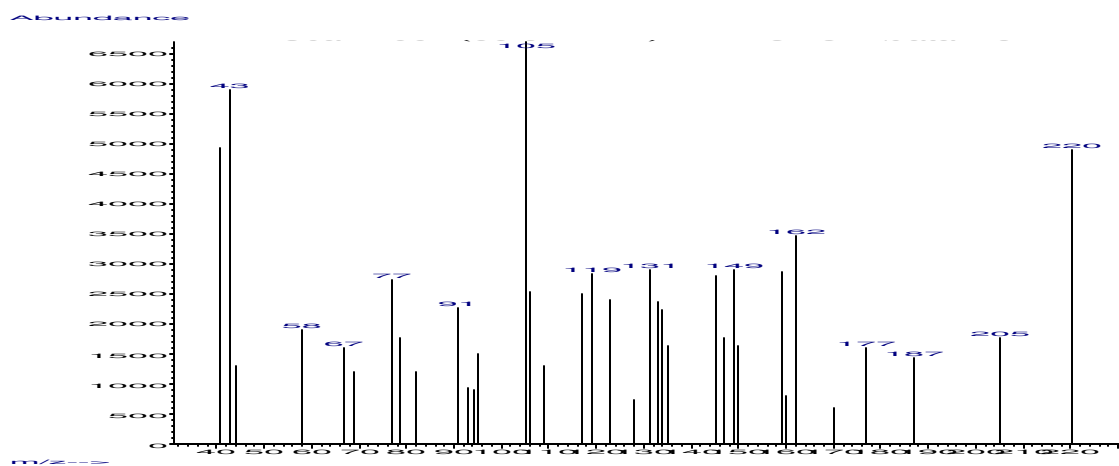


Figura 19 – Espectro de massas do analito com $t_R = 33,92$ min

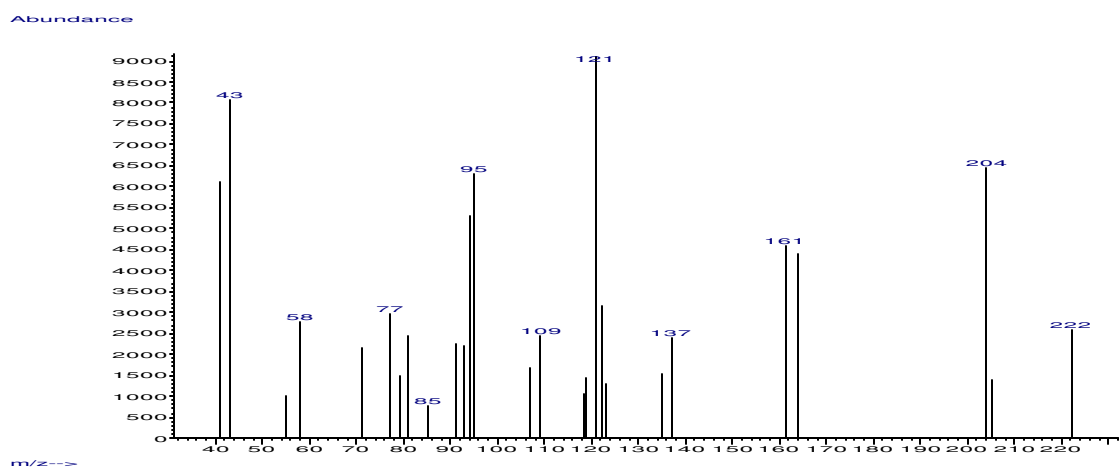


Figura 20 – Espectro de massas do analito com $t_R = 34,54$ min

ANEXO 2

CROMATOGRAMAS (GC/MSD) DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

1. *Achyrocline saturoides*

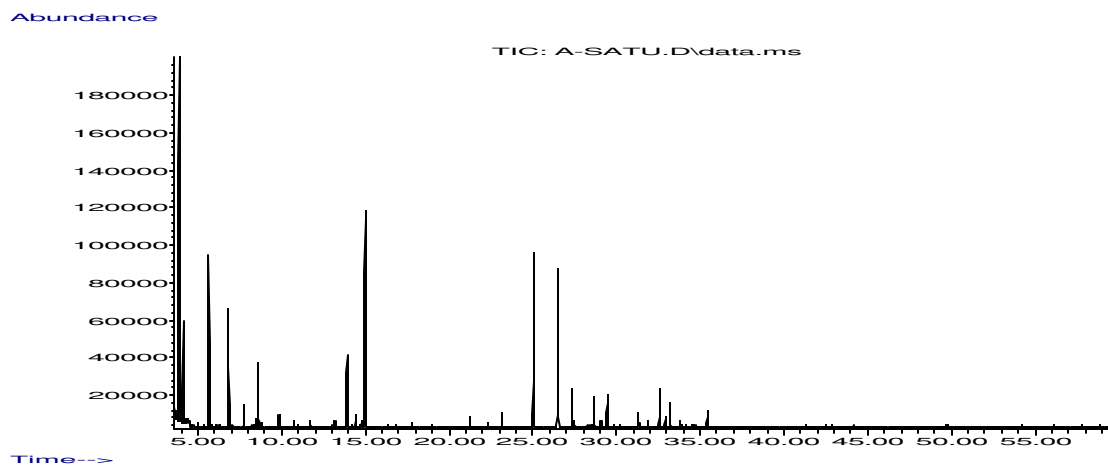


Figura 1 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

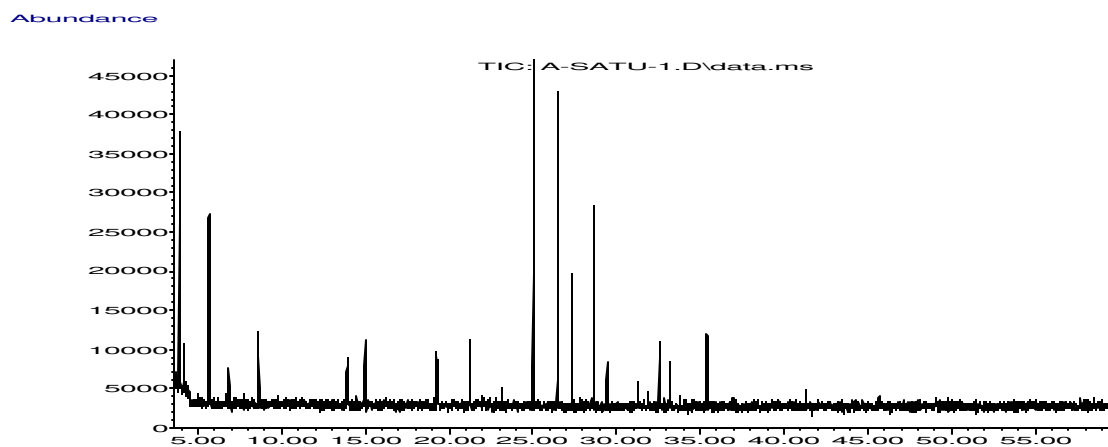


Figura 2 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

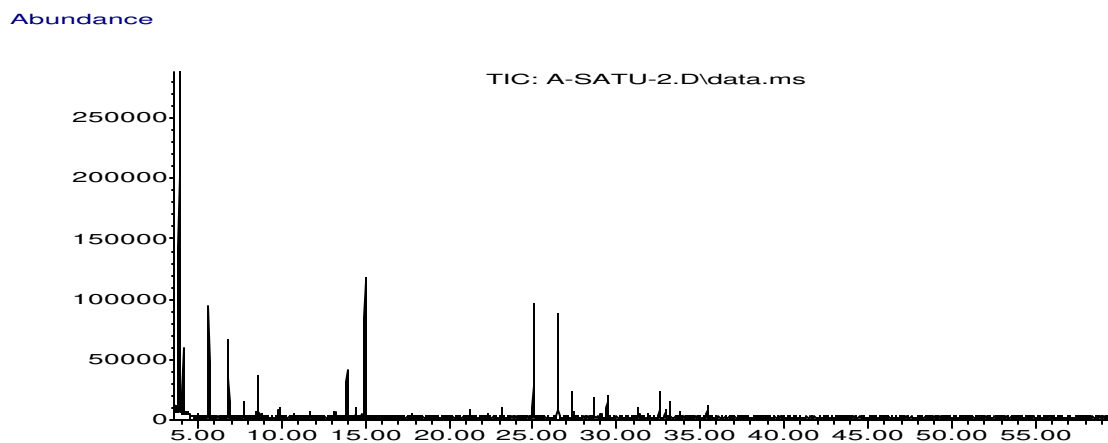


Figura 3 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

2. *Achillea millefolium*

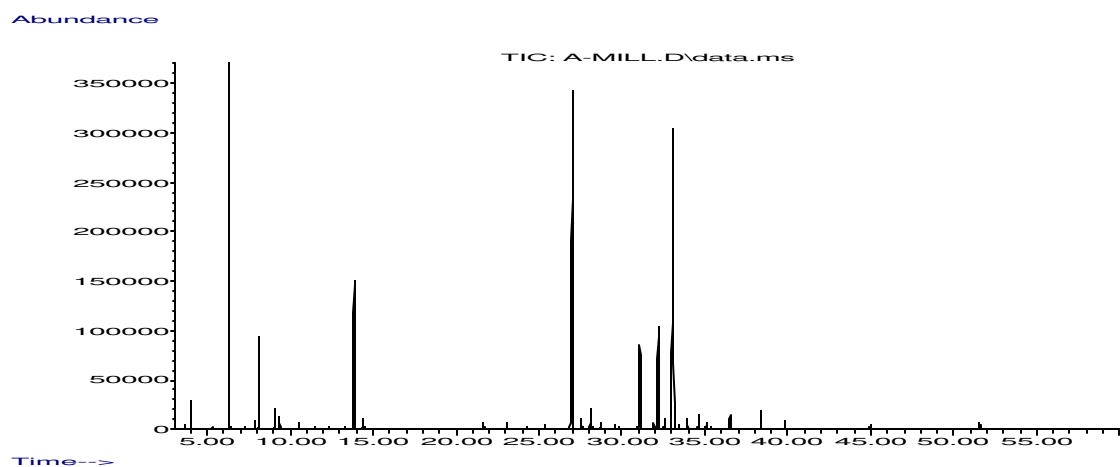


Figura 4 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.



Figura 5 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.



Figura 6 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

3. *Aloysia gratissima*

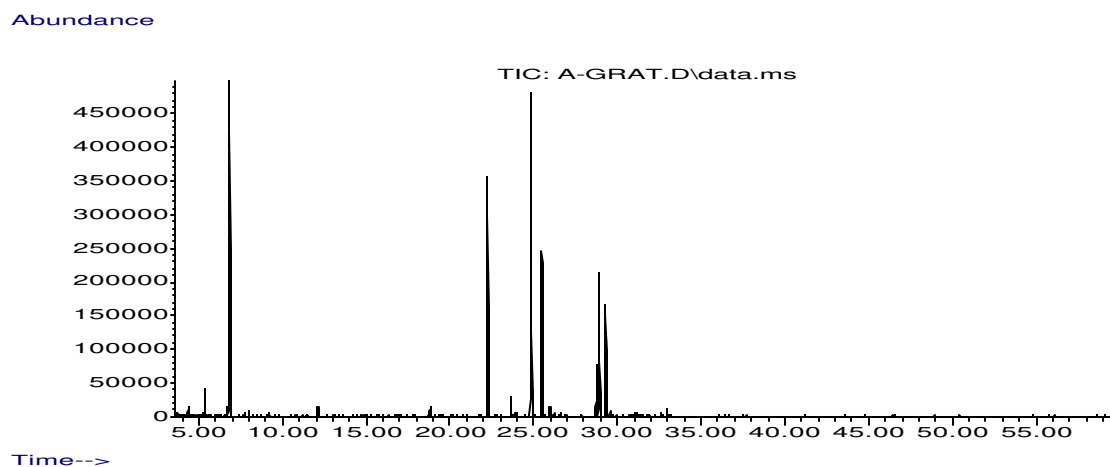


Figura 7 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

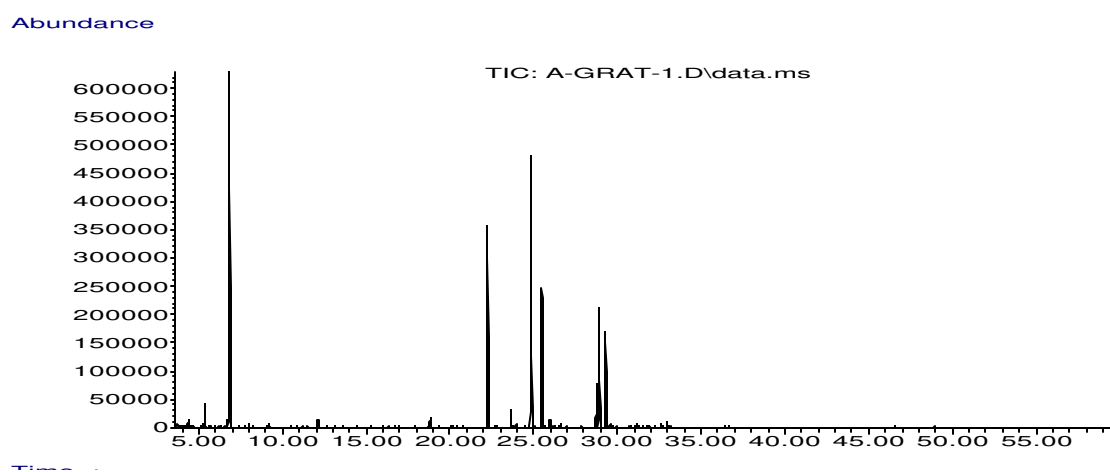


Figura 8 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

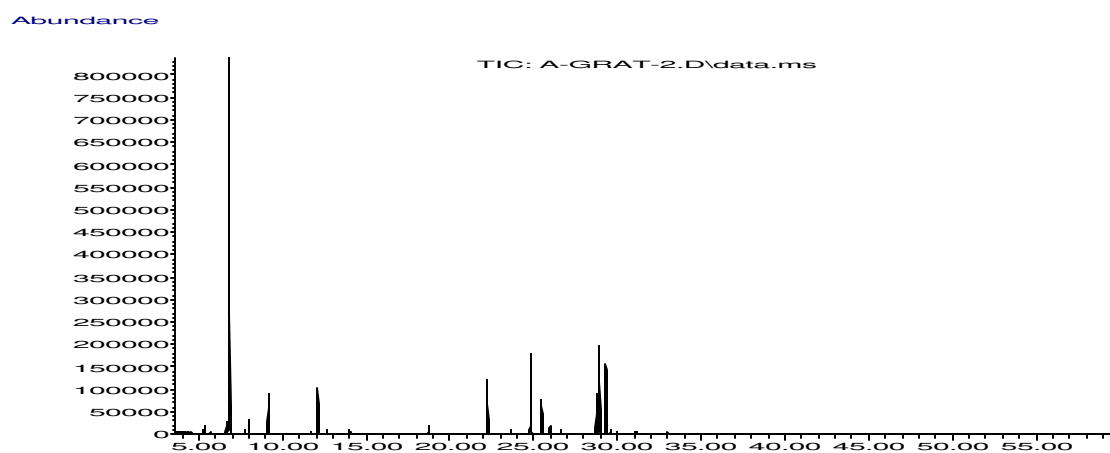


Figura 9 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

4. *Aloysia triphylla*

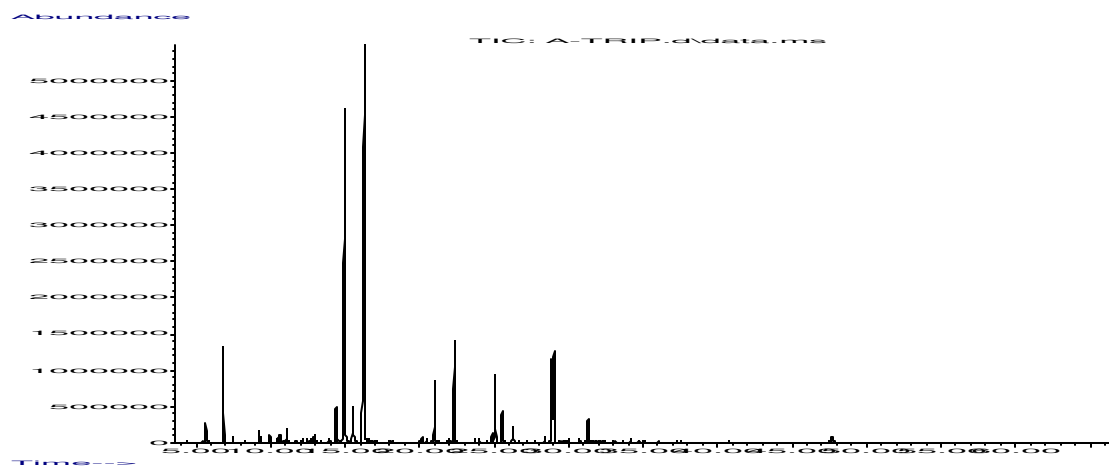


Figura 10 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

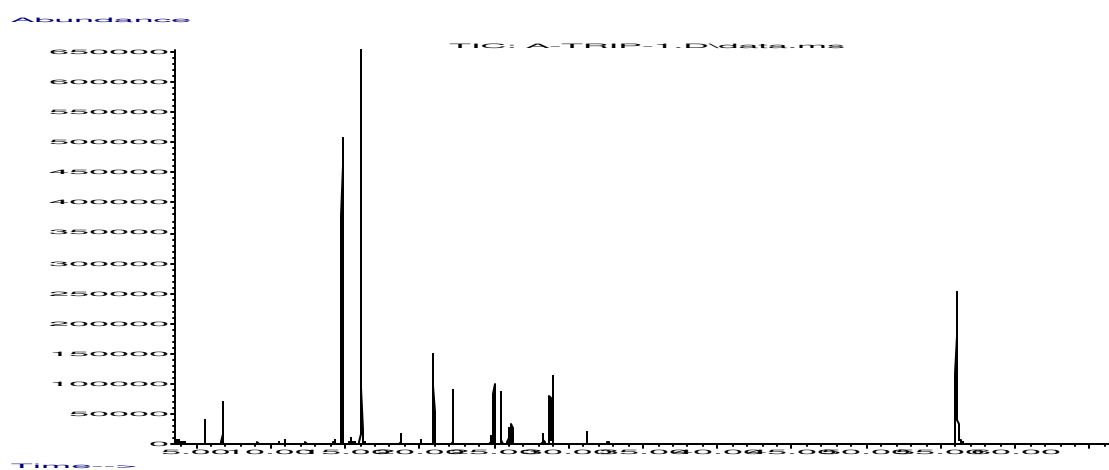


Figura 11 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

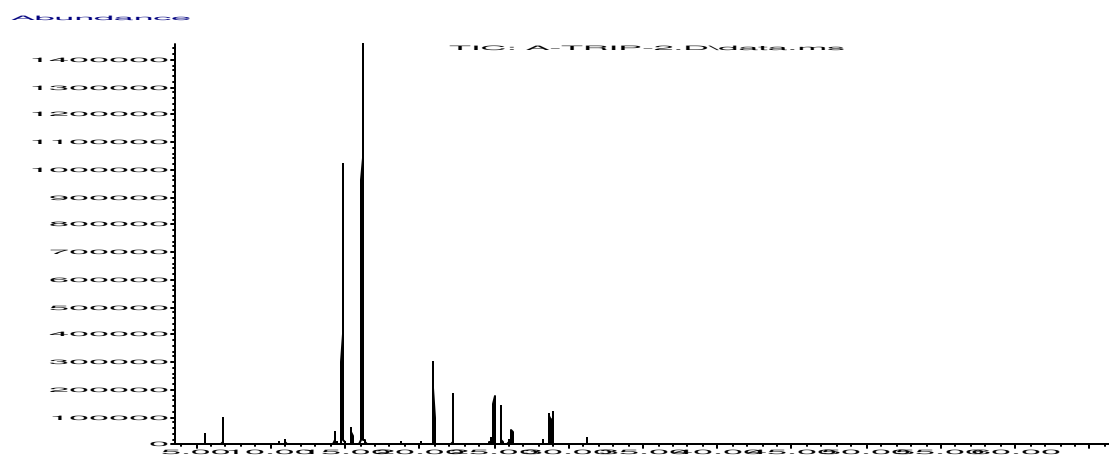


Figura 12 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

5. *Ammi visnaga*

Abundance

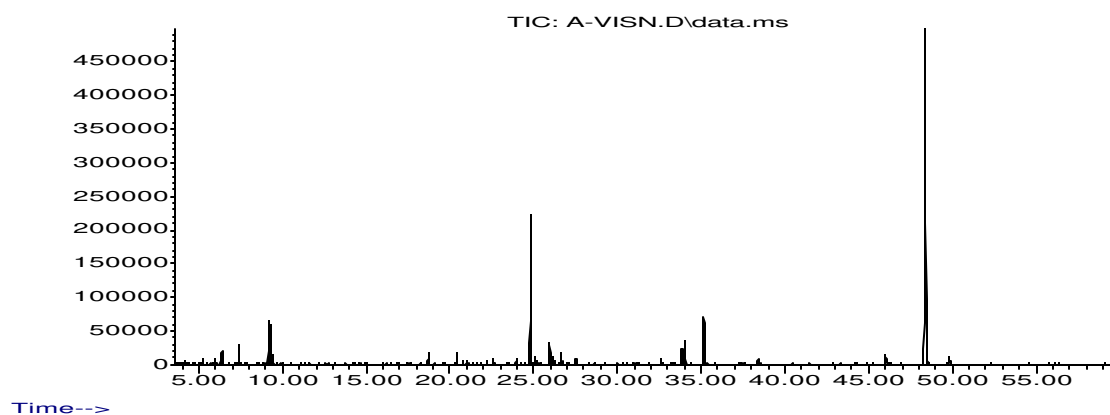


Figura 13 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

Abundance

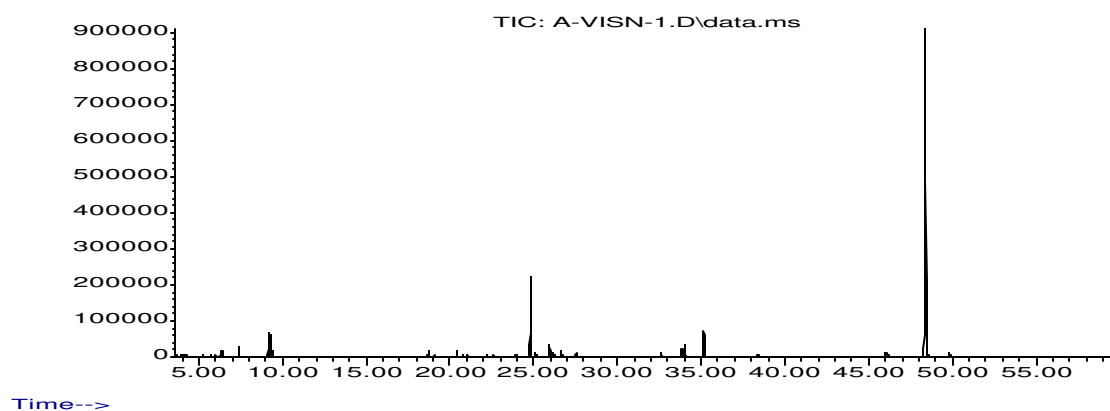


Figura 14 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

Abundance

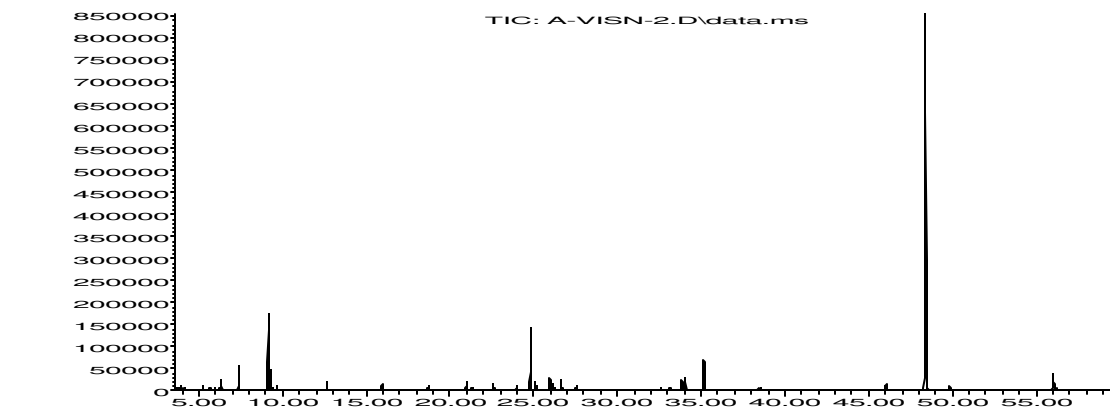


Figura 15 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

6. *Anthemis nobilis*

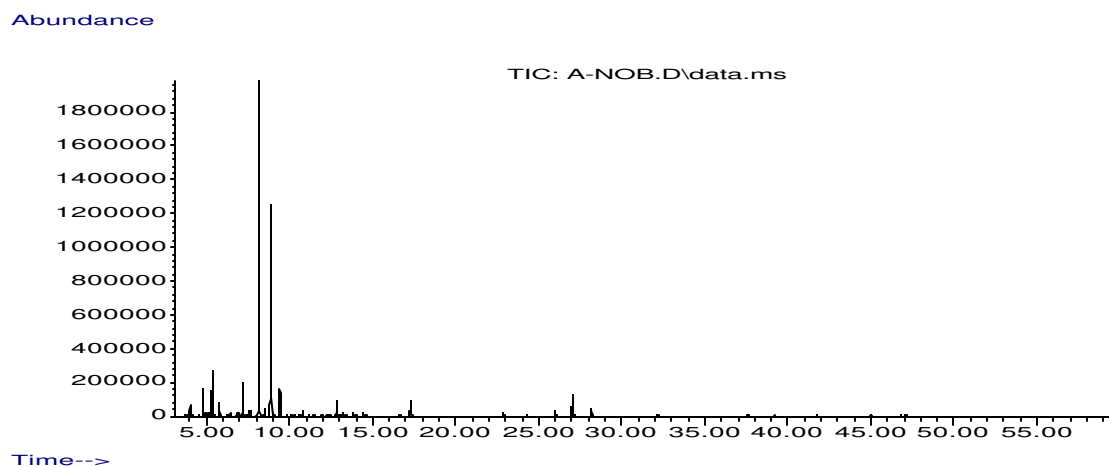


Figura 16 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

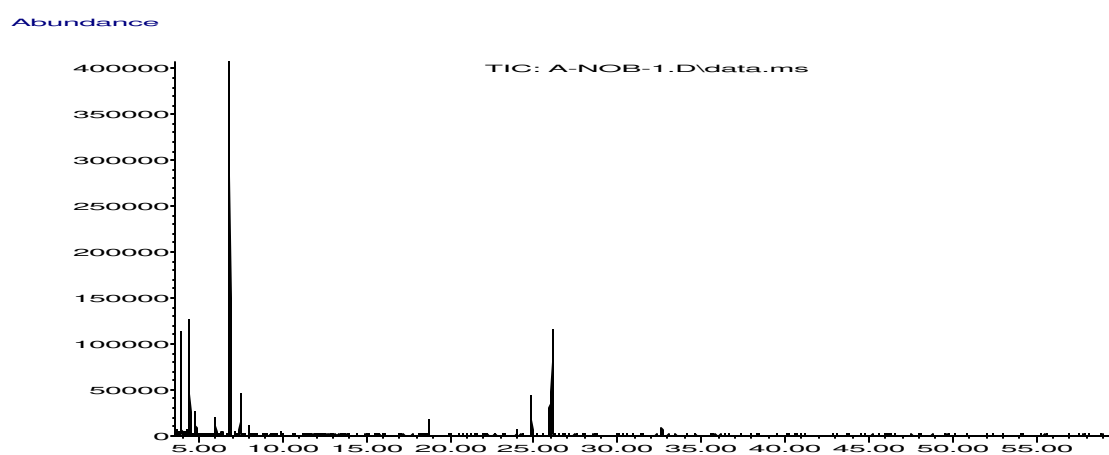


Figura 17 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

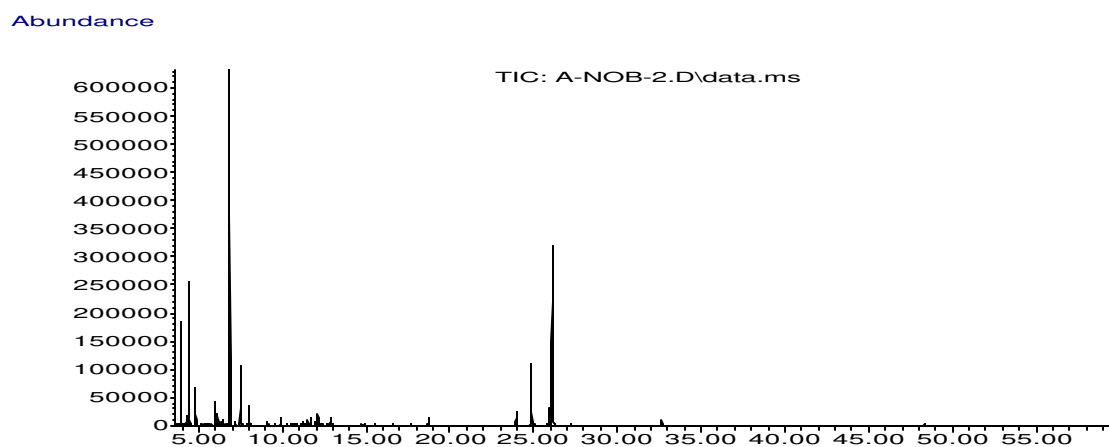


Figura 18 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

7. *Baccharis trimera*

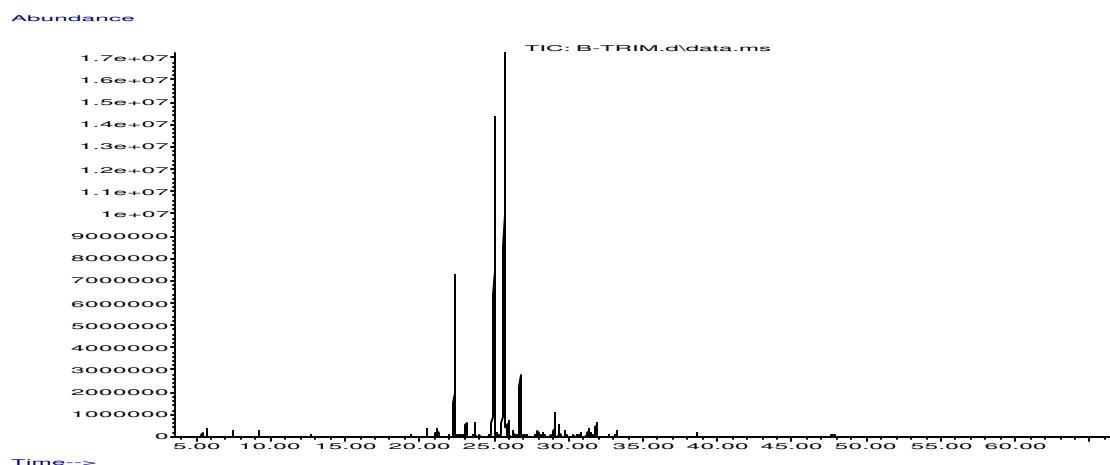


Figura 19 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

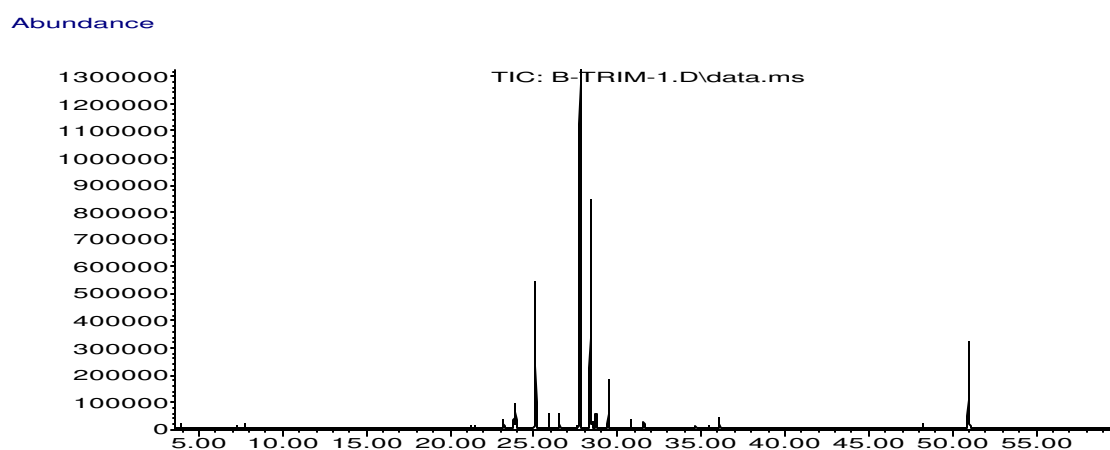


Figura 20 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

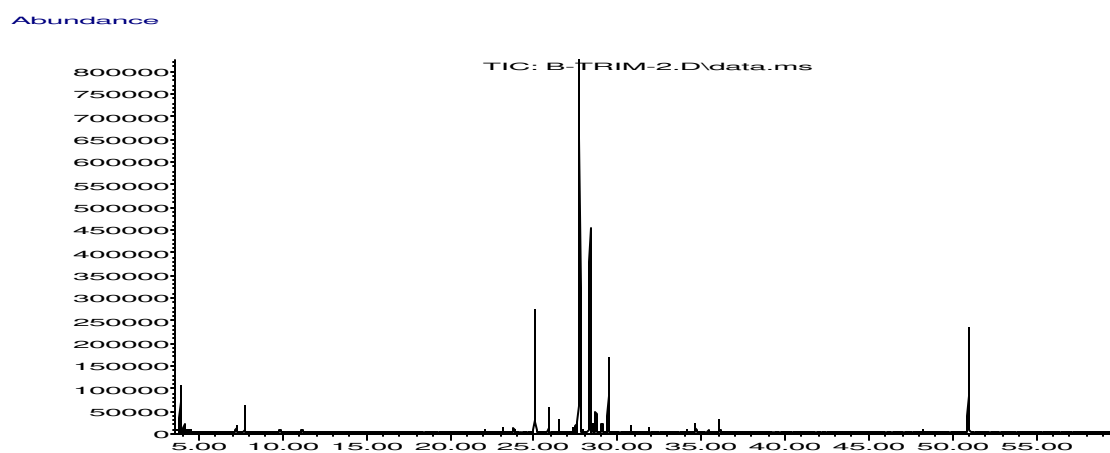


Figura 21 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

8. *Cordia verbenacea*

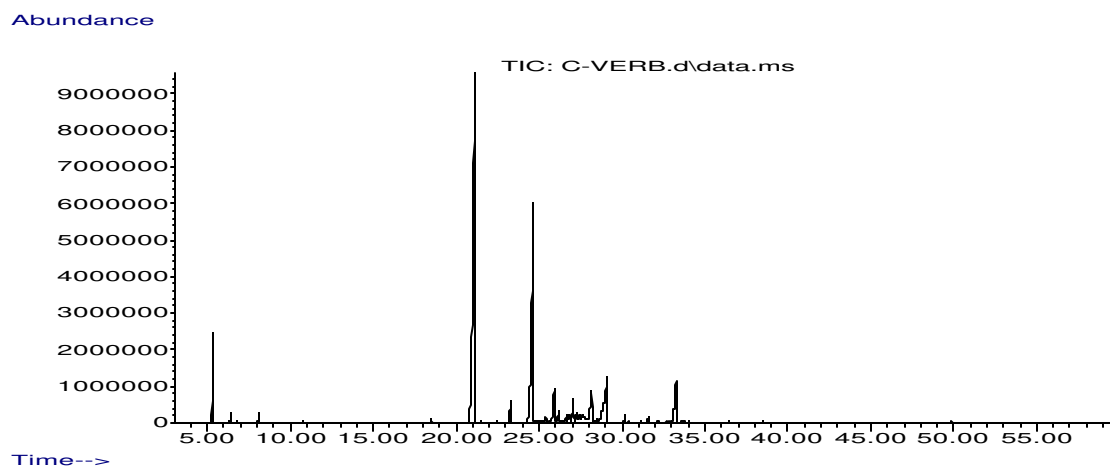


Figura 22 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

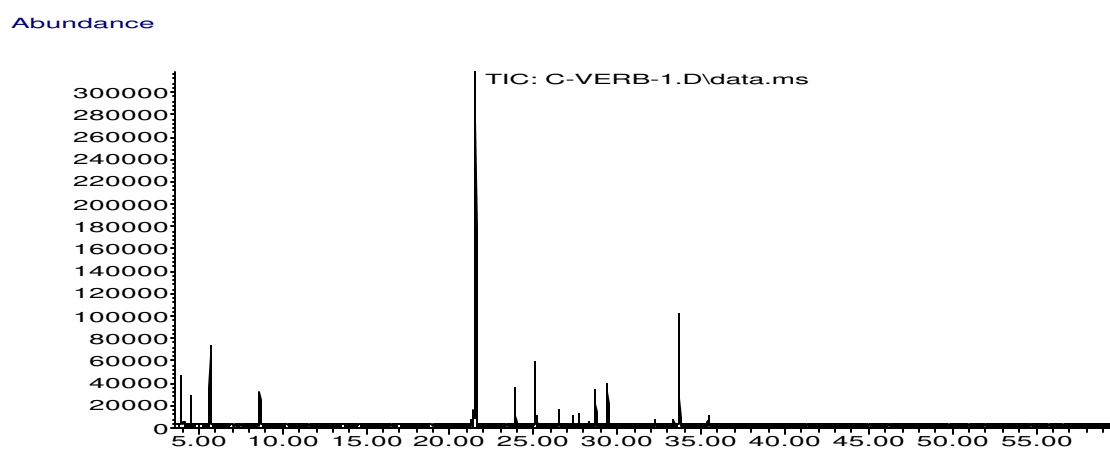


Figura 23 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

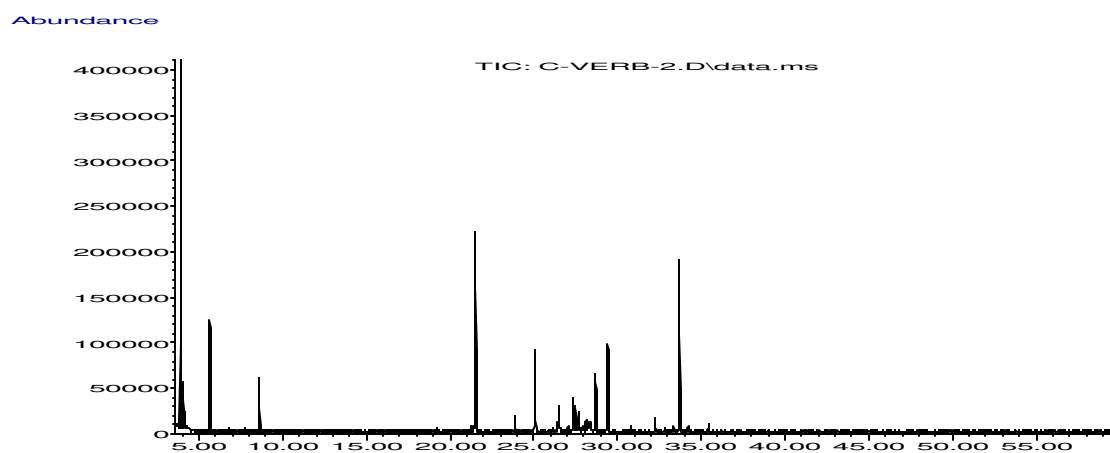


Figura 24 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

9. *Cymbopogum martinii*

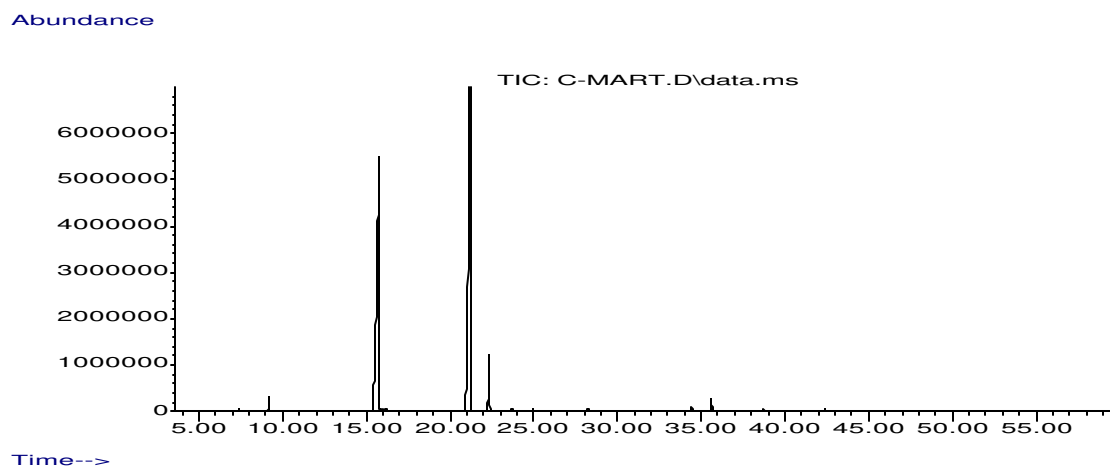


Figura 25 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

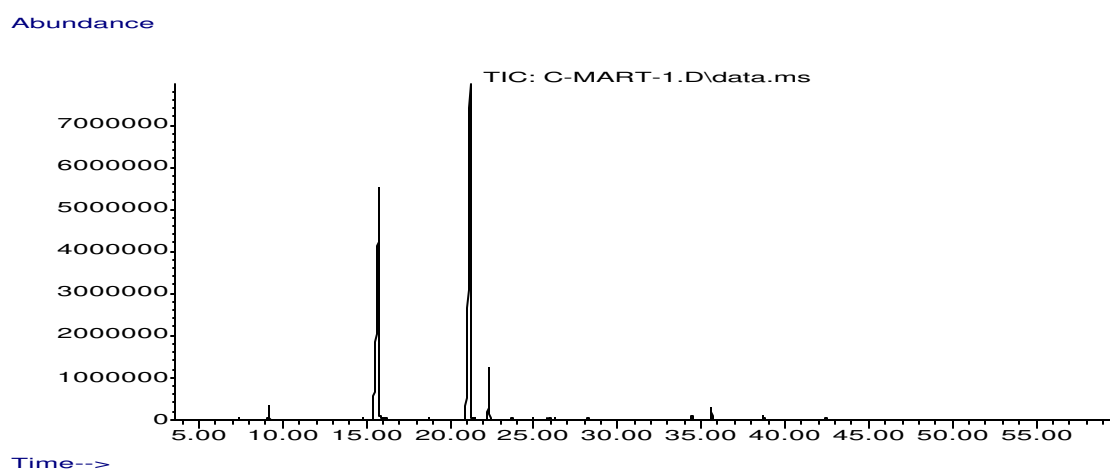


Figura 26 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

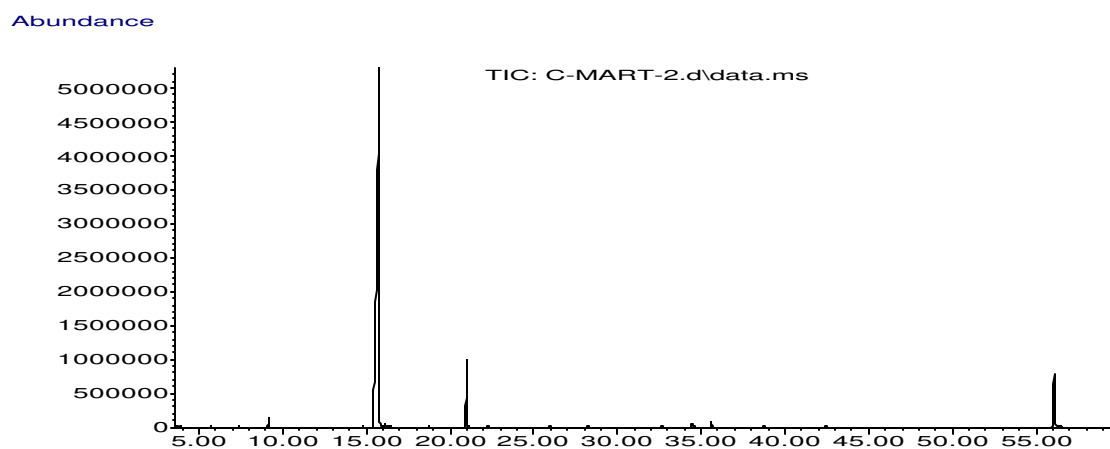


Figura 27 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

10. *Cymbopogum winterianus*

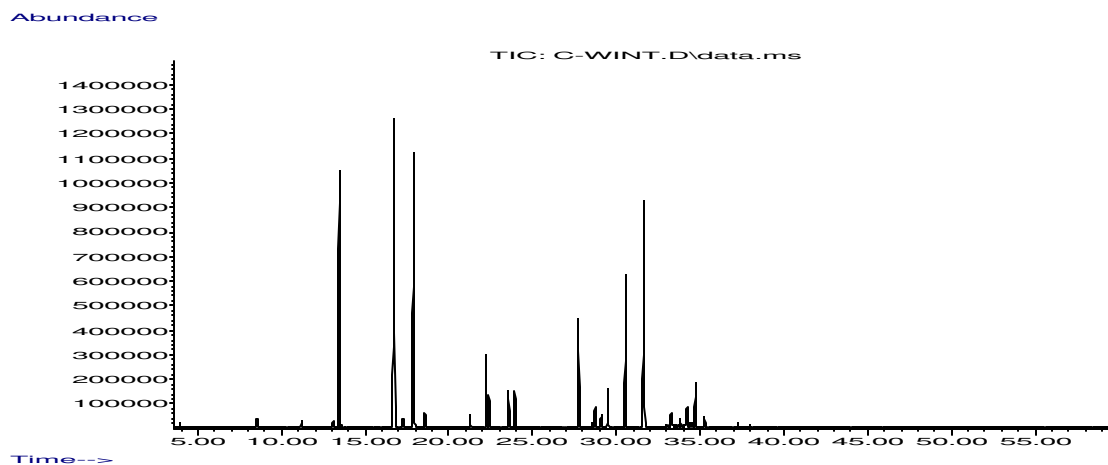


Figura 28 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

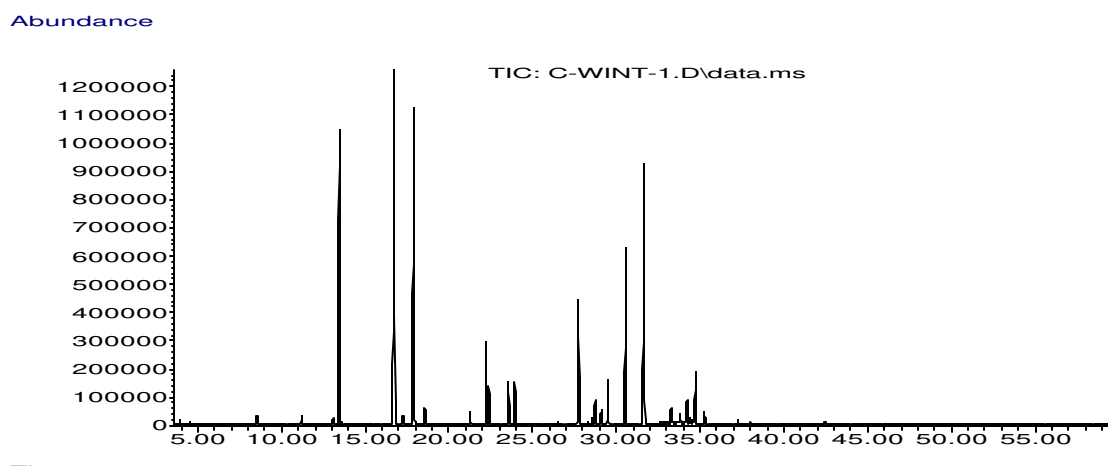


Figura 29 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

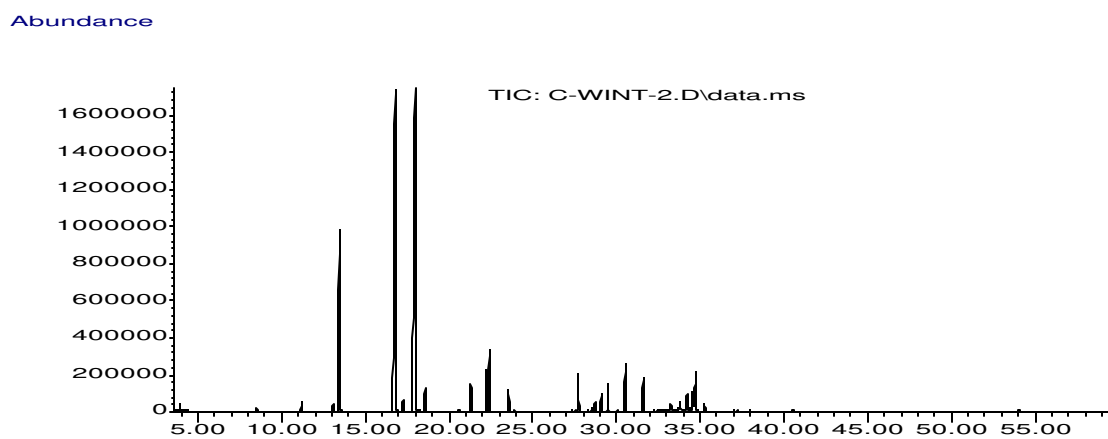


Figura 30 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

11. *Mentha arvensis*

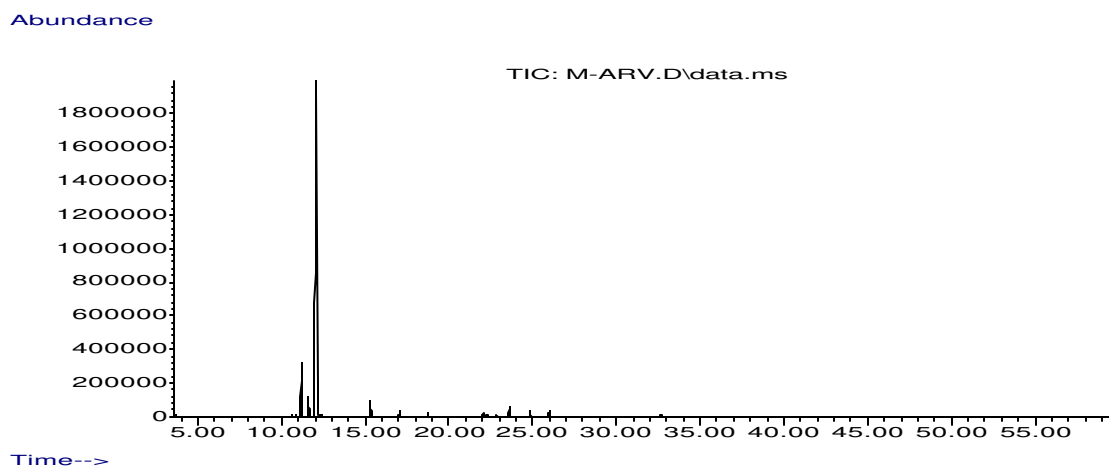


Figura 31 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

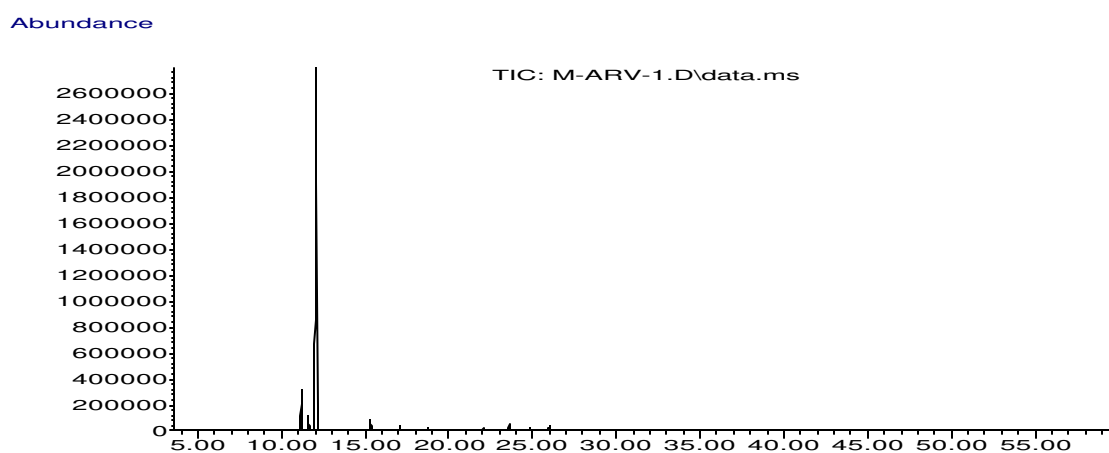


Figura 32 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

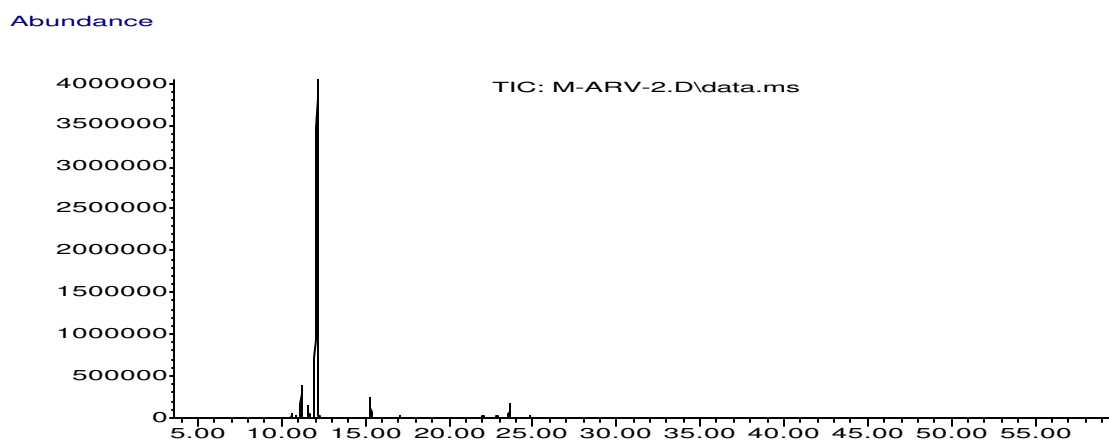
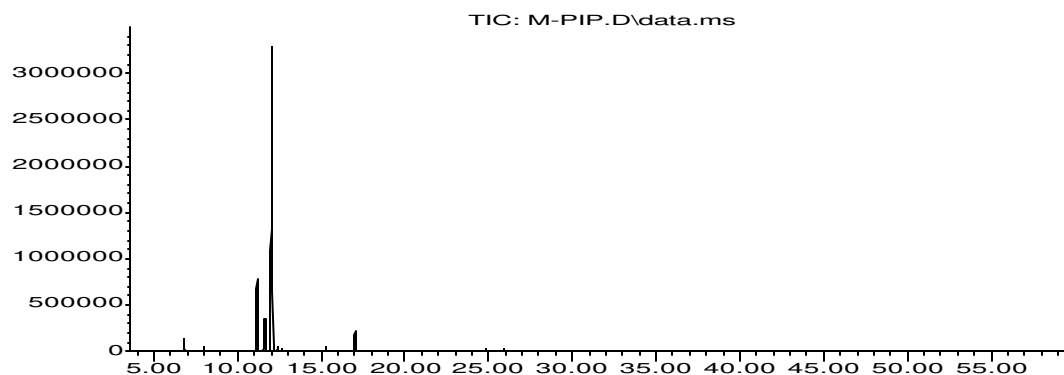


Figura 33 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

12. *Mentha piperita*

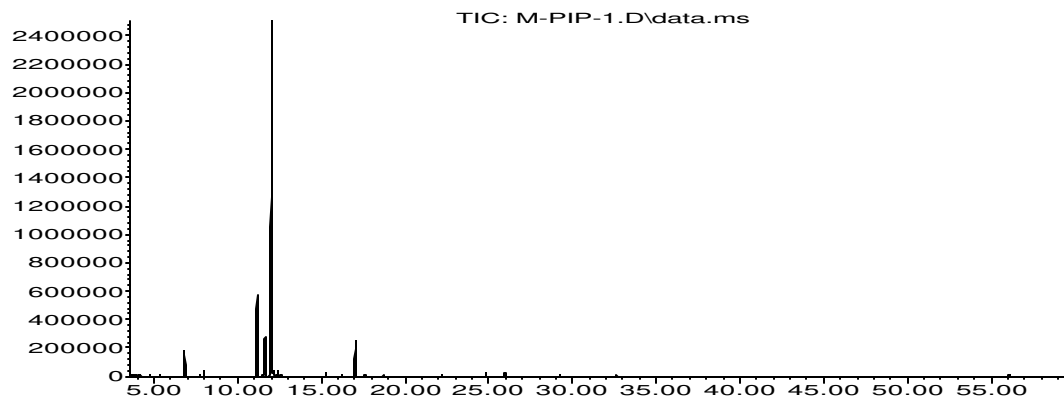
Abundance



Time-->

Figura 34 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

Abundance



Time-->

Figura 35 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

Abundance

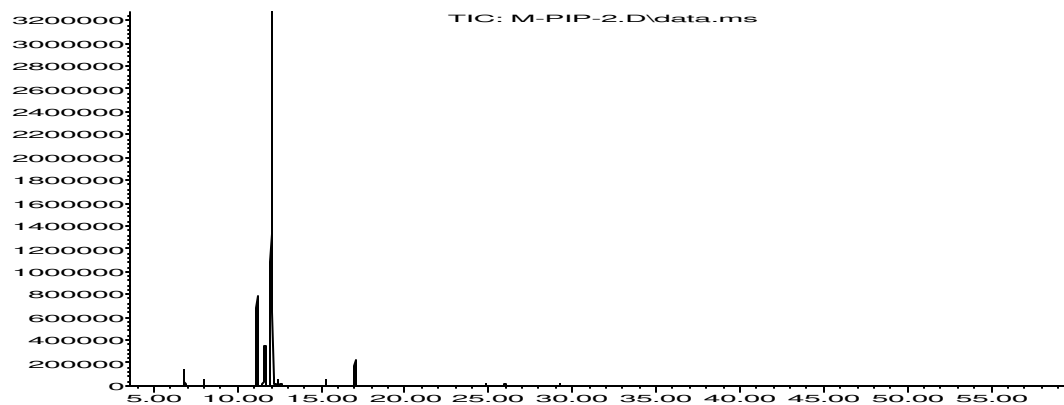
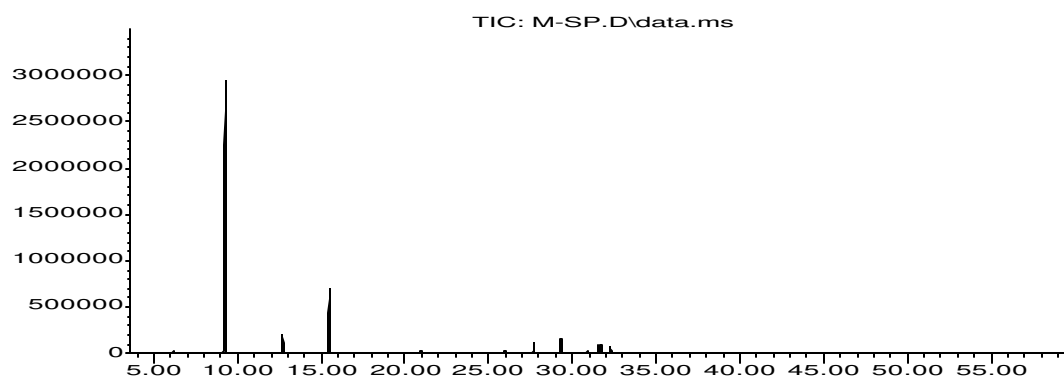


Figura 36 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

13. *Mentha sp*

Abundance



Time-->

Figura 37 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

Abundance

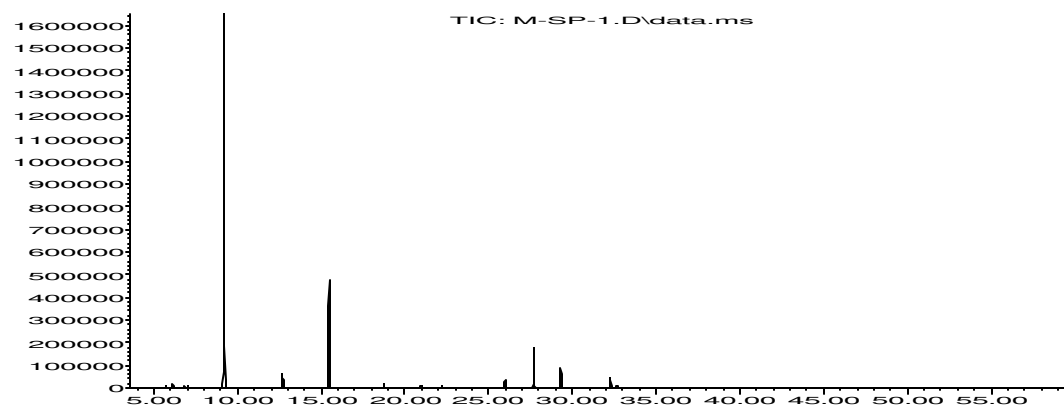


Figura 38 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

Abundance

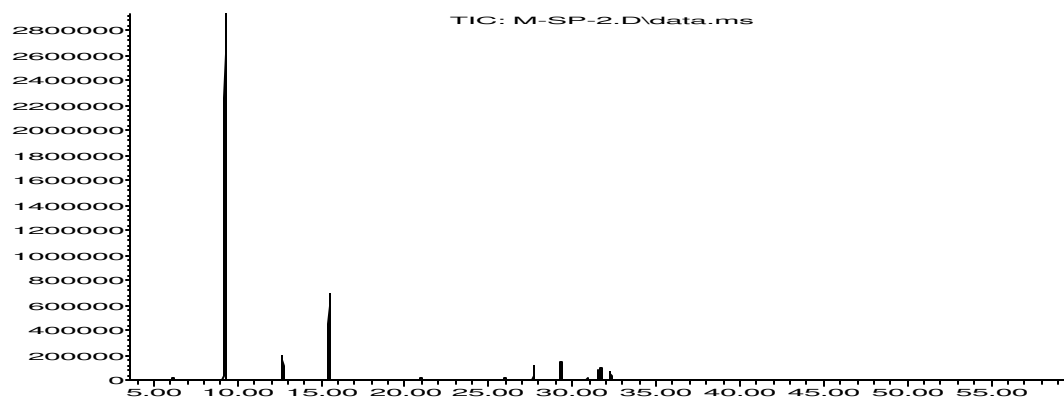


Figura 39 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

14. *Mentha spicata*

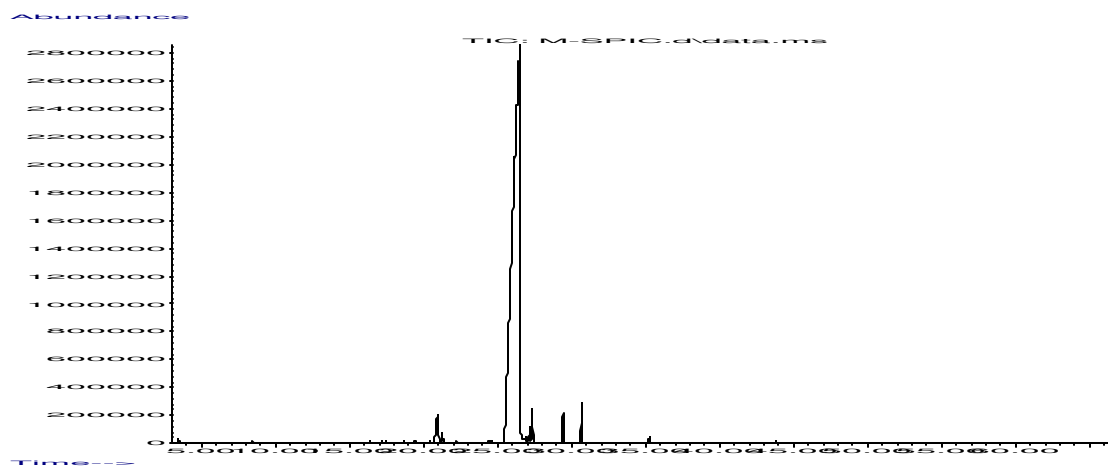


Figura 40 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

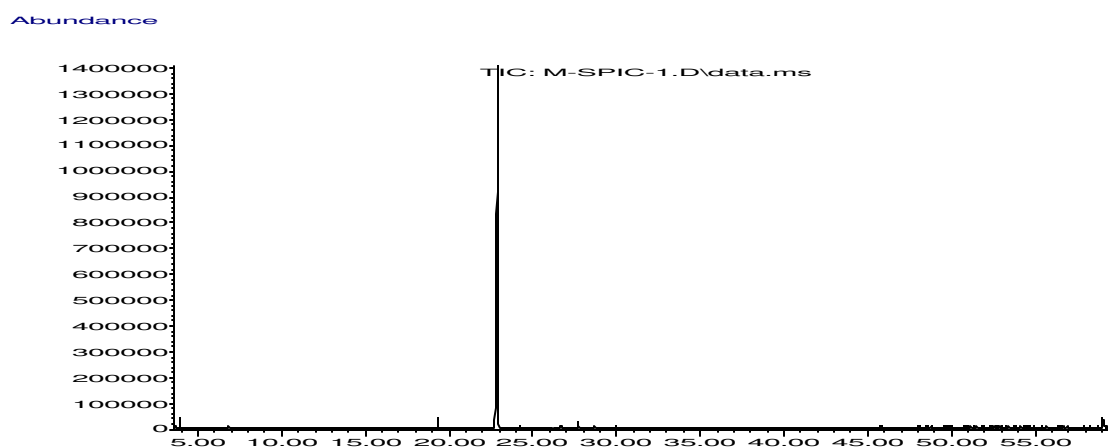


Figura 41 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

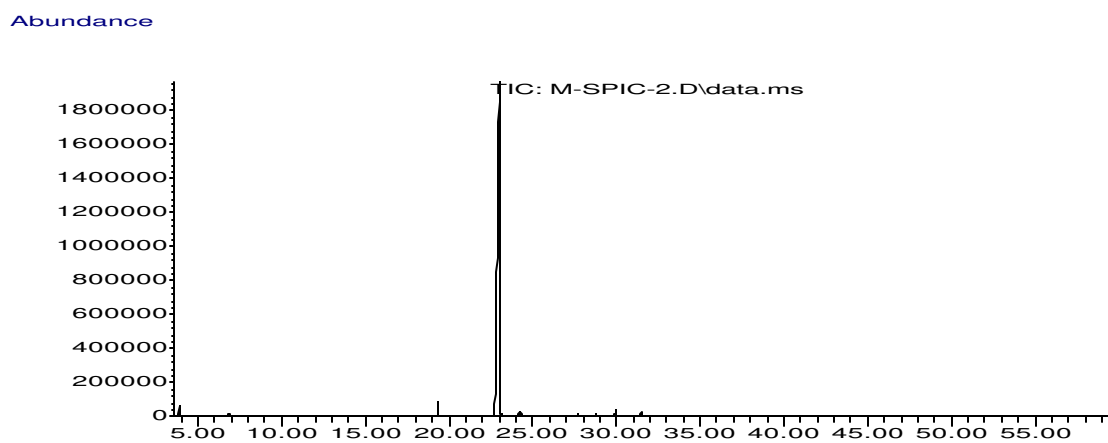


Figura 42 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

15. *Mikania glomerata*

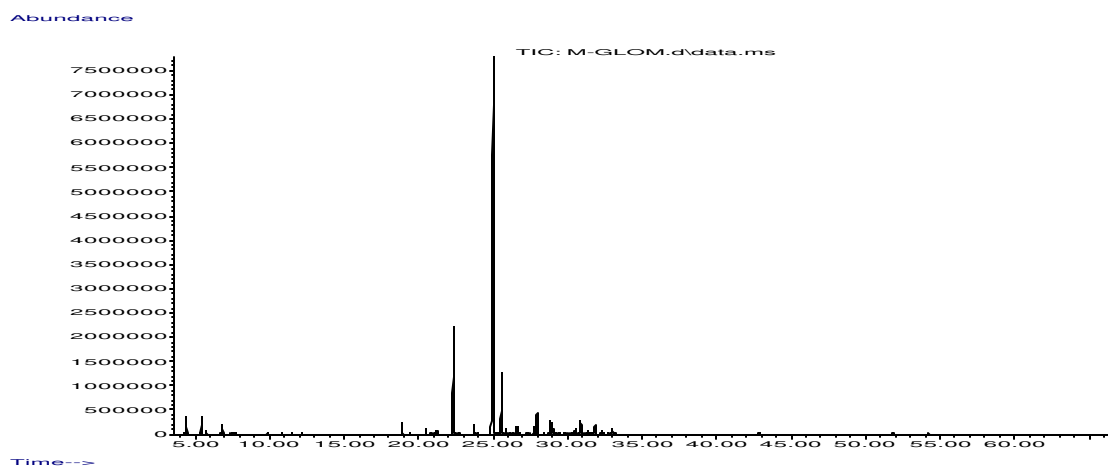


Figura 43 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

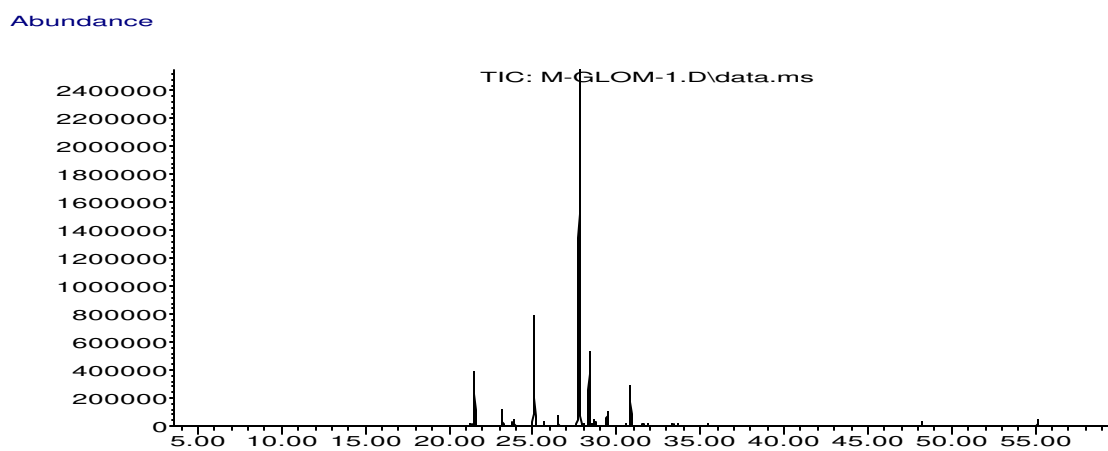


Figura 44 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

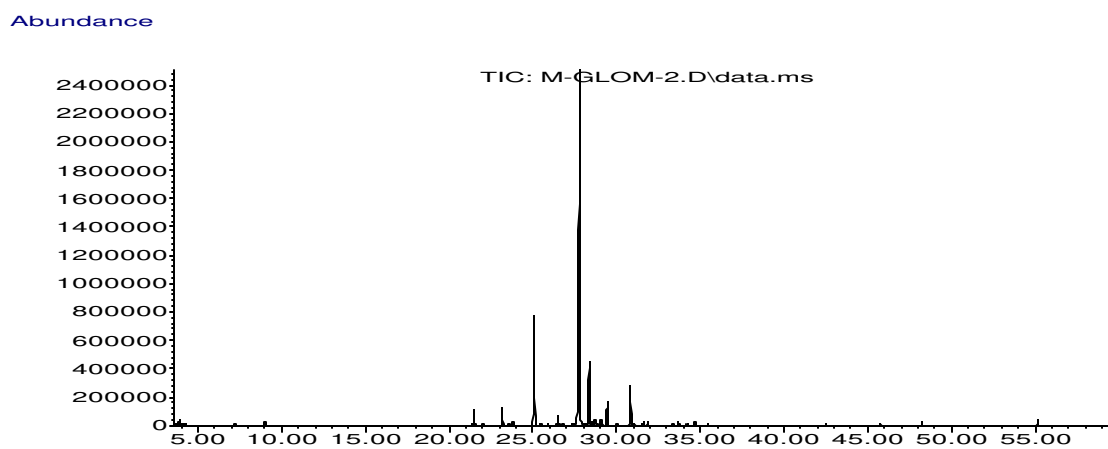
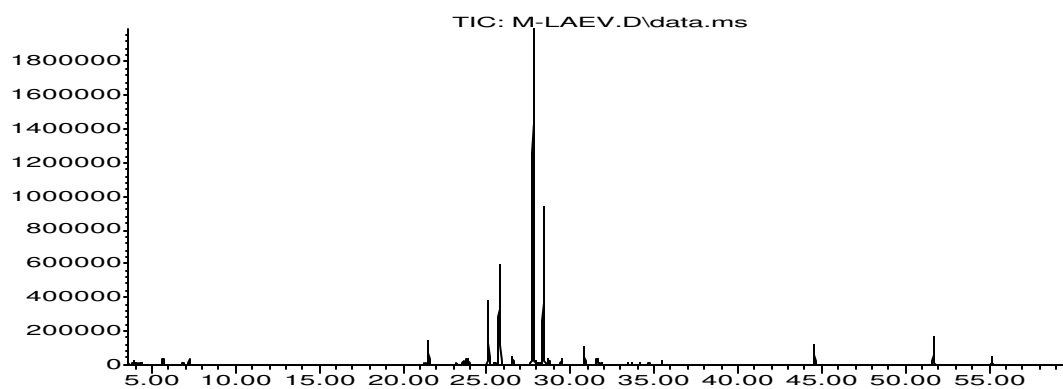


Figura 45 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

16. *Mikania laevigata*

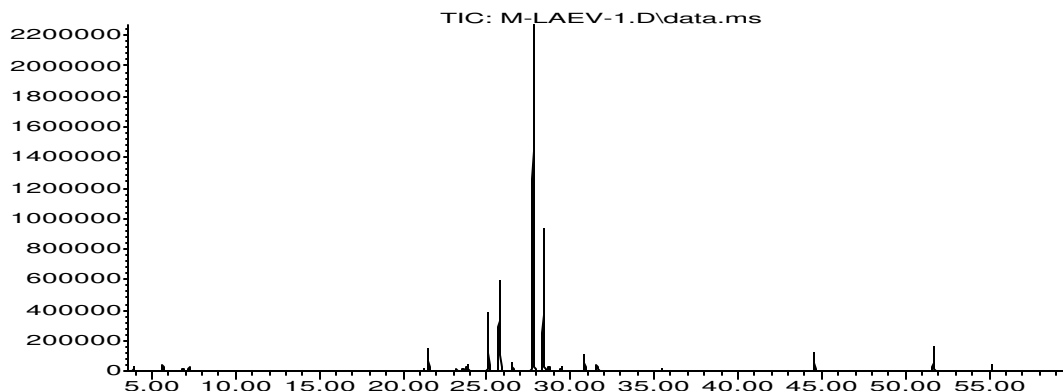
Abundance



Time-->

Figura 46 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

Abundance



Time-->

Figura 47 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

Abundance

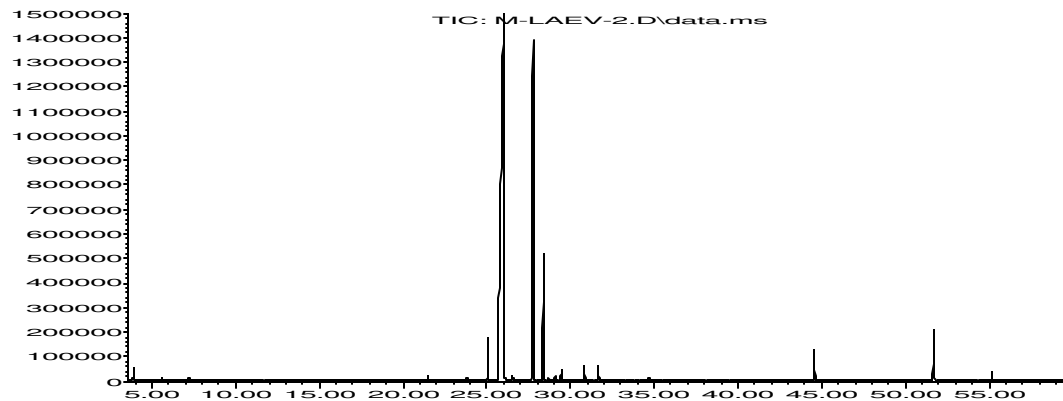


Figura 48 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

17. *Ocimum basilicum*

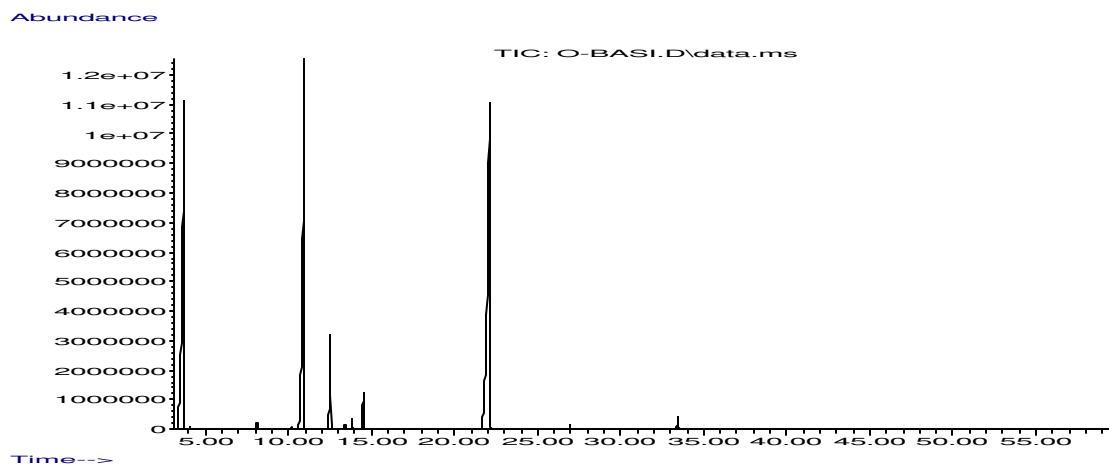


Figura 49 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

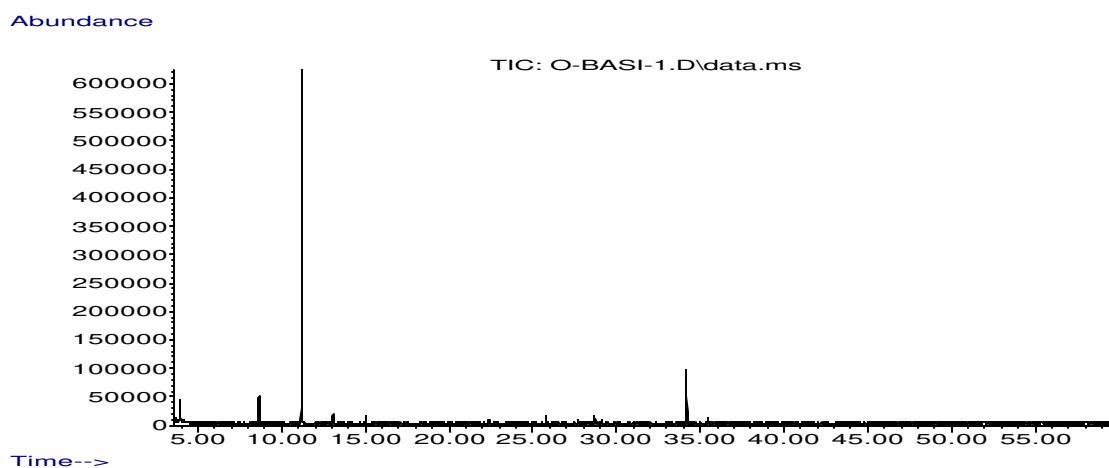


Figura 50 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

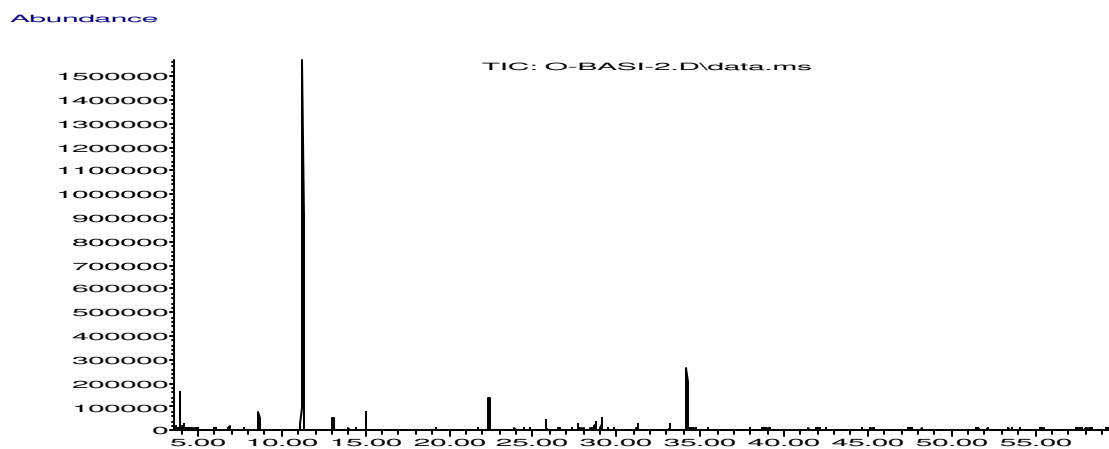


Figura 51 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

18. *Ocimum gratissimum*

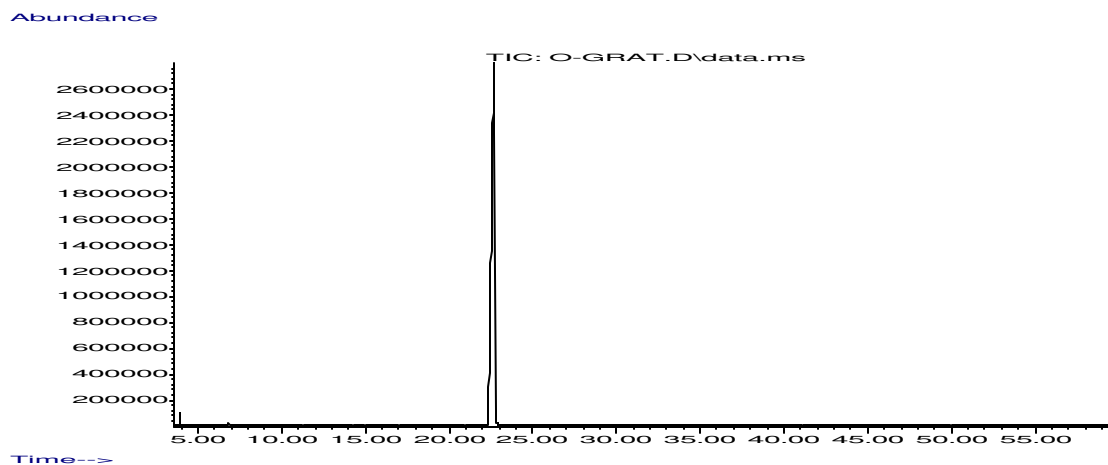


Figura 52 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

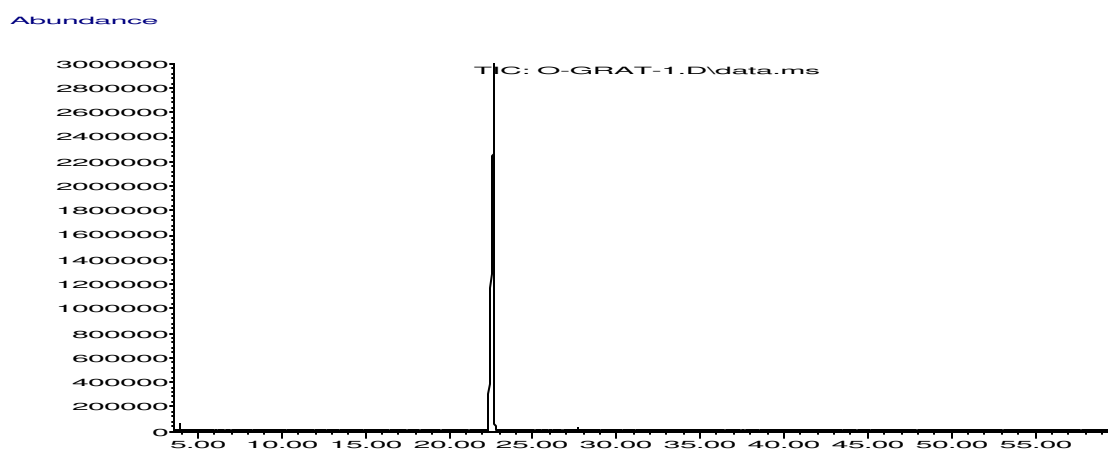


Figura 53 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

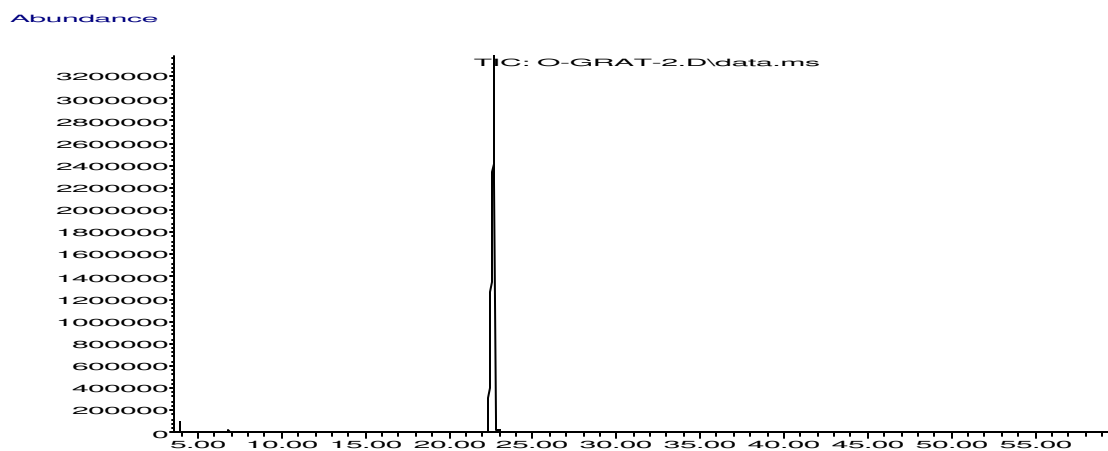


Figura 54 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

19. *Origanum applii*

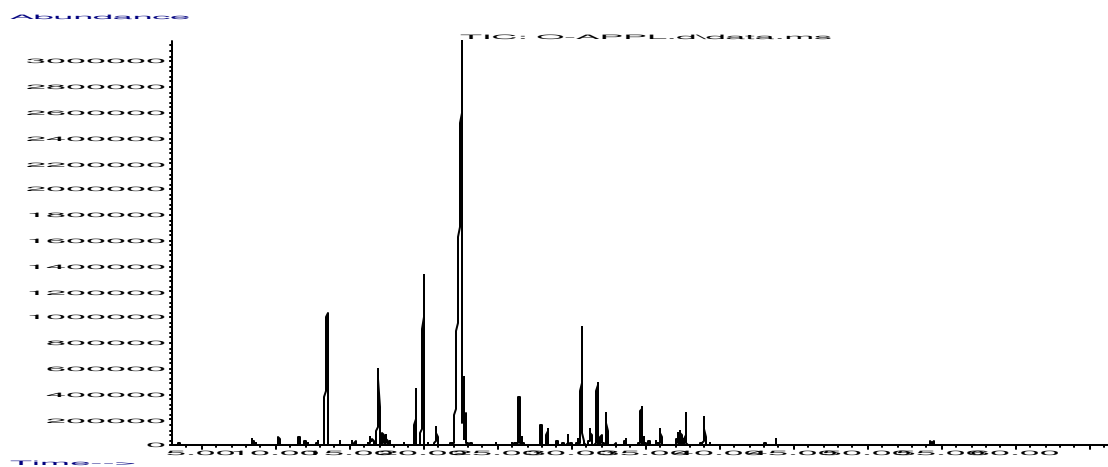


Figura 55 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

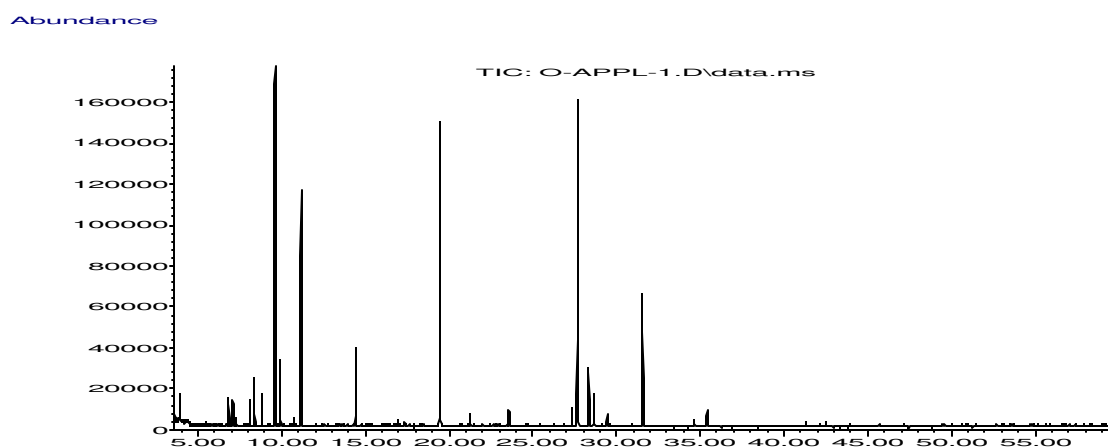


Figura 56 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

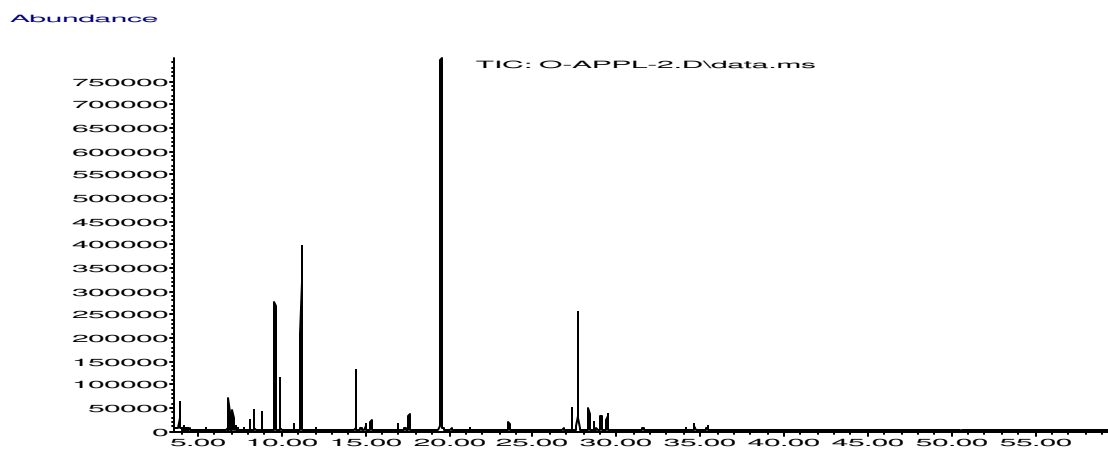


Figura 57 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

20. *Origanum vulgare*

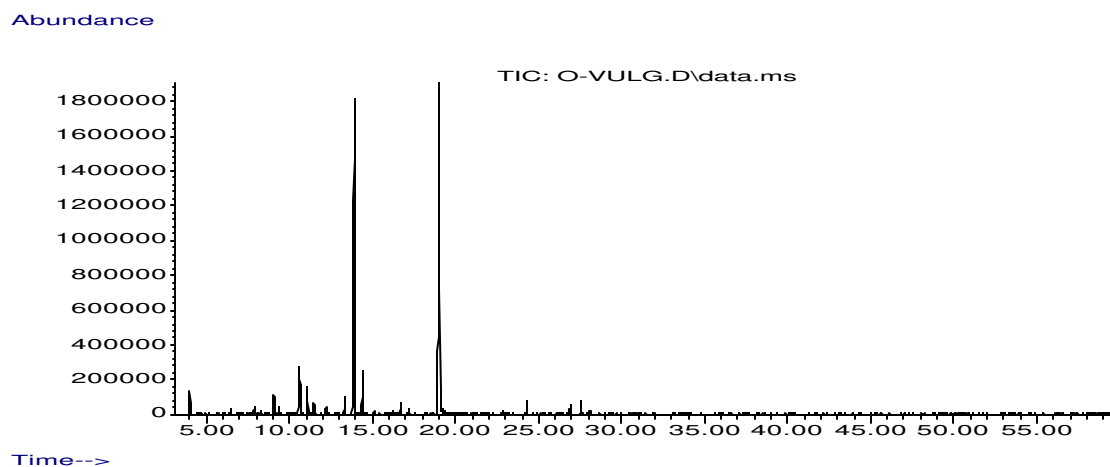


Figura 58 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

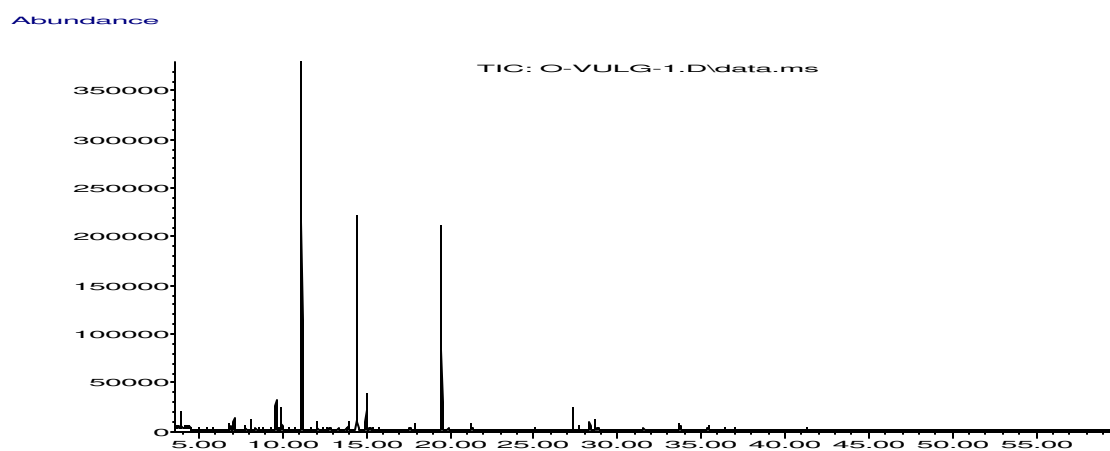


Figura 59 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

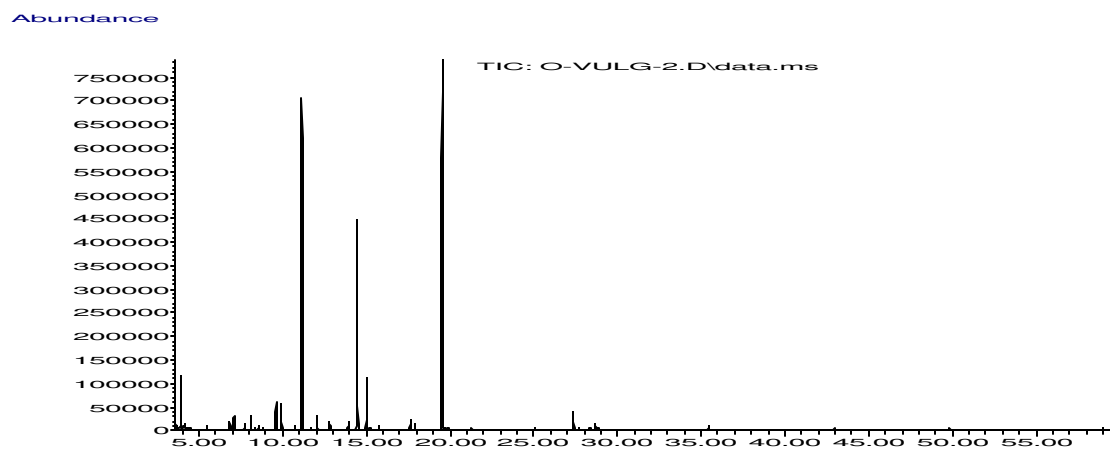


Figura 60 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.

21. *Piper aduncum*

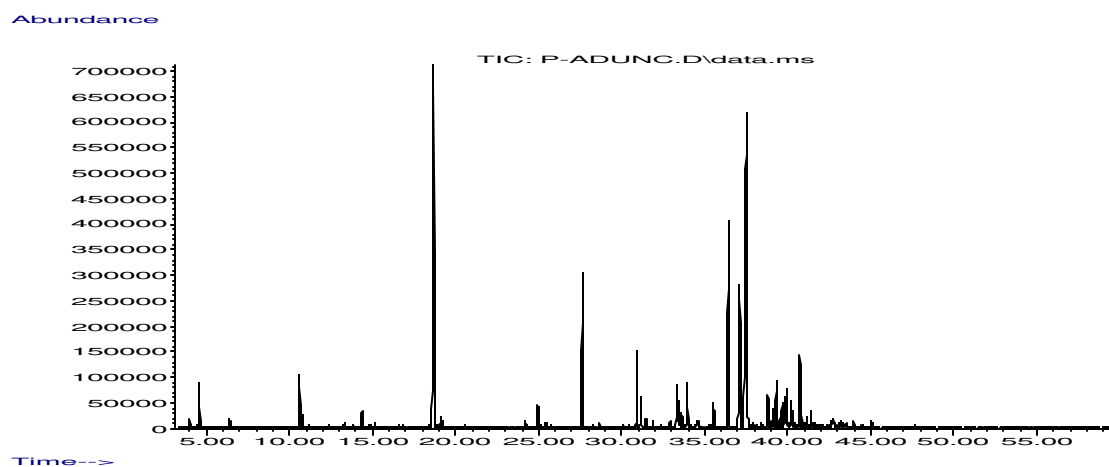


Figura 61 – Cromatograma do óleo essencial obtido por hidrodestilação.

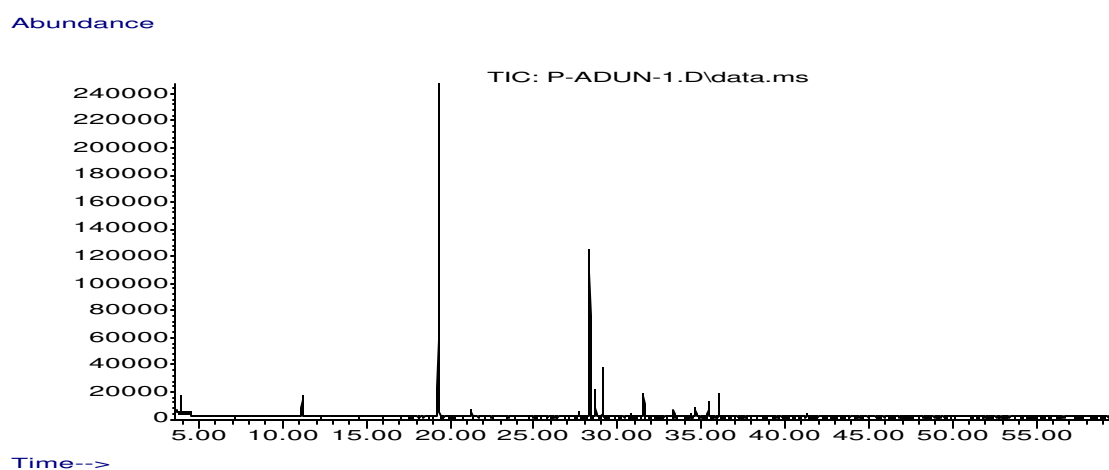


Figura 62 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS.

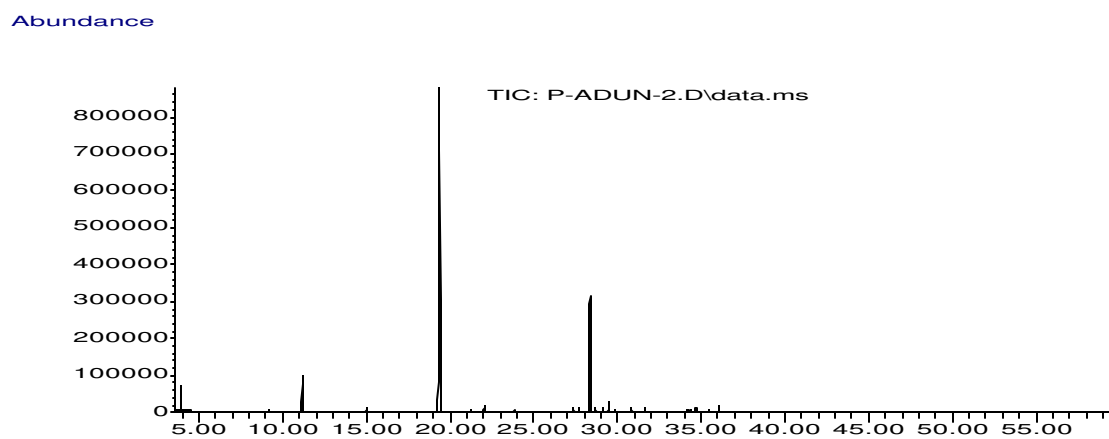


Figura 63 – Cromatograma dos voláteis extraídos com fibra PDMS/DVB.