



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA/OLFATOMÉTRICA DO POTENCIAL  
AROMÁTICO DE EXTRATOS NATURAIS LIVRES E INCORPORADOS  
A MATERIAIS PELA IMPREGNAÇÃO SUPERCRÍTICA**

**VANESSA BARBIERI XAVIER**

ENGENHEIRA QUÍMICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre**

**Março, 2016**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA/OLFATOMÉTRICA DO POTENCIAL  
AROMÁTICO DE EXTRATOS NATURAIS LIVRES E INCORPORADOS  
A MATERIAIS PELA IMPREGNAÇÃO SUPERCRÍTICA**

**VANESSA BARBIERI XAVIER**

ENGENHEIRA QUÍMICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO CASSEL

Tese realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

*Trabalho vinculado ao Projeto: FAPERGS/CAPES 010/2011*

**Porto Alegre  
Março, 2016**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
FACULDADE DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**ANÁLISE CROMATOGRÁFICA/ OLFATOMÉTRICA DO  
POTENCIAL AROMÁTICO DE EXTRATOS NATURAIS LIVRES  
E INCORPORADOS A MATERIAIS PELA IMPREGNAÇÃO  
SUPERCRÍTICA**

**CANDIDATA: VANESSA BARBIERI XAVIER**

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. EDUARDO CASSEL - ORIENTADOR

**BANCA EXAMINADORA**

DRA. TÂNIA MARA PIZZOLATO - PPGQ - UFRGS

DRA. BETINA BLOCHTEIN - DO PPGZOO - PUCRS

DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

**PUCRS**

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900  
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625  
E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br  
www.pucrs.br/feng

*A adversidade desperta em nós  
capacidades que, em  
circunstâncias favoráveis, teriam  
ficado adormecidas.  
(Horácio)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, que estiveram sempre ao meu lado, meus pais, João e Clair.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a FAPERGS pela bolsa de doutorado concedida.

Ao meu orientador e professor Dr. Eduardo Cassel por todo o apoio.

Aos Engenheiros Cícero Bedinot e Fernando Testa pela ajuda na construção, planejamento e ajustes do olfatômetro que foi acoplado no cromatógrafo a gás.

À Me. Laura Fariña, do Laboratório de Biotecnologia de Aromas da Faculdade de Química da Universidad de la República, pelo curso de extensão Cromatografia Gasosa/Olfatometria.

Ao doutorando Manuel Minteguiaga e ao Dr. Eduardo Dellacassa, da Faculdade de Química da Universidad de la República, por toda ajuda com o tema olfatometria.

Ao Me. Aleksandro Dallegrove pela ajuda com a técnica de microextração em fase sólida.

A professora Dra. Berenice Dedavid por todo apoio e orientação nas análises de microscopia.

A professora Dra. Blochtein pelas amostras de mel e pela empresa Dublauto pelas amostras de tecido utilizados nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE), em especial, aos bolsistas Victor Rodrigues e Marcela Beal por toda parceria, ao técnico Gustavo Garces pela ajuda na manutenção do olfatômetro, ao Me. Guilherme Evaldt pela ajuda na impregnação supercrítica, ao Boutros Youseff Abboud e ao Me. Rodrigo Scopel pelo desenvolvimento do software para o olfatômetro e aos colegas que foram avaliadores nas análises olfatométricas: Alexandre Timm, Ana Luisa Fianco, Júlia Scopel, Maria Eduarda Sanvido, Pedro Schein e Graciane da Silva.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>5</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>6</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>14</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>15</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>16</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1. <b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
3.1. <b>Aromas</b> .....	<b>21</b>
3.2. <b>Análise sensorial</b> .....	<b>23</b>
3.2.1. <b>Olfato</b> .....	<b>24</b>
3.2.2. <b>Percepção dos aromas</b> .....	<b>25</b>
3.3. <b>Cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O)</b> .....	<b>27</b>
3.3.1. <b>Instrumentação básica da cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O)</b> .....	<b>30</b>
3.3.2. <b>Seleção e treinamento de avaliadores</b> .....	<b>33</b>
3.3.3. <b>Vocabulário sensorial</b> .....	<b>34</b>
3.3.4. <b>Considerações práticas</b> .....	<b>35</b>
3.4. <b>Isolamento dos compostos com aroma</b> .....	<b>36</b>
3.4.1. <b>Extração com solventes</b> .....	<b>36</b>
3.4.2. <b>Métodos de destilação</b> .....	<b>37</b>
3.4.3. <b>Técnicas <i>headspace</i></b> .....	<b>38</b>
3.4.4. <b>Técnicas de extração em fase sólida</b> .....	<b>39</b>
3.4.4.1. <b>Microextração em fase sólida (SPME)</b> .....	<b>39</b>

<b>3.5. Tipos de olfatometria</b> .....	<b>41</b>
3.5.1. Análise por diluição .....	42
3.5.2. Tempo-intensidade .....	45
3.5.3. Frequência de detecção .....	48
3.5.4. Comparação entre as técnicas .....	49
<b>3.6. Identificação de compostos com aroma</b> .....	<b>49</b>
<b>3.7. Óleos essenciais</b> .....	<b>50</b>
3.7.1. Extração de óleos essenciais .....	52
3.7.2. Análise química e olfatométrica de óleos essenciais .....	52
<b>3.8. Mel</b> .....	<b>53</b>
3.8.1. Origem do mel .....	54
3.8.2. Identificação dos compostos com aroma do mel .....	55
<b>3.9. Impregnação supercrítica de extratos voláteis em materiais têxteis</b> .....	<b>57</b>
3.9.1. Materiais têxteis cosméticos .....	57
3.9.2. Microencapsulação de óleos essenciais em materiais têxteis .....	58
3.9.2.1. Impregnação supercrítica (SI) .....	61
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>63</b>
<b>4.1. Montagem do olfatômetro e adaptação no cromatógrafo a gás</b> .....	<b>63</b>
<b>4.2. Óleos essenciais</b> .....	<b>68</b>
4.2.1. Amostras e extração de compostos voláteis .....	68
4.2.2. Análise cromatográfica .....	69
4.2.3. Análise olfatométrica .....	70
<b>4.3. Mel</b> .....	<b>71</b>
4.3.1. Amostras e extração de compostos voláteis .....	71
4.3.2. Análise cromatográfica .....	73
4.3.3. Análise olfatométrica .....	73
<b>4.4. Material têxtil</b> .....	<b>74</b>
4.4.1. Amostras .....	74
4.4.2. Impregnação supercrítica .....	74
4.4.3. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM) .....	77
4.4.4. Extração de compostos voláteis .....	77
4.4.5. Análise cromatográfica .....	79



4.4.6. Análise olfatométrica.....	80
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>5.1. Óleos essenciais.....</b>	<b>81</b>
5.1.1. <i>Baccharis</i> .....	81
5.1.2. Pitangueira.....	81
5.1.3. Laranjeira.....	87
<b>5.2. Mel.....</b>	<b>93</b>
5.2.1. Resultados da análise cromatográfica.....	93
5.2.2. Resultados da análise olfatométrica.....	95
<b>5.3. Material têxtil.....</b>	<b>100</b>
5.3.1. Análises do produto antimicrobiano natural.....	100
5.3.2. Análises do tecido preparado com microcápsulas da mistura de óleos essenciais.....	104
5.3.3. Análises do tecido impregnado com a mistura de óleos essenciais pela impregnação supercrítica.....	106
5.3.4. Comparação entre os resultados das análises para os dois tecidos em estudo.....	109
5.3.5. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM).....	110
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>117</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>131</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Esquema da via nasal e via retronasal humana. ....	25
Figura 3.2. Estrutura química dos isômeros ópticos da carvona.....	26
Figura 3.3. Estrutura química dos isômeros ópticos do limoneno.....	26
Figura 3.4. Esquema geral de um cromatógrafo a gás. ....	28
Figura 3.5. Esquema do GC equipado com o detector olfatométrico.....	31
Figura 3.6. Olfatômetro da Gerstel.....	32
Figura 3.7. Esquema do olfatômetro da SGE. ....	32
Figura 3.8. Olfatômetro da Brechbühler. ....	33
Figura 3.9. (a) Representação dos componentes de um amostrador e uma fibra empregados em SPME; (b) Técnicas de SPME por “headspace” e imersão direta. ....	41
Figura 3.10. Construção de um aromagrama Charm.....	44
Figura 3.11. Exemplo de um aromagrama de AEDA. ....	44
Figura 3.12 Variação da intensidade aromática de um corpo puro em função da concentração. I: intensidade odorante; C: concentração do odor; a: constante da lei de Stevens; b: parâmetro que representa o crescimento da intensidade em função da constante (valor entre 0,2 e 0,8). ....	46
Figura 3.13. Exemplo de Osmograma. ....	47
Figura 3.14. Dispositivo de Finger Span. (1) um anel fixo para o polegar, e (2) o anel móvel para o maior ou o dedo indicador ligado a um reóstato 195 milímetros de comprimento; (3) faixa cursor, e (4) da lâmpada de sinal, (5) ligar / desligar.....	47
Figura 3.15. Esquema da melissopalínologia.....	55
Figura 3.16. Diagrama esquemático de uma microcápsula. ....	59
Figura 3.17. Diferentes tipos de microcápsulas: (i) microcápsula simples, (ii) matriz (microesfera), (iii) microcápsulas irregulares, (iv) microcápsula com	

multi-núcleo, (v) microcápsula com multi-parede, e (vi) conjunto de microcápsulas. ....	60
Figura 3.18. Esquema do equipamento utilizado na impregnação supercrítica. ....	62
Figura 4.1. Esquema do GC/FID com o olfatômetro. ....	64
Figura 4.2. Olfatômetro antes da instalação no cromatógrafo. ....	65
Figura 4.3. Olfatômetro desenvolvido no laboratório acoplado ao cromatógrafo a gás. ....	66
Figura 4.4. Equipamento híbrido (GC/O) para análises olfatométricas. ....	66
Figura 4.5. Interface do software para o registro de dados de análises olfatométricas. ....	67
Figura 4.6. Equipamento de cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas (GC/MS). ....	69
Figura 4.7. Processo de microextração em fase sólida (SPME). a) Extração e b) dessorção térmica da fibra no cromatógrafo a gás. ....	72
Figura 4.8. Esquema do equipamento de impregnação supercrítica. ....	75
Figura 4.9. Foto do equipamento de impregnação supercrítica. ....	75
Figura 4.10. a) Estante em aço inox com amostra de tecido cortado e um recipiente com a mistura de óleos essenciais. b) Estante inserida na célula de impregnação. ....	76
Figura 5.1. Gráfico aranha do óleo essencial de pitangueira na pressão de 1bar. ...	83
Figura 5.2. Gráfico aranha do óleo essencial de pitangueira na pressão de 1,5bar. ...	84
Figura 5.3. Gráfico aranha do óleo essencial de pitangueira na pressão de 2bar. ...	84
Figura 5.4. Gráfico aranha do óleo essencial de laranjeira na pressão de 1bar. ....	89
Figura 5.5. Gráfico aranha do óleo essencial de laranjeira na pressão de 1,5bar. ...	89
Figura 5.6. Gráfico aranha do óleo essencial de laranjeira na pressão de 2bar. ....	90

Figura 5.7. Comparação entre o cromatograma e o aromagrama com as FM para a amostra de óleo essencial de laranjeira extraído por destilação por arraste a vapor a 2,0bar, obtido por GC/MS. ....	92
Figura 5.8. Gráfico aranha da amostra de mel de aroeira. ....	96
Figura 5.9. Gráfico aranha da amostra de mel de eucalipto. ....	96
Figura 5.10. Gráfico aranha da amostra de mel de quitoco. ....	97
Figura 5.11. Gráfico aranha da amostra de mel branco C. ....	97
Figura 5.12. Gráfico aranha da amostra de mel branco AC.....	98
Figura 5.13. Gráfico aranha da mistura de óleos essenciais. ....	103
Figura 5.14. Gráfico aranha dos compostos voláteis do tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais. ....	106
Figura 5.15. Gráfico aranha dos compostos voláteis do tecido impregnado a 90bar e 313K.....	108
Figura 5.16. a) e b) Tecido sem tratamento, c) e d) Tecido com microcápsulas, e) e f) Tecido impregnado. Todos com os mesmos aumentos, à esquerda de 2000X e à direita de 4000X.....	111
Figura 5.17. Imagens do tecido com microcápsulas com a medição das mesmas no aumento de 4000X.....	112
Figura 5.18. Imagens do tecido impregnado à 90bar com a medição das microcápsulas no aumento de 4000X.....	113
Figura 5.19. Imagens do tecido impregnado à 90bar com a medição das microcápsulas no aumento de 120000X.....	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Análise Cromatográfica GC/MS do óleo essencial de pitangueira extraído em três pressões diferentes. ....	82
Tabela 5.2. Compostos identificados por GC/MS e GC/O para o óleo essencial de pitangueira. ....	85
Tabela 5.3. Análise Cromatográfica GC/MS do óleo essencial de laranjeira extraído em três pressões diferentes. ....	87
Tabela 5.4. Compostos identificados por GC/MS e GC/O para o óleo essencial de laranjeira. ....	91
Tabela 5.5. Análise Cromatográfica GC/MS das amostras de mel. ....	93
Tabela 5.6. Compostos identificados por GC/MS e GC/O dos compostos de mel. ...	98
Tabela 5.7. Análise Cromatográfica GC/MS dos compostos voláteis extraídos por SPME da mistura de óleos essenciais (cravo, cedro, tomilho, lavanda, melaleuca e capim limão).....	101
Tabela 5.8. Compostos identificados por GC/MS e GC/O da mistura de óleos essenciais. ....	103
Tabela 5.9. Análise Cromatográfica GC/MS dos compostos voláteis extraído por SPME do tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais. .	104
Tabela 5.10. Compostos identificados por GC/MS e GC/O do tecido com as microcápsulas. ....	106
Tabela 5.11. Análise Cromatográfica GC/MS dos compostos voláteis extraído por SPME do tecido impregnado à 90bar e 313K. ....	107
Tabela 5.12. Compostos identificados por GC/MS e GC/O do tecido impregnado a 90bar e 313K.....	108
Tabela 5.13. Comparação da liberação do aroma dos 4 compostos presentes no tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais e no tecido impregnado. ....	109

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 3.1. Relação entre estrutura química e propriedades organolépticas. ....22

Quadro 3.2. Semelhanças entre composto químico e aroma de produtos. ....23

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AEDA	<i>Aroma Extraction Dilution Analysis</i>
GC	Cromatógrafo a gás ou cromatografia gasosa
GC/O	Cromatografia gasosa/olfatometria
CHARM	<i>Combined Hedonic Aroma Response Measurement</i>
CW	Carbowax
DSE	Extração direta com solventes
ECD	Detector de captura de elétrons
LLE	Extração líquido-líquido
FESEM	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
FID	Detector de ionização de chama
FSCM	<i>Finger Span Cross-Modality Matching</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HS	<i>Headspace</i>
IMA	Instituto do Meio Ambiente da PUCRS
LOPE	Laboratório de Operações Unitárias
MS	Espectrometria de massas ou espectrometro de massas
NIF/SNIF	<i>Nasal Impact Frequency/Surface of Nasal Impact Frequency</i>
OGA	<i>Olfactometry Global Analysis</i>
OSME	<i>Oregon State Method</i>
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RI	Índice de retenção
SBSE	<i>Stir bar sortive extraction</i>
SDE	Destilação-extração simultânea
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopia eletrônica de varredura)
SI	Impregnação supercrítica
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida

## RESUMO

XAVIER, Vanessa Barbieri. **Análise cromatográfica/olfatométrica do potencial aromático de extratos naturais livres e incorporados a materiais pela impregnação supercrítica.** Porto Alegre. 2016. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A determinação da contribuição de determinados constituintes para o aroma global de um produto tem sido alvo de interesse de pesquisadores. Sabe-se que apenas uma pequena parte do grande número de compostos voláteis presentes em uma matriz perfumada contribui para percepção do seu aroma. Além disso, estes compostos não contribuem igualmente para o perfil do aroma global da matriz, portanto, uma grande concentração relativa de um determinado composto, não necessariamente correspondem a intensidades altas de aroma. A cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O) é a técnica analítica indicada para estudar tais questões, pois permite a avaliação do aroma de cada componente de uma mistura complexa, através da correlação específica com os compostos de interesse; isso é possível porque os componentes voláteis das substâncias são percebidos simultaneamente por dois detectores, sendo um deles o sistema olfativo humano e o outro um detector cromatográfico. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento, implantação e validação de um equipamento híbrido (GC/O) para análises olfatométricas e emprego do mesmo como ferramental de análise de extratos naturais incorporados em materiais. Inicialmente, o olfatômetro foi construído, testado e validado, para uso em diferentes matrizes. Com o olfatômetro, foram analisados óleos essenciais de espécies nativas como forma de avaliar o potencial aromático destes extratos e compostos voláteis de méis como forma de propor e validar uma técnica alternativa de identificação de origem destes produtos. A partir dos resultados referentes ao equipamento e às matérias primas, realizou-se estudos sobre a liberação controlada de compostos voláteis impregnados em tecidos pela impregnação supercrítica, tendo como método de análise a cromatografia gasosa/olfatometria.

Palavras-Chaves: Aromas, cromatografia/olfatometria, impregnação supercrítica.



## ABSTRACT

XAVIER, Vanessa Barbieri. **Chromatographic/olfactometry analysis of aromatic potential of natural extracts free and incorporated in materials by supercritical impregnation.** Porto Alegre. 2016. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The determination of the contribution of certain constituents to the global odor of a product has been the subject of interest to researchers. It is known that only a small part of the large number of volatile compounds present in a fragrant matrix contributes to the perception of its odor. In addition, these molecules do not contribute equally to the global odor profile of a sample, so a large relative concentration of a compound; do not necessarily correspond to a high intensity odor. Gas chromatography/olfactometry (GC/O) is analytic technic appropriate for studying such issues, since it enables the assessment of odor of each component of complex mixture through specific correlation with the compounds of interest. This is possible because the volatile components of the substances have perceived simultaneously by two detectors, one being the human olfactory system and the other the chromatography detector. The objective of this study is the project, development, implementation and validation of a hybrid equipment (GC/O) to olfactometric analysis and the use of it as tooling for analysis of natural extracts incorporated in different materials. The initial result of the work consisted of the olfactometer own, tested and validated for use in studies associated with this thesis. With the olfactometer, essential oils were analyzed of native species in order to assess the aromatic potential of these extracts and volatile compounds of honey as a way to develop and validate an alternative technique to identification source. With the results referent to the equipment and raw materials, there was made studies on the controlled release of volatile compounds impregnated in textiles by supercritical impregnation, using the gas chromatography/olfactometry as an analytical method.

Key-words: Odors, gas chromatography/olfactometry, supercritical impregnation.

## 1. INTRODUÇÃO

Os aromas sempre foram parte integrante da evolução da humanidade e com o desenvolvimento tecnológico dos materiais, eles se destinam a melhorar a qualidade sensorial e aprimorar os produtos. A avaliação destes aromas é um dos pontos chave em alguns processos de produção industrial (alimentos, bebidas, calçados, vestuário e outros) e está adquirindo importância constante em campos tecnológicos, como por exemplo, a qualidade do ar. Esta questão diz respeito principalmente ao impacto ambiental de várias atividades industriais como curtumes, refinarias, matadouros, destilarias, usinas de tratamento, aterros sanitários, usinas de compostagem e outros (Wardencki et al., 2009; Brattoli et al., 2011). A utilização dos aromas é diferente do uso dos demais aditivos, já que ao contrário destes, os aromas precisam ser notados pelo olfato humano. A determinação da contribuição de alguns constituintes para o aroma global de um produto tem sido alvo de interesse de pesquisadores. A percepção de compostos voláteis pelo nariz humano, liberados a partir de alimentos e fragrâncias, depende da extensão da liberação da matriz e das propriedades do aroma dos compostos. Sabe-se que apenas uma pequena parte do grande número de compostos voláteis que ocorrem em uma matriz perfumada contribui para percepção do seu aroma (Grosch, 1994; Van Ruth, 2001). Além disso, estes compostos não contribuem igualmente para o perfil de aroma global de uma amostra, portanto uma alta concentração relativa de um composto determinada por um detector cromatográfico, não necessariamente corresponde a intensidade alta de aroma, devido às diferentes relações intensidade/concentração (Zellner et al., 2008; Xavier, 2011). A cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O) é uma técnica analítica mista indicada para solucionar tais questões, pois permite a avaliação de cada componente ativo na mistura complexa, através da correlação específica com os picos cromatográficos de interesse; isso é possível porque as substâncias eluídas são percebidas

simultaneamente por dois detectores, sendo um deles o sistema olfativo humano e o outro o detector cromatográfico (van Baren, 2008).

Consequentemente, a GC/O não só fornece um resultado instrumental, mas também uma análise sensorial. Esta última é definida como a quantificação das respostas humanas aos estímulos percebidos pelos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição (Meilgaard et al., 1991; Richardson, 1999). Quando acoplada a técnicas analíticas, como no GC/O, torna-se uma abordagem precisa e descritiva para caracterizar estímulos, avaliar e mensurar impressões, como também um importante processo que permite a compreensão e quantificação de uma característica sensorial.

A meta deste estudo consiste no projeto de criação de um equipamento híbrido (GC/O), acoplado a um software de aquisição de dados, para análises olfatométricas e a validação da técnica olfatométrica como ferramental de análise de materiais. Para tal, foi construído o equipamento de análise olfatométrica, definida a metodologia utilizada e foram realizados ensaios preliminares com óleos essenciais de algumas espécies de *Baccharis* (Xavier et al. 2013; Santo et al., 2014), *Eugenia uniflora* L. e *Citrus sinensis*, espécies que ainda não haviam sido avaliadas olfatometricamente. Na sequência foram realizados experimentos com compostos voláteis de amostras de mel, com a intenção de propor e validar uma técnica de identificação da origem botânica do mel. Estes compostos voláteis foram extraídos pela técnica de microextração em fase sólida (SPME). Também foi realizada a impregnação supercrítica de óleos essenciais em tecido de poliéster e foi avaliado a liberação do aroma neste tecido impregnado, utilizando a SPME e a análise cromatográfica/olfatométrica (GC/O).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral do trabalho é o uso da técnica olfatométrica como ferramental de análise do potencial aromático de extratos de produtos naturais livres e incorporados a materiais.

### **2.1. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos são:

- Construção e validação de equipamento para análise olfatométrica acoplado a cromatógrafo a gás.
- Definição das técnicas para análise olfatométrica a partir de matrizes líquidas e de matrizes sólidas previamente não avaliadas por olfatometria.
- Utilização da cromatografia gasosa/olfatometria como técnica alternativa a melissopalínologia para identificação da origem de amostras de mel a partir de seus compostos voláteis.
- Impregnação supercrítica de extratos com aroma em matrizes poliméricas.
- Avaliação da liberação do aroma em matrizes poliméricas utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) associada à cromatografia gasosa/olfatometria.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Aromas**

Os compostos com aroma são amplamente utilizados em formulações de alimentos, rações, bebidas, cosméticos, detergentes, produtos químicos e farmacêuticos, entre outros produtos (Gupta et al., 2015). O objetivo da inclusão de aromas na formulação de todos estes diferentes produtos é influenciar os consumidores, seja para melhorar as suas propriedades sensoriais ou simplesmente através da indicação para que o produto seja facilmente reconhecível (Teixeira et al., 2013; Gupta et al., 2015). Por outro lado, os consumidores são atraídos por produtos perfumados, porque eles são capazes de influenciar a sua imagem, o humor, ou mesmo a sua personalidade. Notavelmente, a incorporação de aromas em produtos tem também o papel de melhorar as avaliações dos consumidores quanto ao desempenho desses produtos: aromas frescos são frequentemente utilizados em produtos de limpeza, pois os consumidores associam fresco com limpo. Esta relação bilateral é explicada pelo poder do sentido do olfato que ultrapassa as fronteiras, onde outros sentidos não podem alcançar (Teixeira et al., 2013).

Recentemente, devido ao aumento da conscientização e interesse na saúde do consumidor em produtos naturais, tem havido mais procura por fragrâncias obtidas a partir de fontes naturais. Os aromas naturais são aquelas substâncias aromatizantes ou preparações que são obtidas por processos físicos, enzimáticos ou microbiológicos, a partir de materiais de origem vegetal ou animal. De um modo geral, estes aromas incluem óleos essenciais, óleo-resinas, essências ou extratos, proteínas hidrolisadas, destilado de qualquer produto de torrefação, produtos lácteos ou produtos de fermentação (Gupta et al., 2015).

Os aromas de produtos naturais são geralmente devidos a misturas complexas de centenas de compostos individuais. Alguns produtos podem apresentar naturalmente mais de mil substâncias que, em conjunto, conferem um aroma característico. Um exemplo é o aroma natural de café, que torrado apresenta um aroma tão complexo que já se identificaram mais de mil componentes na sua constituição. O mel apresenta um aroma composto por mais de 200 aromas individuais, enquanto a maçã apresenta em seu aroma mais de 130 componentes voláteis. A contribuição de cada um destes compostos no perfil do aroma global varia muito. Compostos presentes em quantidades mínimas podem ser contribuintes mais importantes do que aqueles presentes em concentrações mais elevadas (Rowe, 2005; Food Ingredients Brasil, 2009).

Em maior ou menor grau, representantes de praticamente todas as funções de química orgânica possuem propriedades organolépticas, sendo utilizados na elaboração de reproduções de aromas naturais (Food Ingredients Brasil, 2009; Gupta et al. 2015). Por exemplo, os ésteres são geralmente adicionados em bebidas, balas, chicletes, iogurtes por contribuir com o aroma frutado (Gupta, et al., 2015). Ainda não se pode estabelecer uma relação precisa entre estrutura química, perfil de aroma e propriedades tecnológicas, embora ocorram algumas semelhanças com determinados grupos e séries de compostos (Quadros 3.1 e 3.2). (Food Ingredients Brasil, 2009).

Quadro 3.1. Relação entre estrutura química e propriedades organolépticas.

<b>Propriedade Organoléptica</b>	<b>Estrutura Química</b>
Azedo, picante	Ácidos orgânicos
Salgado	Sais orgânicos e cloreto de sódio, glutamato monossódico, nucleotídeos
Amargo	Alcaloides e glicosídeos-gumarinas, hidrocarbonetos terpênicos e terpenoides
Doce	Sacarídeos e alcoóis polivalentes
Aroma perfumado	Relacionado com componentes com alto peso molecular e estrutura compacta, neste caso a presença de grupos funcionais não parece relevante

Aroma floral	Ésteres – embora alguns não ésteres também tenham esta característica
Aroma ácido	Ácidos graxos de alto peso molecular

Fonte: Food Ingredients Brasil, 2009.

Quadro 3.2. Semelhanças entre composto químico e aroma de produtos.

Composto Químico	Aroma
Aldeído benzoico	Amêndoas
Aldeído C - 14	Pêssego
Aldeído C - 16	Morango
Aldeído C - 18	Coco
Acetato de amila	Banana
Antranilato de metila	Uva
Caproato de alila	Abacaxi
Aldeído cinâmico	Canela
Anetol	Anis
Aldeído para toluíla	Cereja
Aldeído de estiralila	Goiaba

Fonte: Food Ingredients Brasil, 2009.

### 3.2. Análise sensorial

Graças aos sentidos percebemos o mundo que nos rodeia. A visão, a audição, o tato, o gosto e o olfato nos permite receber, selecionar, organizar e interpretar a informação ao nosso redor e chega até nós através de distintos instintos (Muñoz, 2011).

A análise sensorial é realizada em função das respostas transmitidas pelos indivíduos às várias sensações que se originam de reações fisiológicas e são resultantes de certos estímulos, gerando a interpretação das propriedades intrínsecas aos produtos. Para isto é preciso que haja entre as partes, indivíduos e produtos, contato e interação. O estímulo é medido por processos físicos e químicos

e as sensações por efeitos psicológicos. As sensações produzidas podem dimensionar a intensidade, extensão, duração, qualidade, gosto ou desgosto em relação ao produto avaliado (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

Os sentidos do olfato e do gosto constituem os denominados sentidos químicos, já que resultam da interação direta de certos compostos químicos com nossos sistemas receptores periféricos: o epitélio olfatório localizado no nariz e os botões gustativos que se encontram na língua. Ambos são os mais primitivos dos nossos sistemas sensoriais (Muñoz, 2011).

### **3.2.1. Olfato**

O olfato está ligado a parte do nosso cérebro que controla a memória e as emoções, de forma que, frequentemente, memória, emoção e aroma se encontram inter-relacionados. Isto faz com que ao perceber um determinado estímulo de aroma, nossa mente visualize a situação que associamos com determinado aroma, de maneira que somos capazes de sentir que estamos vivenciando a situação novamente (Muñoz, 2011).

A mucosa do nariz humano possui milhares de receptores nervosos e o bulbo olfativo está ligado no cérebro a um “banco de dados” capaz de armazenar, em nível psíquico, os aromas sentidos pelo indivíduo durante toda a vida. Na percepção do aroma, as substâncias desprendidas e aspiradas são solubilizadas pela secreção aquosa que recobre as terminações ciliadas, entrando em contato com os receptores nervosos e produzindo impulsos elétricos. Estes, quando chegam ao cérebro, geram informações que, comparadas aos padrões conhecidos por ele se encaixam como num sistema de “chave-fechadura”. Em média, o ser humano pode distinguir de 2000 a 4000 impressões olfativas distintas (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Na verdade, podemos ser capazes de detectar aromas em concentrações inferiores a um equipamento de cromatografia gasosa, mas, ao mesmo tempo, só podemos distinguir alguns produtos químicos apresentados em uma mistura de centenas de compostos com aromas diferentes (Teixeira et al., 2013).



O sentido do olfato é mais aguçado do que a qualquer outro sentido. Um exemplo prático para ilustrar este fato é o de comparar as cores e aromas: geralmente, a descrição geral de uma cor é feita por meio da utilização de uma ou duas palavras (no máximo) que muitas vezes se traduz explicitamente a cor que qualquer indivíduo com boa acuidade também descreveria. Já para a descrição de aromas frequentemente isto não é verdade. Quando se tenta descrever o aroma de uma rosa, por exemplo, vão surgir várias palavras, sentimentos, emoções ou memórias do indivíduo. Além disso, pessoas diferentes vão usar diferentes adjetivos ou classes para caracterizar o perfume de uma rosa. A principal razão disso é que não somos ensinados a descrever aromas diferentes, como somos ensinados a distinguir cores, formas ou sons. Outro motivo está relacionado com a variabilidade interpessoal e a complexidade do sistema olfativo humano (Teixeira et al., 2013).

### 3.2.2. Percepção dos aromas

Os sentidos do olfato e do gosto se encontram estreitamente conectados entre si, chegando a confundir qual deles recebe realmente o estímulo químico. Ambos sentidos interferem conjuntamente quando se trata de alimentos e na avaliação de sua qualidade, por exemplo (Muñoz, 2011). O aroma é perceptível pelo órgão olfativo quando certas substâncias voláteis são aspiradas, via ortonasal, e quando é resultante de compostos voláteis que entram a partir da boca e do sistema respiratório, via retronasal, durante a degustação (Figura 3.1) (Van Ruth, 2001; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

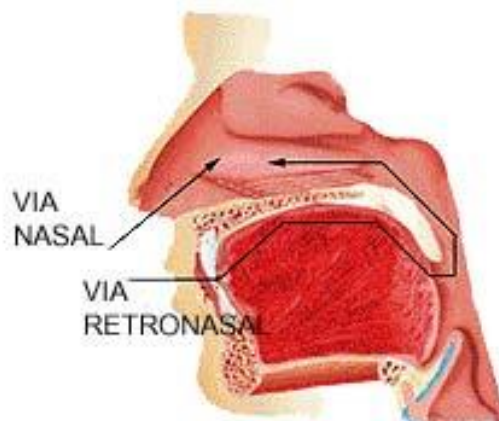


Figura 3.1. Esquema da via nasal e via retronasal humana.

Fonte: Instituto Adolf Lutz, 2008.

O sentido do olfato humano é capaz de distinguir e reconhecer uma grande variedade de qualidades atribuíveis aos compostos voláteis. No entanto, os pesquisadores ainda têm de identificar um bom relacionamento entre o cheiro de um composto e as propriedades físicas do composto que causam esse cheiro. Os compostos que são estruturalmente muito diferentes uns dos outros podem ter o mesmo aroma, enquanto que os compostos quase idênticos em termos de estrutura podem ter a qualidade de aroma muito diferente (Delahunty et al., 2006). No caso dos isômeros ópticos da carvona (Figura 3.2), (R)-carvona que tem cheiro de cominho e (S)-carvona que tem cheiro de hortelã. Já no caso dos isômeros ópticos do limoneno (Figura 3.3), (R)-limoneno tem cheiro de laranja e o (S)-limoneno tem cheiro de limão (Barreiro et al., 1997).

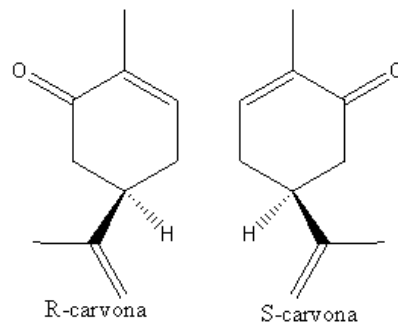


Figura 3.2. Estrutura química dos isômeros ópticos da carvona.

Fonte: Barreiro et al., 1997.

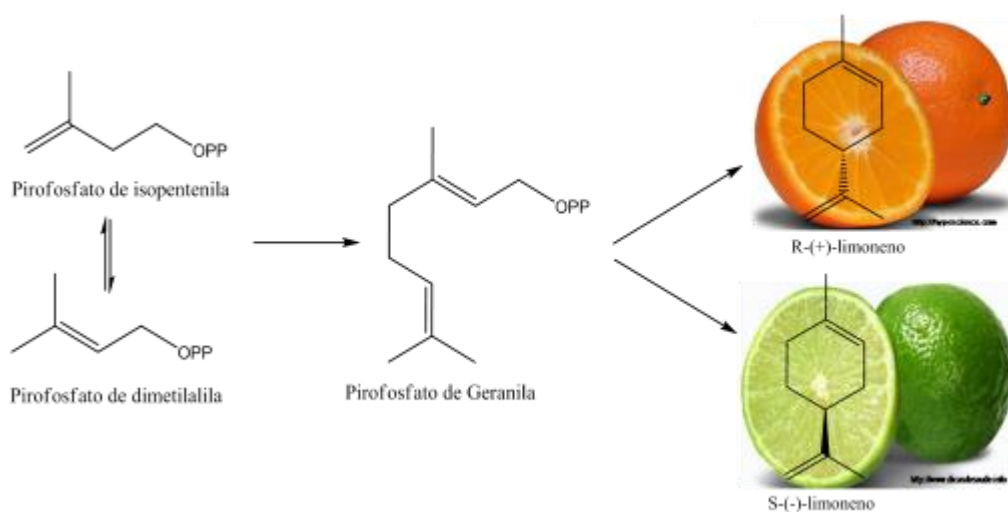


Figura 3.3. Estrutura química dos isômeros ópticos do limoneno.

Fonte: Barreiro et al., 1997.

O aroma percebido de qualquer material é formado por um ou mais compostos voláteis (às vezes centenas) que estão presentes em concentrações acima do limite de sensibilidade (Delahunty et al., 2006; Wardencki et al., 2009). A percepção de compostos voláteis liberados a partir de um produto pelo nariz humano depende da extensão da liberação a partir da matriz deste e das propriedades do aroma do composto. Há indicações de que apenas uma pequena fração do grande número de compostos voláteis que ocorrem em uma matriz perfumada contribui para o aroma (Grosch, 1994; Van Ruth, 2001). A experiência mostra que muitos compostos de aroma ativo ocorrem em concentrações muito baixas (Kataoka et al., 2000; Van Ruth, 2001). Portanto, o perfil cromatográfico obtido por qualquer detector “químico” não reflete necessariamente o perfil de aroma de um produto (Xavier, 2011).

### **3.3. Cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O)**

A cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O) é uma técnica híbrida. Ela combina o poder de separação da cromatografia gasosa (GC) com a seletividade e a sensibilidade específicas do nariz humano (Goodner e Rouseff, 2011). A GC/O utiliza o nariz como um detector paralelo ao detector físico-químico (por exemplo, o detector de ionização de chama - FID ou espectrometria de massas - MS) para obter uma resposta sensorial e química de compostos de aroma, e permite a identificação de compostos-chave para o aroma global (Minteguiaga et al., 2015).

A cromatografia é um método físico de separação, no qual os componentes, presentes em uma amostra a serem separados são distribuídos entre duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. Na cromatografia gasosa (GC) esta separação ocorre na fase gasosa, logo a técnica é viável também para amostras líquidas e sólidas que vaporizam em determinada faixa de temperatura. A amostra é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária por um sistema de injeção. Ela é transportada por uma corrente de gás (fase móvel) chamada gás de arraste. A interação entre os componentes e a fase estacionária leva a uma separação diferencial dos componentes da mistura (Mc Master, 1998).

Um cromatógrafo a gás funciona da seguinte forma (Figura 3.4): um gás inerte (gás de arraste) flui continuamente de um cilindro (1) para a coluna (6) através de um ponto de injeção (4). A amostra é injetada utilizando uma microsseringa no ponto de injeção, devidamente aquecido para que ocorra a vaporização da amostra que será “arrastada” pelo gás de arraste através da coluna. Na análise de óleos essenciais, normalmente, utiliza-se colunas capilares de 10 a 100 m de comprimento e diâmetro interno de 0,1 a 0,75 mm. Após passar pela coluna, o gás de arraste carregando a amostra passa por um detector (7) que irá gerar um sinal elétrico, registrado em formato de picos, que será enviado a um sistema de dados (8) (Mc Nair e Miller, 2009).

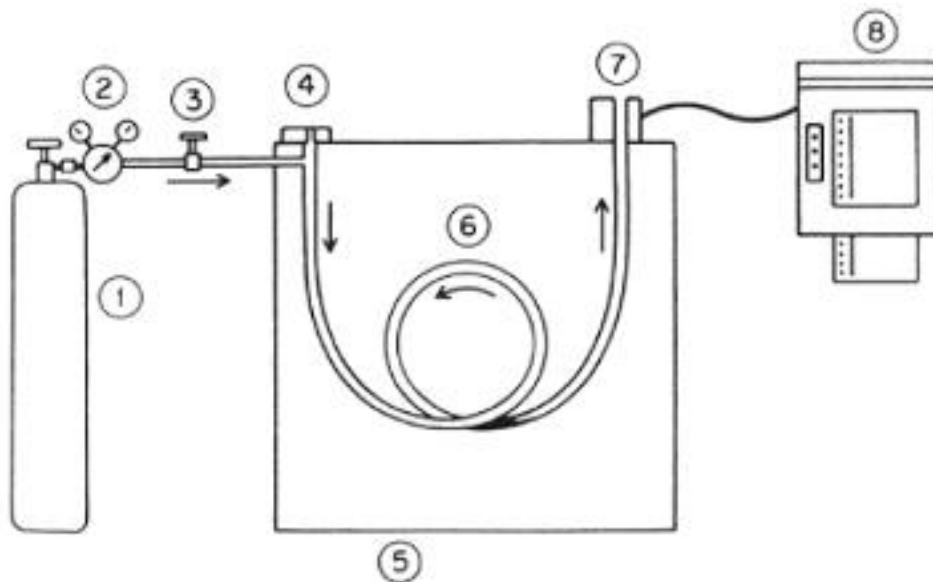


Figura 3.4. Esquema geral de um cromatógrafo a gás.

(1) cilindro de gás de arraste, (2) e (3) controladores de fluxo de gás, (4) sistema de injeção de amostra, (5) forno para aquecimento da coluna, (6) coluna cromatográfica, (7) detector, (8) sistema de aquisição de dados.

Fonte: McNair e Miller, 2009.

Além das vantagens de sensibilidade, de não ser uma técnica destrutiva, e de requerer pequenas quantidades de amostra, a cromatografia gasosa (GC) apresenta algumas dificuldades, tais como a limitação de compostos voláteis com pesos moleculares abaixo de 1000 Daltons. Compostos mais pesados devem ser evitados ou pode-se fazer uso de lã de vidro no *liner* do injetor, assim prevenindo a injeção de alguma impureza no cromatógrafo. Porém seu maior problema é a falta de

provas definitivas sobre a natureza dos compostos detectados. Para a maioria dos detectores de GC, a identificação é baseada apenas no tempo de retenção. Uma vez que muitos compostos podem possuir o mesmo tempo de retenção, fica a dúvida quanto à natureza e à pureza do(s) composto(s) no pico separado (Mc Master, 1998; McNair e Miller, 2009).

A análise cromatográfica é dependente da fase estacionária e método de análise utilizado, pois o tempo de retenção pode ser diferente para o mesmo composto variando estes fatores. Para a identificação correta do composto utiliza-se o índice de retenção que é baseado na análise de um padrão, normalmente uma série de alcanos. O índice mais utilizado é o índice de Kovats. Para análises com programação de temperatura, o índice mais adequado é o índice Aritmético, também chamado de índice Linear (Adams, 2007).

A GC/O (cromatografia gasosa/olfatometria) é um método que determina diretamente quais compostos na mistura complexa de voláteis têm atividade aromática (Goodner e Rouseff, 2011). Embora especialistas em cromatografia notassem que aromas específicos eluíam durante a análise no GC, a técnica não foi utilizada até 1964 (Fuller et al., 1964), onde foi proposto que um nariz humano iria avaliar a eluição de compostos com aroma durante a separação do GC. Mesmo que a técnica de GC/O possa determinar quais voláteis têm atividade aromática e quais não tem, deve-se ter em mente que os resultados não fornecem indicação de como estes compostos irão interagir uns com os outros ou com a matriz da amostra (Goodner e Rouseff, 2011). Em GC/O são avaliados compostos individuais. Esta técnica não fornece informação sobre o seu comportamento de mistura, embora ele indique a importância de alguns compostos para o aroma (Van Ruth, 2001). Identificações preliminares destes compostos com aroma são geralmente obtidas através da comparação entre o comportamento de retenção e descrições sensoriais de dois ou três diferentes tipos de colunas capilares do GC (Goodner e Rouseff, 2011). Em geral, é muito difícil determinar a relevância sensorial de voláteis a partir de uma única análise de GC/O (Van Ruth, 2001). Tentativas de identificação podem ser confirmadas comparando os tempos de retenção e as características sensoriais de padrões autênticos a partir do volátil identificado na tentativa. Sempre que

possível, a espectrometria de massas é também utilizada como uma ferramenta de confirmação de identificação (Goodner e Rouseff, 2011).

A GC/O tem sido amplamente aplicada para a caracterização de compostos de aroma em uma variedade de matrizes, principalmente em alimentos, como vinho, café, pão, chá, carnes, queijos, cogumelos e frutas (Xavier et al., 2013; Minteguiaga et al., 2015; Gerretzen et al., 2015). Há estudos que indicam a utilização da técnica para controle de qualidade: diferenciar espécies de trufas chinesas e pretas (Culleré et al., 2013), comparar diferentes aguardentes de uva comerciais (Cacho et al., 2013) e vinhos (Gürbüz et al., 2013). Outros utilizam para a caracterização do perfil de aroma com o objetivo de identificar os principais compostos responsáveis pelo aroma, tais como nas seguintes matrizes: bananas (Pino e Febles, 2013), azeite de oliva (Kesen et al., 2013), carnes (Straber e Schieberle, 2013), frutas silvestres (Kraujalytė, 2013), cenoura cozida (Buttery e Takeoka, 2013), morango (Prat et al., 2013), extratos de açafraão iraniano (Amanpour et al., 2015), tomates (Du et al., 2015), suco de laranja (Mastello et al., 2015). Outros trabalhos buscam alternativas de melhorar e/ou modificar as características aromáticas de um produto, tais como em vinhos (Bencomo et al., 2013).

### **3.3.1. Instrumentação básica da cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O)**

A determinação dos aromas das substâncias é possível graças à presença de uma ligação especial, uma porta chamada "*sniffing port*" (porta olfatométrica) ligada em paralelo com um detector convencional, tal como o detector de ionização de chama (FID) ou acoplamento à espectrometria de massas (MS) (Figura 3.5). O fluxo é dividido de tal modo que os compostos voláteis atingem os dois detectores ao mesmo tempo, de forma que se possa compará-los. A combinação do detector de olfatometria com um espectrômetro de massas é particularmente vantajosa, uma vez que torna a identificação dos compostos voláteis com atividade aromática possível (Plutowska e Wardencki, 2008).

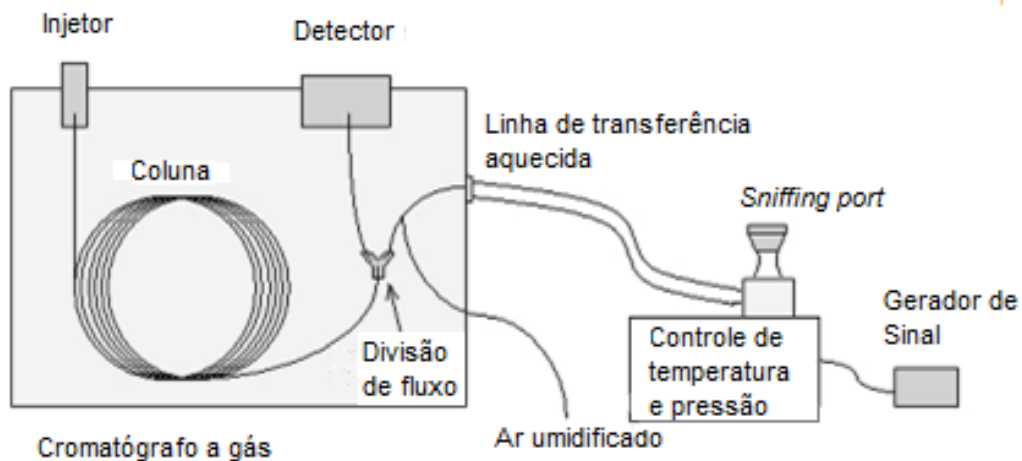


Figura 3.5. Esquema do GC equipado com o detector olfatométrico.

Fonte: Adaptado de Plutowska e Wardencki, 2008.

O projeto de todas as portas olfatométricas disponíveis comercialmente é muito semelhante. O material utilizado na fabricação da porta olfatométrica é o vidro em formato cônico no molde de um nariz, já que ele não interfere nos aromas em comparação a outros materiais tais como o plástico. A linha de transferência, que conduz a coluna cromatográfica que sai do cromatógrafo até o nariz humano, é aquecida para evitar a condensação de compostos semivoláteis sobre as paredes do capilar. Ar úmido é adicionado à corrente que segue para o olfatômetro a fim de evitar que as mucosas do nariz do avaliador sequem, podendo causar desconforto, especialmente em análises mais longas. O comprimento da linha de transferência pode variar amplamente, mas deve ser suficiente para assegurar uma posição sentada confortável para o avaliador durante a detecção e para evitar o desconforto devido à proximidade dos componentes do cromatógrafo que estarão quentes (Plutowska e Wardencki, 2008; Goodner e Rouseff, 2011). Um estudo relatou que a inclusão do ar umidificado seria importante também para melhorar a eficiência de transporte de moléculas para fora da coluna (Hanaoka et al., 2000).

Há inúmeros modelos de olfatômetros que foram desenvolvidos para avaliar aroma dos compostos voláteis que saem da coluna de GC. Algumas unidades são vendidas em separado, como por exemplo, o da Gerstel (Baltimore, MD, EUA) (Figura 3.6), SGE (Austin, TX, EUA) (Figura 3.7) e Brechbühler (Houston, TX, EUA) (Figura 3.8). Outros são vendidos somente como parte de um instrumento completo tais como: os de Datu, (Geneva, NY, EUA) e Microanalytics (Austin, TX, EUA).



Figura 3.6. Olfatômetro da Gerstel.

Fonte: [http://www.gerstelus.com/products\\_subcat.php?id=9](http://www.gerstelus.com/products_subcat.php?id=9).

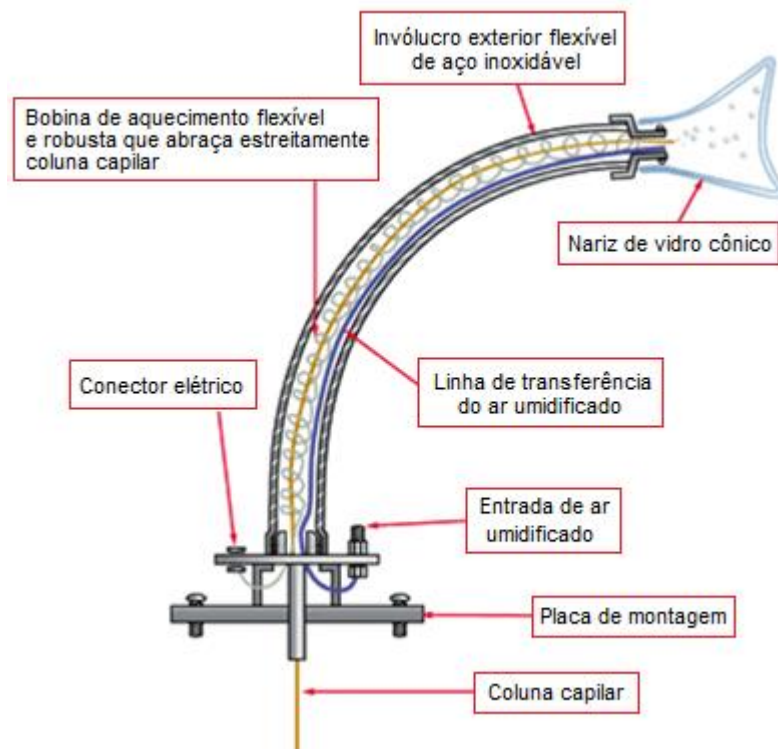


Figura 3.7. Esquema do olfatômetro da SGE.

Fonte: <http://www.sge.com/products/gc-accessories/olfactory-dectector-outlet-odo-ii>.





Figura 3.8. Olfatômetro da Brechbühler.

Fonte: <http://www.esensing.net/en/product/show.asp?id=351&parentid=1&classid=1>.

### 3.3.2. Seleção e treinamento de avaliadores

A qualidade dos resultados obtidos com a técnica de GC/O depende da capacidade dos avaliadores. Uma cuidadosa seleção e treinamento de avaliadores melhora o desempenho, exatidão e precisão dos dados coletados. Sugerem-se avaliadores com sensibilidade, motivação, capacidade de concentração e capacidade de lembrar e reconhecer qualidades aromáticas. Dentre os fatores que interferem na análise estão idade, tabagismo, alergias, uso de prótese ou medicamento (Delahunty et al., 2006; Dussort et al., 2012).

Embora muitos dos primeiros estudos da técnica de GC/O terem sido conduzidos utilizando apenas um único avaliador experiente, às vezes chamado de “sniffer”, atualmente dois a três avaliadores são considerados o mínimo. Vários “sniffers” são necessários para compensar a diferença entre os critérios individuais e minimizar anosmias (incapacidade de sentir aromas) específicas (Goodner e Rouseff, 2011).

Não há um procedimento de treinamento comumente aceito para avaliadores e há relatos conflitantes sobre os benefícios do treinamento. Friedrich et al. (2001),

por exemplo, sugeriram um conjunto de 40 aromas que seriam suficientes para cobrir todas as categorias de aroma. Um conjunto de 10 a 20 padrões de compostos com aroma seriam utilizados para o treinamento. Os avaliadores analisariam repetidas vezes os padrões até serem capazes de identificá-los de forma consistente. Se o avaliador não tivesse experiência anterior, o treinamento duraria em média de 3 a 6 semanas.

### **3.3.3. Vocabulário sensorial**

A descrição inicial do avaliador é baseada em sua própria experiência. Os compostos são normalmente descritos em termos de aromas previamente experimentados ou outras substâncias voláteis.

Segundo Goodner e Rouseff (2011), houve poucas tentativas de padronizar o vocabulário sensorial e tem sido complicado pelo fato de que há muitas divergências em termos de como algo cheira devido a diferenças genéticas nos receptores olfativos. Em termos de GC/O, duas abordagens básicas têm sido desenvolvidas. Uma delas é um procedimento de escolha fixa em uma lista de descrições desenvolvida a partir de análises anteriores, onde todas as respostas subsequentes devem ser selecionadas desta lista. A outra opção são as descrições de livre escolha. Esta opção permite uma maior versatilidade na descrição e leva em consideração as variações de percepção entre avaliadores sensoriais. Essa segunda opção também não requer treinamento, nem uma lista fixa, porque não exige o acordo em termos de aroma percebido. No entanto, a interpretação dos dados finais é mais difícil porque os avaliadores usam diferentes descrições para o mesmo aroma. Muitas vezes, a única maneira de resolver a discrepância na descrição é analisar novamente um padrão, desde que a identificação possa ser feita, e pedir que o avaliador confirme se é o mesmo aroma que foi observado na análise da amostra. A escolha baseada em um banco de dados fixo fica menos ambígua que a escolha realizada quando o avaliador é forçado a escolher uma descrição específica. A escolha forçada pode ser confusa quando os avaliadores lidam com amostras complexas e componentes de aroma que eluem rapidamente e em estreita proximidade uns com os outros. Os avaliadores podem estar procurando na lista de descrições e perderem o componente com aroma seguinte.

Existem alguns sites onde se pode encontrar a descrição do aroma de alguns compostos voláteis, baseada em dados experimentais, tais como: <http://www.flavornet.org/flavornet.html> e <http://www.thegoodscentcompany.com>. O primeiro deles foi desenvolvido por H. Arn e T. E. Acree (1998).

#### **3.3.4. Considerações práticas**

Existem alguns fatores práticos que interferem diretamente na análise de GC/O. Primeiramente a localização da unidade de GC/O. A unidade deve estar situada em uma área de pouco movimento de pessoas ou de pouca atividade para minimizar a distração do avaliador. Também deve ser colocada longe de qualquer local onde haja a preparação de alimentos, fornos de micro-ondas ou cozinhas (Plutowska e Wardencki, 2008; Goodner e Rouseff, 2011). O instrumento deve ser localizado em uma sala separada, equipada com filtro de carvão e ventilação a pressão positiva em relação às salas adjacentes (Goodner e Rouseff, 2011).

É muito importante a escolha de condições adequadas de cromatografia, tais como temperatura e modo de injeção, assim como o tipo de fase estacionária da coluna cromatográfica. A fase estacionária da coluna cromatográfica deve assegurar não só uma elevada seletividade, mas também a eficiência de separação, especialmente no caso de métodos que medem diretamente a intensidade (Plutowska e Wardencki, 2008).

Devem ser evitados longos períodos de armazenamento da amostra para compostos voláteis instáveis (Van Ruth, 2001; Plutowska e Wardencki, 2008). É recomendada a divisão do extrato em pequenas porções individuais para evitar alterações na composição causada pela abertura repetida do recipiente com a amostra (Plutowska e Wardencki, 2008).

Os avaliadores não devem usar perfumes, desodorantes perfumados ou sprays de cabelo nos dias em que irão avaliar. Os avaliadores não devem ter comido ou bebido algo com sabor pelo menos 1 hora antes da análise (Goodner e Rouseff, 2011).

### **3.4. Isolamento dos compostos com aroma**

Um dos aspectos mais importantes da GC/O é o processo de preparação e introdução da amostra no GC (Vas e Vékey, 2004; Plutowska e Wardencki, 2008; Goodner e Rouseff, 2011; Minteguiaga et al., 2015). É mais vantajoso utilizar métodos de isolamento que refletem a liberação dos compostos voláteis a partir da matriz em vez de determinar o conteúdo total, uma vez que facilita a sua correlação com os resultados da análise sensorial (Plutowska e Wardencki, 2008).

Para isolar os compostos com aroma é necessário o isolamento de substâncias puras e a identificação das mesmas. Os compostos que contribuem mais significativamente para o aroma, não são necessariamente os componentes de maior concentração. Muitas vezes estes compostos importantes estão presentes em quantidades mínimas, tornando o isolamento e identificação mais desafiadores (Rowe, 2005; Zellner et al., 2008; Xavier, 2011).

Existem várias técnicas utilizadas na preparação de amostras para a análise de aroma. A escolha de uma ou outra depende, em grande parte, de quais os compostos que se quer analisar. Todos têm vantagens e desvantagens, logo deve-se analisar estes fatores antes de optar por uma técnica em particular (Muñoz, 2011). Com base no princípio de isolamento de compostos com aroma, os métodos de preparação de amostras para análise de aroma podem ser agrupados em métodos de extração com solvente, métodos de destilação, técnicas headspace e técnicas de extração em fase sólida (Rowe, 2005; Muñoz, 2011). Dentre as técnicas de extração em fase sólida, temos a microextração em fase sólida (SPME), que será descrita com mais detalhes, já que foi a técnica mais utilizada no desenvolvimento experimental desta tese.

#### **3.4.1. Extração com solventes**

Esta é uma das técnicas mais utilizadas para extrair os compostos voláteis de alimentos, quando aplicável (Berger, 2007; Muñoz, 2011). O conceito básico é a transferência de compostos voláteis de um produto para um solvente orgânico. O extrato é obtido através da mistura de uma amostra líquida ou sólida com um

solvente, usualmente orgânico (diclorometano, éter dietílico, entre outros), permitindo a separação e recolha dos solutos na fase do solvente, após longos períodos. Após isso é necessário a concentração do extrato mediante a evaporação do solvente. Em muitos casos a separação pode ser efetuada pela agitação em um funil de separação (Rowe, 2005; Plutowska e Wardencki, 2008; Muñoz, 2011). Quando a matriz é líquida, temos a extração líquido-líquido (LLE), e quando a matriz é sólida, temos a extração direta com solventes (DSE) (Muñoz, 2011).

Apesar dessas técnicas apresentarem bons resultados e apresentem vantagens, como sua grande sensibilidade e simplicidade, também contam com inúmeros inconvenientes. Entre eles, utilizam grandes volumes de solventes orgânicos prejudiciais para o meio ambiente, necessitam tempos muito longos de análise com uma grande manipulação de amostras, sua baixa seletividade e seu resíduo (Muñoz, 2011). Outro problema é que são extraídos materiais semivoláteis e não voláteis, que podem desgastar e degradar partes do GC (Goodner e Rouseff, 2011).

#### **3.4.2. Métodos de destilação**

Estes métodos de separação se baseiam na diferença de volatilidade dos componentes de uma amostra (Muñoz, 2011). Este grupo inclui as técnicas de destilação simples a vapor, que geram um extrato aquoso, e destilação-extração simultânea (SDE), em que o produto final é um extrato de solvente. A principal vantagem das técnicas de destilação a vapor é que os extratos resultantes não contêm qualquer produto não volátil. Os compostos não voláteis permanecem na matriz original (Rowe, 2005; Berger, 2007).

A destilação por arraste a vapor é muito comumente usada para produção de materiais com aroma provenientes de material vegetal, plantas por exemplo (Berger, 2007). A destilação por arraste a vapor é a técnica mais utilizada para extração de óleos essenciais de plantas por ser um método simples e barato quando comparado a métodos modernos que utilizam fluidos supercríticos. O processo basicamente consiste na geração de uma corrente de vapor em uma caldeira que percorre o vaso de extração onde se encontra o leito de plantas. Em seguida, a mistura água e óleo

essencial na fase vapor é introduzida em um condensador, onde o vapor é liquefeito. A diferença de solubilidade entre a água e o óleo essencial permite a separação destes em duas fases líquidas (Cassel e Vargas, 2006).

No caso do aroma, os compostos com aroma apresentam uma volatilidade muito maior que o resto dos componentes. Por isso, é possível separá-los do restante da matriz de forma rápida mediante sua vaporização e posterior condensação, o qual se consegue com uma instrumentação simples. No caso de amostras aquosas, tem que se levar em conta que a água pode constituir uma grande interferência, já que, ao ter um ponto de ebulição relativamente baixo, também se destilará junto com os compostos voláteis. Se a quantidade de água que se extrair for excessiva, então será necessário eliminá-la por adição de sais anidros, por congelação-concentração ou mediante uma extração com solventes (Muñoz, 2011).

### **3.4.3. Técnicas *headspace***

As técnicas *headspace* consistem em extrair os compostos voláteis da fase vapor que está em equilíbrio com a matriz, de forma a obter um extrato mais parecido possível com a fração volátil que inalamos de um produto (Muñoz, 2011).

A análise do *headspace* pode ser de dois tipos: estático e dinâmico. No primeiro a amostra é mantida em um recipiente fechado até que se atinja o equilíbrio termodinâmico dos compostos voláteis entre a fase líquida ou sólida e a fase vapor, geralmente à temperatura ambiente, seguida da injeção de uma alíquota da fase vapor em cromatógrafo a gás. No *headspace* dinâmico ou “purge and trap” há uma coleta contínua dos compostos voláteis, realizada por um sistema a vácuo ou pela passagem de um gás inerte. Uma armadilha, recheada com material adsorvente, coleta e concentra os compostos voláteis. Nesses sistemas, as condições ótimas de coleta dos compostos voláteis dependem dos tempos de captura, da dimensão e tipo de polímero da armadilha. Posteriormente, os compostos voláteis são desorvidos da armadilha por um solvente orgânico adequado, ou termicamente (Facundo, 2009; Muñoz, 2011).

Em comparação com técnicas convencionais de extração exaustiva, os métodos *headspace* têm a vantagem de normalmente não causar a perda dos compostos mais voláteis, que muitas vezes têm a maior influência sobre o aroma da amostra. Além disso, as técnicas *headspace* permitem a análise cromatográfica destes compostos, o que é muitas vezes difícil com os métodos de extração com solvente, devido à presença do pico do solvente, que mascararia a presença de compostos mais leves (Plutowska e Wardencki, 2008).

Porém, as técnicas *headspace* apresentam alguns inconvenientes. Um deles é o fato da concentração relativa dos componentes no *headspace* não refletirem a concentração na amostra, devido às diferenças de volatilidade dos compostos com aroma. Outra desvantagem é o fato do perfil do aroma ser dependente da temperatura de amostragem (Rowe, 2005).

#### **3.4.4. Técnicas de extração em fase sólida**

##### **3.4.4.1. Microextração em fase sólida (SPME)**

Com base na teoria de sorção (adsorção-absorção), a microextração em fase sólida (SPME) foi desenvolvida pelo grupo de Pawliszyn em 1990 como uma técnica livre de solvente (Arthur e Pawliszyn, 1990; Yang et al., 2013). A SPME permite a extração e concentração simultânea dos compostos (Muñoz, 2011).

O princípio básico da SPME é a exposição de uma fibra pré-revestida, normalmente polimérica, em uma matriz para captura de analitos de interesse. O revestimento da superfície exposta adsorve os compostos de interesse uma vez que o equilíbrio entre este e a matriz seja atingido. Após isso, a fibra com os compostos é transferida para um dispositivo onde ocorre a dessorção dos mesmos que segue para um instrumento de medida de detecção (Dórea et al., 2008; Orlando, 2009; Balasubramanian e Panigrahi, 2011).

Na SPME utiliza-se uma fibra de sílica fundida, recoberta com um adsorvente adequado (Figura 3.9 a). A fibra se encontra acondicionada dentro de uma espécie

de agulha em um amostrador semelhante a uma seringa, ficando exposta somente no momento da extração (Orlando et al., 2009).

O tipo de revestimento das fibras escolhido vai depender dos compostos alvo a serem extraídos. As características de polaridade e volatilidade dos compostos de interesse são levadas em conta na escolha (Balasubramanian e Panigrahi, 2011). As fibras são, em sua maioria, feitas de um ou mais polímeros, sendo as mais utilizadas e de maior disponibilidade no mercado as de polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), carbowax (CW) e as combinadas polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), Carboxen-PDMS e Carbowax-DVB. Essas fibras possuem espessuras que variam entre 7–100  $\mu\text{m}$  e comprimento de normalmente 1cm (Kataoka et al., 2000; Orlando et al., 2009; Balasubramanian e Panigrahi, 2011).

O processo de extração por SPME pode ser realizado por imersão da fibra diretamente na matriz ou através da exposição no espaço confinante chamado “*headspace*”, onde a fibra entra em contato somente com os vapores do analito liberados da matriz com ou sem aquecimento (Figura 3.9 b) (Kataoka et al., 2000; Vas e Vékey, 2004; Orlando et al., 2009; Balasubramanian e Panigrahi, 2011). A técnica “*headspace*” é especialmente útil quando existe alguma incompatibilidade entre a fibra e a matriz, sendo bastante empregada na determinação de compostos voláteis por GC. A SPME “*headspace*” é usada quase exclusivamente na investigação de sabor e aroma de alimentos (Jelen et al., 2012). Já a extração direta é utilizada para compostos menos voláteis. Após a extração pela fibra, o soluto é desorvido termicamente (Balasubramanian e Panigrahi, 2011).

O processo mais comum para a desorção de analitos a partir da fibra de SPME é desorção térmica no injetor de um cromatógrafo de gás, porque este método de desorção elimina completamente o uso de solventes orgânicos (Balasubramanian e Panigrahi, 2011). A SPME se tornou a técnica de extração e pré-concentração especialmente adequada para metodologias de análise química onde posteriormente serão utilizadas técnicas de separação, detecção e identificação de compostos presentes em uma amostra, incluindo aplicações ambientais e biológicas (Yang et al., 2013), assim como as várias aplicações na área de alimentos (Jelen et al., 2012).



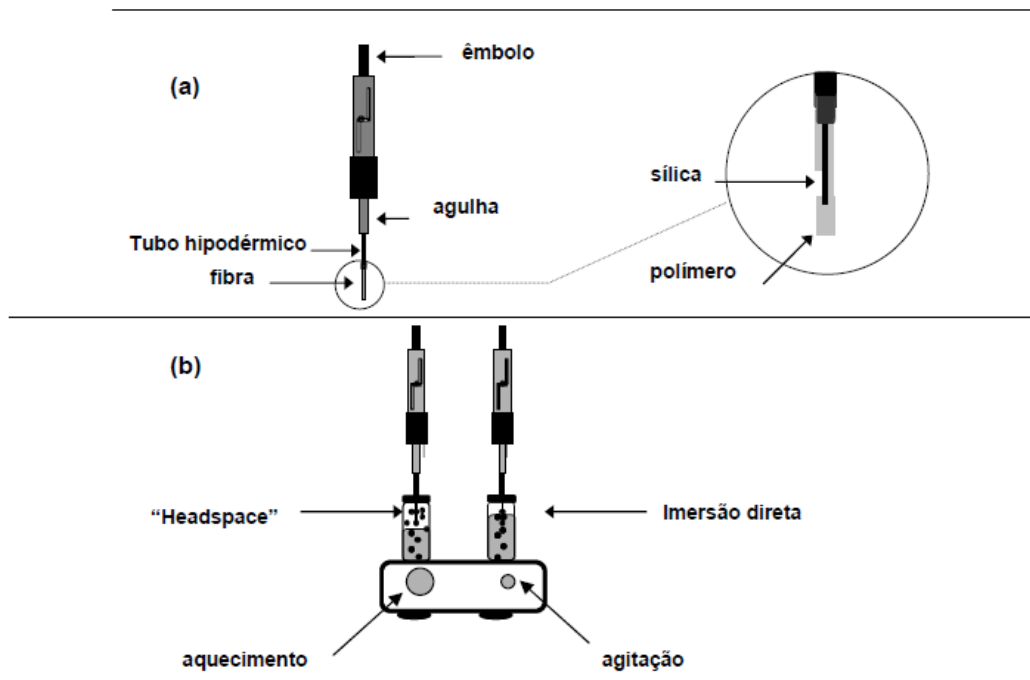


Figura 3.9. (a) Representação dos componentes de um amostrador e uma fibra empregados em SPME; (b) Técnicas de SPME por “headspace” e imersão direta.

Fonte: Orlando et al., 2009.

A SPME apresenta vantagens como a economia de tempo e solvente, resumindo o processo de extração em praticamente um único passo (Kataoka et al., 2000; Vas e Vékey, 2004; Orlando et al, 2009; Balasubramanian e Panigrahi, 2011; Yang et al., 2013). Além da técnica de SPME apresentar grande seletividade, existe uma ampla variedade de adsorventes (fibras) comercializadas (Muñoz, 2011). Os custos reduzidos na SPME devem-se, ainda, ao fato das fibras de extração serem utilizadas várias vezes antes de serem descartadas (Orlando et al., 2009). Uma desvantagem é o fato de que o perfil de aroma dos compostos voláteis extraídos depende do tipo, espessura e comprimento da fibra, bem como do tempo e temperatura de amostragem (Rowe, 2005).

### 3.5. Tipos de olfatométrica

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para obter e processar os dados de GC/O e estimar a contribuição sensorial do aroma de compostos isolados. Os principais métodos são os seguintes: análise por diluição, tempo-intensidade e frequência de detecção (Van Ruth, 2001; Goodner e Rouseff, 2011).

Essas técnicas possibilitam determinar quais compostos voláteis têm aroma e quais deles são importantes para a formação do mesmo, bem como os que contribuem para a qualidade da matriz estudada. O ser humano tem a capacidade de detectar os compostos com aroma que eluem do efluente cromatográfico, além de mensurar a duração (início ao fim) de cada aroma, quantificar sua intensidade e descrever sua qualidade, pois o nariz humano é muito mais sensível aos compostos com aroma do que vários detectores (Delahunty et al., 2006).

Em comum, as técnicas olfatométricas apresentam a forma de condução dos compostos voláteis da coluna cromatográfica até o nariz do avaliador, utilizando uma porta olfatométrica, também chamada de olfatômetro. No entanto, algumas diferenças podem ser observadas com relação a amostra e aquisição de dados (Facundo, 2009).

### **3.5.1. Análise por diluição**

Os métodos de análise por diluição são os mais antigos e populares métodos de GC/O (Goodner e Rouseff, 2011). O objetivo da técnica é a de determinar a potência relativa da atividade aromática de compostos voláteis presentes em um extrato. Na análise por diluição, o extrato é diluído por etapas, geralmente uma série de diluições de 1:2 ou 1:3, da amostra mais concentrada até as mais diluídas, sucessivamente até que nenhum aroma significativo seja detectado (Van Ruth, 2001; Goodner e Rouseff, 2011). A amostra mais diluída no qual um composto de aroma-ativo pode ser detectado é chamada de valor de diluição ou fator valor de diluição (valor de FD). Por exemplo, se um extrato for diluído numa série de 1:2 (uma parte de extrato em duas partes de solvente) e o aroma de interesse foi percebido até à diluição de número seis, o valor de diluição é de  $2^5 = 32$ . A extração com solventes é o procedimento mais comum utilizado para extrair e concentrar voláteis com aroma para este tipo de GC/O (Goodner e Rouseff, 2011).

Há duas técnicas baseadas neste princípio de análise por diluição que foram desenvolvidas por grupos de pesquisa diferentes: "*Charm Analysis*" (*Combined Hedonic Aroma Response Measurement*) desenvolvida por Acree et al. (1984) e

análise de diluição do extrato de aroma - AEDA (*Aroma Extraction Dilution Analysis*) desenvolvida por Schieberle e Grosch (1987) e Ullrich e Grosch (1987). A única diferença entre as técnicas CHARM e AEDA é a maneira de processar os dados. Enquanto a AEDA só indica a unidade de diluição máxima em que um composto volátil pode ser percebido, em CHARM é possível verificar a duração da percepção do composto nas diluições (Miyazawa, 2009). A “*Charm Analysis*” requer um software específico e necessita de um computador, enquanto que a AEDA pode ser realizada com papel e caneta. Esta seria a principal razão desta última ser mais utilizada (Goodner e Rouseff, 2011).

Na CHARM os avaliadores treinados registram o início e fim da percepção de cada aroma usando um software, e informam a descrição sensorial. Os dados registrados pelos avaliadores geram um aromagrama com picos e áreas integradas de picos (valores CHARM), no qual cada composto com aroma é resultante da somatória de todas as diluições em que é percebido em um determinado tempo de retenção (Van Ruth, 2001; Miyazawa, 2009; Goodner e Rouseff, 2011). Um valor CHARM pode ser calculado de acordo com a Equação 3.1.

$$c = d^{n-1} \tag{3.1}$$

onde  $n$  é o número de respostas coincidentes e  $d$  é o fator de diluição.

A Figura 3.10 mostra a construção idealizada de um aromagrama CHARM (Goodner e Rouseff, 2011). Compostos voláteis de maior área (somatória) representam os de maior importância aromática para a matriz (Acree et al., 1984).

A técnica AEDA determina o máximo de diluições em que o aroma ainda é percebido pelo avaliador, sendo calculado para cada composto com aroma um fator de diluição. Quanto maior o fator de diluição, maior a importância aromática do composto para a matriz (Ullrich e Grosch, 1987). Na AEDA o fator de diluição (FD valor) é simplesmente a última diluição na qual um composto de aroma-ativo é detectado. Os resultados são normalmente apresentados como o logaritmo do fator de diluição ( $\log$  FD - eixo  $y$ ) *versus* o índice de retenção (eixo  $x$ ), ou listando os

valores FD (Van Ruth, 2001; Goodner e Rouseff, 2011). Um exemplo de um aromagrama AEDA é apresentado na Figura 3.11.

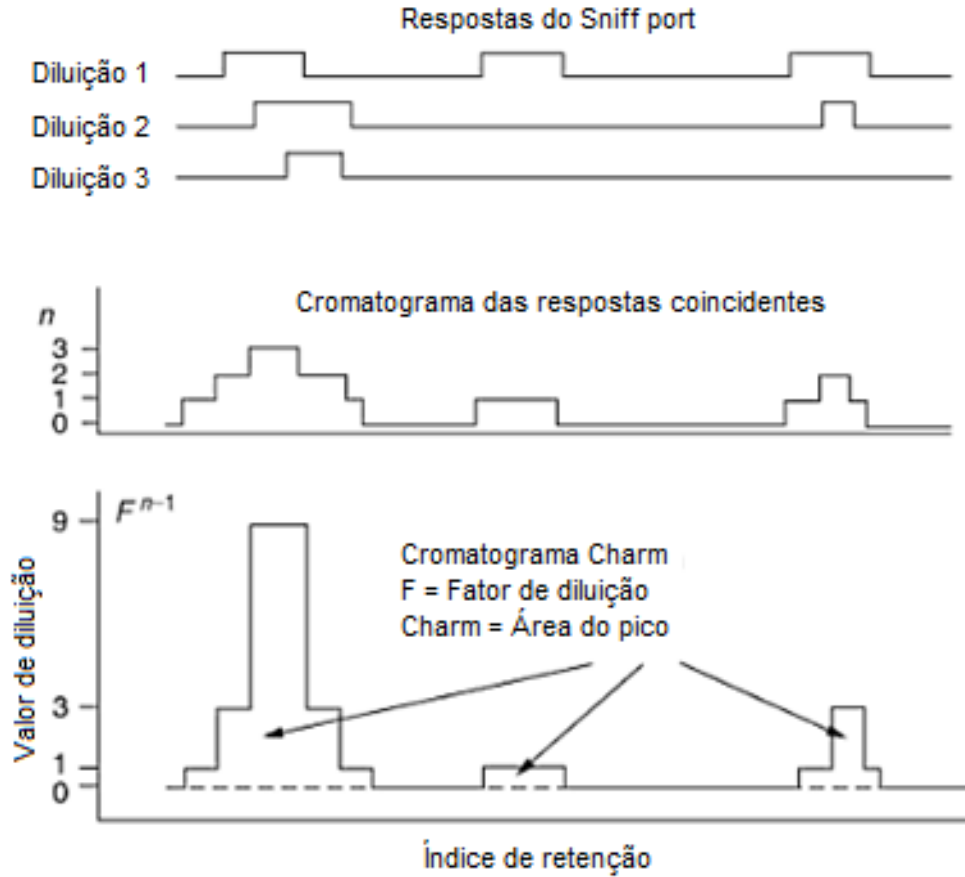


Figura 3.10. Construção de um aromagrama Charm.

Fonte: Goodner e Rouseff, 2011.

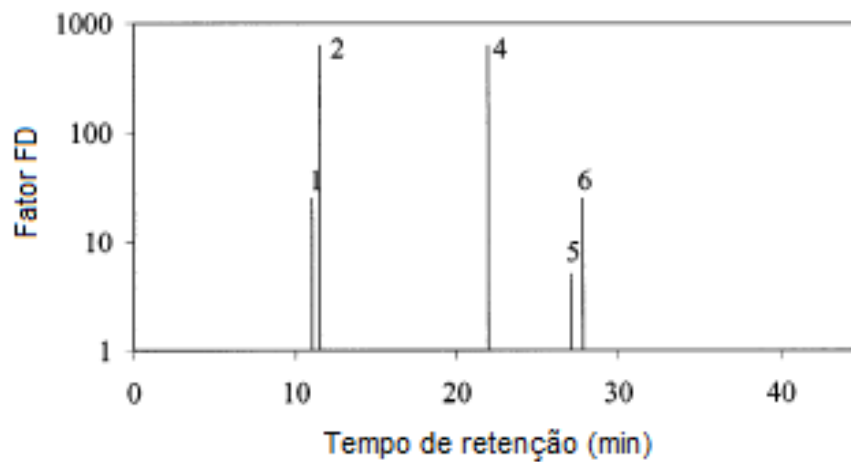


Figura 3.11. Exemplo de um aromagrama de AEDA.

Fonte: Van Ruth, 2001.

Nas técnicas CHARM e AEDA várias diluições do isolado original da amostra são analisadas por GC/O por dois ou três julgadores treinados, o que pode gerar uma análise tendenciosa pelo pequeno número de indivíduos. Este fato e o grande número de corridas cromatográficas podem ser consideradas desvantagens dos métodos (Miyazawa, 2009). Outra desvantagem é que na análise de diluição os compostos percebidos ao mais alto nível de diluição são considerados os mais potentes na amostra e isso não corresponde necessariamente a uma ordem de intensidade dos aromas identificados (Van Ruth, 2001).

### 3.5.2. Tempo-intensidade

Os métodos de tempo-intensidade baseiam-se na estimativa de magnitude da intensidade do aroma (Van Ruth, 2001). Há duas técnicas baseadas neste princípio de tempo-intensidade: OSME (*Oregon State Method*), desenvolvida por McDaniel et al. (1990), e FSCM (*Finger Span Cross-modality Matching*), desenvolvida por Etiévant et al. (1999).

A técnica de tempo-intensidade OSME é considerada uma das mais adequadas para se avaliar a importância do aroma de compostos voláteis, já que se fundamenta na Lei de Stevens (Gostelow et al., 2001).

Segundo Carvalho (2001), a intensidade do aroma é o poder de percepção da sensação aromática sendo proporcional à concentração do aroma, devido a uma ou mais substâncias no ar. De acordo com Carmo Jr. (2005), a intensidade é uma função crescente da concentração dos aromas no ar respirado. A relação entre a concentração de aroma e a intensidade percebida ou fisiológica é representada pela curva de Stevens, representada na figura 3.12.

Qualquer tipo de aroma é caracterizado por uma curva que traçará a intensidade olfativa e sua concentração. Essa curva apresenta um patamar inodoro (intensidade indeterminada), localizado abaixo do limite de percepção, e um patamar de saturação. Pode se concluir pela análise da curva de Stevens que quanto mais forte é o aroma, menores serão seus limites de identificação e de percepção (Souza, 2007).

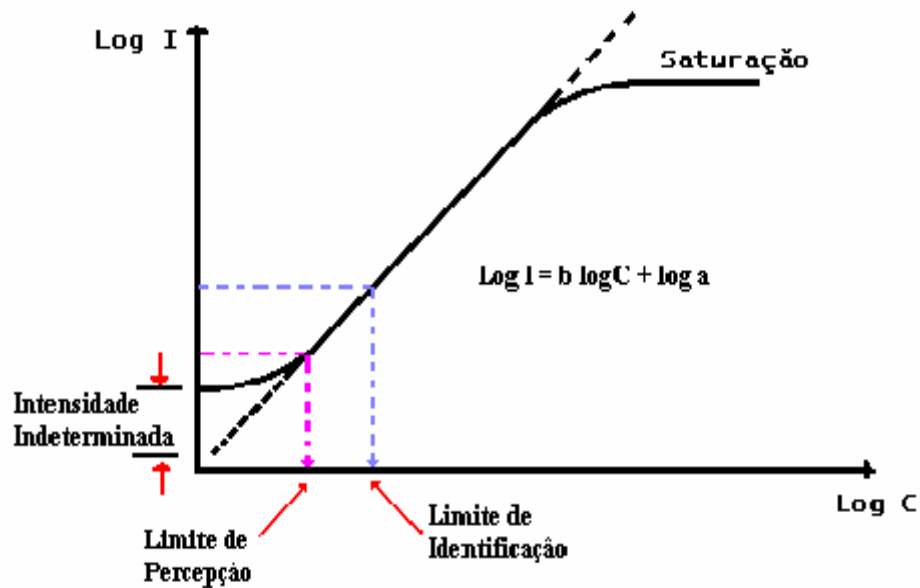


Figura 3.12 Variação da intensidade aromática de um corpo puro em função da concentração. I: intensidade odorante; C: concentração do odor; a: constante da lei de Stevens; b: parâmetro que representa o crescimento da intensidade em função da constante (valor entre 0,2 e 0,8).

Na técnica tempo-intensidade, avaliadores treinados e selecionados avaliam o isolado original, em repetições. O avaliador analisa sensorialmente cada composto com aroma que sai do efluente cromatográfico e descreve a qualidade deste ao mesmo tempo em que utiliza um programa de tempo-intensidade para registrar o tempo de duração do aroma sentido e sua intensidade (Facundo, 2009; Miyazawa, 2009).

As repetições de cada julgador são analisadas e integradas, formando um osmograma (Figura 3.13) individual médio para cada julgador, que são então analisados, gerando um aromagrama consensual da equipe. Os compostos de maior importância do aroma são representados pelos picos mais altos, mais intensos e/ou de maior área. O aromagrama consensual pode ser comparado ao cromatograma, permitindo assim, identificar os compostos importantes para a formação do aroma de uma matriz, mesmo que estes estejam em concentrações muito baixas no isolado (Facundo, 2009; Miyazawa, 2009).

A técnica olfatométrica Finger Span (Figura 3.14) é similar à técnica OSME, no entanto ao invés de estimar a intensidade com o uso de escalas, este método

aplica um dispositivo que permite variar a amplitude da abertura dos dedos polegar e indicador na mesma proporção em que o julgador percebe a intensidade aromática dos compostos (Etiévant et al., 1999).

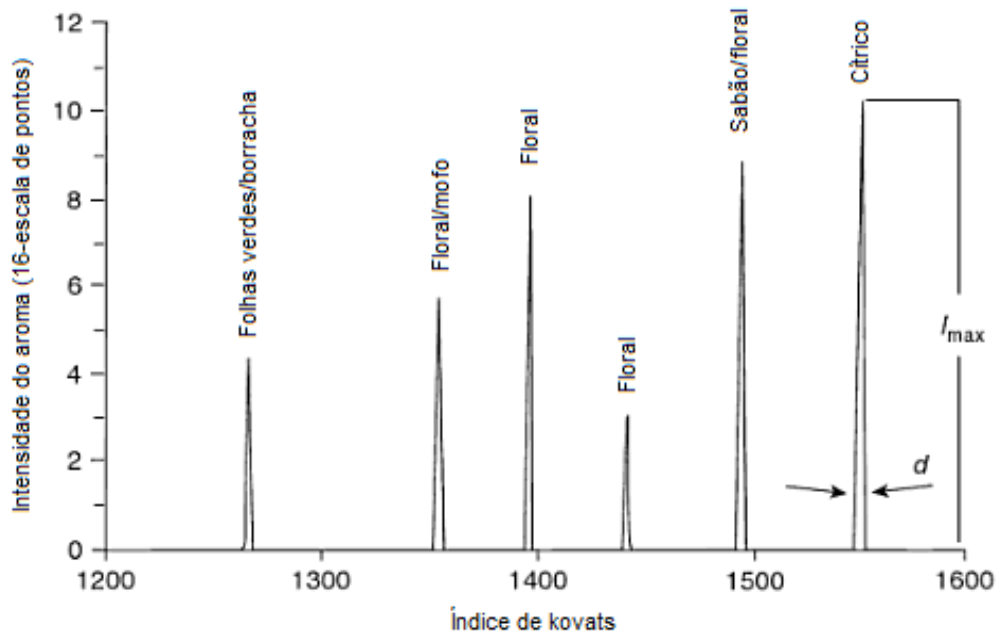


Figura 3.13. Exemplo de Osmograma.

Fonte: Goodner e Rouseff, 2011.

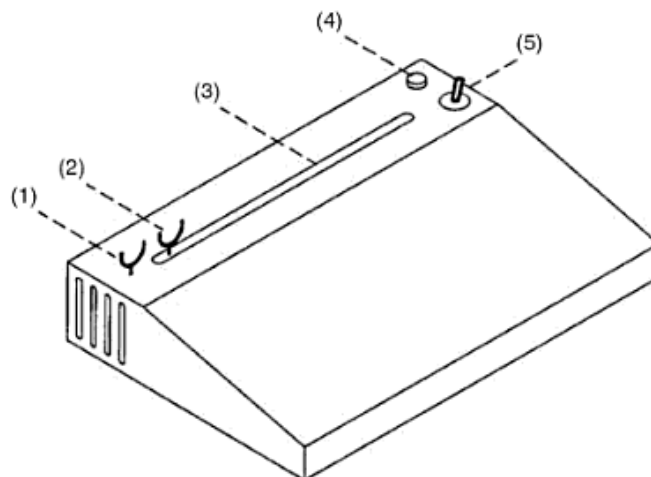


Figura 3.14. Dispositivo de Finger Span. (1) um anel fixo para o polegar, e (2) o anel móvel para o maior ou o dedo indicador ligado a um reóstato 195 milímetros de comprimento; (3) faixa cursor, e (4) da lâmpada de sinal, (5) ligar / desligar.

Fonte: Goodner e Rouseff, 2011.

Como não é uma técnica de diluições sucessivas, esta apresenta como vantagem um menor tempo de análise, pois os avaliadores necessitam apenas realizar as repetições de um mesmo isolado, além de fornecer um aromagrama correspondente ao cromatograma (Facundo, 2009).

### **3.5.3. Frequência de detecção**

Na técnica de frequência de detecção, seis a doze julgadores avaliam o isolado original. A importância dos compostos com aroma é medida pelo número de julgadores que detectam o aroma do composto. A proposta dessa técnica é detectar um mesmo aroma em um tempo de retenção específico, sendo que, compostos que são detectados com maior frequência possuem maior importância aromática. A maior vantagem dessa técnica é não ser necessário treinar os avaliadores (Miyazawa, 2009). Ela é um processo rápido e fácil de manusear (Machiels et al., 2003). Há duas técnicas de frequência de detecção: NIF/SNIF (Nasal Impact Frequency / Surface of Nasal Impact Frequency), proposta por Pollien et al. (1997), e OGA (Olfactometry Global Analysis), por Linssen et al. (1993).

A técnica GC-SNIF (Pollien et al., 1997) fornece a medida da intensidade baseada no número de julgadores que detectam um mesmo aroma simultaneamente (frequência de detecção), ou seja, há uma soma dos aromagramas individuais gerando um aromagrama normalizado em formato de cromatograma, onde a altura normalizada ou superfície dos picos é chamada de NIF/SNIF. Essa técnica necessita um número mínimo de 8-10 julgadores diferentes não treinados (Facundo, 2009).

No caso da técnica de frequência OGA são necessários julgadores selecionados e treinados, que avaliam o efluente da coluna cromatográfica, sem repetição. Os julgadores utilizam um software para registrar a duração do aroma percebido ao mesmo tempo em que o descrevem para o analista. Com os dados do tempo de duração do aroma e o número de julgadores que perceberam o aroma é gerado o aromagrama da equipe. Quanto maior o número de julgadores que perceberam o aroma do composto, maior a contribuição do aroma desse composto para a matriz (Miyazawa, 2009).



### 3.5.4. Comparação entre as técnicas

Delahunty et al. (2006), ao compararem as técnicas olfatométricas, relataram que existem diferenças em seus princípios e a escolha da técnica deverá ser baseada no objetivo do estudo. Quando há necessidade de se obter resultados rapidamente, as técnicas mais indicadas são as de frequência, seguidas das de tempo-intensidade e por último das técnicas de diluição, que demandam mais tempo para serem aplicadas. Com relação à facilidade de aplicação, as técnicas de tempo-intensidade são consideradas mais complexas, enquanto que as de frequência e de diluição são mais facilmente empregadas. As técnicas de diluição e frequência são muito úteis na identificação dos compostos de maior importância aromática, porém são criticadas por não medirem a intensidade do estímulo/aroma percebido.

### 3.6. Identificação de compostos com aroma

Compostos com aroma, que têm sido amplamente utilizados em alimentos, perfumes, medicamentos, entre outros produtos, são economicamente importantes. A identificação precisa dos compostos de aroma é um pré-requisito para o controle de qualidade e desenvolvimento de produtos (Yan et al., 2015). A correta identificação dos compostos pode ser extremamente complicada devido as amostras apresentarem centenas de compostos (Goodner e Rouseff, 2011). Nas últimas décadas, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) provou ser uma ferramenta útil para a identificação de compostos orgânicos, devido à sua elevada capacidade de separação e identificação precisa (Yan et al., 2015).

O espectrômetro de massas (MS) é um sistema que pode ser acoplado ao cromatógrafo gasoso. Ele requer pouca quantidade de amostra. O funcionamento do MS baseia-se na ionização e quebra das moléculas. A forma mais utilizada para que ocorra a ionização, quando o sistema é acoplado a um cromatógrafo a gás seguido de um analisador de massas e um detector, é por impacto de elétrons (EI, do inglês *electron impact*). Quando a molécula no estado vapor entra no MS, ela recebe um impacto de elétrons gerados por um filamento. Com esse impacto, a

molécula é fragmentada e ionizada, e posteriormente os íons são separados por sua razão massa/carga ( $m/z$ ) no analisador de massas (Mc Nair e Miller, 2009).

O principal objetivo da análise GC/MS é separar compostos de misturas complexas. Normalmente, a identificação de compostos é conseguida através de pesquisa em biblioteca com base na comparação dos espectros de massa experimental com aqueles armazenados numa biblioteca apropriada. No entanto, espectros de massa não podem fornecer informações estruturais suficiente para distinguir todos os compostos facilmente. Além de correspondência de espectros de massa, dados de retenção cromatográficos podem servir como informação complementar para identificação positiva de componentes resolvidos (Yan et al., 2015).

Os índices de retenção (RI) também são utilizados na identificação dos compostos voláteis, para comparar a ordem de eluição experimental com a ordem de eluição descrita na literatura na mesma fase estacionária, além do uso de padrões analíticos que auxiliam e eliminam possibilidades equivocadas, aumentando a confiabilidade da identificação (Miyazawa, 2009; Goodner e Rouseff, 2011; Yan et al., 2015). Vários bancos de dados de índice de retenção são disponíveis. Digno de nota, entre vários conjuntos de dados de índice de retenção, são compilações publicadas como livros e amplamente utilizados como obras de referência, por exemplo, aqueles de autoria de Jennings e Shibamoto (Jennings e Shibamoto, 1980) e de Adams (Adams, 2007). Para compostos de aroma, o banco de dados de índice de retenção na "<http://www.flavournet.org>" tem sido amplamente usado.

### **3.7. Óleos essenciais**

Óleo essencial é definido como um produto obtido por hidrodestilação, destilação por arraste a vapor ou destilação seca ou por um processo mecânico adequado sem aquecimento (para frutas cítricas) de uma planta ou de algumas partes dela (Rubiolo et al., 2010; Turek e Stinzinger, 2013). A volatilidade e a insolubilidade em água e a solubilidade em solventes orgânicos usuais permitem caracterizá-los e promover seu isolamento. Apresentam-se, geralmente, sob a forma

de líquidos oleosos, de aroma agradável e intenso. Todavia existem os de aroma desagradável e ainda os inodoros (Costa, 1994). Alguns fatores influenciam em sua estabilidade, tais como: ar, luz, temperatura, umidade e metais contaminantes (Vitti e Brito, 2003; Turek e Stinzing, 2013).

Os óleos essenciais são substâncias do metabolismo secundário, presentes em alguns tipos de plantas, que conferem o aroma ou sabor característico a elas, e estão relacionados com diversas funções necessárias de adaptação ao meio ambiente. O metabolismo secundário serve para proteger a planta contra animais que a comem e contra doenças, para atrair insetos e outros animais polinizadores, ou animais que espalham suas sementes (Gonçalves et al., 2014).

Podemos encontrar os óleos essenciais em matrizes vegetais, na parte aérea, nas flores, nas folhas, nos frutos, na madeira, nas cascas do caule, nas raízes, nos rizomas e nas sementes. Os óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, propriedades físico-químicas e aromas distintos (Simões e Spitzer, 2000).

Os constituintes dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos de enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, existindo alguns compostos majoritários, outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades, chamados de traços (Serafini et al., 2002).

Há uma ampla gama de possíveis aplicações para os óleos essenciais devido a grande variedade em sua composição, inclusive em fragrâncias (Turek e Stinzing, 2013). A contribuição dos compostos simples para o aroma não depende estritamente da sua respectiva concentração, mas depende do seu limite de percepção que é determinado pela estrutura e volatilidade. Consequentemente, mesmo componentes minoritários resultantes de reações de oxidação ou degradação podem ter um forte impacto sobre o aroma (Grosch, 2007). Além de sua função aromatizante, os óleos essenciais representam uma alternativa "verde" no campo nutricional, farmacêutico, e agrícola, devido à atividade antimicrobiana,

antiviral, antifúngica, inseticida, propriedades antioxidantes, e também atividades estimulantes do sistema nervoso (Turek e Stinzing, 2013).

### **3.7.1. Extração de óleos essenciais**

Muitas espécies de plantas contêm compostos voláteis que podem ser extraídos na forma de óleo essencial. A extração dos óleos essenciais pode ser feita por diversas técnicas clássicas e convencionais, como por exemplo, a destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, prensagem a frio, extração com solventes orgânicos, enfloração, entre outros (Simões e Spitzer, 2000; Cassel e Vargas, 2006; El Asbahani et al. 2015). Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo na planta (flores, folhas, cascas, raízes e rizomas) e sua utilização (Simões e Spitzer, 2000). As vantagens e as desvantagens de alguns métodos foram discutidas por Cassel e Vargas (2006). Há também técnicas inovadoras, com o objetivo de reduzir o tempo de extração, consumo de energia e uso de solvente, como por exemplo: extração com líquido subcrítico (H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>), extração assistida por ultrassom (UAE), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração por micro-ondas livre de solvente (SFME), hidrodifusão e gravidade por micro-ondas (MHG), destilação a vapor de micro-ondas (MSD), difusão a vapor de micro-ondas (MSDf), entre outras (El Asbahani et al. 2015).

### **3.7.2. Análise química e olfatométrica de óleos essenciais**

A composição do óleo essencial pode variar dependendo de muitos fatores, tais como método de extração, local de coleta do material vegetal, período do ano de coleta, clima, entre outros. Como regra geral, métodos cromatográficos acoplados a vários modos de detecção são aplicados na investigação da composição do óleo essencial fornecendo informações sobre identidade, possíveis impurezas ou falsificações, bem como reações de degradação do óleo podem ser detectados. A cromatografia gasosa (GC) é o método de separação de compostos de uma mistura complexa mais aplicado. Na maioria dos casos, o GC é acoplado a detectores tais como ionização de chama (FID) ou espectrometria de massa (MS), fornecendo ferramentas adequadas para determinação dos compostos (Turek e Stinzing, 2013).

Para caracterização sensorial dos óleos essenciais pode ser utilizada a cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O), onde a separação cromatográfica dos compostos é combinada com a detecção sensorial (Turek e Stinzing, 2013). No entanto, poucos trabalhos utilizam a GC/O para avaliar plantas aromáticas e seus extratos de óleos essenciais (Minteguiaga et al. 2015). Podem-se citar alguns trabalhos da cromatografia gasosa/olfatometria utilizada na análise dos óleos essenciais. Um deles é a tese de doutorado da Dra. Catalina M. van Baren (2008) que apresenta a caracterização química e sensorial, além do estudo das atividades biológicas de *Mulinum spinosum* (Cav.) Persoon, com o objetivo de avaliar a potencialidade industrial desta espécie aromática e medicinal. Um trabalho, com a espécie de *Baccharis articulata*, avaliou a diferença entre os óleos essenciais obtido de plantas masculinas e femininas da espécie pela cromatografia gasosa/olfatometria e espectrometria de massa (Minteguiaga et al., 2015). Neste último, os resultados mostraram que apesar da composição química ser muito semelhante, foram encontradas grandes diferenças no perfil de aroma.

### **3.8. Mel**

O mel é um produto natural, nutritivo e terapêutico e, normalmente, não contém aditivos ou conservantes. É o produto primário mais importante da apicultura, com importância econômica em todo o mundo. Ele é elaborado a partir do néctar das flores e de secreções de partes vivas de determinadas plantas ou ainda de excreções de insetos sugadores de plantas, no qual abelhas coletam, transformam, combinam e deixam maturar nos favos das colmeias (Anklam, 1998; Venturini et al., 2007, Cuevas-Glory et al. 2007; Manyi-Loh et al., 2011).

O mel é constituído principalmente de açúcares monossacarídeos e água. O restante é composto por diferentes nutrientes, tais como vitaminas, minerais, enzimas, compostos orgânicos com aroma, aminoácidos livres e numerosos compostos voláteis (Anklam, 1998; Venturini et al., 2007, Manyi-Loh et al., 2011). Esta menor fração da composição total é responsável pelas propriedades organolépticas e nutricionais do mel (Manyi-Loh et al., 2011).

A composição química do mel é altamente dependente da sua fonte botânica e também da área geográfica de onde se originou (Witter et al., 2014). As características do mel podem ser alteradas de acordo com o tipo de flor utilizada, clima, solo, umidade, altitude, entre outros, afetando o sabor, a cor e o aroma do mesmo (Venturini et al., 2007; Manyi-Loh et al., 2011).

### **3.8.1. Origem do mel**

No que diz respeito à sua origem, o mel pode ser classificado como floral, quando é derivado a partir do néctar das flores, ou não-floral, quando ele é derivado de depósitos doces secretados pelas partes vivas de plantas ou excretados por insetos sugadores (Manyi-Loh et al., 2011). Com relação ao mel de origem floral, ele é classificado de acordo com as plantas utilizadas na sua elaboração. Portanto este pode ser monofloral, ou seja, é produzido a partir do néctar de flores de uma única espécie, ou ainda polifloral, ou seja, é aquele produzido a partir do néctar de diversas espécies florais (Venturini et al., 2007).

A fim de determinar a origem floral do mel, a análise do pólen, melissopalínologia, e propriedades organolépticas ou físico-químicas são tradicionalmente empregadas. Os objetivos básicos dos estudos melissopalínológicos são identificar e quantificar os grãos de pólen no mel, para definir as fontes de néctar em cada região florístico-geográfica e para estimar a origem geográfica e floral dos méis. Na figura 3.15 estão apresentadas as etapas de identificação dos grãos de pólen presentes no mel (fonte: WEBBEE).

Na etapa (1) o mel é colocado sobre uma lâmina para ser observado em microscópio (2). Em (3) há uma ideia da variedade de formas e tipos de grãos de pólen que se pode encontrar. Em (4) e (5) pode-se verificar a qual espécie vegetal pertence o grão encontrado, através de comparação com o polinário de referência. Dependendo da frequência com que os grãos apareceram na lâmina pode-se afirmar que a espécie vegetal em questão é uma importante fonte de néctar (6) para a abelha estudada (fonte: WEBBEE).

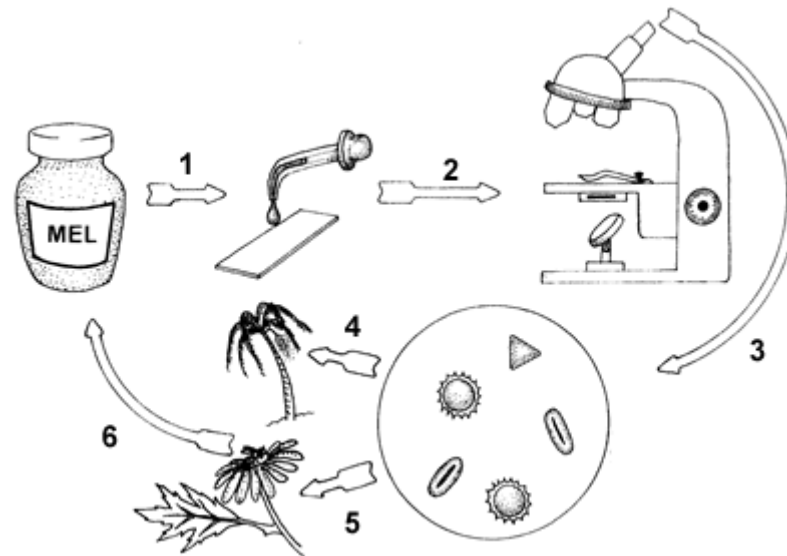


Figura 3.15. Esquema da melissopalínologia.

Fonte: WEBBEE.

No entanto, a melissopalínologia requer um analista muito experiente e é um método muito demorado, dependente da habilidade e julgamento do perito. Além disso, os compostos químicos presentes no mel podem sofrer modificações através do tempo e das condições de armazenamento, reduzindo a confiabilidade desses métodos baseados na quantificação dos parâmetros físico-químicos (Anklam, 1998; Cuevas-Glory et al., 2007).

Mais de 600 compostos foram identificados como compostos voláteis de mel em diferentes famílias químicas, originado a partir de várias vias de biossíntese. Eles representam uma impressão digital de um mel específico e, portanto, poderia ser usado para diferenciar entre origem monofloral de diferentes fontes florais, fornecendo assim informações valiosas a respeito de origem botânica e geográfica do mel. Claramente, a contribuição de um composto volátil ao aroma do mel é determinada pelo seu valor de atividade de aroma (Cuevas-Glory et al., 2007; Manyi-Loh et al., 2011).

### 3.8.2. Identificação dos compostos com aroma do mel

O aroma do mel de abelha depende da composição da fração volátil, o que é influenciada pela composição do néctar e de sua origem floral. Mel de origem

monofloral geralmente apresenta maior valor comercial, portanto, a determinação floral e certificação do mel monofloral desempenha um papel importante no controle de qualidade (Anklam, 1998; Soria et al., 2003; Cuevas-Glory et al., 2007; Venturini et al., 2007).

Os compostos com aroma estão presentes no mel em concentrações muito baixas e se apresentam como misturas complexas de compostos voláteis de diferentes funcionalidades e pesos moleculares relativamente baixos. Uma vez que a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) combina alta eficiência de separação e sensibilidade, e fornece dados qualitativos e quantitativos para estes compostos, é geralmente a técnica escolhida para a determinação do perfil de aroma. No entanto, a técnica exige a retirada prévia de açúcar e água, os dois principais componentes do mel. (Cuevas-Glory et al., 2007).

Para evitar produtos indesejados e consumo de solventes orgânicos caros e tóxicos, alguns métodos têm sido alternativos. São eles extração em fase sólida (SPE), *headspace* (HS) e microextração em fase sólida (SPME). Este último tem sido o mais utilizado devido às vantagens previamente apresentadas. Ele não utiliza solventes orgânicos (tóxicos), permite a quantificação de um grande número de compostos, é de fácil preparação de amostras, encurta substancialmente o tempo de análise, é simples e, além disso, pode ser facilmente acoplado a diferentes instrumentos tais como cromatógrafo a gás (GC, GC/MS, GC/O) e HPLC (Manyi-Loh et al., 2011).

O método SPME pode ser realizado em três modos básicos: extração direta, extração *headspace* e extração com proteção da membrana. A extração *headspace* foi classificada como o modo de amostragem mais adequada, uma vez que protege a fibra de efeitos adversos provocados pelos compostos não voláteis presentes na matriz, ou seja, açúcares, e também permite que as modificações, por exemplo de pH, não tenham efeito sobre a fibra. A técnica de SPME acoplada ao GC/MS mostrou ser uma técnica muito confiável devido a elevada reprodutibilidade e sensibilidade alcançadas na extração e a identificação de compostos voláteis de mel, quando comparada à complexidade dos métodos tradicionais (Cuevas-Glory et al., 2008).



Na extração dos compostos voláteis do mel, pelo método SPME, já foram utilizadas as fibras tais como CAR/PDMS (75  $\mu\text{m}$ ), PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ) e DVD/CAR/PDMS (50/30  $\mu\text{m}$ ), sendo que as mesmas têm mostrado bons resultados. Os resultados são dependentes das características da fibra e as condições de extração utilizados para a análise (Cuevas-Glory et al., 2008). Dentre as fibras utilizadas, a divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) apresentou os melhores resultados em comparação com as outras fibras (Manyin-Loh et al., 2011).

### **3.9. Impregnação supercrítica de extratos voláteis em materiais têxteis**

#### **3.9.1. Materiais têxteis cosméticos**

Hoje em dia, os consumidores de todo o mundo estão cada vez mais focados em saúde e beleza. O interesse do consumidor em produtos cosméticos naturais cria a demanda por novos produtos e outros reformulados com ingredientes botânicos e funcionais (Carvalho et al. 2015). Segundo a ANVISA, produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes: são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2014).

Apesar de não ser consensual, os materiais têxteis cosméticos podem ser classificados como cosméticos de cuidado com a pele (Boh e Knez, 2006; Voncina et al., 2009; Carvalho et al., 2015). Eles têm sido aplicados no setor de cosméticos, devido a tendência de os usuários solicitarem por materiais têxteis com funções além das características básicas, tais como conforto, mas também funções extras como, proteção antipoluição e antimicrobiana, cuidados com a saúde e beleza, utilizando produtos naturais (Cheng et al., 2008).

No meio ambiente pode-se encontrar diversos microorganismos: vírus, fungos, esporos e bactérias que se depositam sobre o corpo humano, sobre roupas

em contato com a pele (CITEVE, 2008). Como os microorganismos patogênicos estão se tornando mais resistentes aos antibióticos, tecidos funcionais que possuem atividade antimicrobiana têm atraído um interesse considerável nos últimos anos. Esses microorganismos multiplicam-se muito rapidamente no substrato têxtil, devido à ação do calor, humidade e na presença de nutrientes (por exemplo, fibras naturais e aditivos) (CITEVE, 2008). Têxteis antimicrobianos têm sido amplamente utilizados em têxteis do lar e produtos de cuidados pessoais (Bakny et al., 2015).

As fibras naturais são mais propensas ao ataque microbiano, uma vez que são facilmente digeridas por bactérias e fungos. As fibras sintéticas, tais como poliamida, a acrílica e o poliéster, também podem ser atacadas por microorganismos, não a fibra propriamente dita, mas sim os produtos de acabamento. No campo têxtil os tratamentos antimicrobianos podem ser aplicados nas mais variadas áreas, sendo as mais utilizadas: vestuário (de uso esportivo, de trabalho, meias, roupa interior, entretelas, calçados), para higiene hospitalar (artigos de cirurgia, roupa de cama, forro de colchões, gases, fitas adesivas) e filtros em geral (CITEVE, 2008).

Em contato com o corpo humano e pele, os materiais têxteis cosméticos são projetados para transferir uma substância ativa para fins cosméticos. O princípio é conseguido simplesmente através da transmissão dos ingredientes cosméticos e farmacêuticos presentes no tecido da roupa para a pele, por exemplo, com o movimento natural do corpo, a pele lentamente recebe a função cosmética. Para atingir estes efeitos funcionais, a tecnologia de microencapsulação se mostra uma alternativa eficaz para proporcionar um desempenho satisfatório e controlar as propriedades de liberação dos ingredientes ativos que prolongam a funcionalidade de materiais têxteis cosméticos (Cheng et al., 2008).

### **3.9.2. Microencapsulação de óleos essenciais em materiais têxteis**

A microencapsulação é um processo em que pequenas partículas ou gotículas são rodeadas por uma parede de revestimento, ou estão incorporadas numa matriz homogênea ou heterogênea, de modo a formar pequenas cápsulas. O núcleo pode ser sólido, líquido ou gasoso. O material do núcleo é gradualmente

difundido através das paredes da cápsula, proporcionando assim propriedades de liberação controlada sob condições desejadas (Bakny et al., 2015).

A microencapsulação pode ser definida como um processo de construção de uma barreira funcional entre o núcleo e o material da parede para evitar reações químicas e físicas e para manter as propriedades biológicas, funcionais, e físico-químicas dos materiais do núcleo (Bakny et al., 2015). Ela tem a capacidade de proteger os ingredientes ativos de ambientes críticos, como oxidação, calor, acidez, alcalinidade, humidade ou evaporação; protege os ingredientes de interagir com outros compostos no sistema, o que pode resultar em degradação ou polimerização; e tem a propriedade de libertação controlada dos extratos encapsulados que parecem ser a melhor escolha para aumentar a eficiência e durabilidade (Cheng et al., 2008).

O diagrama esquemático mostrando um núcleo de microcápsulas e material de parede é mostrado na Figura 3.16. De um modo geral, as microcápsulas consistem de um material de núcleo, que é referido como a fase interna ou preenchimento, e uma parede referida como o revestimento, casca ou membrana. O material da parede determina a estabilidade das micropartículas, a eficiência do processo e o grau de proteção para o núcleo. Alguns tipos de microcápsulas são mostrados na Figura 3.17. Geralmente, o tamanho e a forma das microcápsulas dependem do material de parede e os métodos utilizados para os preparar (Bakny et al., 2015).

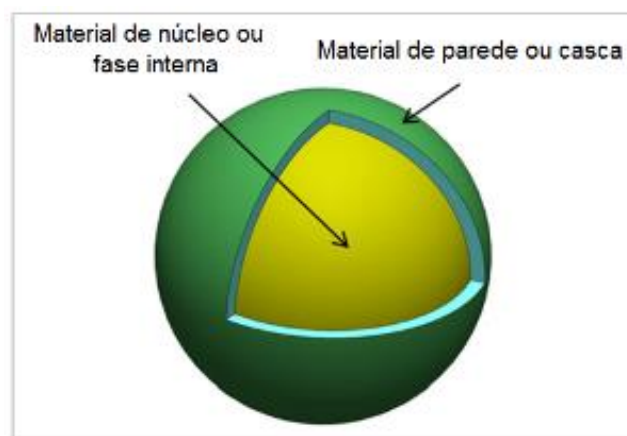


Figura 3.16. Diagrama esquemático de uma microcápsula.

Fonte: Adaptado de Bakny et al., 2015.

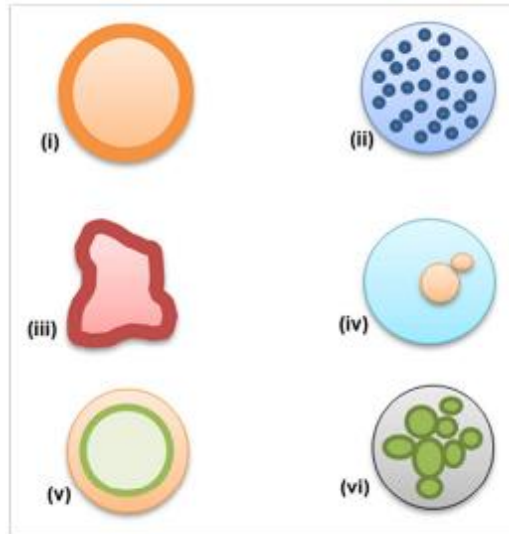


Figura 3.17. Diferentes tipos de microcápsulas: (i) microcápsula simples, (ii) matriz (microesfera), (iii) microcápsulas irregulares, (iv) microcápsula com multi-núcleo, (v) microcápsula com multi-parede, e (vi) conjunto de microcápsulas.

Fonte: Bakny et al., 2015.

Na indústria têxtil cosmética, o principal interesse na microencapsulação é a aplicação de vitaminas, óleos essenciais, agentes hidratantes da pele, agentes de arrefecimento da pele, agentes anti-envelhecimento, entre outros. A escolha do método mais adequado depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (Cheng et. al., 2008). Os materiais de parede mais utilizados para a microencapsulação de óleos incluem polímeros sintéticos e naturais (biomateriais geralmente hidratos de carbono e proteínas) (Bakny et al., 2015).

Os óleos essenciais microencapsulados têm encontrado diversas aplicações, inclusive em materiais têxteis (Bakny et al., 2015). Alguns exemplos de óleos essenciais utilizados em materiais têxteis cosméticos são: lavanda (*Lavandula hybrida*), sálvia (*Salvia officinalis*), alecrim (*R. officinalis*), aloe vera (*Aloe vera* L.) (Carvalho et al., 2015). Porém, a composição dos óleos essenciais pode variar como resultado da oxidação, interações químicas e volatilização. Com o objetivo de limitar a degradação/perda e controlar sua liberação no tempo e momento desejado, a

microencapsulação é uma alternativa. Inúmeras técnicas têm sido aplicadas na microencapsulação de óleos essenciais, incluindo: emulsificação, *spray-drying*, eletrospray coaxial, liofilização/*freeze-drying*, coaservação, polimerização *in situ*, extrusão, leite fluidizado e impregnação supercrítica (SI) (Cheng et al., 2008; Carvalho et al., 2015; Bakry et al., 2015). A única técnica descrita nesta tese será a última por ser a metodologia utilizada.

### 3.9.2.1. Impregnação supercrítica (SI)

A microencapsulação de óleos essenciais através do uso de tecnologia de fluido supercrítico tem muita relevância para indústrias farmacêutica, cosmética, e de alimentos e, em particular, tem várias vantagens inerentes: não toxicidade, a fácil remoção do solvente, não degradação do produto, e que o processo utiliza uma grande variedade de materiais produzindo tamanhos de partículas e morfologia controlada (Braga et al., 2008; Varona et al., 2011; Bakny et al., 2015). Fluido supercrítico é qualquer substância em uma temperatura e pressão acima do seu ponto crítico, no qual não existe mais distinção entre as fases líquida e gasosa. Ele sofre efusão através de sólidos como um gás (escoamento de um gás através de uma pequena abertura, causado pela agitação térmica das moléculas do gás), e pode dissolver materiais como um líquido (Bakny et al., 2015).

O processo de impregnação supercrítica tem provado ser bem-sucedido para uma ampla variedade de substâncias (óleos essenciais, fragrâncias, compostos farmacêuticos ativos, e corantes) e matrizes (madeira, algodão, polímeros, e lentes de contato) (Varona et al., 2011; Bakny et al., 2015). A impregnação supercrítica é um método utilizado para depositar um extrato de interesse em uma matriz sólida, por exemplo um fármaco em um polímero. O fluido supercrítico é utilizado para dissolver o extrato, e quando a solução é posta em contato com a matriz sólida, o extrato é depositado ou dissolve-se na matriz (Braga et al., 2008; Girota et al., 2013). O equipamento utilizado na impregnação supercrítica é esquematicamente representado na Figura 3.18.

Este equipamento é operado de modo descontínuo e consiste em um reservatório de alta pressão, um controlador temperatura, uma placa de agitação

magnética, um transdutor de pressão e uma bomba de dióxido de carbono líquido a alta pressão. A célula de impregnação é aquecida até a temperatura desejada e previamente alimentada com uma quantidade fixa de extrato, o material a ser impregnado, e um cossolvente, este último quando necessário. Após isso, a célula é selada e o solvente, fluido supercrítico, é introduzido na célula até que a pressão desejada seja alcançada, a fim de assegurar a solubilização do extrato no solvente supercrítico (Bakny et al., 2015). A placa de agitação está em constante funcionamento com o objetivo de solubilizar e homogeneizar o extrato e o solvente comprimido.

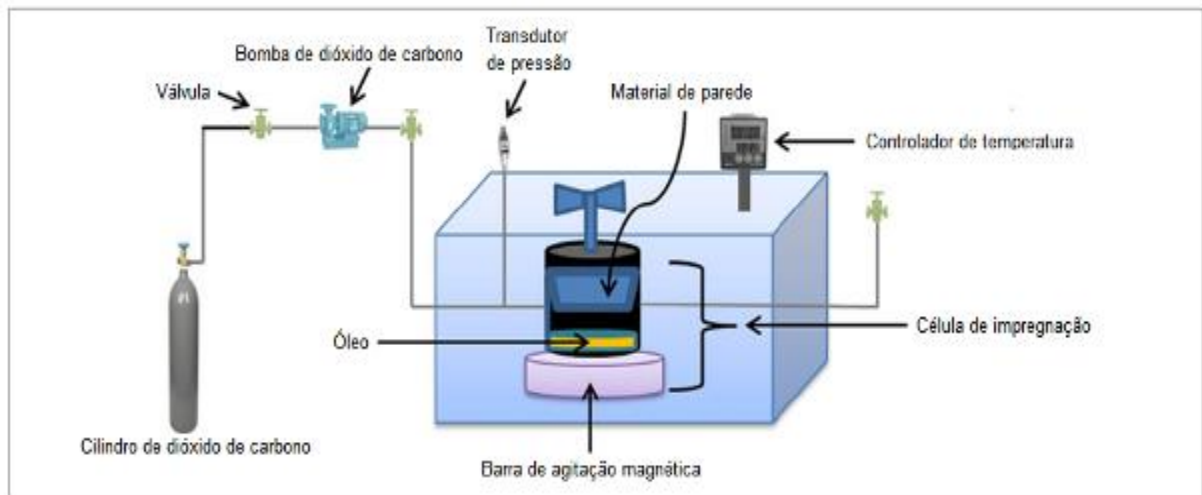


Figura 3.18. Esquema do equipamento utilizado na impregnação supercrítica.

Fonte: Adaptado de Bakny et al., 2015.

A quantidade de extrato a ser impregnado é determinada levando em consideração a solubilidade nas condições operacionais. O sistema é mantido nestas condições de operação durante um tempo pré-determinado. Passado esse período, o solvente comprimido, ou a mistura solvente-cossolvente, é removido pela despressurização do sistema (Braga et al., 2008). Além da interação e solubilidade do extrato no material a ser impregnado, outro parâmetro importante que deve ser avaliado, é a velocidade de despressurização. Uma despressurização rápida pode causar um rompimento interno da matriz, já uma despressurização muito lenta pode causar uma impregnação preferencial de determinados compostos em relação a outros (Varona et al., 2011).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental foi dividida em quatro etapas. A primeira foi a montagem do olfatômetro e adaptação do mesmo no cromatógrafo a gás. A segunda foram os experimentos de olfatometria com óleos essenciais. A terceira foram experimentos de olfatometria com amostras de mel. E a quarta foi a impregnação supercrítica de aromas em tecido e posterior análise olfatométrica com o objetivo de avaliar a liberação controlada do extrato encapsulado.

### 4.1. Montagem do olfatômetro e adaptação no cromatógrafo a gás

A partir do estudo da técnica de olfatometria, foi desenvolvido o projeto de implementação de um equipamento híbrido (GC/O) para análises olfatométricas. Foi realizada uma pesquisa sobre olfatômetros, “*sniffing ports*”, existentes no mercado e das possíveis variáveis que deveriam ser levadas em conta na construção do mesmo, tais como: divisão do fluxo do gás de arraste na coluna cromatográfica, isolamento da coluna cromatográfica na parte do olfatômetro, controle de temperatura na linha do olfatômetro, a umidificação da linha e o ponto de amostragem. A partir destas informações o olfatômetro foi projetado, ao invés da aquisição de um modelo comercial, devido a maior flexibilidade do equipamento para uso em pesquisa e pela maior facilidade de adaptação ao cromatógrafo a gás existente no laboratório.

Primeiramente foi realizado um esquema simples contemplando as variáveis necessárias para implementação do olfatômetro e sua adaptação no cromatógrafo a gás (Figura 4.1). O cromatógrafo a gás, utilizado, é equipado com dois injetores manuais e dois detectores, um detector por ionização de chama (FID) e o outro de captura de elétrons (ECD). Neste trabalho foi utilizado o FID.

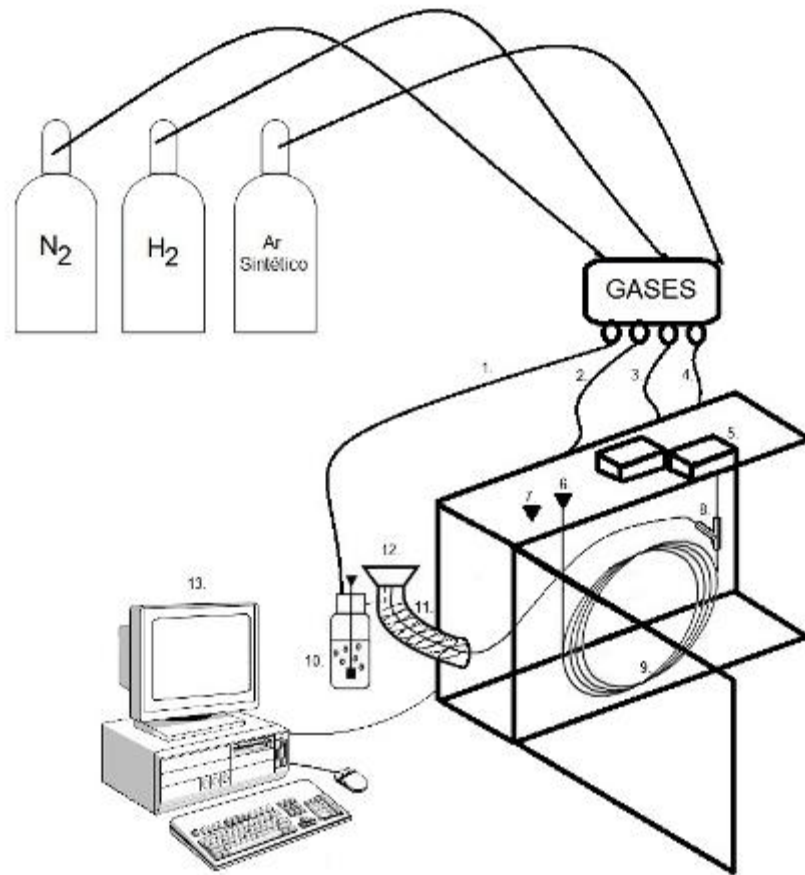


Figura 4.1. Esquema do GC/FID com o olfatômetro.

1. e 2. Linhas de ar sintético. 3. Linha de hidrogênio. 4. Linha de nitrogênio. 5. FID. 6. e 7. Injetores do cromatógrafo a gás. 8. Divisor do fluxo da coluna cromatográfica. 9. Coluna cromatográfica. 10. Frasco com água deionizada. 11. Linha do olfatômetro. 12. Ponto de amostragem, também chamado de “nariz” do olfatômetro ou olfatômetro. 13. Computador e *Software* do cromatógrafo.

A linha de ar sintético (1) foi conectada ao frasco com água deionizada (10). O ar sintético foi borbulhado no frasco e teve por objetivo umidificar o ponto de amostragem (12). O ar sintético (2) e o hidrogênio (3) alimentam a chama do FID (5). O nitrogênio (4) é utilizado como gás de arraste. No injetor do cromatógrafo (6) é introduzida a amostra por injeção manual com seringa, para amostras líquidas, e com fibra de SPME para as amostras sólidas. O controle da temperatura da linha do olfatômetro (11) é realizado pelo controlador de temperatura do segundo injetor do cromatógrafo (7), utilizando um sensor de temperatura PT100. Esta temperatura é definida no software do cromatógrafo (13) e este sensor se encontra na linha do olfatômetro (11). A temperatura da linha do olfatômetro (11) deve ser constante e igual à do FID (5) para que os compostos voláteis não condensem no ponto de



amostragem (12). Foi realizada uma separação do fluxo da coluna cromatográfica (9), utilizando um divisor de fluxo de quartzo desativado *splittler*, em formato de “Y” (8). Parte do fluxo vai para o FID (5) e a outra parte vai para o ponto de amostragem (12), a coluna é do mesmo tamanho nos dois lados da divisão. A linha do olfatômetro (11) possui um tubo de teflon revestido com uma resistência, um sensor de temperatura e um material isolante. A parte da coluna cromatográfica (9) que é direcionada para o ponto de amostragem do olfatômetro (12) passa por dentro do tubo de teflon. O material utilizado para o isolamento da linha do olfatômetro (11) foi uma fita de fibra de vidro, visto que esse material suporta altas temperaturas. No ponto de amostragem, também chamado de “nariz” do olfatômetro (12), é o local onde o avaliador percebe os aromas, confeccionado em vidro. Ao mesmo tempo, o computador registra no software do cromatógrafo (13), o perfil cromatográfico da amostra.

A Figura 4.2 mostra o olfatômetro antes da instalação no cromatógrafo e a Figura 4.3 mostra o olfatômetro já acoplado ao cromatógrafo. A Figura 4.4 mostra o equipamento final.



Figura 4.2. Olfatômetro antes da instalação no cromatógrafo.



Figura 4.3. Olfatômetro desenvolvido no laboratório acoplado ao cromatógrafo a gás.



Figura 4.4. Equipamento híbrido (GC/O) para análises olfatométricas.

Inicialmente, o procedimento adotado para aquisição dos resultados gerados pelos avaliadores consistiu em marcar o tempo em um cronômetro manual, definir a intensidade do aroma e também identificar o mesmo a partir da memória olfativa de cada um dos avaliadores. Em função de um grande número de compostos separados na etapa cromatográfica da análise, observou-se que poucos avaliadores têm capacidade de executar as três tarefas ao mesmo tempo, sendo necessário repetir as análises e, mesmo assim, alguns aromas não são identificados. Então foi

desenvolvido pelo Laboratório de Operações Unitárias um software de aquisição de dados que permite ao avaliador a definição da intensidade do aroma através do registro da mesma pelo teclado do computador e o registro da descrição do aroma através da identificação por voz.

O software representa uma ferramenta facilitadora na aquisição dos dados obtidos nas análises do GC/O, portanto possui uma interface de fácil compreensão. Seu funcionamento compreende no acionamento de um cronômetro que inicializa o programa, a descrição do aroma é armazenada em um arquivo de áudio do tipo Arquivo.wav, relacionando descrição versus tempo. A intensidade é definida pelo operador e registrada pelo teclado do computador – escala de 1 a 5. O armazenamento dos resultados, dados de intensidade, é feito em um arquivo de texto do tipo arquivo.txt, relacionando a intensidade versus tempo.

Para criar um algoritmo de referência, seria necessária a implantação de software que facilitasse os registros dos dados obtidos através da técnica de GC/O. No desenvolvimento do software, de modo a se possível utilizá-lo em diversas plataformas, buscou-se o emprego de três plataformas de desenvolvimento: Excel (Vba), Matlab e Visual Basic. A partir da definição das plataformas de desenvolvimento, criou-se o software para o registro de dados de análises olfatométricas cuja interface está apresentada na Figura 4.5.

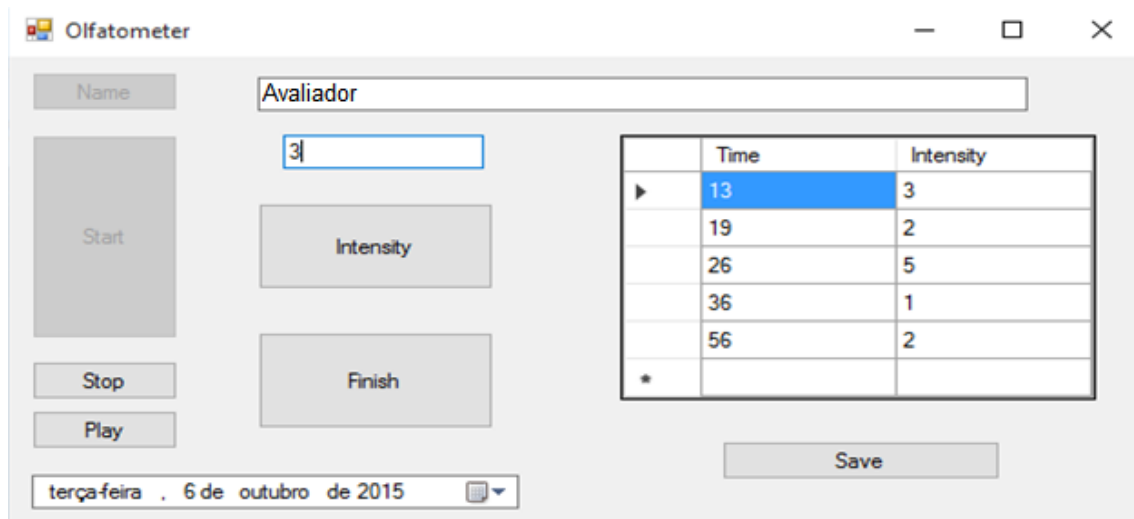


Figura 4.5. Interface do software para o registro de dados de análises olfatométricas.

## 4.2. Óleos essenciais

### 4.2.1. Amostras e extração de compostos voláteis

Foram realizadas análises com óleos essenciais de partes aéreas de duas espécies de *Baccharis* (*Baccharis trimera* e *Baccharis tridentata*), *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) e *Citrus sinensis* (laranjeira). Os óleos essenciais das *Baccharis* foram extraídos pelo método de destilação por arraste a vapor em escala laboratorial. Já os óleos de pitangueira e laranjeira foram extraídos em três pressões diferentes: 1,0 bar, 1,5 bar e 2,0 bar pelo método de destilação por arraste a vapor em uma unidade piloto.

O equipamento utilizado no método de destilação por arraste a vapor em escala laboratorial é constituído por uma caldeira de aproximadamente 5 litros onde a geração de vapor é feita através de uma resistência elétrica imersa na água, um vaso extrator com capacidade de 4 litros, onde ocorre o contato do vapor com a matriz vegetal e um clewenger compreendido por um sistema de condensação e separação da mistura óleo-vapor e recirculação da água, retornando-a para o sistema de aquecimento, diminuindo assim a quantidade de água requerida para a realização da extração (Santo et al., 2014).

O equipamento piloto de extração por arraste a vapor possui uma caldeira com capacidade para 20 litros de solvente (água), com sensores de níveis (superior e inferior), pressão e temperatura. O vapor é gerado a partir da ebulição da água aquecida por um resistor elétrico com potência de 2 kW. O vaso extrator, onde são acondicionadas as folhas, tem capacidade volumétrica de 10 litros, com sensores de temperatura e pressão. O condensador é multitubular casco-tubo refrigerado com água a aproximadamente 1°C. O processo é controlado por um sistema supervisório computacional. As extrações foram realizadas a três diferentes pressões: 1 bar, 1.5 bar e 2 bar.

#### 4.2.2. Análise cromatográfica

Para a identificação da composição das amostras de óleos essenciais foram realizadas análises em um cromatógrafo a gás da marca Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS) da marca Agilent 5975C (Figura 4.6). O gás de arraste utilizado foi o hélio. A coluna analítica foi uma coluna capilar de sílica HP-5MS com fase estacionária de 5% de fenil e 95% de metil siloxano (30 m X 0,25 mm, 0,25 $\mu$ m).



Figura 4.6. Equipamento de cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas (GC/MS).

As condições do cromatógrafo utilizadas para análises foram as seguintes: temperatura da coluna no forno, 60°C durante 8 minutos, aumentando para 180°C a 3°C/min, 180-250°C a 20 ° C/min, então 250°C por 10 minutos; temperatura do injetor, 250°C; modo de injeção *split*, razão de *split* 1:55; volume injetado, 0,2  $\mu$ L; o gás de arraste foi hélio com vazão 0,8 mL/min; a temperatura da interface, 250°C; modo MS EI; tensão de EI, 70eV; intervalo de massas de aquisição, m/z 40-450 (Xavier, 2011; Xavier et al. 2013; Santo et. al., 2014).

Os compostos foram identificados por comparação de seus índices de retenção (RI) na coluna utilizada, determinados a partir de uma série de n-alcenos (C8-C20), com os de padrões puros ou citados na literatura (Jenning e Shibamoto, 1980; Davies, 1990; Adams, 2007). A comparação dos espectros de massas também foi realizada para a confirmação da identidade dos compostos. A equação

4.2 foi utilizada para o cálculo do índice de retenção (RI) para análise com temperatura programada (Adams, 2007):

$$RI = 100n + 100 \frac{t_{Rx} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} \quad (4.2)$$

onde: RI = índice de retenção; n = número de átomos de carbono de cada alcano normal da mistura;  $t_{Rx}$  = tempo de retenção ajustado do composto x;  $t_{Rz}$  e  $t_{R(z+1)}$  = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal, sendo que  $t_{Rx}$  é intermediário a  $t_{Rz}$  e  $t_{R(z+1)}$ .

#### 4.2.3. Análise olfatométrica

A análise do perfil olfatométrico das amostras de óleos essenciais foi realizada utilizando-se o cromatógrafo a gás equipado com um sistema de detecção por ionização de chama (FID) da Perkin Elmer Auto System e o olfatômetro desenvolvido neste trabalho (Figura 4.4). A linha de transferência foi mantida a 250°C. No equipamento foi utilizada a mesma coluna utilizada para as análises por GC/MS, com as mesmas especificações e o mesmo programa de temperatura. O objetivo foi relacionar o resultado da análise sensorial com a composição química dos voláteis das amostras de óleos essenciais.

A injeção das amostras de óleos essenciais no GC/FID foi realizada diretamente no injetor. Para cada análise foram injetados 2 µL de óleo essencial diluído em ciclohexano (2:1) no modo *splitless*, sendo que o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma vazão de 1 mL/min. O injetor e o FID foram ajustados a 250°C e o programa de temperatura utilizado foi: 60°C durante 8 minutos, aumentando para 180°C a 3°C/min, 180-250°C a 20°C/min, então 250°C por 10 minutos, e o detector olfatométrico foi mantido constante à 250°C durante toda a análise.

A metodologia descrita por van Baren (2008) foi a base para o desenvolvimento desta metodologia. Para a realização da análise olfatométrica (GC/O) foram selecionados três avaliadores para os óleos essenciais das espécies de *Baccharis* e para o óleo essencial de laranjeira e quatro avaliadores para o óleo

de pitangueira. A diferença no número dos avaliadores se deve apenas a disponibilidade de avaliadores no período de realização dos experimentos. Cada um dos avaliadores relatou as seguintes informações sobre os aromas durante a análise:

- a) tempo, em relação ao início da análise, em que sentiu um determinado aroma;
- b) descrição do aroma;
- c) intensidade do aroma, em uma escala de números inteiros, de 1 a 5, sendo 1 a menor intensidade e 5 a maior intensidade.

A partir dos dados fornecidos pelos avaliadores foi possível fazer uma comparação entre os resultados obtidos individualmente e gerar uma nova grandeza, que relaciona intensidade e frequência de detecção, denominada Frequência Modificada (FM), que é calculada pela Equação 4.1. A equação da FM utilizada foi proposta por Dravnieks (1985):

$$FM(\%) = \sqrt{(F(\%)) \cdot I(\%)} \quad (4.1)$$

onde  $F(\%)$  é a frequência, em termos percentuais, de detecção de um aroma entre o universo de avaliadores e  $I(\%)$  é a intensidade média de um atributo de aroma em relação à escala, sendo 100% correspondendo a média 5. Se um aroma possui 100% de FM quer dizer que o mesmo foi detectado por todos os avaliadores e com a máxima intensidade. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **4.3. Mel**

#### **4.3.1. Amostras e extração de compostos voláteis**

Foram testadas cinco amostras de mel cedidas pelo Instituto do Meio Ambiente da PUCRS: mel de aroeira, mel de eucalipto, mel de quitoco, mel branco C e mel branco AC. Para cada uma das análises dos compostos voláteis das

amostras de mel foram utilizados 5,0 gramas de mel puro. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente e em um recipiente fechado com um septo.

Os compostos voláteis foram extraídos pela técnica de microextração em fase sólida (SPME) pelo modo *headspace*. A fibra utilizada foi a DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane). Ela foi escolhida com base na literatura (Manyi-Loh et al., 2011). Não foi realizada agitação, já que esta ação não apresentou interferência positiva na extração. Nos experimentos foi utilizado um tempo de equilíbrio de 30 minutos. A temperatura utilizada tanto no período de equilíbrio quanto no período de extração foi de 70°C. Após o sistema entrar em equilíbrio no *headspace*, o amostrador de SPME foi inserido no frasco e a fibra foi exposta para adsorver os compostos presentes na fase de vapor. O tempo de exposição foi de 30 minutos. Terminado o período de adsorção dos compostos voláteis na fibra, ela foi recolhida e inserida no injetor do cromatógrafo, onde foi exposta novamente para dessorção térmica dos compostos voláteis na coluna cromatográfica. O tempo de dessorção foi de 2 minutos. Para a definição dos tempos de equilíbrio, exposição e dessorção e a temperatura de adsorção foram realizados testes tendo como ponto de partida os tempos e a temperatura utilizados na literatura (Soria et al., 2003). O esquema do procedimento experimental utilizado é apresentado na Figura 4.7.

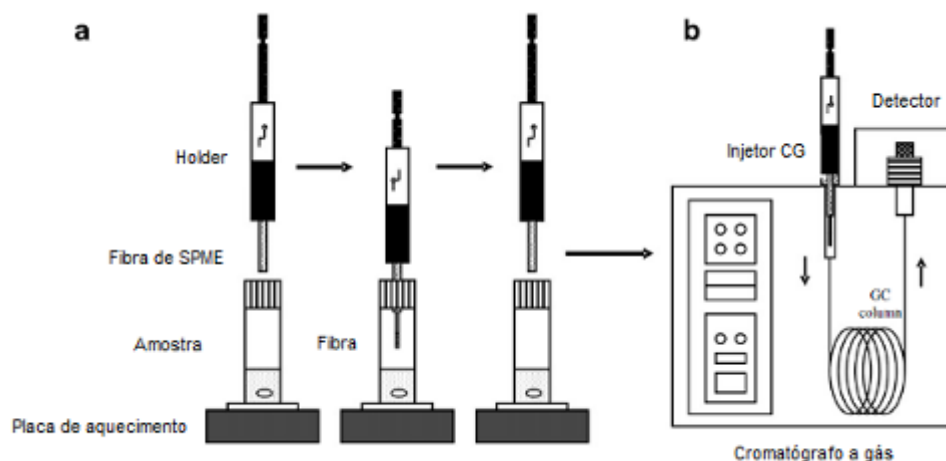


Figura 4.7. Processo de microextração em fase sólida (SPME). a) Extração e b) dessorção térmica da fibra no cromatógrafo a gás.

Fonte: Cuevas-Glory et al., 2007.



### 4.3.2. Análise cromatográfica

Para a identificação da composição da fase volátil das amostras de mel foram realizadas análises em um cromatógrafo a gás da marca Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS) da marca Agilent 5975C (Figura 4.5). O gás de arraste utilizado foi o hélio. A coluna analítica foi uma coluna capilar de sílica HP-5MS com fase estacionária de 5% de fenil e 95% de metil silox (30 m X 0,25 mm X 0,25 $\mu$ m).

As condições do cromatógrafo utilizadas para análises foram as seguintes: temperatura da coluna no forno, 60°C durante 4 minutos, aumentando a 5°C/min até 180°C, a 20°C/min até 250°C, e a 250°C por 5 min; temperatura do injetor, 250°C; modo de injeção, *split*; razão de *split* 1:55; injeção com fibra de SPME; o gás de arraste foi hélio com vazão 0,8 mL/min; a temperatura da interface, 250°C; modo MS EI; tensão de EI, 70eV; intervalo de massas de aquisição, m/z 40-450.

Os compostos foram identificados por comparação de seus índices de retenção (IR) na coluna utilizada, determinados a partir de uma série de n-alcenos (C8-C20), com os de padrões puros ou indicados na literatura (Jenning e Shibamoto, 1980; Davies, 1990; Adams, 2007). A comparação dos espectros de massas também foi realizada para a confirmação da identidade dos compostos. A equação 4.2, utilizada para o cálculo do índice de retenção (RI), foi apresentada anteriormente (Adams, 2007).

### 4.3.3. Análise olfatométrica

A análise do perfil olfatométrico da fase volátil das amostras de mel foi realizada utilizando o cromatógrafo a gás equipado com um sistema de detecção por ionização de chama (FID) da Perkin Elmer Auto System e o olfatômetro desenvolvido neste trabalho (Figura 4.4). A linha de transferência foi mantida a 250°C. No equipamento foi utilizada a mesma coluna utilizada para as análises por GC/MS, com as mesmas especificações e o mesmo programa de temperatura. O

objetivo foi relacionar o resultado da análise sensorial com a composição química dos voláteis das amostras de mel.

Logo após a adsorção dos compostos voláteis na fibra de SPME, a fibra foi colocada no injetor do cromatógrafo (GC/O). O injetor, o olfatômetro e o detector FID estavam a 250°C. O programa de temperatura do cromatógrafo para separação dos compostos voláteis foi o seguinte: 60°C por 4 min, aumentando a 5°C/min até 180°C, a 20°C/min até 250°C, e a 250°C por 5 min.

A metodologia descrita por van Baren (2008) também foi a base para o desenvolvimento desta metodologia. Para a realização da análise olfatométrica das amostras de mel foram selecionados seis avaliadores treinados.

#### **4.4. Material têxtil**

##### **4.4.1. Amostras**

Duas amostras de tecido asti preto 100% poliéster com gramatura de 95 g/m<sup>2</sup>, e um frasco contendo um produto antimicrobiano natural produzido a partir de uma mistura de óleos essenciais (cravo, cedro, tomilho, lavanda, melaleuca e capim limão) foram cedidos por uma empresa. Uma das amostras de tecido havia sido preparada com microcápsulas do produto antimicrobiano natural e a outra não. Este tipo de tecido é utilizado na superfície de palmilhas. O produto antimicrobiano, produzido a partir da mistura de óleos essenciais, foi utilizado na impregnação supercrítica no tecido que não o continha.

##### **4.4.2. Impregnação supercrítica**

A impregnação supercrítica foi realizada em um equipamento que consiste em uma bomba de CO<sub>2</sub> de alta pressão (ISCO 260-D), uma célula de impregnação de aço inox (Waters) com visor, uma resistência (Resistec) que controla a temperatura do ar no entorno da célula, uma placa de agitação magnética (Fisatom)

e um transdutor de pressão (Smar). O esquema é apresentado na Figura 4.8 e uma foto do equipamento é apresentada na Figura 4.9.

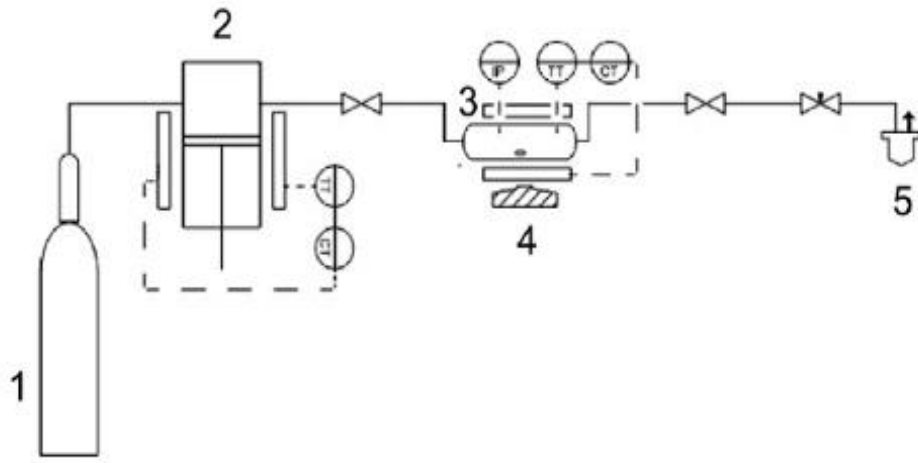


Figura 4.8. Esquema do equipamento de impregnação supercrítica.

1: cilindro de CO<sub>2</sub>; 2: bomba termostática; 3: célula de impregnação; 4: agitador magnético; 5: vaso de expansão; IP: indicador de pressão; TT: transmissor de temperatura; CT: controlador de temperatura.

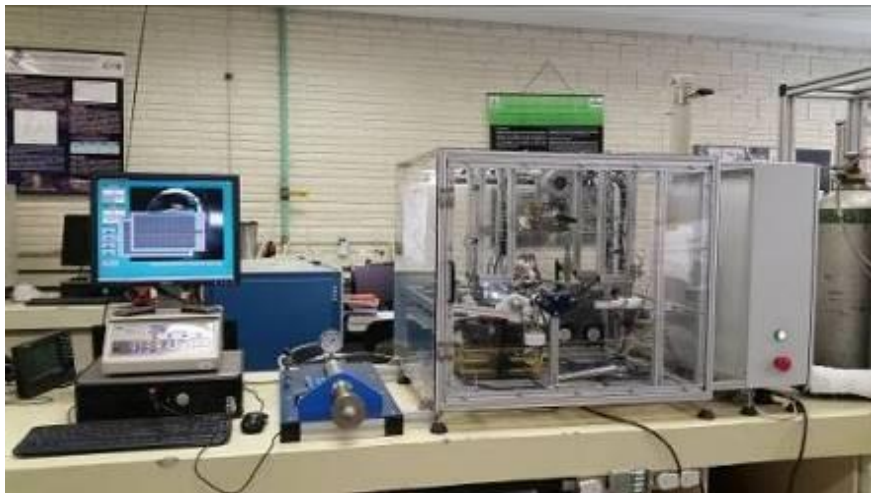
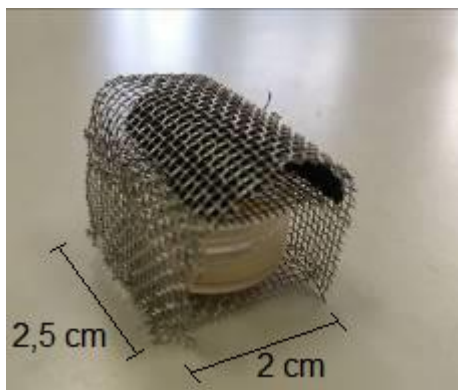


Figura 4.9. Foto do equipamento de impregnação supercrítica.

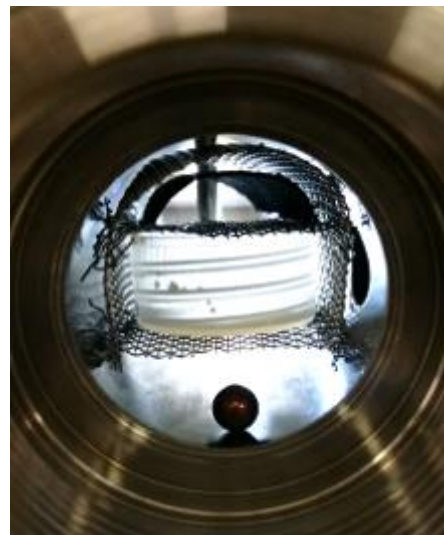
Na impregnação foi utilizado o tecido asti preto 100% poliéster sem o produto antimicrobiano e o produto antimicrobiano produzido a partir da mistura de óleos essenciais. A amostra foi cortada no tamanho de 2 x 2 cm<sup>2</sup> devido ao tamanho do suporte confeccionado com uma rede de aço inox, no formato de uma pequena estante (Figura 4.10a), que foi inserida na célula de impregnação do equipamento

(Figura 4.10b). O pedaço de tecido foi colocado na parte de cima e a mistura de óleos essenciais foi colocada em um recipiente na parte de baixo da estante.

A quantidade do produto antimicrobiano utilizada foi definida experimentalmente a partir da solubilidade e saturação da mesma no material e tamanho do recipiente utilizados. Foram testadas quantidades inferiores ao tamanho do recipiente até que não se observasse ao final da impregnação nenhuma ou quase nenhuma quantidade da mistura de óleos no mesmo. Ao se observar que toda quantidade do produto antimicrobiano empregada havia sido solubilizada do recipiente, foi definida a quantidade. Esta quantidade utilizada foi de 200  $\mu\text{L}$ .



(a)



(b)

Figura 4.10. a) Estante em aço inox com amostra de tecido cortado e um recipiente com a mistura de óleos essenciais. b) Estante inserida na célula de impregnação.

A estante contendo o pedaço de tecido e o recipiente com o produto antimicrobiano foram inseridos na célula de impregnação e permaneceram em contato com o  $\text{CO}_2$  no estado supercrítico por 2 h à 90 bar e 313 K. Decorrido esse tempo, despressurizou-se o equipamento a uma taxa de 5 bar/min. O tecido foi guardado em um recipiente fechado com septo para análises cromatográficas e olfatométricas. Essa metodologia foi repetida 4 vezes, resultando em uma amostra por avaliador que realizou a análise olfatométrica.

#### **4.4.3. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM)**

Óleos essenciais encapsulados podem ter diversas aplicabilidades. Partículas encapsuladas em escala micro e nano apresentam vantagens, pois apresentam maior área superficial de contato em relação ao seu volume. Nesse sentido, a microscopia eletrônica de varredura (*Scanning Electron Microscopy* - SEM) pode ser empregada para determinação de tamanho de partículas (Pontes, 2013).

A SEM é uma técnica que utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional. Os aparelhos mais modernos permitem aumentos de cerca de até 300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos. É um aparelho que pode fornecer de forma rápida informações sobre morfologia e identificação de elementos químicos presentes em uma amostra sólida (Dedavid et al., 2007).

Três pedaços de tecido foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo: um tecido com microcápsulas do produto antimicrobiano, um sem o produto, e o terceiro que passou pelo processo de impregnação do produto à 90 bar e 313 K. As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise da PUCRS utilizando um microscópio modelo Inspect F50 – FEI com tensão de trabalho de 0,3 a 30 kV e resolução de ponto de 1.2 nm. As amostras foram depositadas em *stubs* cobertos por fita dupla face de carbono com superfície metalizada com ouro.

#### **4.4.4. Extração de compostos voláteis**

Os compostos voláteis presentes no produto antimicrobiano produzido a partir da mistura de óleos essenciais foram extraídos por SPME. Estes resultados serviram de base para a definição da metodologia para as análises do tecido, assim como para o treinamento dos avaliadores. Foi realizada uma extração para análise cromatográfica e uma extração para cada avaliador da análise olfatométrica.

Utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME), foram extraídos os compostos voláteis do tecido com as microcápsulas do produto antimicrobiano e do tecido tratado pela impregnação supercrítica, com o objetivo de avaliar e comparar a liberação do aroma da mistura de óleos essenciais nos dois tecidos durante 10 dias. Ambos os tecidos foram mantidos na própria embalagem em que foram fornecidos pela empresa, apenas retirados para cortes.

O tecido sem as microcápsulas do produto antimicrobiano, após ser cortado e passar pela impregnação supercrítica à 90 bar e 313 K é colocado em um recipiente fechado com septo e no mesmo dia da impregnação ocorreu a primeira extração dos compostos voláteis por SPME. Este dia foi denominado dia zero. Após a extração, o pedaço de tecido é mantido no frasco fechado com septo até a próxima extração. São realizadas extrações em dois, quatro, sete e dez dias após a impregnação. Em cada dia a amostra foi retirada do frasco e colocada em um novo frasco. Neste novo frasco é realizada a extração dos compostos voláteis após 5 minutos de equilíbrio com agitação. A amostra é retirada do frasco e colocada em um novo para evitar erros nas análises fruto dos componentes voláteis armazenados desde a última extração. Neste frasco novo, o pedaço de tecido permanece até o próximo dia de extração e assim sucessivamente até o último dia. Para a análise cromatográfica, esse processo foi realizado uma única vez, enquanto que para a análise olfatométrica, esse processo foi repetido para cada avaliador.

O tecido que continha as microcápsulas do produto antimicrobiano é retirado da embalagem e cortado no tamanho de 2 x 2 cm<sup>2</sup> e colocado em um recipiente fechado com septo. A primeira extração é considerada a extração do dia zero. Realizando o mesmo procedimento de troca de frascos, foram executadas extrações em dois, quatro, sete e dez dias após a primeira extração.

Em cada um dos dias, os compostos voláteis das duas amostras de tecido (tecido com as microcápsulas do produto antimicrobiano e tecido impregnado), foram extraídos pela técnica de microextração em fase sólida (SPME) pelo modo *headspace*. A fibra utilizada na extração foi a DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane). Nos experimentos foi utilizado um tempo de equilíbrio de 5 minutos com agitação para a liberação dos compostos

voláteis no *headspace*. A temperatura utilizada tanto no período de equilíbrio quanto no período de extração foi de 40°C, temperatura mais próxima possível da temperatura do corpo humano. Após o sistema entrar em equilíbrio no *headspace*, o amostrador de SPME foi inserido no frasco e a fibra é exposta para adsorver os compostos presentes na fase de vapor. O tempo de adsorção foi de 30 minutos. Terminado o período de adsorção dos compostos voláteis na fibra, ela foi recolhida e inserida no injetor do cromatógrafo, onde foi exposta novamente para dessorção térmica dos compostos voláteis na coluna cromatográfica. O tempo de dessorção foi de 2 minutos. Para a definição dos tempos de equilíbrio, adsorção e dessorção, e a temperatura de adsorção foram realizados testes experimentais, avaliando o espectro cromatográfico dos compostos voláteis obtidos por SPME.

#### 4.4.5. Análise cromatográfica

Para a identificação dos compostos com aroma presentes nas amostras de tecido e no produto antimicrobiano foram realizadas análises em um cromatógrafo a gás da marca Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS) da marca Agilent 5975C (Figura 4.5). O gás de arraste utilizado foi o hélio. A coluna analítica foi uma coluna capilar de sílica HP-5MS com fase estacionária de 5% de fenil e 95% de metil silox (30m x 250µm i.d., 0,25µm de espessura da fase).

As condições do cromatógrafo utilizadas para análises foram as seguintes: temperatura da coluna no forno, 60°C durante 4 minutos, aumentando a 5°C/min até 180°C, a 20°C/min até 250°C, e a 250°C por 5 min; temperatura do injetor, 250°C; modo de injeção, *split*; razão de *split* 1:55; injeção com fibra de SPME; o gás de arraste foi hélio com vazão 0,8 mL/min; a temperatura da interface, 250°C; modo MS EI; tensão de EI, 70 eV; intervalo de massas de aquisição, m/z 40-450.

Os compostos foram identificados por comparação de seus índices de retenção (IR) na coluna utilizada, determinados a partir de uma série de n-alcenos (C8-C20), com os de padrões puros ou reportados na literatura (Jenning e Shibamoto, 1980; Davies, 1990; Adams, 2007). A comparação dos espectros de massas também foi realizada para a confirmação da identidade dos compostos. A

equação 4.2, utilizada para o cálculo do índice de retenção (RI), foi apresentada anteriormente (Adams, 2007).

#### **4.4.6. Análise olfatométrica**

A análise do perfil olfatométrico das amostras de tecido e do produto antimicrobiano foi realizada utilizando-se o cromatógrafo a gás equipado com um sistema de detecção por ionização de chama (FID) da Perkin Elmer Auto System e o olfatômetro desenvolvido neste trabalho (Figura 4.2). A linha de transferência foi mantida a 250°C. No equipamento foi utilizada a mesma coluna utilizada para as análises por GC/MS, com as mesmas especificações e o mesmo programa de temperatura. O objetivo foi relacionar o resultado da análise sensorial com a composição química dos voláteis das amostras.

Logo após a adsorção dos compostos voláteis na fibra de SPME, a fibra foi colocada no injetor do cromatógrafo (GC/O). O injetor, o olfatômetro e o detector FID estavam a 250°C. O programa de temperatura do cromatógrafo para separação dos compostos voláteis foi o seguinte: 60°C por 4 min, aumentando a 5°C/min até 180°C, a 20°C/min até 250°C, e a 250°C por 5 min.

A metodologia descrita por van Baren (2008) também foi a base para o desenvolvimento desta metodologia. Para a realização da análise olfatométrica das amostras de tecidos foram selecionados quatro avaliadores.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Óleos essenciais

#### 5.1.1. *Baccharis*

A análise cromatográfica dos compostos voláteis presentes nas amostras de óleos essenciais de *Baccharis Trimeria* e *Baccharis Tridentata*, extraídos pela destilação por arraste a vapor em escala laboratorial, foi realizada por GC/MS. Os compostos majoritários encontrados por GC/MS nas duas espécies foram b-pineno, acetato de carquejila e palustrol. Por sua vez, a análise olfatométrica (GC/O) foi capaz de identificar uma grande variabilidade de aromas para as duas espécies, com destaque para o aroma chá na *Baccharis Trimeria* e maisena na *Baccharis tridentata*, já que estes apresentaram maior frequência modificada (FM).

Contudo apenas três dos aromas percebidos pelos avaliadores foram identificados pela GC/MS, ou seja, a grande maioria dos aromas encontrados provém de constituintes minoritários nos óleos essenciais. Estes resultados, pela GC/MS e GC/O, obtidos para as espécies de *Baccharis* foram apresentados no COBEQ 2014 (Santo et al., 2014) e seguem no item Anexo deste trabalho.

#### 5.1.2. Pitangueira

A análise cromatográfica dos compostos voláteis presentes no óleo essencial de pitangueira, extraídos pela destilação por arraste a vapor em escala piloto em três pressões (1,0; 1,5; 2,0 bar), foi realizada por GC/MS. O resultado da análise cromatográfica, obtida para o óleo essencial de pitangueira nas três pressões utilizadas no processo de extração, segue na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Análise Cromatográfica GC/MS do óleo essencial de pitangueira extraído em três pressões diferentes.

Composto <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	% Área <sup>c</sup>		
		1,0 bar <sup>d</sup>	1,5 bar	2,0 bar
mirreno	991	0,52	0,51	0,66
α-felandreno	1001	0,64	0,54	0,22
para-cimeno	1026	0,22	0,24	0,32
Z-β-ocimeno	1037	0,89	0,86	0,67
E-β-ocimeno	1048	2,22	2,14	1,63
terpinoleno	1085	0,45	0,39	0,15
δ-elemeno	1335	0,64	0,79	0,96
β-elemeno	1390	2,35	3,02	3,34
α-gurjuneno	1406	0,19	0,23	0,30
E-cariofileno	1417	2,94	3,19	3,63
γ-elemeno	1431	0,62	1,06	1,91
α-humuleno	1450	0,46	0,52	0,71
germacreno D	1479	2,85	2,66	2,48
β-selineno	1483	0,54	0,55	0,92
δ-selineno	1490	0,54	0,19	0,69
viridifloreno + biciclogermacreno	1497	12,49	11,57	9,17
curzereno	1499	12,70	11,53	6,30
δ-cadineno	1522	0,99	1,22	2,02
germacreno B	1557	8,04	7,61	7,49
cubeban-11-ol	1590	1,03	0,82	1,68
selina-1,3,7(11)-trien-8-one	1634	12,83	13,05	14,27
germacrono	1698	10,43	5,84	2,07
selina-1,3,7(11)-trien-8-one epóxido	1747	7,26	7,14	7,38
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>81,86</b>	<b>75,69</b>	<b>68,95</b>

<sup>a</sup> = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007); composto com área ≥ 0,1%. <sup>b</sup>RI = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos. <sup>c</sup>% Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma. <sup>d</sup>As pressões da tabela se tratam de pressões absolutas.

Os compostos majoritários obtidos na análise cromatográfica do óleo essencial de pitangueira, para pressão de 1,0 bar, 1,5 bar e 2,0 bar, respectivamente, foram: viridifloreno + biciclogermacreno (12,49%; 11,57%; 9,17%), curzereno (12,70%; 11,53%; 6,30%), germacreno B (8,04%; 7,61%; 7,49%), selina-1,3,7(11)-trien-8-one (12,83%; 13,05%; 14,27%), germacreno (10,43%; 5,84%; 2,07%) e selina-1,3,7(11)-trien-8-one epóxido (7,26%; 7,14%; 7,38%).

Foram avaliadas diferentes pressões de extração com o intuito de verificar o rendimento do óleo essencial extraído e a variação da composição do mesmo. Estas extrações ocorreram com vapor saturado, logo para maior pressão, maior será a temperatura de extração. Algumas vezes, com uma maior temperatura de extração, melhor poderá ser o rendimento e alguns compostos podem ter maior solubilidade. Isto quer dizer, que alguns compostos podem sair apenas em maiores pressões. No caso do óleo essencial de pitangueira, a pressão não teve influência na composição do óleo essencial.

A análise por cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O) foi capaz de identificar uma grande variabilidade de aromas no óleo essencial de pitangueira. Nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 são apresentados, em formato de gráfico aranha, os aromas identificados que obtiveram Frequência Modificada (FM) maior ou igual a 40 para o óleo essencial de pitangueira nas pressões de 1,0, 1,5 e 2,0bar, respectivamente.

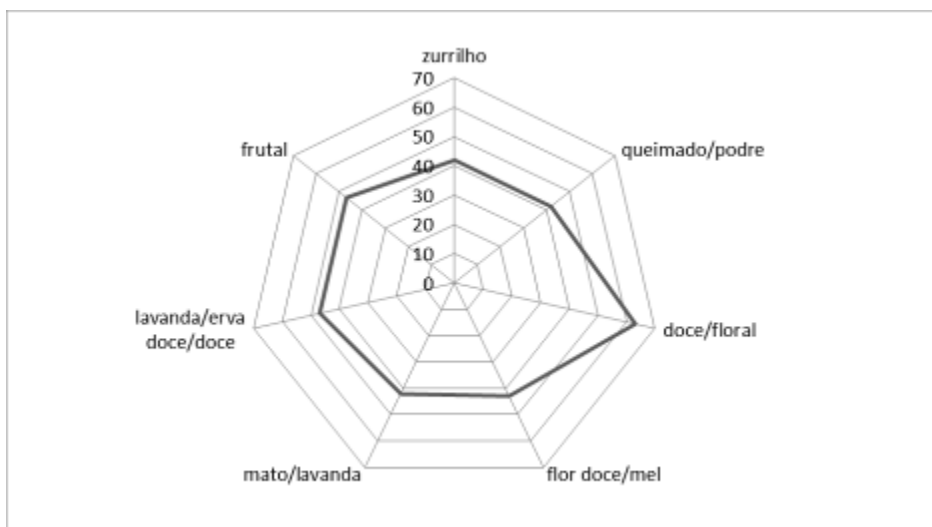


Figura 5.1. Gráfico aranha do óleo essencial de pitangueira na pressão de 1bar.

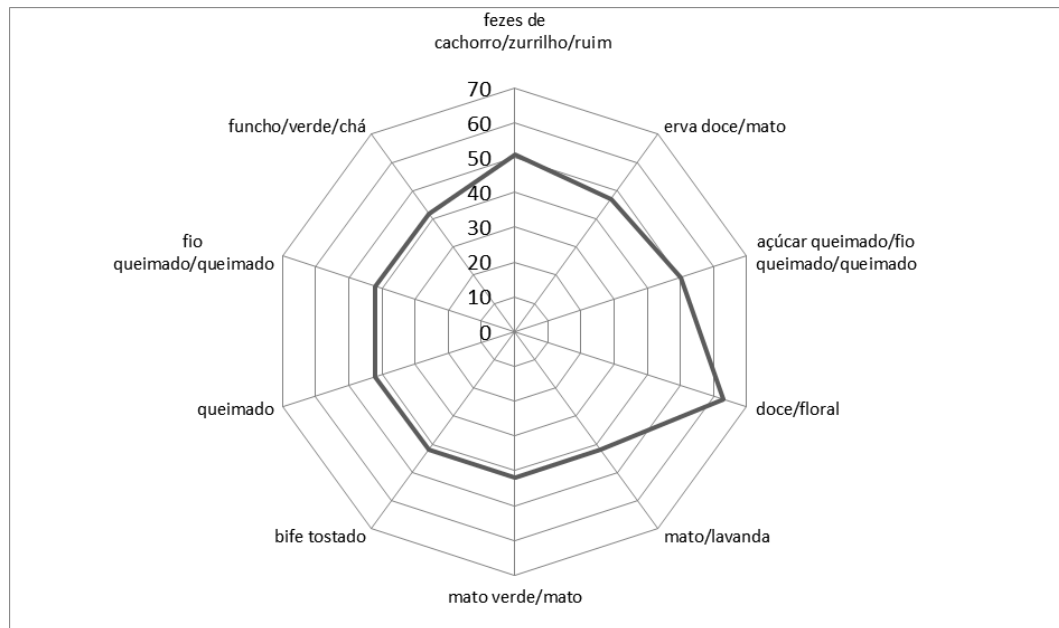


Figura 5.2. Gráfico aranha do óleo essencial de pitangueira na pressão de 1,5bar.

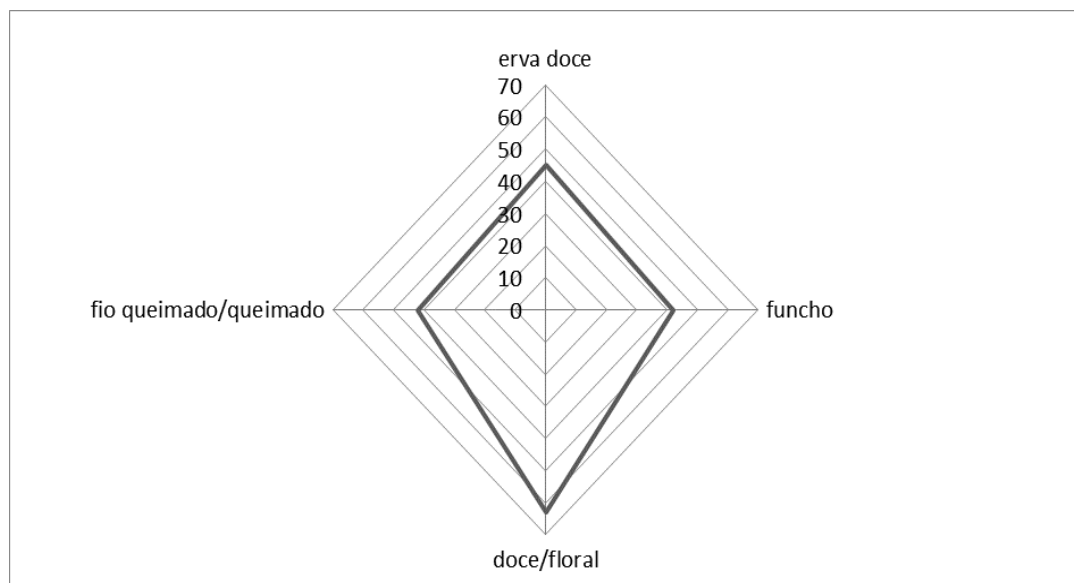


Figura 5.3. Gráfico aranha do óleo essencial de pitangueira na pressão de 2bar.

Foi definido selecionar valores iguais ou maiores que 40 com base na literatura (van Baren, 2008). Valores menores não foram considerados por serem fruto da baixa intensidade aromática do composto e/ou ao fato de alguns avaliadores terem menor sensibilidade que outros. Para as amostras de óleo essencial de pitangueira foram detectados 21 aromas com Frequência Modificada (FM) maior ou igual a 40. Desses 21 aromas, 7 foram detectados na amostra de 1,0

bar, 10 foram detectados na amostra de 1,5 bar e 4 foram detectados na amostra de 2,0 bar. Com destaque para os aromas, doce/floral, que foi detectado nas três amostras com a mesma FM de 63%, e o aroma mato/lavanda, que foi detectado nas amostras de 1,0 e 1,5 bar com a mesma FM de 42%. Com relação a pressão de extração, observa-se que de 1,0 para 1,5bar, aumenta o número de aromas significativos, porém ao aumentar mais a pressão, até 2,0bar, este número de aromas significativos diminui. Como na composição, a pressão não interfere, a pressão de 1,5bar é a melhor opção em relação a quantidade de aromas, já que apresenta o maior número de aromas compostos voláteis com aroma.

Para os óleos essenciais de pitangueira o cruzamento entre os compostos identificados olfatometricamente e os que foram identificados por espectrometria de massa resulta em apenas dois compostos identificados pelos dois métodos. A Tabela 5.2 apresenta os compostos voláteis identificados com destaque nos compostos identificados nos dois métodos, sendo que nenhum deles é majoritário em composição do óleo. Para o óleo essencial obtido à 2,0bar não houve correspondência para o composto E- $\beta$ -ocimeno, provavelmente a sua quantidade está abaixo do limite perceptível ao nariz humano.

Tabela 5.2. Compostos identificados por GC/MS e GC/O para o óleo essencial de pitangueira.

Pressão	RI	Composto <sup>a</sup>	% Área	Aroma <sup>d</sup>	FM (%)
1,0 bar	810	- <sup>b</sup>	tr <sup>c</sup>	Zorrilho	42
	820	-	tr	Queimado/podre	42
	1037	Z- $\beta$ -ocimeno	0,89	Doce/floral	63
	1045	-	tr	Flor doce/mel	43
	1048	E- $\beta$ -ocimeno	2,22	Mato/lavanda	42
	1078	-	tr	Lavanda/erva doce/doce	47
	1125	-	tr	Frutal	47
1,5 bar	812	-	tr	Fezes de cachorro/zorrilho/ruim	51
	836	-	tr	Erva doce/mato	47
	862	-	tr	Açúcar queimado/fio queimado/queimado	50
	1037	Z- $\beta$ -ocimeno	0,86	Doce/floral	63

	1048	E- $\beta$ -ocimeno	2,14	Mato/lavanda	42
	1130	-	tr	Mato verde/mato	42
	1147	-	tr	Bife tostado	42
	1156	-	tr	Queimado	42
	1169	-	tr	Fio queimado/queimado	42
	1233	-	tr	Funcho/verde/chá	42
	923	-	tr	Erva doce	45
	999	-	tr	Funcho	42
2,0 bar	1037	Z- $\beta$ -ocimeno	0,67	Doce/floral	63
	1127	-	tr	Fio queimado/queimado	42

<sup>a</sup>Compostos voláteis identificados pela GC/MS; <sup>b</sup>Foi detectado aroma na GC/O, mas não foi identificado composto na GC/MS; <sup>c</sup>O composto apresenta % em área <0,1%; <sup>d</sup>Aroma detectado na GC/O.

Os resultados mostram que os compostos majoritários na análise por GC/MS não são os mesmos encontrados na análise sensorial com FM igual ou maior que 40. Isto se observa na Tabela 5.2, já que compostos como o E- $\beta$ -ocimeno e o Z-  $\beta$  – ocimeno, que apresentam as maiores FM. Isso vem a confirmar o que é encontrado na literatura (Xavier et al., 2013), que os compostos não contribuem igualmente para o perfil de aroma global de uma amostra, portanto uma alta concentração relativa de um composto determinada por um detector cromatográfico, não necessariamente corresponde a intensidade alta de aroma, devido às diferentes relações intensidade/concentração (Grosch, 1994; Van Ruth, 2001; Zellner et al, 2008; Xavier, 2011).

Os óleos essenciais obtidos em temperaturas mais elevadas, que correspondem a pressões mais elevadas, apresentam um menor potencial aromático. No caso do óleo essencial de pitangueira, o aumento da pressão de 1,0 a 1,5bar aumentou o potencial aromático, porém ao aumentar de 1,5 a 2,0bar diminuiu. Por isso é importante avaliar diferentes pressões e selecionar a melhor para potencial aromático e composição de interesse.

### 5.1.3. Laranja

A análise cromatográfica dos compostos voláteis presentes no óleo essencial de laranja, extraídos pela destilação por arraste a vapor em escala piloto em três pressões (1,0; 1,5; 2,0 bar), foi realizada por GC/MS. O resultado da análise cromatográfica, obtida para o óleo essencial de laranja nas três pressões utilizadas no processo de extração, segue na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Análise Cromatográfica GC/MS do óleo essencial de laranja extraído em três pressões diferentes.

Composto <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	% Área <sup>c</sup>		
		1,0 bar <sup>d</sup>	1,5 bar	2,0 bar
α-tujeno	923	0,36	0,60	0,66
α-pineno	930	1,74	2,55	2,40
sabineno	976	33,21	39,30	34,20
mirceno	991	2,94	4,33	3,78
α-felandreno	1001	0,67	0,96	0,93
δ-3-careno	1010	5,37	7,85	6,88
α-terpinoleno	1015	0,82	2,17	2,84
para-cimeno	1026	0,30	0,44	0,37
silvestreno	1028	3,81	4,40	4,96
Z-β-ocimeno	1037	0,26	0,33	0,41
E-β-ocimeno	1048	6,85	7,73	8,27
γ-terpineno	1055	1,27	2,61	0,12
hidrato de cis-sabineno	1065	0,25	0,14	0,13
terpinoleno	1086	2,12	2,12	2,35
linalol	1101	8,40	4,32	6,25
citronelal	1154	5,37	3,46	3,78
terpinen-4-ol	1176	1,42	2,03	3,27
α-terpineol	1188	0,30	0,21	0,33
nerol	1228	0,93	0,43	0,44

neral	1241	3,97	1,70	1,58
geranial	1271	5,11	0,15	2,09
acetato de citronelila	1353	0,29	0,49	0,56
acetato de nerila	1364	0,52	0,61	0,61
acetato de geranila	1383	0,50	0,55	0,61
$\beta$ -elemeno	1390	0,21	0,67	1,52
E-cariofileno	1416	0,90	0,66	0,83
$\alpha$ -humuleno	1450	0,12	0,19	0,30
E- $\beta$ -farneseno	1455	0,15	0,13	0,19
$\alpha$ -selineno + Bicyclogermacreno	1493	0,33	0,23	0,16
valenceno	1502	0,26	0,53	0,65
$\beta$ -sinensal	1697	0,91	1,57	2,07
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>89,65</b>	<b>93,46</b>	<b>93,53</b>

<sup>a</sup> = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007); composto com área  $\geq 0,1\%$ . <sup>b</sup>RI = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos. <sup>c</sup>% Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma. <sup>d</sup>As pressões da tabela se tratam de pressões absolutas.

Foram identificados em média 90% dos constituintes detectados. Os compostos majoritários obtidos na análise química da laranjeira, para pressão de 1,0 bar, 1,5 bar e 2,0 bar, respectivamente, foram: sabineno (33,21%; 39,30; 34,20%),  $\delta$ -3-careno (5,37%; 7,85%, 6,88%), E- $\beta$ -ocimeno (6,85%; 7,73%; 8,27%) e linalol (8,40%; 4,32%, 6,25%).

Foram avaliadas diferentes pressões de extração com o intuito de verificar o rendimento do óleo essencial extraído e a variação da composição do mesmo. Assim como no caso do óleo essencial de pitangueira, no caso do óleo essencial de laranjeira, a pressão não teve influência na composição do óleo essencial.

A análise por cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O) foi capaz de identificar uma grande variabilidade de aromas no óleo essencial de laranjeira. Nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 são apresentados, em formato de gráfico aranha, os aromas



identificados que obtiveram Frequência Modificada (FM) maior ou igual a 40 para o óleo essencial de laranjeira nas pressões de 1,0, 1,5 e 2,0bar, respectivamente.

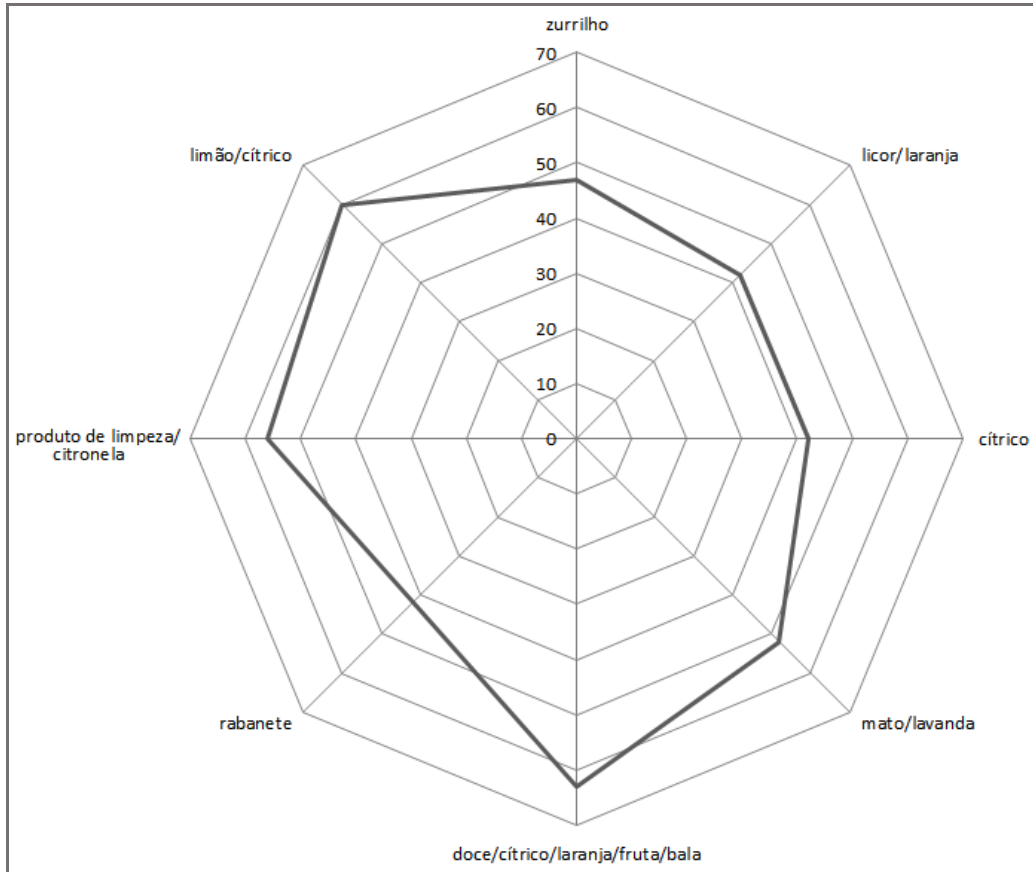


Figura 5.4. Gráfico aranha do óleo essencial de laranjeira na pressão de 1bar.

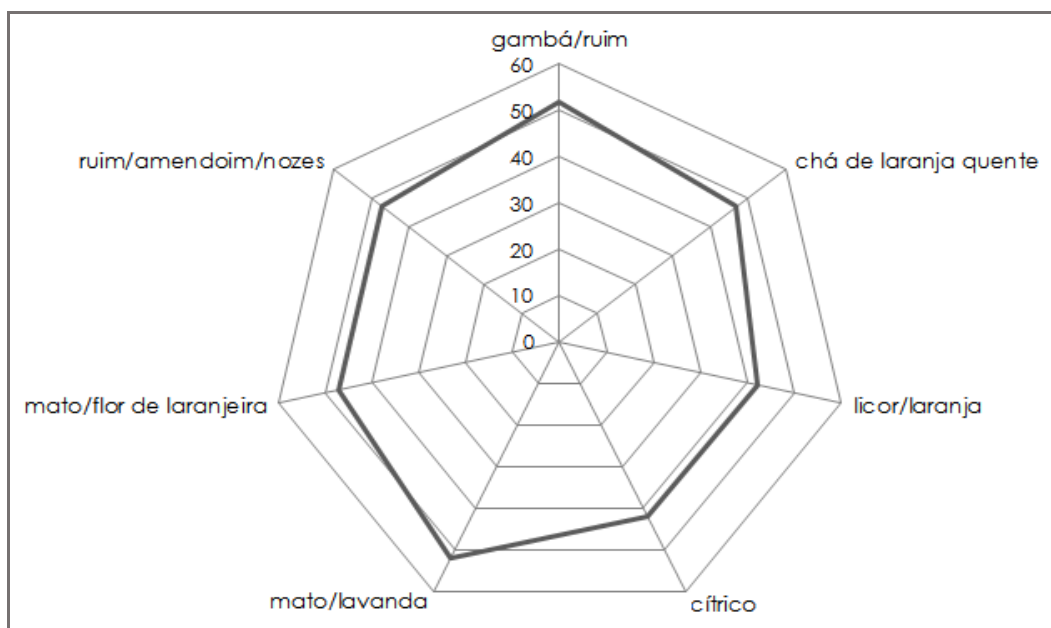


Figura 5.5. Gráfico aranha do óleo essencial de laranjeira na pressão de 1,5bar.

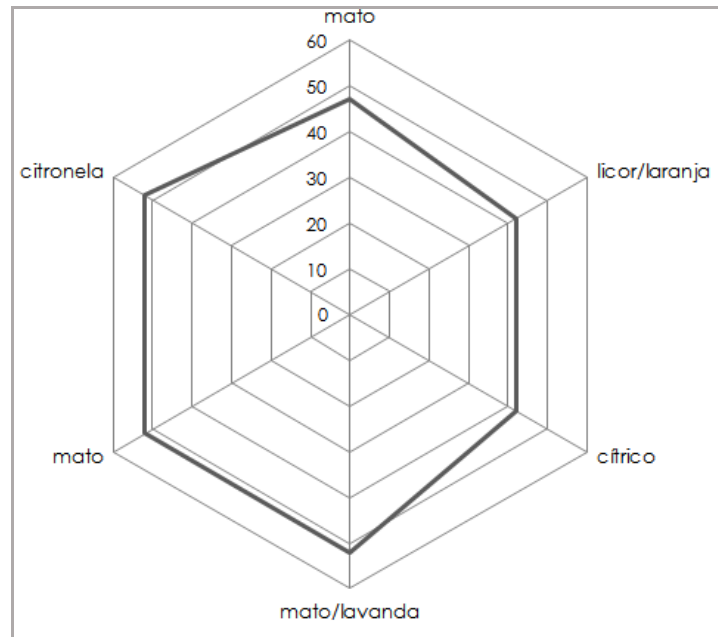


Figura 5.6. Gráfico aranha do óleo essencial de laranja na pressão de 2bar.

Foi definido selecionar valores iguais ou maiores que 40 com base na literatura (van Baren, 2008). Valores menores não foram considerados por serem fruto da baixa intensidade aromática do composto e/ou ao fato de alguns avaliadores terem menor sensibilidade que outros. Para as amostras de óleo essencial de laranja foram detectados 21 aromas com Frequência Modificada (FM) maior ou igual a 40. Desses 21 aromas, 8 foram detectados na amostra de 1,0bar, 7 foram detectados na amostra de 1,5bar e 6 foram detectados na amostra de 2,0bar. Os aromas licor/laranja, cítrico e mato/lavanda foram detectados nas três amostras com a mesmas FM, de 42%, 42% e 52%, respectivamente. Com relação a pressão de extração, observa-se que com o aumento da pressão o número de aromas significativos diminui.

Para os óleos essenciais de laranja o cruzamento entre os compostos identificados olfatometricamente e os que foram identificados por espectrometria de massa resulta em quatro compostos identificados pelos dois métodos, três deles para os óleos obtidos nas três pressões diferentes. A Tabela 5.4 apresenta os compostos voláteis identificados nos dois métodos, sendo que o composto Z- $\beta$ -ocimeno apresentou área menor que 1% em relação ao total de suas amostras.

Tabela 5.4. Compostos identificados por GC/MS e GC/O para o óleo essencial de laranjeira.

Pressão	RI	Composto <sup>a</sup>	% Área	Aroma <sup>d</sup>	FM (%)
1,0 bar	810	- <sup>b</sup>	tr <sup>c</sup>	Zorrilho	47
	1028	silvestreno	3,81	Licor/laranja	42
	1037	Z- $\beta$ -ocimeno	0,26	Cítrico	42
	1048	E- $\beta$ -ocimeno	6,85	Mato/lavanda	52
	1082	-	tr	Doce/cítrico/laranja fruta/bala	63
	1099	-	tr	Rabanete	42
	1193	-	tr	Produto de limpeza	56
	1241	neral	3,97	Limão/cítrico	60
1,5 bar	814	-	tr	Gambá/ruim	52
	867	-	tr	Chá de laranja quente	47
	1028	silvestreno	4,40	Licor/laranja	42
	1037	Z- $\beta$ -ocimeno	0,33	Cítrico	42
	1048	E- $\beta$ -ocimeno	7,73	Mato/lavanda	52
	1075	-	tr	Mato/flor de laranjeira	47
	1229	-	tr	Ruim/amendoim/nozes	47
2,0 bar	860	-	tr	Mato	47
	1028	silvestreno	4,96	Licor/laranja	42
	1037	Z- $\beta$ -ocimeno	0,41	Cítrico	42
	1048	E- $\beta$ -ocimeno	8,27	Mato/lavanda	52
	1107	-	tr	Mato	52
	1236	-	tr	Citronela	52

<sup>a</sup>Compostos voláteis identificados pela GC/MS; <sup>b</sup>Foi detectado aroma na GC/O, mas não foi identificado composto na GC/MS; <sup>c</sup>O composto apresenta % em área <0,1%; <sup>d</sup>Aroma detectado na GC/O.

Os resultados mostram que os compostos majoritários na análise por GC/MS não são os mesmos encontrados na análise sensorial com FM igual ou maior que 40 (Figura 5.7). Isso vem a confirmar o que é encontrado na literatura (Xavier et al., 2013), que os compostos não contribuem igualmente para o perfil de aroma global de uma amostra, portanto uma alta concentração relativa de um composto determinada por um detector cromatográfico, não necessariamente corresponde a intensidade alta de aroma, devido às diferentes relações intensidade/concentração

(Grosch, 1994; Van Ruth, 2001; Zellner et al, 2008; Xavier, 2011). Isto também pode ser observado na Figura 5.7 para a amostra de óleo essencial de laranja extraído por destilação por arraste a vapor a 2,0bar.

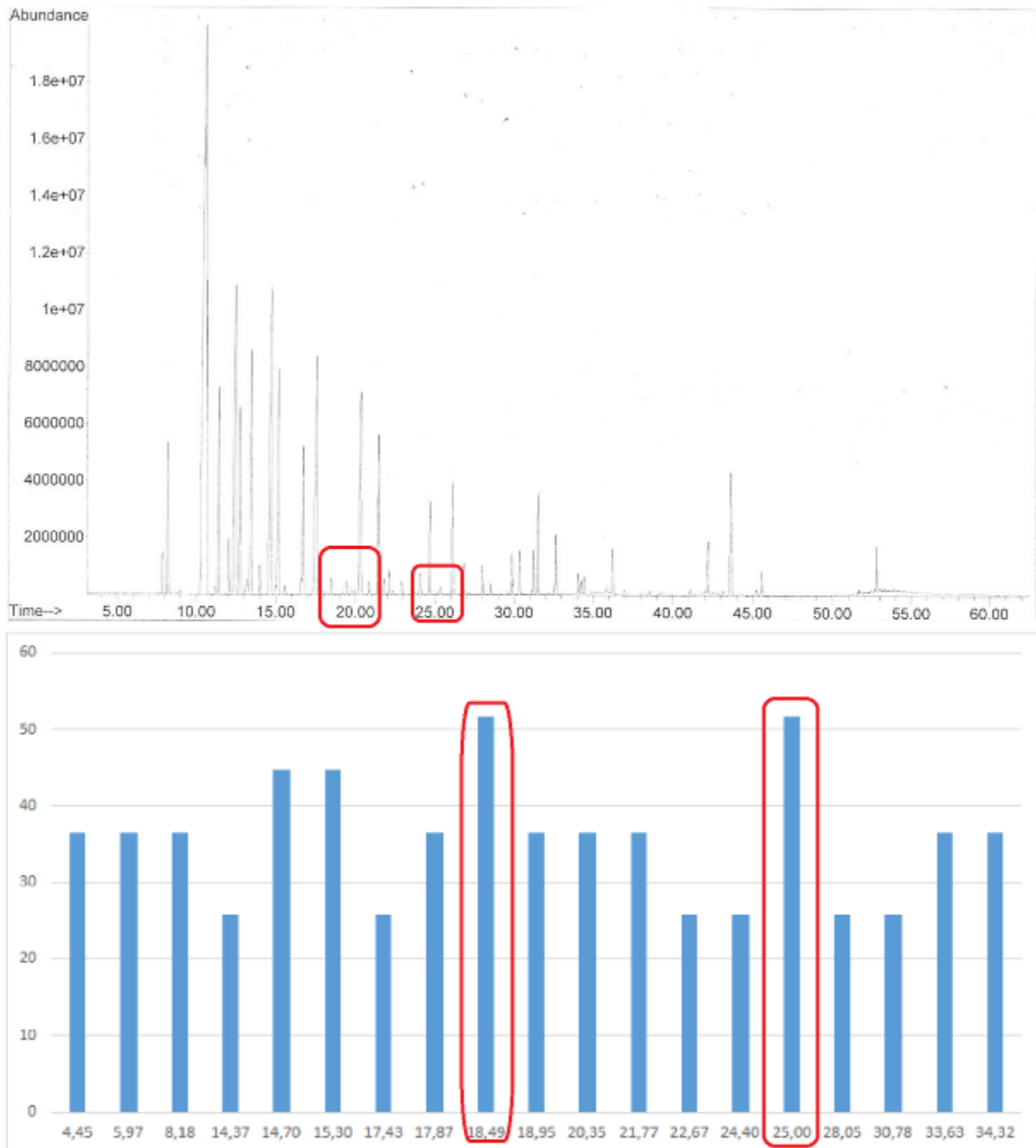


Figura 5.7. Comparação entre o cromatograma e o aromagrama com as FM para a amostra de óleo essencial de laranja extraído por destilação por arraste a vapor a 2,0bar, obtido por GC/MS.

Os óleos essenciais obtidos em temperaturas mais elevadas, que correspondem a pressões mais elevadas, apresentam um menor potencial aromático. Isto se observou no caso do óleo essencial de laranjeira.

## 5.2. Mel

### 5.2.1. Resultados da análise cromatográfica

A análise cromatográfica dos compostos voláteis presentes nas amostras de mel extraídos por SPME foi realizada por GC/MS. Na Tabela 5.5 estão apresentados os resultados obtidos nas análises das amostras: mel de aroeira, mel de eucalipto, mel de quitoco, mel branco C. e mel branco AC. Para todas as amostras analisadas foram identificados mais de 93% dos compostos presentes nas mesmas e os compostos majoritários se encontram em destaque na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Análise Cromatográfica GC/MS das amostras de mel.

COMPOSTO <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Área <sup>c</sup> (%)				
		<i>Aroeira</i>	<i>Eucalipto</i>	<i>Quitoco</i>	<i>Branco C</i>	<i>Branco AC</i>
furfural	830	0,27	0,13	0,63	-	-
ácido 2-metil-butanóico	832	0,68	1,30	-	-	-
α-pineno	936	1,63	0,34	-	-	-
β-citroneleno	940	4,25	0,65	-	-	-
canfeno	944	3,14	4,96	-	-	-
benzaldeído	949	4,08	6,21	-	2,24	-
n-heptanol	962	-	0,14	0,69	4,63	1,50
β-pineno	977	-	0,18	-	-	-
n-octanal	999	-	0,12	-	-	0,27
limoneno	1024	0,22	0,40	-	-	-
ácido 5-metil-hexanóico	1033	0,67	-	-	0,35	0,79
benzeno acetaldeído	1036	0,72	1,12	-	0,54	1,30
salicilaldeído	1042	0,43	-	-	1,17	-
isobutil angelato	1046	0,49	0,64	<b>19,60</b>	1,31	0,71
n-octanol	1063	-	0,24	-	-	-
formato de benzila	1075	-	5,71	<b>16,07</b>	1,46	1,27
óxido de trans-linalol (furanóide)	1080	0,49	-	2,83	-	0,67

dehidro-linalol	1088	-	-	-	0,47	-
linalol	1091	-	0,65	4,95	0,69	0,29
n-nonanal	1103	0,30	-	0,41	0,55	-
fenil Etil Álcool	1106	0,39	<b>16,50</b>	<b>16,00</b>	0,91	2,04
dimetil acetal benzaldeído	1113	-	-	-	5,46	-
isoforona	1117	0,37	-	1,14	<b>21,24</b>	5,76
óxido trans-rosa	1125	0,51	-	-	-	1,40
dihidro-linalol	1132	-	-	0,14	-	-
cânfora	1145	0,32	1,07	0,25	-	-
citronelal	1147	0,42	-	-	-	1,75
isoborneol	1154	-	-	0,55	-	-
trans- $\beta$ -terpineol	1156	0,71	1,53	1,41	1,44	1,13
óxido de cis-linalol (piranóide)	1171	1,07	-	0,34	-	0,58
óxido de trans-linalol (piranóide)	1172	-	0,49	0,20	0,93	-
cis-pinocarveol	1183	-	-	-	3,03	-
1-fenil etil acetato	1192	0,33	2,45	3,43	-	0,86
formato de linalol	1210	-	0,39	-	-	-
nerol	1230	-	-	1,09	-	-
acetato tetrahidro-linalol	1234	-	-	-	-	0,15
neral	1237	0,45	-	1,01	-	1,10
ácido benzenoacético, etil ester	1243	0,94	0,55	-	-	-
geraniol	1249	1,60	2,34	-	1,87	0,21
geranial	1259	2,63	0,69	0,99	<b>8,40</b>	4,19
n-decanol	1263	-	0,64	1,36	-	-
ácido nonanóico	1269	1,40	0,83	-	-	1,65
acetato de dihidro-linalol	1276	-	0,46	0,45	-	-
carvacrol	1296	-	0,29	-	0,60	-
n-tridecano	1301	-	-	-	-	0,24
undecanal	1305	-	-	-	-	0,44
2E-acetato de nonenol	1310	0,63	0,40	-	-	-
$\alpha$ -metil cinamaldeído	1319	-	0,16	-	2,48	2,45
decanoato de metila	1325	-	1,23	0,45	-	1,97
aldeído limoneno	1330	8,03	7,44	4,25	<b>18,25</b>	<b>15,41</b>
3-hidroxi-4-fenil-2-butanona	1340	-	-	4,88	-	-
2-fenil-etil-propanoato	1349	<b>9,30</b>	<b>8,73</b>	-	-	0,97
E- $\beta$ -damascenona	1386	-	-	-	-	0,22

vanilina	1393	1,49	-	-	-	1,12
metil-n-metil antranilato	1406	-	0,30	-	-	0,36
butanoato de linalol	1417	0,73	0,92	-	-	1,54
vanilil álcool	1441	<b>16,16</b>	0,27	0,89	1,42	0,72
E-iso Eugenol	1446	-	-	-	3,53	-
g-gurjuneno	1480	0,64	-	-	-	-
2-tridecanona	1497	1,87	1,48	-	-	0,46
n-pentadecano	1502	3,87	<b>9,10</b>	2,86	7,59	<b>18,32</b>
neril isovalerato	1584	-	0,75	-	-	1,39
1,2-dihidro-8-hidroxi-(2E)-linalol	1656	<b>13,22</b>	-	-	-	5,33
7-epi- $\alpha$ -eudesmol	1661	8,57	5,36	-	-	-
n-tetradecanol	1672	0,57	5,44	3,01	-	<b>12,41</b>
n-octadecano	1798	0,79	0,19	-	-	-
ocidol	1834	0,11	1,03	3,14	-	2,40
n-nonadecano	1900	0,14	0,45	-	-	1,08
(Z,E)-geranil linalol	1996	-	-	-	5,27	-
<b>TOTAL IDENTIFICADO</b>		<b>94,65</b>	<b>94,30</b>	<b>93,02</b>	<b>95,83</b>	<b>94,46</b>

<sup>a</sup> = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007); compostos com área  $\geq 0,1\%$ ; <sup>b</sup> RI = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos; <sup>c</sup>Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma.

Na Tabela 5.5 observa-se que os compostos voláteis encontrados nas cinco amostras de mel são diferentes. Isso se deve ao fato de que tanto a composição quanto o tipo de composto são função de aspectos climáticos, geográficos e botânicos (Witter et al., 2014). Seria importante obter o material vegetal (plantas aromáticas) da região onde as abelhas coletam o material. Vale salientar que os compostos voláteis obtidos de óleos essenciais são originários de folhas e os das amostras de mel de flores.

### 5.2.2. Resultados da análise olfatométrica

Na análise (GC/O) foi possível identificar uma grande variabilidade de aromas em todas as amostras. As Figuras 5.8, 5.9, 5.10, 5.11 e 5.12 apresentam os compostos voláteis identificados que obtiveram FM maior ou igual a 40. Foi definido

selecionar valores iguais ou maiores que 40 com base na literatura (van Baren, 2008).

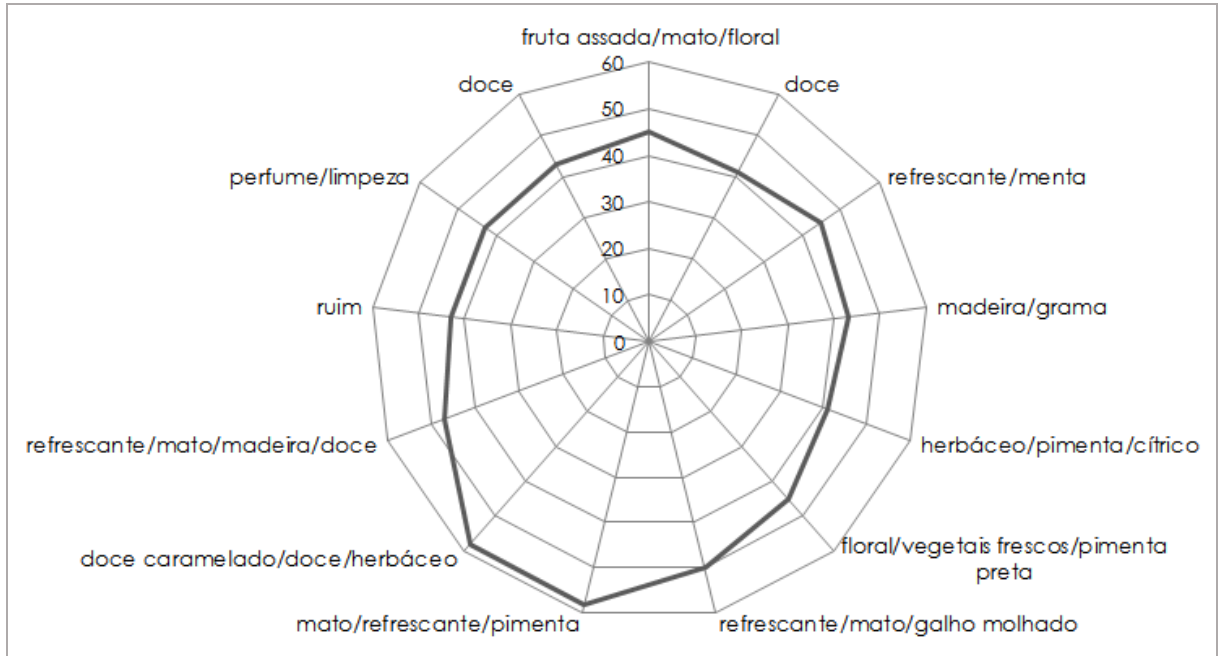


Figura 5.8. Gráfico aranha da amostra de mel de aroeira.

Foram encontrados 13 compostos voláteis com aromas significativos na amostra de mel de aroeira. Podem-se destacar os aromas mato/refrescante/pimenta e doce caramelado/doce/herbáceo, ambos com FM de 58.

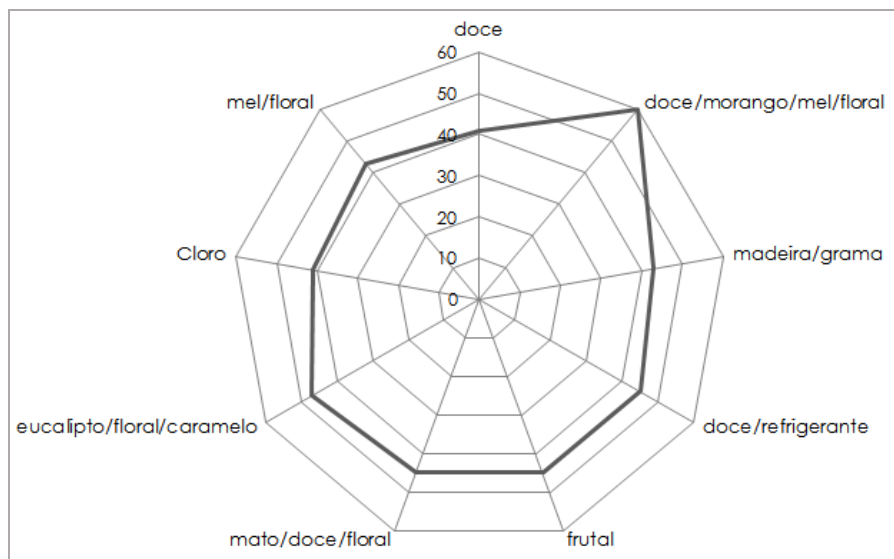


Figura 5.9. Gráfico aranha da amostra de mel de eucalipto.



Foram encontrados 9 compostos voláteis com aromas significativos na amostra de mel de eucalipto. Podem-se destacar o aroma doce/morango/mel/floral com FM de 60.

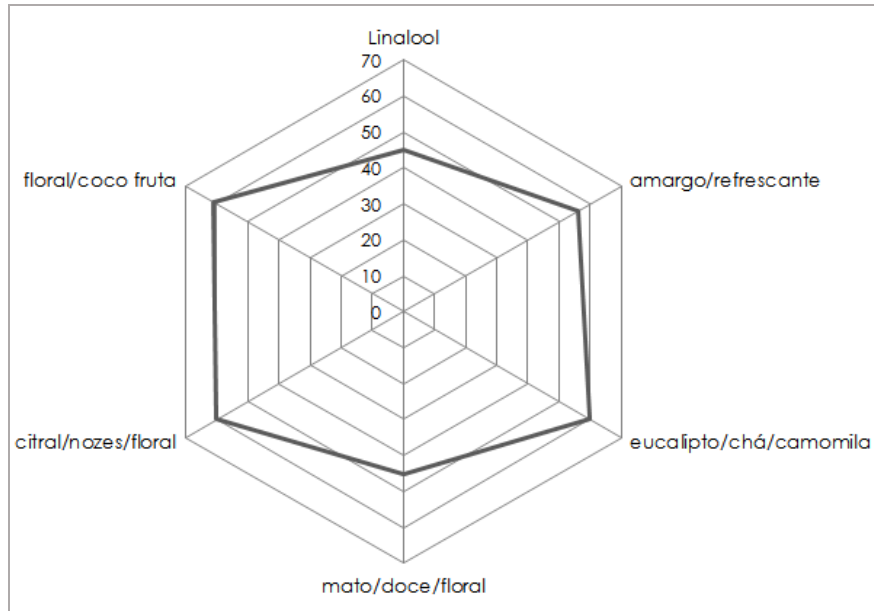


Figura 5.10. Gráfico aranha da amostra de mel de quitoco.

Foram encontrados 6 compostos voláteis com aromas significativos na amostra de mel de quitoco. Podem-se destacar os aromas eucalipto/chá/camomila e citral/nozes/floral, ambos com FM de 60 e o aroma floral/coco fruta com FM de 61.

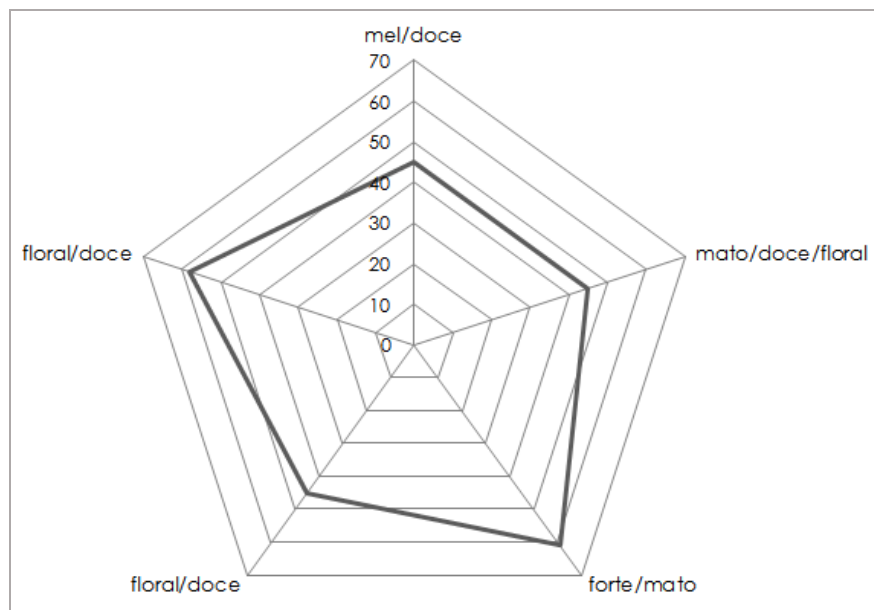


Figura 5.11. Gráfico aranha da amostra de mel branco C.

Foram encontrados 5 compostos voláteis com aromas significativos na amostra de mel branco C. Podem-se destacar os aromas forte/mato e floral/doce, com FM de 61 e 58, respectivamente.

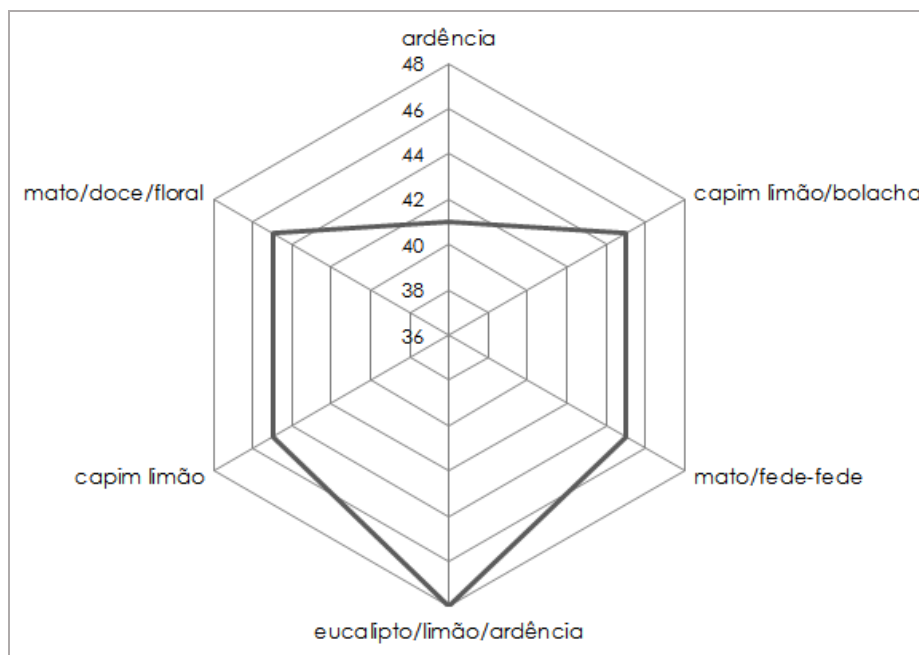


Figura 5.12. Gráfico aranha da amostra de mel branco AC.

Foram encontrados 6 compostos voláteis com aromas significativos na amostra de mel branco AC. Podem-se destacar o aroma eucalipto/limão/ardência com FM de 48. O cruzamento entre os compostos identificados pela análise sensorial e os que foram identificados pelo espectrômetro de massa resultou em onze compostos identificados pelos dois métodos para as amostras de mel. Estes resultados estão apresentados na Tabela 5.6. Os resultados mostram que os compostos majoritários em composição química não necessariamente apresentam as maiores FM.

Tabela 5.6. Compostos identificados por GC/MS e GC/O dos compostos de mel.

Mel	RI	Composto <sup>a</sup>	Área (%)	Aroma <sup>d</sup>	FM (%)
aroeira	814	- <sup>b</sup>	tr <sup>c</sup>	Fruta assada/mato/floral	45
	832	ácido 2-metil-butanóico	0,68	Doce	41

	924	-	tr	Refrescante/menta	45
	936	$\alpha$ -pineno	1,63	Madeira/grama	43
	1014	-	tr	Herbáceo/pimenta/cítrico	41
	1305	-	tr	Floral/vegetais frescos/pimenta preta	45
	1393	vanilina	1,49	Refrescante/mato/galho molhado	50
	1437	-	tr	Mato/refrescante/pimenta	58
	1473	-	tr	Doce caramelado/doce/herbáceo	58
	1648	-	tr	Refrescante/mato/madeira/doce	47
	1680	-	tr	Ruim	43
	1870	-	tr	Perfume/limpeza	43
	1987	-	tr	Doce	43
	<hr/>				
	832	ácido 2-metil-butanóico	1,30	Doce	41
	849	-	tr	Doce/morango/mel/floral	60
	936	$\alpha$ -pineno	0,34	Madeira/grama	43
	974	-	tr	Doce/Refrigerante	45
eucalipto	1015	-	tr	Frutal	45
	1106	fenil etil álcool	16,50	Mato/doce/floral	45
	1137	-	tr	Eucalipto/floral/caramelo	47
	1171	-	tr	Cloro	41
	1736	-	tr	Mel/Floral	43
	<hr/>				
	942	-	tr	linalol	45
	1075	formato de benzila	16,07	Amargo/refrescante	56
	1091	linalol	4,95	Eucalipto/chá/camomila	60
quitoco	1106	fenil etil álcool	16,00	Mato/doce/floral	45
	1267	-	tr	Citral/nozes/floral	60
	1408	-	tr	Floral/coco fruta	61
	<hr/>				
	1005	-	tr	Mel/doce	45
branco C	1106	fenil etil álcool	0,91	Mato/doce/floral	45
	1491	-	tr	Forte/mato	61

	1526	-	tr	Floral/doce	45
	1596	-	tr	Floral/doce	58
branco AC	808	-	tr	Ardência	41
	912	-	tr	Capim limão/bolacha	45
	977	-	tr	Mato/fede-fede	45
	993	-	tr	Eucalipto/limão/ardência	48
	1052	-	tr	Capim limão	45
	1106	fenil etil álcool	2,04	Mato/doce/floral	45

<sup>a</sup>Compostos voláteis identificados pela GC/MS; <sup>b</sup>Foi detectado aroma na GC/O, mas não foi identificado composto na GC/MS; <sup>c</sup>O composto apresenta % em área <0,1%; <sup>d</sup>Aroma detectado na GC/O.

Os resultados das análises cromatográficas dos tipos de mel estudados apresentam compostos de aroma com aromas distintos, com destaque para o aroma de mato/doce/floral encontrado nas cinco amostras. Contudo apenas onze aromas percebidos pelos analisadores foram identificados pelo espectrômetro de massas. Ou seja, a grande maioria dos aromas encontrados provém de constituintes minoritários, logo os aromas mais perceptíveis não correspondem necessariamente aos compostos majoritários (Xavier et al., 2013), presentes nos voláteis do mel.

Observou-se que a técnica permite a identificação dos compostos e dos aromas das amostras de mel. Logo, existe um caminho para obtenção de uma metodologia alternativa para identificação da origem do mesmo. Na sequência, poder-se-ia buscar dados sobre as matérias primas, extraíndo os compostos voláteis das flores por SPME, e comparar com estes resultados da análise olfatométrica, buscando um aroma específico que possa caracterizar o mel.

### 5.3. Material têxtil

#### 5.3.1. Análises do produto antimicrobiano natural

O produto antimicrobiano natural é produzido a partir de uma mistura de óleos essenciais (cravo, cedro, tomilho, lavanda, melaleuca e capim limão). A análise

cromatográfica desta mistura de óleos foi realizada por GC/MS. Os resultados são apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Análise Cromatográfica GC/MS dos compostos voláteis extraídos por SPME da mistura de óleos essenciais (cravo, cedro, tomilho, lavanda, melaleuca e capim limão).

<b>Composto<sup>a</sup></b>	<b>RI<sup>b</sup></b>	<b>% Área<sup>c</sup></b>
triciclano	923	0,11
α-pineno	931	0,85
canfeno	948	0,17
sabineno	970	tr <sup>d</sup>
β-pineno	976	0,18
6-metil-5-hepten-2-ona	981	2,46
mirreno	986	0,48
α-felandreno	1004	0,10
d-3-careno	1008	tr
α-terpineno	1015	3,00
para-cimeno	1023	6,06
1,8-cineol	1028	0,55
Z-β-ocimeno	1031	2,29
E-β-ocimeno	1044	0,21
γ-terpineno	1057	8,16
cis-hidrato de sabineno	1068	0,15
terpinoleno	1084	1,41
linalol	1099	9,34
cânfora	1142	tr
isoborneol	1150	1,42
borneol	1163	0,10
terpinen-4-ol	1179	15,41
α-terpineol	1188	0,10
geraniol	1248	9,58
timol	1290	2,68
terpinen-7-al	1294	0,42
eugenol	1353	6,63
α-copaeno	1374	0,59
α-cedreno	1408	0,11
E-cariofileno	1419	5,18
cis-tujopseno	1427	1,25
α-guaieno	1440	12,26

$\alpha$ -humuleno	1452	0,19
viridifloreno	1492	0,37
biciclogermacreno	1501	0,41
$\gamma$ -cadineno	1509	0,73
acetato de eugenila	1518	0,26
globulol	1585	tr
epi-cedrol	1613	1,30
<b>Total identificado</b>		<b>94,72</b>

<sup>a</sup> = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007); composto com área  $\geq 0,1\%$ . <sup>b</sup>RI = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos. <sup>c</sup>% Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma. <sup>d</sup>% Área  $<0,1\%$ .

Na análise cromatográfica da mistura de óleos essenciais foram detectados 51 compostos e destes, 39 compostos foram identificados. Estes 39 compostos identificados representam 94,72% do total de compostos detectados. Os compostos majoritários encontrados foram: para-cimeno (6,06%),  $\gamma$ -terpineno (8,16%), linalol (9,34%), terpinen-4-ol (15,41%), geraniol (9,58%), eugenol (6,63%), E-cariofileno (5,18%) e  $\alpha$ -guaiano (12,26%). Na literatura (Novacosk e Torres, 2006; Guimarães et al., 2008; Probst, 2012; Goes et al., 2012; Carvalho et al., 2015; Mariscal-Lucero et al., 2015) estes compostos são encontrados para os óleos essenciais que constituem a mistura.

A análise por cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O) dos compostos voláteis, extraídos por SPME, presentes na mistura de óleos essenciais foi capaz de identificar uma grande variabilidade de aromas. Na Figura 5.13 são apresentados os aromas que obtiveram Frequência Modificada (FM) maior ou igual a 40. Foram encontrados 14 compostos voláteis com aromas significativos na mistura de óleos essenciais. Podem-se destacar os aromas refrescante e floral/pinho/verniz, com FM de 84 e 87, respectivamente.

O cruzamento entre os compostos identificados pela análise sensorial e os que foram identificados pelo espectrômetro de massa resultou em 12 compostos identificados pelos dois métodos para a mistura de óleos essenciais. Estes resultados estão apresentados na Tabela 5.8. Os resultados mostram que os compostos majoritários em composição química não necessariamente apresentam

as maiores FM. Isso vem a confirmar o que é encontrado na literatura (Xavier et al., 2013), que os compostos não contribuem igualmente para o perfil de aroma global de uma amostra.

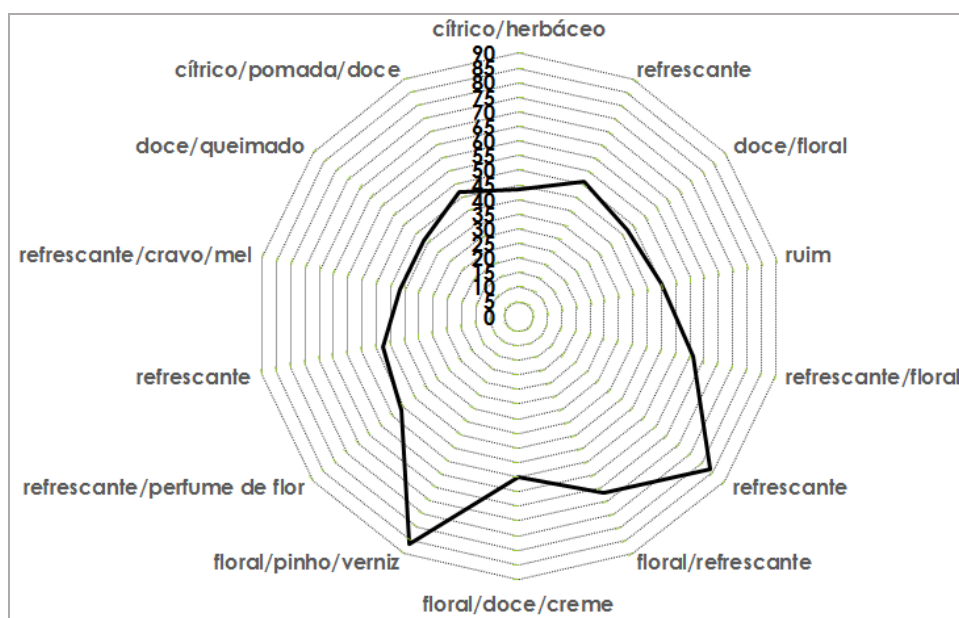


Figura 5.13. Gráfico aranha da mistura de óleos essenciais.

Tabela 5.8. Compostos identificados por GC/MS e GC/O da mistura de óleos essenciais.

RI	Composto	% Área	Aroma	FM (%)
931	$\alpha$ -pineno	0,85	cítrico/herbáceo	43
948	canfeno	0,17	refrescante	51
981	6-metil-5-hepten-2-ona	2,46	doce/floral	47
1057	$\gamma$ -terpineno	8,16	ruim	50
1099	linalol	9,34	refrescante/floral	61
1150	isoborneol	1,42	refrescante	84
1163	borneol	0,10	floral/refrescante	67
1179	terpinen-4-ol	15,41	floral/pinho/verniz	87
1248	geraniol	9,58	refrescante/perfume de flor	51
1290	timol	2,68	refrescante	47
1353	eugenol	6,63	refrescante/cravo/mel	42
1585	globulol	tr	cítrico/pomada/doce	47

### 5.3.2. Análises do tecido preparado com microcápsulas da mistura de óleos essenciais

Uma das amostras de tecido avaliadas continha microcápsulas da mistura de óleos essenciais presentes no produto antimicrobiano natural fornecido pela empresa. A análise cromatográfica deste tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais foi realizada por GC/MS. Os resultados são apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Análise Cromatográfica GC/MS dos compostos voláteis extraído por SPME do tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais.

Composto <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Dias de extração				
		0 <sup>c</sup>	2	4	7	10
		% Área <sup>d</sup>				
6-metil-5-hepten-2-ona	981	0,37	tr <sup>e</sup>	tr	tr	tr
α-terpineno	1015	1,68	3,37	3,91	4,06	3,38
para-cimeno	1023	2,04	3,71	4,48	4,87	2,95
γ-terpineno	1057	3,63	7,28	8,79	9,57	7,75
terpinoleno	1084	1,70	1,50	1,81	1,97	2,39
linalol	1099	4,28	4,34	5,25	5,71	7,18
isoborneol	1150	0,97	1,08	1,31	0,59	0,67
terpinen-4-ol	1179	9,13	9,84	10,49	11,43	10,59
geraniol	1248	9,41	9,68	9,50	10,35	8,92
timol	1290	12,93	9,35	6,70	7,29	11,18
terpinen-7-al	1294	1,00	0,94	1,13	-	-
eugenol	1353	7,66	10,23	5,50	5,99	9,19
α-copaeno	1374	1,03	0,36	- <sup>f</sup>	-	-
E-cariofileno	1419	4,41	3,49	4,21	4,58	3,19
cis-tujopseno	1427	2,01	1,61	1,94	2,11	1,68
α-guaieno	1440	19,41	16,45	19,86	21,63	19,93
viridifloreno	1492	0,88	0,39	0,47	-	-
biciclogermacreno	1501	0,73	0,34	-	-	-
γ-cadineno	1509	1,12	1,06	1,26	1,36	-
acetato de eugenila	1518	0,77	0,64	0,77	0,35	-
globulol	1585	1,12	0,76	-	-	-
epi-cedrol	1613	8,40	10,41	9,61	5,83	8,94



<b>Total identificado</b>	<b>94,66</b>	<b>96,85</b>	<b>97,03</b>	<b>97,74</b>	<b>97,98</b>
---------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

<sup>a</sup> = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007); composto com área  $\geq 0,1\%$ . <sup>b</sup>RI = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos. <sup>c</sup> Dias de extração onde ocorreram as análises, 0 = primeira análise, 2 = dois dias após a primeira, 4 = quatro dias após a primeira, 7 = sete dias após a primeira, 10 = dez dias após a primeira. <sup>d</sup>% Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma. <sup>e</sup>% Área  $<0,1\%$ . <sup>f</sup>Não foi detectado o composto.

Na análise cromatográfica dos compostos voláteis do tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais foram detectados 27 compostos da mistura de óleos essenciais na primeira extração (dia zero) e destes, 22 compostos foram identificados. Na Tabela 5.9 também é apresentada a variação de percentual destes compostos com a passagem de tempo. O percentual de cada composto pode variar já que a presença de alguns compostos não se manteve até o último dia de extração, porém, o composto  $\alpha$ -guaieno se manteve como um dos majoritários até o último dia.

A análise por cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O) dos compostos voláteis, extraídos por SPME, presentes no tecido que continha as microcápsulas da mistura de óleos essenciais foi capaz de identificar uma grande variabilidade de aromas. Na Figura 5.14 são apresentados os aromas que obtiveram Frequência Modificada (FM) maior ou igual a 40 no primeiro dia de experimento, bem como a variação de FM nos demais dias em que foram feitas as análises. A partir do dia dois são considerados FM menores que 40 a fim de avaliar a durabilidade dos aromas no tecido que no primeiro dia apresentaram FM maior que 40.

Foram encontrados 6 compostos voláteis com aromas significativos na amostra de tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais. Podem-se destacar os aromas refrescante/floral, refrescante e floral/pinho/verniz.

O cruzamento entre os compostos identificados pela GC/O e os que foram identificados pelo GC/MS para o tecido com as microcápsulas da mistura de óleos essenciais mostrou que todos os aromas com FM maior que 40 na análise sensorial foram também identificados na análise cromatográfica (Tabela 5.10).

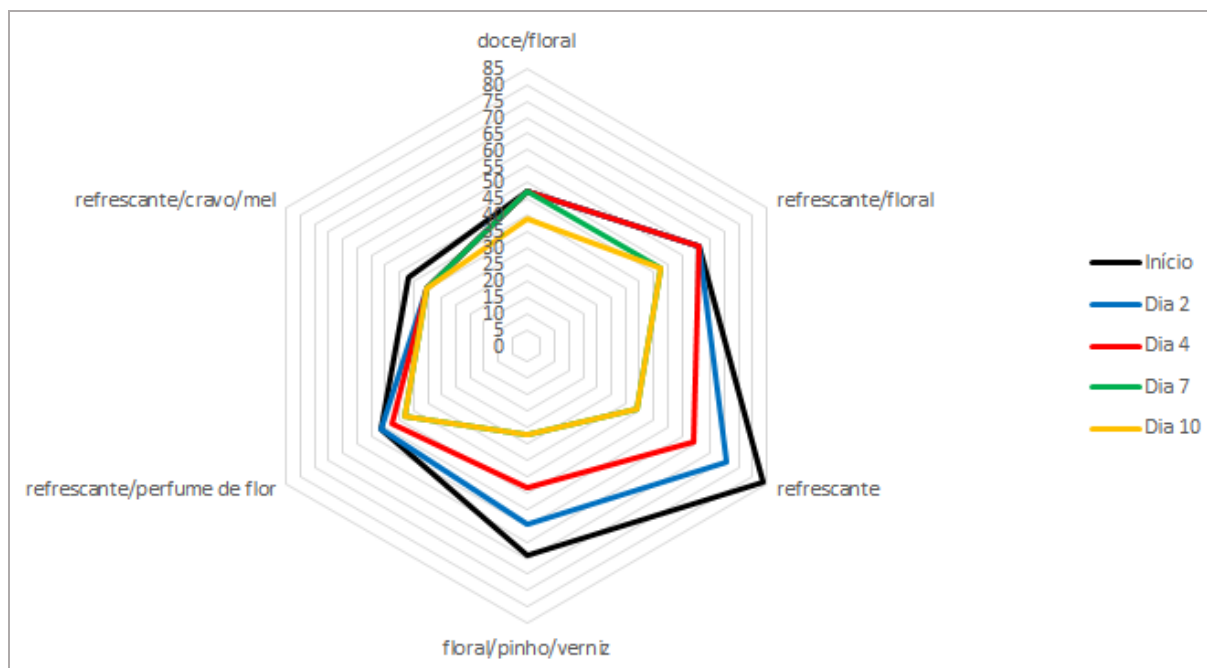


Figura 5.14. Gráfico aranha dos compostos voláteis do tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais.

Tabela 5.10. Compostos identificados por GC/MS e GC/O do tecido com as microcápsulas.

RI	Composto	% Área*	Aroma	FM (%)**
981	6-metil-5-hepten-2-ona	0,37	doce/floral	47
1099	linalol	4,28	refrescante/floral	61
1150	isoborneol	0,97	refrescante	71
1179	terpinen-4-ol	9,13	floral/pinho/verniz	55
1248	geraniol	9,41	refrescante/perfume de flor	51
1353	eugenol	7,66	refrescante/cravo/mel	35

\*%Área da extração do dia zero. \*\*FM(%) da extração do dia zero.

### 5.3.3. Análises do tecido impregnado com a mistura de óleos essenciais pela impregnação supercrítica

A outra amostra de tecido avaliada não continha a mistura de óleos essenciais presentes no produto antimicrobiano natural fornecido pela empresa. Este tecido passou pela impregnação supercrítica a 90bar e 313K. A análise cromatográfica deste tecido impregnado com a mistura de óleos essenciais foi realizada por GC/MS. Os resultados são apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Análise Cromatográfica GC/MS dos compostos voláteis extraído por SPME do tecido impregnado à 90bar e 313K.

Composto <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Dias de extração				
		0 <sup>c</sup>	2	4	7	10
		% Área <sup>d</sup>				
6-metil-5-hepten-2-ona	981	0,78	0,34	0,28	0,30	0,04
linalol	1099	2,36	2,46	3,41	0,68	0,04
terpinen-4-ol	1179	5,56	5,00	8,14	4,04	10,36
α-terpineol	1188	0,42	-	-	-	-
timol	1290	30,51	30,66	26,75	29,03	23,88
terpinen-7-al	1294	4,83	5,86	4,56	4,95	5,27
eugenol	1353	35,70	47,24	50,56	54,86	48,22
globulol	1585	0,96	-	-	-	-
epi-cedrol	1613	16,81	7,13	3,91	4,24	11,33
<b>Total identificado</b>		<b>97,93</b>	<b>98,69</b>	<b>97,61</b>	<b>98,11</b>	<b>99,15</b>

<sup>a</sup> = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007); composto com área  $\geq 0,1\%$ . <sup>b</sup>RI = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos. <sup>c</sup> Dias de extração onde ocorreram as análises, 0 = primeira análise, 2 = dois dias após a primeira, 4 = quatro dias após a primeira, 7 = sete dias após a primeira, 10 = dez dias após a primeira. <sup>d</sup>% Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma. <sup>e</sup>% Área  $<0,1\%$ . <sup>f</sup>Não foi detectado o composto.

Na análise cromatográfica dos compostos voláteis do tecido impregnado à 90bar e 313K foram detectados 11 compostos da mistura de óleos essenciais na primeira extração (dia zero) e destes, 9 compostos foram identificados. Na Tabela 5.11 também são apresentados os resultados para as amostras extraídas nos dias seguintes, como definido na metodologia. O percentual de cada composto pode variar já que alguns compostos não se mantem até o décimo dia de extração, porém, os compostos timol e eugenol se mantiveram como majoritários até o último dia de extração.

A análise por cromatografia gasosa/olfatometria (GC/O) dos compostos voláteis, extraídos por SPME, presentes no tecido impregnado a 90bar e 313K foi capaz de identificar uma grande variabilidade de aromas. Na Figura 5.15 são apresentados os aromas que obtiveram Frequência Modificada (FM) maior ou igual a 40 no primeiro dia de experimento, bem como a variação de FM nos demais dias

em que foram feitas as análises. A partir do dia dois são considerados FM menores que 40 a fim de avaliar a durabilidade dos aromas no tecido que no primeiro dia apresentaram FM maior que 40.

Foram encontrados 5 compostos voláteis com aromas significativos na amostra de tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais. Podem-se destacar os aromas refrescante/floral e floral/pinho/verniz, também presentes na amostra de tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais.

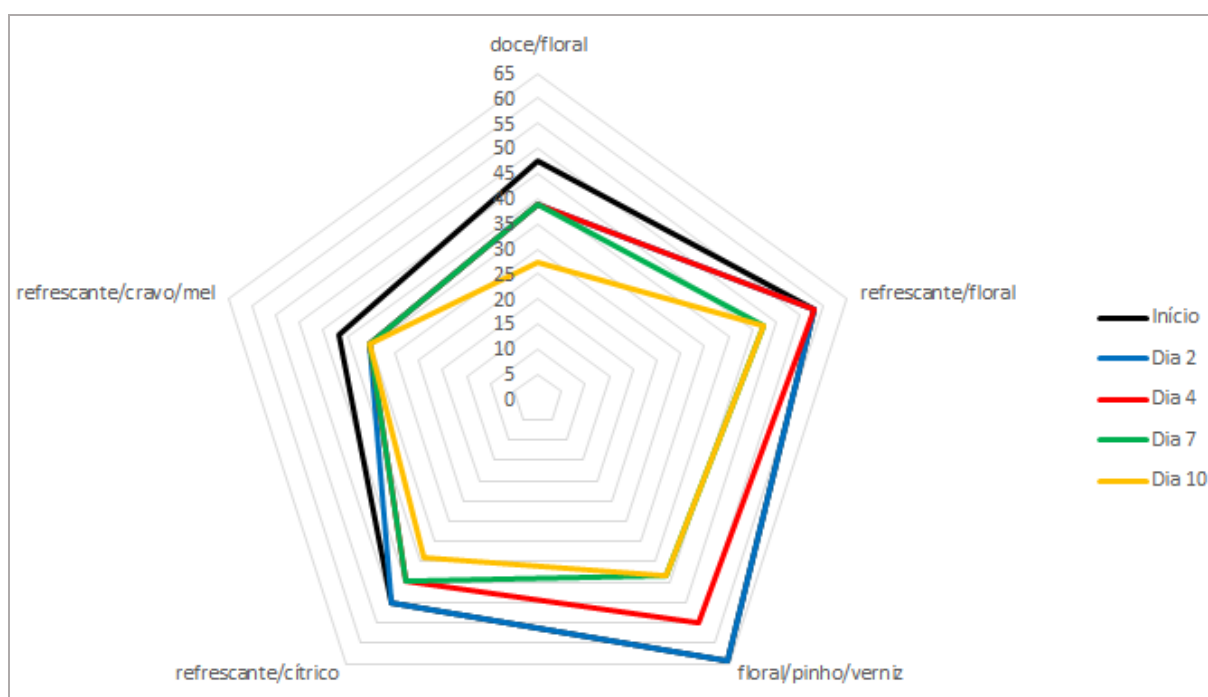


Figura 5.15. Gráfico aranha dos compostos voláteis do tecido impregnado a 90bar e 313K.

O cruzamento entre os compostos identificados pela GC/O e os que foram identificados pelo GC/MS para o tecido com as microcápsulas da mistura de óleos essenciais mostrou que todos os aromas com FM maior que 40 na análise sensorial foram também identificados na análise cromatográfica (Tabela 5.12).

Tabela 5.12. Compostos identificados por GC/MS e GC/O do tecido impregnado a 90bar e 313K.

RI	Composto	% Área*	Aroma	FM (%)**
981	6-metil-5-hepten-2-ona	0,78	doce/floral	47
1099	linalol	2,36	refrescante/floral	58

1179	terpinen-4-ol	5,56	floral/pinho/verniz	64
1294	terpinen-7-al	4,83	refrescante/cítrico	50
1353	eugenol	35,70	refrescante/cravo/mel	42

\*%Área da extração do dia zero. \*\*FM(%) da extração do dia zero.

#### 5.3.4. Comparação entre os resultados das análises para os dois tecidos em estudo

Comparando as análises cromatográficas dos dois tecidos e da mistura de óleos essenciais observou-se que dos 39 compostos identificados pela GC/MS na mistura de óleos essenciais, 22 estavam presentes na primeira análise do tecido com microcápsulas e 9 no do tecido impregnado. Dos 9 compostos identificados na amostra de tecido impregnado, 8 também estavam presentes no tecido previamente tratado e são eles: 6-metil-5-hepten-2-ona, linalol, terpinen-4-ol, timol,  $\gamma$ -terpinen-7-al, eugenol, globulol e epi-cedrol. O composto  $\alpha$ -terpineol aparece apenas na análise do tecido impregnado, porém aparece somente na primeira extração.

Comparando as análises olfatométricas dos dois tecidos e a da mistura de óleos essenciais observou-se que dos 12 compostos identificados pelos dois métodos, GC/MS e GC/O, na mistura de óleos essenciais, 6 foram identificados no tecido com microcápsulas e 5 no tecido impregnado. E desses 5 compostos da amostra de tecido impregnado, 4 também estavam presentes no tecido com as microcápsulas. A comparação da liberação desses 4 compostos identificados nos dois tecidos é apresentada na Tabela 5.13. O composto  $\gamma$ -terpinen-7-al é percebido apenas na análise do tecido impregnado.

Tabela 5.13. Comparação da liberação do aroma dos 4 compostos presentes no tecido com microcápsulas da mistura de óleos essenciais e no tecido impregnado.

Composto	FM (%)		FM (%)		FM (%)		FM (%)		FM (%)	
	0 dias		2 dias		4 dias		7 dias		10 dias	
	TMC	TI	TMC	TI	TMC	TI	TMC	TI	TMC	TI
6-metil-5-hepten-2-ona	47	47	47	39	47	39	47	39	39	27
linalol	61	58	61	58	61	58	47	47	47	47
terpinen-4-ol	64	64	55	64	43	55	27	43	27	43
eugenol	42	42	35	35	35	35	35	35	35	35

TMC = Tecido com as microcápsulas; TI = Tecido impregnado

A partir da Tabela 5.13 pode-se observar que a liberação do composto eugenol se deu da mesma maneira nos dois tecidos. Para os compostos 6-metil-5-hepten-2-ona e linalol a liberação foi semelhante. Já para o composto terpinen-4-ol a liberação de aroma a partir do dia 2 foi mais rápida no tecido com microcápsulas do que no tecido impregnado.

Em função dos resultados das análises GC/O é possível observar que o processo de impregnação proposto para a incorporação de extratos voláteis em tecidos 100% poliéster apresenta resultados semelhantes aos encontrados pelo procedimento já estabelecido que é a microencapsulação. A técnica de GC/O se mostra eficaz para avaliar o comportamento de materiais funcionais como é o caso da adição de extratos voláteis, assim como é uma ferramenta que gera resultados sobre a eficácia da introdução ou não de novas tecnologias de processamento de tecidos funcionais.

### **5.3.5. Caracterização por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM)**

Foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo um pedaço de tecido sem tratamento, um pedaço de tecido com as microcápsulas da mistura de óleos essenciais e um pedaço de tecido que passou pelo processo de impregnação à 90bar e 313K da mistura de óleos essenciais. Na Figura 5.16, são apresentados os três tecidos com aumentos de 2000X e 4000X.

A partir das imagens apresentadas na Figura 5.16 abaixo, se pode observar que o tecido sem tratamento apresenta um depósito sobre as fibras do tecido em formato de crostas e não se observa nenhuma microcápsula (Figura 5.16a e 5.16b). Já nos tecidos com microcápsulas (Figura 5.16c e 5.16d) e no tecido que passou pelo processo de impregnação à 90bar e 313K (Figura 5.16e e 5.16f) observam-se microcápsulas com alguns fragmentos do mesmo depósito do tecido sem tratamento. No tecido com microcápsulas (Figura 5.16c e 5.16d) há uma grande quantidade das mesmas. Elas se apresentam em conjuntos de microcápsulas com formato de microesferas definidas e irregulares. Algumas parecem estar com o material de núcleo preenchido e outras com aspecto de material de núcleo rompido.

Já no tecido impregnado à 90bar e 313K (Figura 5.16e e 5.16f) há uma quantidade muito menor de microcápsulas e nestes aumentos não se observam conjuntos e sim, uma microcápsula simples isolada e alguns fragmentos menores que nesses aumentos não se pode identificar o formato.

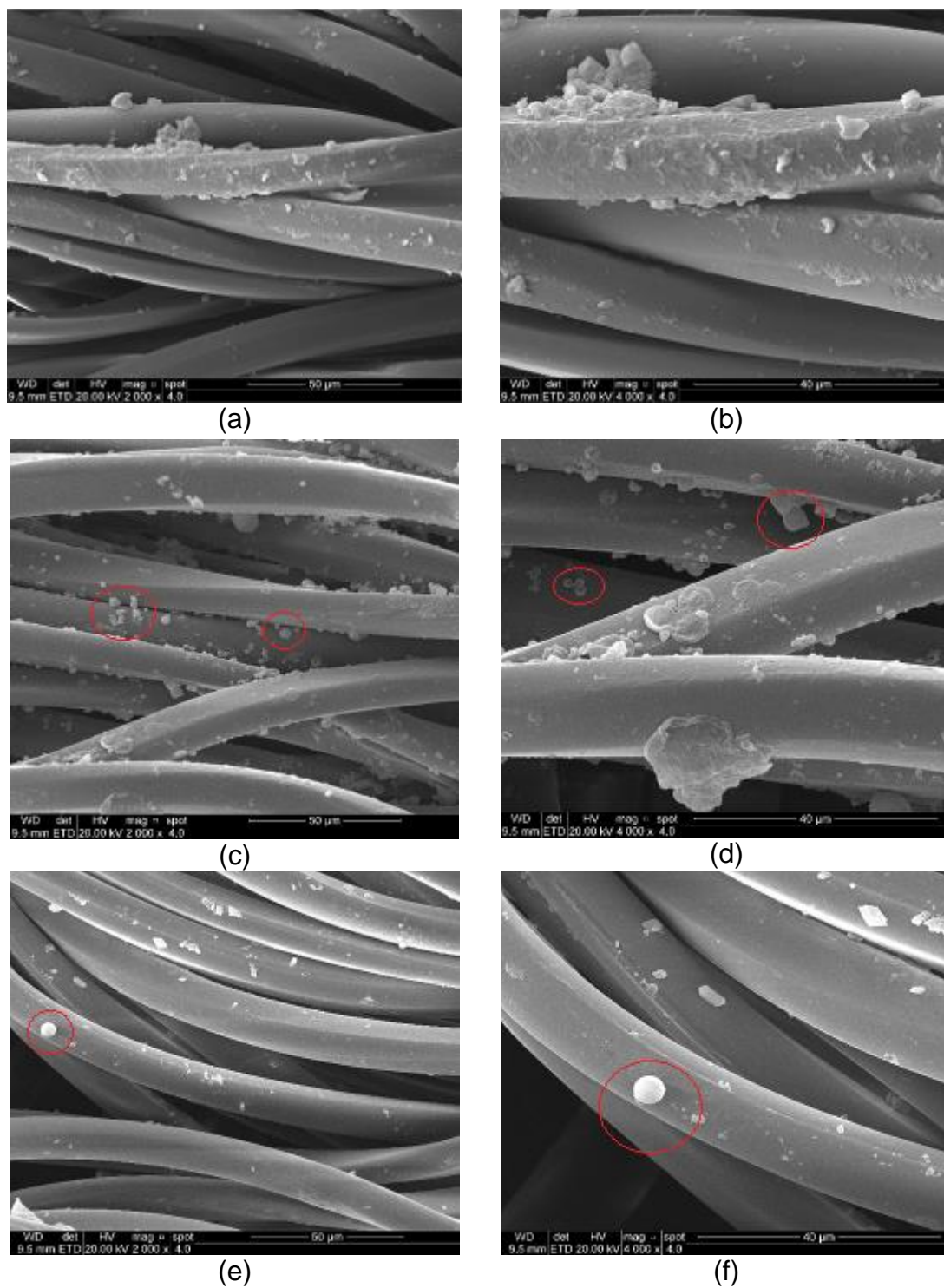


Figura 5.16. a) e b) Tecido sem tratamento, c) e d) Tecido com microcápsulas, e) e f) Tecido impregnado. Todos com os mesmos aumentos, à esquerda de 2000X e à direita de 4000X.

A fim de comparar e medir o tamanho das microcápsulas foram capturadas imagens de localizações diferentes em cada tecido. Na Figura 5.17 são apresentadas duas imagens com aumento de 4000X para o tecido com microcápsulas. Nestas imagens se pode observar que neste tecido as microcápsulas apresentam tamanhos que variam de 1,5 a 4,8 $\mu$ m.

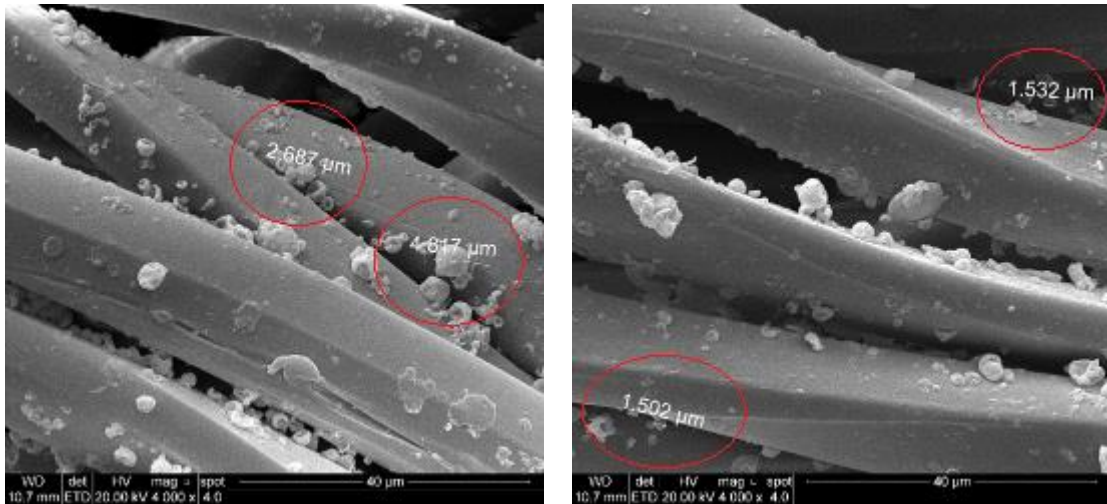


Figura 5.17. Imagens do tecido com microcápsulas com a medição das mesmas no aumento de 4000X.

Na Figura 5.18 são apresentadas quatro imagens com aumento de 4000X para o tecido impregnado à 90bar e 313K. O maior número de imagens para o tecido impregnado se deve ao fato das microcápsulas estarem isoladas e não em conjuntos como no caso do tecido previamente tratado. Nestas imagens se pode observar que no tecido impregnado as microcápsulas apresentam tamanhos que variam de 2,5 a 5,1 $\mu$ m.

No tecido impregnado foram aplicados aumentos de 120000X (Figura 5.19) para observar se existiam microcápsulas menores, já que nas Figura 5.16e e 5.16f se observaram alguns fragmentos menores onde não se podia identificar o formato. Nessas novas imagens foram encontradas algumas microcápsulas em conjuntos e algumas com tamanhos por volta dos 200nm. Segundo a literatura, Melo et al., 2010, podem ser consideradas nanocápsulas, as cápsulas que apresentarem diâmetro inferior a 1000nm.



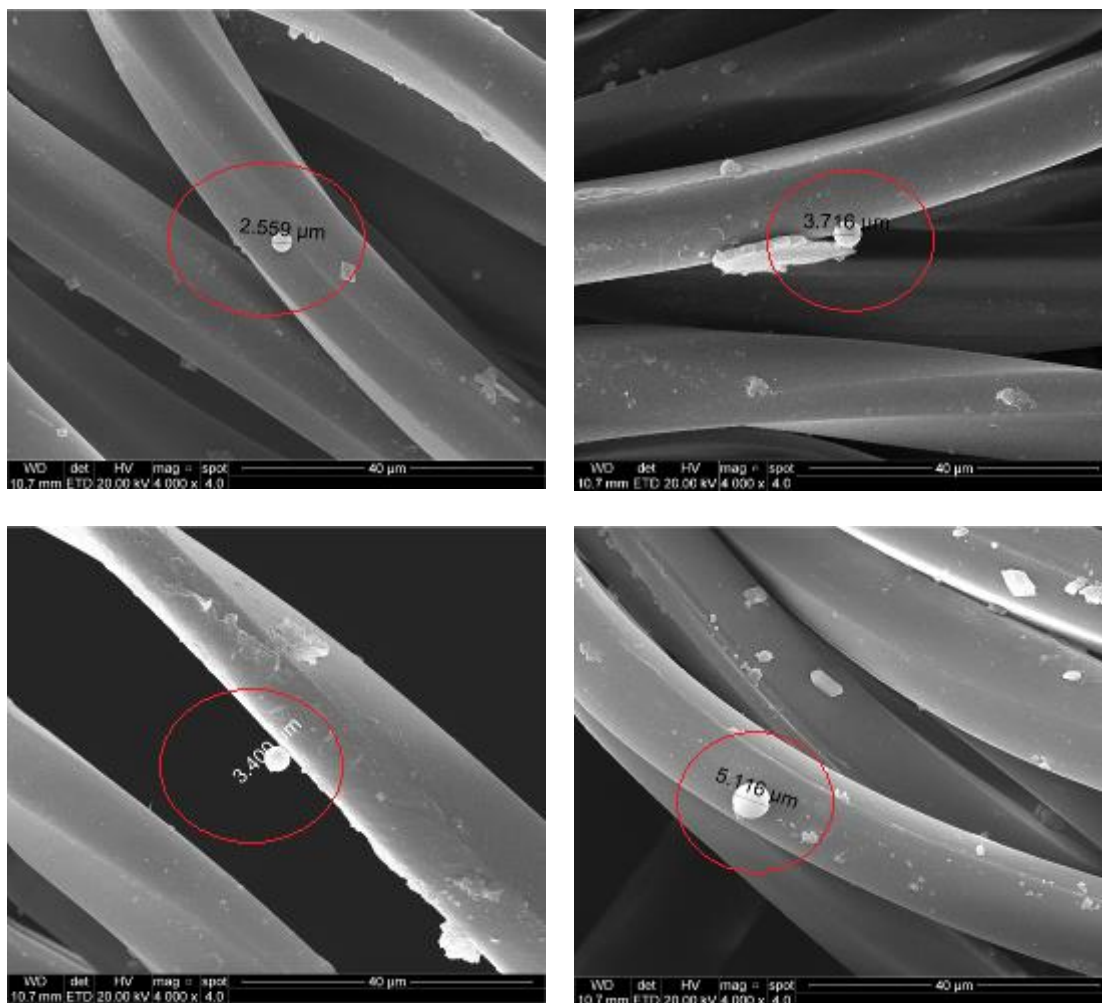


Figura 5.18. Imagens do tecido impregnado à 90bar com a medição das microcápsulas no aumento de 4000X.

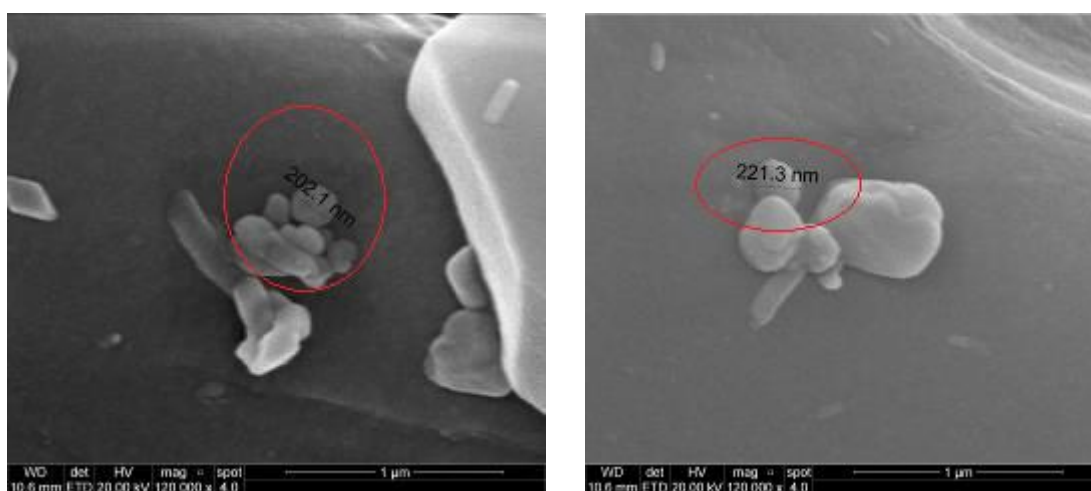


Figura 5.19. Imagens do tecido impregnado à 90bar com a medição das microcápsulas no aumento de 120000X.

Avaliando as análises de GC/O juntamente com a microscopia indicam que a quantidade da mistura de óleos incorporada é menor no tecido impregnado, mas os resultados quanto ao potencial aromático (FM) são semelhantes. Todavia, o processo de impregnação utilizado necessita passar por uma otimização, mas já se mostra eficiente para incorporar óleos essenciais à tecidos, apresentando resultados semelhantes ao processo industrial de microencapsulação já estabelecido.

## 6. CONCLUSÕES

A GC/O é uma poderosa técnica que se tornou uma ferramenta importante para a análise de aromas. Esta técnica determina a atividade relativa dos compostos como compostos individuais, portanto, a comparação dos dados sensoriais com a técnica cromatográfica deve ser realizada com certo cuidado. A partir dos resultados obtidos com diferentes matrizes é possível concluir que os compostos majoritários, determinados por GC/MS, não apresentam necessariamente as maiores frequências modificadas, isto é, os compostos de maior intensidade aromática, não correspondem aos de maiores concentrações.

A implementação e a validação da técnica olfatométrica foi realizada com sucesso. O olfatômetro construído apresenta diferenciais em relação aos existentes como o software de aquisição de dados que reduz o tempo de registro das informações minimizando erros da aquisição dos resultados. Este mostrou-se eficiente para análises de compostos voláteis obtidos a partir de diferentes matrizes, sejam elas matrizes líquidas ou matrizes sólidas. A técnica foi utilizada para matrizes que ainda não haviam sido avaliadas olfatometricamente.

A partir dos resultados obtidos com as amostras de mel, concluiu-se que a técnica de extração utilizada, SPME, mostrou-se eficiente na obtenção dos compostos voláteis de mel e a GC/O consolidou-se como técnica alternativa à melissopalínologia. Porém, ainda serão necessários estudos complementares para se estabelecer a técnica como forma de classificar méis, visto que se busca um ou mais compostos-chave que sejam capazes de identificar a origem do mel a partir da planta usada como fonte de matéria-prima.

Foi estabelecida uma metodologia utilizando a técnica de SPME onde foi possível comparar duas amostras de tecido com aromas provenientes de óleos

essenciais microencapsulados por dois métodos diferentes. A técnica olfatométrica foi validada como ferramental de análise de materiais, bem como para avaliar a liberação de aromas em tecidos. Através da técnica da GC/O foi possível avaliar a eficiência de um novo processo de incorporação de óleos essenciais, a impregnação supercrítica, sendo assim considerada uma ferramenta também de avaliação de processo.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Na continuidade deste trabalho poder-se-ia:

- A partir dos resultados para o mel, realizar um estudo complementar, buscando as matérias primas usadas para as referidas amostras de mel, extrair os compostos voláteis e desenvolver uma metodologia através da seleção de um ou mais compostos-chave que sejam capazes de identificar a origem de uma amostra de mel.
- Testar os dois tipos de tecido em calçados (em vivo) e realizar a extração dos compostos voláteis com SPME em outra escala.
- Realizar um estudo sobre os possíveis microorganismos que podem atacar o tecido e realizar testes antimicrobianos nos dois tecidos estudados.
- Testar outras condições de impregnação, tais como outras pressões e temperaturas, a fim de obter um maior número de microcápsulas ou nanocápsulas, bem como aumentar a durabilidade dos compostos voláteis com ação antimicrobiana.
- Realizar um estudo de determinação da solubilidade do óleo essencial no solvente supercrítico e predizer a melhor condição de impregnação, isto é, otimizar o processo de impregnação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACREE, T. E.; Barnard, J.; Cunningham, D. G. A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. **Food Chem.**, V. 14, p. 273-286, 1984.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4<sup>o</sup> edition. Illinois: Allure. 804p., 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA, Anexo I: RESOLUÇÃO - RDC Nº 4, de 30 janeiro de 2014.

AMANPOUR, A.; Sonmezdag, A. S.; Kelebek, H.; Selli, S. GC-MS-olfactometric characterization of the most aroma-active components in a representative aromatic extract from Iranian saffron (*Crocus sativus* L.). **Food Chemistry**, V. 182, p. 251-256, 2015.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, V. 63, n. 4, p. 549-562, 1998.

ARN, H.; Acree, T. E. Flavomet: a database of aroma compounds based on odor potency in natural products. E. T. Contis et al. (Editors). **Food Flavors: Formation, Analysis and Packaging Influences. Elsevier Science B. V.**, p. 27, 1998. Disponível em:<<http://www.flavornet.org/flavornet.html>> Acesso em: 23 de dezembro de 2015.

ARTHUR, C. L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal. Chem.**, V. 62, p. 2145-2148, 1990.

BAKNY, A. M.; Abbas, S.; Ali, B.; Majeed, H.; Abouelwafa, M. Y.; Mousa, A.; Liang, L. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p. 1-40, 2015.

BALASUBRAMANIAN, S.; Panigrahi, S. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. **Food Bioprocess Technol**, 4:1-26, 2011.

BARREIRO, E. J.; Ferreira, V. F.; Costa, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (sep): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, V. 20, n. 6, 1997.

BENCOMO, J. J. R.; Selli, S.; González, C. M.; Álvarez, P. J. M.; Bayón, M. A. P. Application of glycosidic aroma precursors to enhance the aroma and sensory profile of dealcoholised wines. **Food Research International**, V. 51, p. 450–457, 2013.

BERGER, R. G. Flavours and fragrances: Chemistry, Bioprocessing and sustainability, **Springer**, 2007.

BOH, B. Knez, E. Microencapsulation of essential oils and phase change materials for application in textile products. **Indian J. Fibre Text. Res.**, V. 31, n.1, p. 72-82, 2006.

BRAGA, M. E. M.; Pato, M. T. V.; Silva, H. S. R. C.; Ferreira, E. I.; Gil, M. H.; Duarte, C. M. M.; Sousa, H. C. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivates. **J. of Supercritical Fluids**, V. 44, p. 245-257, 2008.

BRATTOLI, M.; Gennaro, G.; Pinto, V.; Loiotile, A. D.; Lovascio, S.; Penza, M. Odour Detection Methods: Olfactometry and Chemical Sensors. **Sensors**, V. 11, p. 5290-5322, 2011.

BUTTERY, R. G.; Takeoka, G. R. Cooked Carrot Volatiles. AEDA and Odor Activity Comparisons. Identification of Linden Ether as an Important Aroma Component. **J. Agric. Food Chem.**, V. 61, p. 9063–9066, 2013.

CACHO, J.; Moncayo, L.; Palma, J. C.; Ferreira, V., Culleré, L. Comparison of the aromatic profile of three aromatic varieties of Peruvian pisco (Albilla, Muscat and Torontel) by chemical analysis and gas chromatography–olfactometry. **Wiley Online Library**, 2013, DOI 10.1002/ffj.3171.

CARVALHO, I. T.; Estevinho, B. N.; Santos, L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, p. 1-11, 2015.

CARVALHO, R. J.; Souza, G. T.; Honório, V. G.; Sousa, J. P.; Conceição, M. L.; Maganani, M.; Souza, E. L. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v. 52 p. 59-65, 2015.

CASSEL, E.; Vargas, R. M. F. Experiments and modelling of the *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. **J. Mex. Soc.**, V. 55, p. 57-60, 2006.

CHENG, S. Y.; Yuen, C. W. M.; Kan, C. W.; Cheuk, K. K. L. Development of cosmetic textiles using microencapsulation technology. **RJTA**, V. 12, n. 4, p. 41-51, 2008.

CITEVE. Têxteis funcionais. Citeve: Nova Famalicão: 2008.

COSTA, A. F. Farmacognosia. 5. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, V. 1, p. 1031, 1994.

CUEVAS-GLORY, L. F.; Pino, J. A.; Santiago, L. S.; Sauri-Duch, E. A review of



volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1032-1043, 2007.

CUEVAS-GLORY, L.F.; Ortis-Várquez, E.; Centurión-Yah, A.; Alea, J.A.P.; Sauri-Duch, E. Solid-phase micro extraction method development for headspace analysis of volatile compounds in honeys from Yucatan. **Téc. Pecu. Méx.** V. 46, 387–395, 2008.

CULLERÉ, L.; Ferreira, V.; Venturini, M. E.; Marco, P.; Blanco, D. Potential aromatic compounds as markers to differentiate between *Tuber melanosporum* and *Tuber indicum* truffles. **Food Chemistry**, V. 141, p. 105–110, 2013.

DEDAVID, B. A.; Gomes, C. I.; Machado, G. Microscopia eletrônica de varredura: Aplicação e preparação de amostras: Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2007. 60p.

DELAHUNTY, C. M.; Eyres, G.; Dufour, J. P. Gas chromatography-olfactometry: Review. **J. Sep. Sci.**, V. 29, p. 2107-2125, 2006.

DÓREA, H. S.; Gaujac, A.; Navickiene, S. Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos. **Scientia Plena**. V. 4, n. 7, 2008.

DRAVNIEKS, A. **Atlas of odor character profiles**, data series DS 61. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 1985.

DU, X.; Song, M.; Baldwin, E.; Rouseff, R. Identification of sulphur volatiles and GC-olfactometry aroma profiling in two fresh tomato cultivars. **Food Chemistry**, V. 171, p. 306-314, 2015.

DUSSORT, P.; Deprêtre, N.; Bou-Maroun, E.; Fant, C.; Guichard, E.; Brunerie, P.; Le Fur, Y.; Le Quéré, J.-L. An original approach for gas chromatography-olfactometry detection frequency analysis: Application to Gin. **Food Research International**, V. 49, p. 253-262, 2012.

EL ASBAHANI, A.; Miladi, K.; Badri, W.; Sala, M.; Ait Addi, E. H.; Casabianca, H.; El Mousadik, A.; Hartmann, D.; Jilale, A.; Renaud, F. N. R.; Elaissari, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, V. 483, p. 220-243, 2015.

ETTIÉVANT, P. X.; Callement, G.; Langlois, D.; Issnchou, S. Coquibus, N. Odor intensity evaluation in gas chromatography-olfactometry by Finger Span method. *J. Agric. Food Chem.*, V. 47, p.1673-1680, 1999.

FACUNDO, H. V. V. **Mudanças no perfil sensorial e de voláteis do suco de abacaxi concentrado durante o processamento.** Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

FOOD INGREDIENTS BRASIL (SÃO PAULO). Os aromas. **Dossiê aromas**, São Paulo, v. 99, n. 8, p. 40-68, 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/99.pdf>. Acesso em: 28 de abril de 2015.

FRIEDRICH, J. E.; Acree, T. E.; Lavin, E. H. Selecting standards for gas chromatography-olfactometry. **ACS Symp. Ser.**, V. 782, p. 148-155, 2001.

FULLER, G. H.; Tisserand, G. A., Steltenk, R. Gas chromatograph with human sensor – perfumer model. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 116, p. 711-714, 1964.

GERRETZEN, J.; Buydens, L. M. C.; Tromp-van den Beukel, A. O.; Koussissi, E.; Brouwer, E. R.; Jansen, J. J.; Szymanska, E. A novel approach for analyzing gas chromatography-mas spectrometry/olfactometry data. **Chem. And Intel. Lab. Syst.** V. 146, p. 290-296, 2015.

GIROTRA, P.; Singh, S. K.; Nagpal, K. Supercritical fluid technology: a promising approach in pharmaceutical research. **Pharmaceutical Development and Technology**, V. 18 (1), p. 22-38, 2013.

GOES, T. C.; Antunes, F. D.; Alves, P. B.; Silva, F. T. Effect of Sweet Orange Aroma on Experimental Anxiety in Humans. **The journal of alternative and complementary medicine**, v. 18 (8), p. 798–804, 2012.

GONÇALVES, A.; Guazzelli, M. J.; Castro, I. R.; Cavazzola, E. T.; Soares, R. A. **Agrofloresta e óleos essenciais [recurso eletrônico]**. Centro Ecológico - Assessoria e Formação em Agricultura Ecológica. Ipê Serra, litoral norte. Acesso: <http://www.centroecologico.org.br/cartilhas.php>, 2014.

GOODNER, K.; Rouseff, R. In: Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials. Gas Chromatography/Olfactometry - GC/O. **Wiley**, p. 69-90, 2011.

GOSTELOW, P.; Parsons, S. A.; Stuetz, R.M. Odour measurements for sewage treatment works. **Wat. Research**, V. 35, n.03, p. 579-597, 2001.

GROSCH, W. Review. Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). **Flavour Fragrance**, 9, p. 147-158, 1994.

GROSCH, W. Key odorants of food identified by aroma analysis. In: Ziegler, H.; editor. *Flavourings*. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim, Germany: **Wiley-VCH**, 2007.

GUIMARÃES, L. G. D. L., Cardoso, M. D. G., Zacaroni, L. M., Lima, R. K. D., Pimentel, F. A., & Morais, A. R. D. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Quim Nova**, 31, 1476-1480, 2008.

GUPTA, C.; Prakash, D.; Gupta, S. A biotechnological approach to microbial based perfumes and flavours. **Journal of Microbiol. Exp.**, 2 (1), 2015.

GÜRBÜZ, O.; Rouseff, J.; Talcott, S. T.; Rouseff, R. Identification of Muscadine Wine Sulfur Volatiles: Pectinase versus Skin-Contact Maceration. **J. Agric. Food Chem.**, V. 61, p. 532–539, 2013.

HANAOKA, K.; Sieffermann, J. M.; Giampaoli, P. Effects of the sniffing port air makeup in gas chromatography-olfactometry. **J. Agric. Food Chem.**, V. 48, p. 2368-2371, 2000.

<http://www.esensing.net/en/product/show.asp?id=351&parentid=1&classid=1>; Acesso em: 23 de dezembro de 2015.

[http://www.gerstelus.com/products\\_subcat.php?id=9](http://www.gerstelus.com/products_subcat.php?id=9); Acesso em: 23 de dezembro de 2015.

<http://www.sge.com/products/gc-accessories/olfactory-dectector-outlet-odo-ii>; Acesso em: 23 de dezembro de 2015.

<http://www.thegoodscentscopy.com>; Acesso em: 23 de dezembro de 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (SÃO PAULO). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - Versão digital. São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008.

JELLEN, H. H.; Majcher, M.; Dziadas, M. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. **Anal. Chi. Acta.**, V. 738, p. 13-26, 2012.

JENNING, W.; Shibamoto, T. Qualitative analysis of fragrance volatiles by grass capillary gas chromatography. **Academic Press**: New York, 1980.

KATAOKA, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography**, V. 880, p. 35-62, 2000.

KESEN, S.; Kelebek, H.; Senc, K.; Ulas, M.; Selli, S. GC–MS–olfactometric characterization of the key aroma compounds in Turkish olive oils by application of the aroma extract dilution. **Food Research International**, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.005>.

KRAUJALYTĖ, V.; Leitner, E.; Venskutonis, P. R. Characterization of Aronia melanocarpa Volatiles by Headspace-Solid-Phase Microextraction (HS-SPME), Simultaneous Distillation/Extraction (SDE), and Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) Methods. **J. Agric. Food Chem.**, V. 61, p. 4728–4736, 2013.

LINSSEN, J. P. H.; JANSSENS, G. M.; ROOZEN, J. P.; POSTHUMUS, M. A. Combined gas chromatography and sniffing pot analysis of volatile compounds of mineral water packed in polyethylene laminated packages. **Food Chem.**, v. 46, p.367-371, 1993.

MACHIELS, D.; Van Ruth, S. M.; Posthumus, M. A.; Istasse, L. Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. **Elsevier**. *Talanta*, V. 60, p. 755-764, 2003.

MANYI-LOH, C. E.; Ndip, R. N.; Clarke, A. M. Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. **Int. J. Sci.** V. 12, p. 9514-9532, 2011.

MARISCAL-LUCERO, S. R.; Castro, M. R.; Monsalvo, V. S.; Honorato-Salazar, J. A. Evaluación de fenoles y limonoides en hojas de Cedrela odorata (Meliaceae) de una plantación experimental establecida en Tezonapa Veracruz, México. **Rev. Biol. Trop.** (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744), v.63(2), p. 545-558, 2015.

MASTELLO, R. B.; Capobiango, M.; Chin, S. T.; Monteiro, M.; Marriott, P. J. Identification of odour-active compounds of pasteurised orange juice using multidimensional gas chromatography techniques. **Food Research International**, V. 75, p. 281-288, 2015.

MCDANIEL, M. R.; Miranda-Lopez, R.; Watson, B.T.; Micheals, N.J.; Libbey, L.M. Pinot Noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach. In: Flavors and offflavors. Charalambous, G. (Ed.); **Elsevier Science Publishers**: Amsterdam, p.23-36, 1990.

MCMMASTER, C.; McMaster, M. **GC/MS: A Pratical User's Guide**. WILEY-VCH, EUA, 1998.

MCNAIR, H. M.; Miller, J.M. **Basic gas chromatography**. 2<sup>o</sup> edição. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 239p., 2009.

MEILGAARD, M.; Civille, G. V.; Carr, B. T. Sensory evaluation techniques. 2. ed. Florida – **USA: CRC Press**, p. 354, 1991.

MELO, N. F. S., Grillo, R., Rosa, A. H., Fraceto, L. F., Filho, N. L. D., Paula, E., Araújo, D. R. Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas de Poli (L-Lactídeo) Contendo Benzocaína. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 1, p. 65-69, 2010.

MINTEGUIAGA, M.; Umpiérrez, N.; Fariña, L.; Falcão, M. A.; Xavier, V. B.; Cassel, E.; Dellacassa, E. Impact of gas chromatography and mass spectrometry combined with gas chromatography and olfactometry for the sex differentiation of *Baccharis articulata* by the analysis of volatile compounds. *J. Sep. Sci.* V. 38, n. 17, p. 3038-3046, 2015.

MIYAZAWA, T. M. **Compostos voláteis da Uvaia (*Eugenia pyriformis cambess*)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Alimentos e Nutrição. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, São Paulo, 2009.

MUÑOZ, L. A. Aplicación de la cromatografía de gases-olfactometría em la caracterización del aroma del vinagre de vino, de los pistachos y del aceite de oliva. Tese de Doutorado. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Universitat Rovira-Virgili. Terragona, 2011.

NOVACOSK, Rodrigo; Torres, R. S. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus irginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, v. 21, p. 36-39, 2006.

ORLANDO, R. M.; Cordeiro, D. D.; Mathias, A. E. B.; Rezende, K. R.; Gil, E. S. Pré-Tratamento de Amostras. **Vita et Sanitas**, Trindade/Go, n. 03, p. 122-139, 2009.

PINO, J. A.; Febles, Y. Odour-active compounds in banana fruit cv. Giant Cavendish. **Food Chemistry**. V. 141, p. 795–801, 2013.

PLUTOWSKA, B.; Wardencki, W. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. **Food Chemistry**, V. 107, p. 449-463, 2008.

POLLIEN, P.; FAY, L.B.; BAUMGARTNER, M.; CHAINTREAU, A. First attempt of odorant quantitation using gas chromatography-olfactometry. **Anal. Chem.**,v.71, n.23, p.5391-5397, 1997.

PONTES, S. F. O. **Desenvolvimento de nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas em filme de metilcelulose para uso em alimentos**. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. Brasil. Minas Gerais, 2013.

PRAT, L.; Espinoza, M. I.; Agosin, E.; Silva, H. Identification of volatile compounds associated with the aroma of white strawberries (*Fragaria chiloensis*). **J Sci Food Agric** (2013), DOI 10.1002/jsfa.6412.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada. UNESP. Brasil. São Paulo, Botucatu, 2012.

ROWE, D. J. Chemistry and Technology of Flavours and Fragrances. CRC Press, Boca Raton, FL, 336 p., 2005.

RICHARDSON, A. The Chemistry of Fragrances; In Pybus D.H.; Sell C.S. Eds.; **The Royal Society of Chemistry**: Cambridge, 8, p. 145-157, 1999.

RUBIOLO, P.; Sgornibi, B.; Liberto, E.; Cordero, C.; Bicchi, C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis: A review. **Flavour and Fragrance Journal**, V. 25, n. 5, p. 282-290, 2010.

SANTO, A. T. E.; Xavier, V. B.; Lucas, A. M.; Vargas, R.M.F.; Cassel, E. **Extração do óleo essencial de espécies de Baccharis nativas do sul do Brasil: Análise olfatométrica e modelagem matemática**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis: UFSC, 2014.

SERAFINI, L. A.; Santos, A. C. A. dos; Touguinha, L. A.; Agostini, G.; Dalfovo, V. Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. **Coleção Biotecnologia**. EDUCS, Caxias do Sul, 2002.

SCHIEBERLE, P.; Grosch, W. Evaluation of the flavor of wheat and rye. **Z. Lebensm.-Unters. Forsch**, V. 184, p. 111-113, 1987.

SIMÕES, C. M. O.; Spitzer, V. Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O. et. al. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, p. 387-415, 2000.

SORIA, A. C.; Castro, I. M.; Sanz, J. Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 793-801, 2003.

STRABER, S.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in roasted duck liver by means of aroma extract dilution analysis: comparison with beef and pork livers. **Eur Food Res Technol**, 2013, DOI 10.1007/s00217-013-2095-6.



TEIXEIRA, M. A.; Rodríguez, O.; Gomes, P.; Mata, V.; Rodrigues, A. E. *Perfume Engineering – Design, Performance and Classification*. Elsevier, 2013.

TUREK, C; Stintzing, F. C. Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, V. 12, p. 40-53, 2013.

ULLTICH, F.; Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavor compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch*, V. 184, p. 277-282.

VAN BAREN, C. M. **Composición química y actividades biológicas de una especie aromática y medicinal de la estepa patagónica con potencial interés industrial: *Mulinum spinosum* (Cav.) Persoon**. Tese de doutorado em Farmácia e Bioquímica. Cátedra de Farmacognosia. Universidade de Buenos Aires. Buenos Aires, 2008.

VAN RUTH, S. M. Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomolecular Engineering*, V. 17, I. 4-5, p. 121-128, 2001.

VARONA, S.; Rodríguez-Rojo, S.; Martín, A.; Cocero, M. J.; Duarte, C. M. M. Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch. *J. of Supercritical Fluids*, V. 58, p. 313-319, 2011.

VAS, G.; Vékey, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of mass spectrometry*, V. 39, p. 233-254, 2004.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características do Mel**. Espírito Santo. Boletim Técnico. Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, 8p., 2007.

VITTI, A. M. S.; Brito, J. O. Óleo essencial de eucalipto. Documentos florestais. Nº17, p. 1-26, 2003.

VONCINA, B.; Kreft, O.; Kokol, V.; Chen, W. T. Encapsulation of rosemary oil in ethylcellulose microcapsules. **Text. Polym. J.**, V. 1, p. 13-19, 2009.

WARDENCKI, W.; Chmiel, T.; Dymerski, T.; Biernacka, P.; Plutowska, B. Application of gas chromatography, mass spectrometry and olfactometry for quality assessment of selected food products. **Ecological Chemistry and Engineering**, V. 16, No. 3, p. 287-299, 2009.

WEBBEE. Disponível em: <http://www.webbee.org.br/pesquisa/melissopalino.htm> 10/11/2014. Acesso em: 23 de dezembro de 2015.

WITTER, S.; Silva, P. N.; Blochtein, B.; Lisboa, B. B.; Imperatriz-Fonseca, V. L. **As abelhas e a agricultura [recurso eletrônico]**. Dados eletrônicos: EDIPUCRS, 143 p. Modo de Acesso: ISBN 978-85-397-0658-7, 2014.

XAVIER, V. B. **Investigação sobre compostos voláteis de espécies de *Baccharis* nativas do Rio Grande do Sul**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil. Porto Alegre, 2011.

XAVIER, V. B.; Vargas, R. M. F.; Minteguiaga, M.; Umpiérrez, N.; Dellacassa, E.; Cassel, E. Evaluation of the key odorants of *Baccharis anomala* DC essential oil: New applications for known products. **Industrial Crops and Products**. V. 49, p. 492-496, 2013.

YAN, J.; Liu, X. B.; Zhu, W. W.; Zhong, X.; Sun, Q.; Liang, Y. Z. Retention indices for identification of aroma compounds by GC: Development and application of a retention index database. **Chromatographia**, V. 78, p. 89-108, 2015.

YANG, C.; Wang, J.; Li, D. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. **Anal. Chi. Acta.**, V. 799, p. 8-22, 2013.

ZELLNER, B. d'A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. **Journal of Chromatography A**, V. 1186, p. 123-143, 2008.

## **ANEXOS**

# Anexo 1 – Industrial Crops and Products

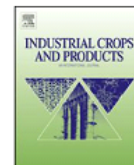
Industrial Crops and Products 49 (2013) 492–496



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)



## Evaluation of the key odorants of *Baccharis anomala* DC essential oil: New applications for known products



Vanessa Barbieri Xavier<sup>a</sup>, Rubem Mário Figueiró Vargas<sup>a</sup>, Manuel Minteguiga<sup>b</sup>,  
Noelia Umpiérrez<sup>b</sup>, Eduardo Dellacassa<sup>b,?</sup>, Eduardo Cassel<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Engineering, PUCRS, Av. Ipiranga, 6681 Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

article info

### Article history:

Received 4 January 2013

Received in revised form 6 May 2013

Accepted 7 May 2013

### Keywords:

*Baccharis anomala* DC essential oil  
Olfactometry

abstract

The essential oil profile of *Baccharis anomala* DC was examined. Samples were collected from in the Pró-Mata area (São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul State, Brazil), and GC–MS data and retention indices were used to identify 58 oil components. –Selinene (40.8%), caryophyllene oxide (9.9%) and spathulenol (6.8%) were the major constituents of the steam-distilled oil. The olfactive profile of the *B. anomala* oil was described as: sweet, resinous and woody. When the oil was evaluated by gas chromatography–olfactometry (GC–O), the study revealed that the oil has a complex aroma profile formed by 34 odorants with modified frequency above 40, 31 of which could be identified. In this way, the odor, was objectively established for this species.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The isolation and identification of new plant metabolites have constituted essential steps toward obtaining new industrial products. In this context, several species of the genus *Baccharis* spp. have been object of research because of their growing importance as a source of new active ingredients with different applications (Frizzo et al., 2001). *Baccharis* species have also been used in traditional medicine to treat wounds, ulcers, fever, gastrointestinal diseases such as spasmolytic, diuretic, analgesic, in diabetes, anti-inflammatory (Herz et al., 1977; Loayza et al., 1995; Abad et al., 2006; Budel and Duarte, 2008), in the treatment of bacterial and fungal infections as an antiseptic and healing agent for external use (Abad and Bermejo, 2007), antimicrobial (Oliveira et al., 2007; Simionatto et al., 2008) and antioxidant activity (Oliveira et al., 2003). Moreover, some species have also applications in perfumery and cosmetics industry (Queiroga et al., 1990) and have pharmacological properties (Verdi et al., 2005).

*Baccharis anomala* DC, known as uva-do-mato (Alice et al., 1985) and cambará-de-cipó (Barroso and Bueno, 2002), can be found growing wild from São Paulo to Rio Grande do Sul arriving to Argentina, Uruguay and Paraguay. Previous phytochemical studies have demonstrated the presence of essential oil (Barbieri Xavier, 2011; Barbieri Xavier et al., 2011) saponins and tannins (Alice

et al., 1985) in the extracts of this plant, which showed antioxidant, antimutagenic and anticancer activities (Kada et al., 1985).

Actually, essential oils and some of their components are used in various products such as cosmetics, household cleaning products and air fresheners, hygiene products as well as in aromatherapy and other para-medical practices (Hajhashemi et al., 2003; Perry et al., 2003; Silva et al., 2003).

There are various reasons why there is continuing interest in determining what gives an essential oil its characteristic odor. This has given rise to the development of various analytical methods to determine the 'key olfactory components' or 'character-impact' compounds in essential oils (Le Berre et al., 2008; San-Juan et al., 2010). Each different approach addresses a slightly different question and produces a subtly different answer. There can be no simple generalization about the key odorants in essential oils; the odor of some essential oils is due to a large amount of a single compound, while trace components are crucial to the odor of others, and in most cases the true odor is the manifestation of a complex mixture of compounds.

The main aim in discovering what gives essential oils their characteristic odor is usually the need to produce an olfactorily acceptable alternative. This could be a fully formulated odor match, perhaps avoiding the use of certain undesirable components, or it could be a single chemical that can be used to imitate the odor of the oil (Meilgaard et al., 1991; Richardson, 1999). The principal analytical technique used in the determination of odorants in essential oils is gas chromatography–olfactometry (GC–O), where a sniff port is combined with other specific detector by means of

<sup>?</sup> Corresponding author. Tel.: +598 2924 4068; fax: +598 2924 1906. E-mail address: [edellac@fq.edu.uy](mailto:edellac@fq.edu.uy) (E. Dellacassa).

a splitting device to identify or characterize the analytes on the same system. Several techniques to assess the comparative importance of the odors have been developed, one of them involving both intensity and frequency of detection, normalized to % scale by the formula of Dravnieks (1985) was used in this work.

In the last years, our group has worked extensively on the essential oil composition of different *Baccharis* species, searching for biological activities and, most of all, intending to find new and less usual applications for the oils (Loayza et al., 1993; Cassel et al., 2000; Frizzo, 2001; Frizzo et al., 2008; Dávila et al., 2008). But as far as we know, the importance of the oil components (their odor and aroma threshold) has been almost ignored for these species. It is the case of *B. anomala* whose essential oil was described by Budel et al. (2012), who studied the secretory elements related to the oil production, of this and other *Baccharis* species, presenting a brief description of its chemical composition (74.4% of components were identified). In this context, the aim of this study was extraction of essential oils from *B. anomala* DC collected in the Pro Mata, Research Station (University PUCRS, Porto Alegre, Brazil), characterization of their components by gas chromatography, and correlation of the components present in the essential oil with their odor description by GC-FID/O.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and essential oil extraction

*B. anomala* leaves and twigs were collected in the Pró-Mata area (São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul State at 29°29' S latitude; 50°11' W longitude and 950 m altitude in January of 2011 (flowering stage). The sample was representative of the species and its geographic area of distribution. All individual plants were chosen in order to be representative of the same pedoclimatic and collection conditions, and extraction conditions were identical for all samples. Hence, the influence of environmental and technical parameters on the chemical composition of the essential oil was avoided. Voucher specimens of the plants were identified and deposited at the Herbarium of the Science and Technology Museum of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MPUC 3354). The oil was obtained by hydrodistillation at atmospheric pressure using a steam distillation laboratory equipment (Cassel et al., 2009). The isolation procedure was continued until the material was exhausted (2 h), the oil was dried with anhydrous sodium sulphate and kept in a sealed flask at -12 °C until the analysis. The experiments were performed in triplicate.

### 2.2. GC/MS analysis

The GC/MS analyses were performed on an Agilent 5975C MS system coupled with the gas chromatograph HP 6890 equipped with reference libraries (McLafferty and Stauffer, 1991; Adams, 2007), using two capillary columns. The first was a HP-5MS (Agilent, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, USA) cross-linked fused-silica capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.), coated with 5% phenylpolymethylsiloxane (0.25 m phase thickness); column temperature, 60 °C (8 min), rising to 180 °C at 3 °C/min, then to 250 °C at 20 °C/min, 250 °C (10 min). Injector temperature, 250 °C; injection mode, split; split ratio, 1:55; volume injected, 0.2 l of the oil. Helium was used as the carrier gas, at 122.2 kPa (51.6 cm/s); interface temperature, 250 °C; acquisition mass range, 40–400; ionization energy, 70 eV. The second column was a HP-INNOWax (Agilent, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, USA) bonded fused-silica capillary column (25 m × 0.25 mm i.d.), coated with polyethylene glycol (0.25 m phase thickness). The experimental conditions were the same than above.

### 2.3. Identification and quantification

The components of the essential oil were identified by comparison of their linear retention indices (LRIs) on the two columns, determined in relation to a homologous series of n-alkanes, with those from pure standards or reported in literature. Comparison of fragmentation patterns in the mass spectra with those stored on databases (Jennings and Shibamoto, 1980; Adams, 2007) and MS data of our collection was also performed. The quantification of the components was performed on the basis of their GC peak areas on HP-5MS, which were obtained without corrections for response factors. Repeatability of the measuring system showed coefficients of variation under 5% for all the components reported in Table 1.

### 2.4. Gas chromatography–olfactometry

Sniffings were carried out on a Shimadzu GC-14B coupled to the Phaser Sniffing Port ODO-1 (SGE, Ringwood, Australia). The transfer line, kept under constant temperature of 250 °C, terminates in an ergonomic glass nose cone. An auxiliary gas (Nitrogen) flow of 5 ml/min was maintained constantly during analyses. The system was equipped with a humidifying device, which reduced nasal mucosa dehydration. Data were collected by GC EZ Chrom software (Shimadzu).

Analyses were performed on a HP-INNOWax (SGE, Australia) column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 m phase thickness) and the system was operated under programmed temperature conditions: 40 °C for 5 minutes, 40–100 °C at 4 °C/min, 100–136 °C at 6 °C/min, 136–220 °C at 3 °C/min, 220 °C (10 min). The GC-14B was equipped with a split/splitless injector (250 °C); injection volume, 0.4 L, in splitless mode injection (1 min sampling time); carrier gas, nitrogen (1 mL/min); detector, FID (250 °C). To prevent condensation of high-boiling compounds on the sniffing port, this was heated sequentially using a laboratory-made rheostat. A panel of eight judges, six women and two men, carried out the sniffings of the oils. Sniffing time was approximately 30 min and each judge carried out one session per day. The panelists were asked to rate the intensity of the eluted odor using a 4-point category scale (0 = not detected; 1 = weak, hardly recognizable odor; 2 = clear but not intense odor, 3 = intense odor), half values being allowed (Escudero et al., 2007). The GC–O analyses, executed in triplicate, were performed by eight assessors, presenting no anosmias, with long-time experience in olfactometry. The quantitative ability of this technique has been already proved (Ferreira et al., 2003). The data processed were a mixture of intensity and frequency of detection (labeled as “modified frequency”, MF), which was calculated with the formula proposed by Dravnieks (1985):

$$MF (\%) = \frac{F (\%) \times I (\%)}{I (\%)}$$

where F (%) is the detection frequency of an aromatic attribute expressed as percentage and I (%) is the average intensity expressed as percentage of the maximum intensity.

The odorants were identified by comparison of their odors, chromatographic retention index in both HP-INNOWax and HP-5 columns, and MS spectra with those of pure reference compounds.

### 2.5. Identification and quantification of oil components

The components of the oil were identified by comparison of their linear retention indices (LRIs) on the two columns (determined in relation to an homologous series of n-alkanes) with those of pure standards or as reported in the literature. Comparison of fragmentation patterns in the MS with those stored on the GC-MS databases (McLafferty and Stauffer, 1991; Adams, 2007) was also performed. The percentages of each component were reported as

**Table 1**  
Percentage composition of essential oil of *B. anomala* extracted by steam distillation of plants collected in January 2011.

Compound <sup>a</sup>	LRI <sup>b</sup>		‰ <sup>c</sup>
	HP-5MS	HP-INNOWax	
-Thujene	922	–	0.1
-Pinene	928	1023	1.2
Sabinene	970	1121	2.7
-Pinene	972	1110	3.3
Myrcene	990	1178	0.3
-Terpinene	1013	1177	0.2
p-Cymene	1021	1270	0.2
Limonene	1027	1200	1.3
-Terpinene	1057	1245	0.4
Terpinolene	1084	1281	0.1
Linalool	1094	1482	0.1
Trans-sabinene hydrate	1098	1469	0.3
Perillene	1102	1344	0.3
Trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol	1117	–	0.1
-Campholenal	1122	1488	0.1
Trans-pinocarveol	1134	1624	0.6
Nopinone	1136	1571	0.1
Trans-sabinol	1140	–	0.2
Pinocarvone	1157	1562	0.8
Sabina ketone	1158	1636	0.1
Terpinen-4-ol	1173	1604	0.8
Cryptone	1181	1665	1.1
Myrtenol	1191	1809	0.5
Safanal	1192	1657	0.5
Verbenone	1204	1793	0.1
Trans-carveol	1215	1819	0.2
Cis-carveol	1229	1844	0.3
Cuminaldehyde	1235	–	0.6
Carvone	1239	1733	0.2
Perilla aldehyde	1269	–	0.3
-Terpinen-7-al	1279	1800	0.1
-Copaene	1373	1483	0.2
-Cubebene	1386	1538	0.9
-Elemene	1390	1595	1.1
2-Epi- $\gamma$ -funebrene	1410	–	1.5
-Caryophyllene	1415	1589	3.2
-Trans-bergamotene	1430	1582	0.1
-Humulene	1450	1662	2.0
(E)- $\gamma$ -Famesene	1456	–	0.3
-Acordiene	1469	1671	0.4
-Muurolene	1476	–	0.3
Germacrene D	1482	1699	0.1
-Selinene	1486	1719	40.8
Bicyclogermacrene	1498	1728	1.5
-Muurolene	1503	1723	0.5
Trans- $\gamma$ -guaiane	1506	–	0.2
-Cadinene	1511	–	0.3
-Cadinene	1517	–	0.1
Hedycaryol	1545	–	0.7
Germacrene B	1556	–	0.2
Spathulenol	1574	2129	6.8
-Caryophyllene oxide	1578	1982	9.9
Globulol	1592	–	0.3
Humulene epoxide II	1611	–	3.5
1-Epi-cubanol	1628	–	0.2
-Eudesmol	1644	–	1.1
-Cadinol	1656	–	0.8
Cadalene	1672	–	0.5
Total identified			95.3
<b>Grouped compounds</b>			
Monoterpene hydrocarbons			9.8
Oxygenated monoterpenes			7.9
Sesquiterpene hydrocarbons			55.1
Oxygenated sesquiterpenes			22.5

<sup>a</sup> The identification of peaks is based on comparison between the experimental Linear Retention Index (LRI) data with those from literature (Jennings and Shibamoto, 1980; Adams, 2007) in two chromatographic columns with that of pure standards and mass spectra (MS) to the literature (Adams, 2007).

<sup>b</sup> The components are reported according to their order of elution on HP-5.

<sup>c</sup> The values correspond to relative proportions of the constituents of essential oils that were expressed as percentages obtained by normalizing the peak area.

raw percentages without standardization. Repeatability of the measuring system showed variation coefficients under 5% for all the components reported in Table 1.

## 2.6. Olfactive evaluation

Twelve assessors from the wine sensory panel of the Facultad de Química-UdelaR (Montevideo, Uruguay), who had had no previous experience in essential oils evaluation, were invited to perform a descriptive analysis of the *B. anomala* essential oil using a hedonic scale to determine its olfactive profile.

## 3. Results and discussion

The *B. anomala* leaves and twigs yielded 0.05% (v/w) of oil by the extraction method employed over air dried material. The results obtained in the analysis of the essential oil from the leaves and twigs of *B. anomala* are reported in Table 1. In total, 58 constituents were

identified representing 94.3% of the total compositions. Sesquiterpene were the main group of compounds (77.6%); in particular, -selinene (40.8%), caryophyllene oxide (9.9%) and spathulenol (6.8%) were the major constituents.

The results should be comparable with those obtained by Budel et al. (2012), but only few components coincide in both studies. The number and proportion of *B. anomala* oil components are almost entirely different, suggesting the need of consider, and explore, ecological factors which could explain the differences found for both close *B. anomala* geographical origins. However, chemical variations, but smaller, are also evident when present results are compared with those previous found by (Barbieri Xavier, 2011; Barbieri Xavier et al., 2011), provoking a possible paradoxical situation. But, as chemical variation related to phenological and environmental factors is frequently encountered in aromatic plants (Palá-Paúl et al., 2001) further studies are needed to see if the changes of chemical composition in the studied oils of *B. anomala* are on the account of different environmental conditions of both localities or the chemotypes are genetically fixed.

In order to investigate if the oil of *B. anomala* could be considered a source of aromatic active molecules, we included suitable assays to evaluate olfactometry activity. In general, the analysis of volatile components is usually conducted by using gas chromatography (GC) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The GC–MS technique allows to analyze more components qualitatively and quantitatively, and the determination is performed through the direct similarity searches in a MS database. However, for the valorization of new aroma sources, it is extremely necessary to decide about the contribution of the individual components to the aromatic profile of the essential oils. GC–O is an extremely useful method of evaluating aroma components with a very low threshold that cannot easily be detected by GC and GC–MS but that contribute significantly to the overall aroma of the sample. By GC–O the compound is presented pure and free of trace contaminants, provided that there are no co-elutions, but only for a short period of time and at varying concentration across the peak (San-Juan et al., 2010).

In order to determine the olfactive profile of the *B. anomala* oil it was subjected to a smell test by twelve assessors from the sensory panel of the Faculty of Chemistry (UdelaR), who had had no previous experience in essential oils evaluation. The olfactive profile was defined as: sweet, resinous and woody.

GC–olfactometry (GC–O) refers to the use of human assessors as a sensitive and selective detector for odor-active compounds.

More than 80 different odorants were detected for the oil analyzed by GCO. For simplicity, only the odorants reaching a minimum MF value of 40% were considered. This led to a final list of 34 odorants.

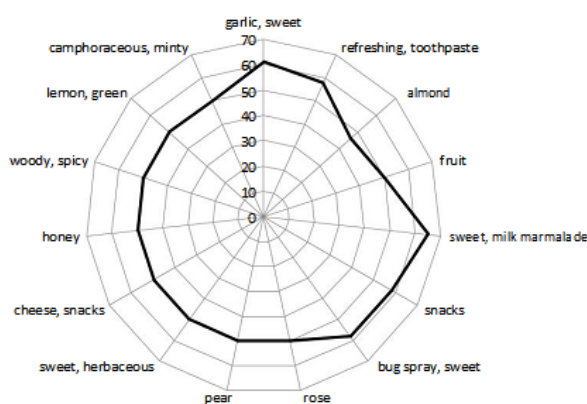
**Table 2**  
Modified Frequency data calculated (above 40) and GC-MS identification of *B. anomala* oil compounds.

MF = 40	LRI <sup>a</sup>	Compound	Description
41	1113	-Pinene	Honey
61	1120	Sabinene	Garlic, sweet
41	1178	Myrcene	Sweet, citric
58	1192	Limonene	Refreshing, toothpaste
46	1238	-Terpinene	Almond
41	1252	p-Cymene	Fuel like
41	1274	-Terpinolene	Medicine
50	1344	Perillene	Fruit
41	1459	Trans-sabinene hydrate	Burning
41	1468	-	Lavender
65	1473	-	Sweet, milk marmalade
41	1482	Linalool	Sweet
41	1490	-Campholenal	Green, woody
41	1528	-Cubebene	Antique
58	1560	Pinocarvone	Snacks
58	1575	-Caryophyllene	Bug spray, sweet
50	1579	-Elemene	Rose
41	1585	-	Fruity
41	1598	Terpinen-4-ol	Woody, earthy
41	1635	Trans-pinocarveol	Herbal
50	1638	Sabina ketone	Pear
50	1654	Safranal	Sweet, herbaceous
50	1664	-Humulene	Cheese, snacks
50	1685	-Acoradiene	Honey
50	1696	Germacrene D	Woody, spicy
41	1712	-Selinene	Soap, herbal
50	1733	Bicyclogermacrene	Lemon, green
41	1793	Verbenone	Incense, camphorous
41	1796	Cumin aldehyde	Sweet
50	1810	Myrtenol	Camphoraceous, minty
41	1819	Trans-carveol	Spicy, earth
41	1847	Cis-carveol	Fungi, humidity, wood
41	1982	-Caryophyllene oxide	Woody, spicy
41	2142	Spathulenol	Herbal, earthy

<sup>a</sup> The components are reported according their elution order on HP-INNOWax.

The MF (modified frequency) values (=40) and the compounds identification by GC-MS and linear retention index (LRIs) are shown in Table 2.

The best perceived odorants (MF = 50) were sabinene (garlic, sweet), limonene (refreshing, toothpaste), perillene (fruit), an unidentified compound with retention time 25.07 (sweet, milk marmalade), pinocarvone (snacks), -caryophyllene (bug spray, sweet), -elemene (rose), sabina ketone (pear), safranal (sweet, herbaceous), -humulene (cheese, snacks), -acoradiene (honey), germacrene D (woody, spicy), bicyclogermacrene (lemon, green) and myrtenol (camphoraceous, minty).



**Fig. 1.** Spider-web graphic representation of the best perceived odorants (MF = 50).

Fig. 1 shows the best perceived odorants (MF = 50) which represent the odor profile of *B. anomala* oil. Even when there was not good correlation between concentration (%) of compound and intensity of perception by GC-O, the different odor notes perceived in the oil described by GC-O gave a clear picture of the characteristic notes in the oil. The spider web plot of odor profile and GC-O showed (Fig. 1) the attributes perceived by the method. The information thus generated can be used to develop blends to obtain desired aroma notes.

#### 4. Conclusions

The odor analysis profiles of individual components of the *Baccharis* oil showed the dominant attributes as well as the other attributes perceived. The different odor notes perceived in the oil described by GC-O method gave a clear picture of the characteristic notes in the oil. The compounds responsible for the characteristic powerful odorants were identified by GC-MS and linear retention index.

The characterization of the oil could help in the formulation of blends. This knowledge can be applied in the preparation of designer beverages and foods, wherein the desired attributes or flavor notes present in different oils can be blended to obtain an acceptable, novel aromatic profile.

The published data and those presented here show that the essential oils from *Baccharis* rarely contain useful chemical markers from the chemotaxonomical point of view (Besten et al., 2012), but the results can be explained by supposing that *B. anomala* varies its secondary metabolites production according to the climatic conditions.

Further efforts are needed to achieve a better knowledge about chemical responses of *Baccharis* genus, in particular for *B. anomala* species, to extrinsic and intrinsic factors. The results will only be achieved after the adoption of special care in collecting and preparing the samples.

#### Acknowledgements

This work was possible thanks to the financial support of CAPES and PUCRS.

#### References

- Abad, M.J., Bessa, A.L., Ballarín, B., Aragón, O., Gonzales, E., Bemejo, P., 2006. Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 103, 338–344.
- Abad, M.J., Bemejo, P., 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *ARKIVOC* 7, 76–96.
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry Allured, 4th ed. Carol Stream, IL, USA.
- Alice, C.B., Silva, G.A.A.B., Siqueira, N.C.S., Mentz, L.A., 1985. Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul (Parte I). *Cad. Farm.* 1, 83–94.
- Barbieri Xavier, V., 2011. Investigação sobre compostos voláteis de espécies de *Baccharis* nativas do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (MSc thesis).
- Barbieri Xavier, V., Vargas, R.M.F., Cassel, E., Lucas, A.M., Santos, M.A., Mondin, C.A., Santarem, E.R., Astarita, L.V., Sartor, T., 2011. Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. *Ind. Crop. Prod.* 33, 599–604.
- Barroso, G.M., Bueno, O., 2002. Compositas: subtribo Baccharidinae. *Herbário Barbosa Rodrigues*, Itajaí.
- Besten, M.A., Jasinski, V.C.G., Costa, A.G.L.C., Nunes, D.S., Sens, S.L., Wisniewski, A., Simionatto, E.L., Riva, D., Dalmarco, J.B., Granato, D., 2012. Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female specimens of each five *Baccharis* species. *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 1041–1047.
- Budel, J.M., Duarte, M.R., 2008. Estudo farmacobotânico de partes vegetativas aéreas de *Baccharis anomala* DC., Asteraceae. *Braz. J. Pharmacogn.* 18, 761–768.
- Budel, J.M., Duarte, M.R., Döll-Boscuardina, P.M., Farago, P.V., Matzenbacher, N.I., Sartoratto, A., Sales Maia, B.H.L.N., 2012. Composition of essential oils and secretory structures of *Baccharis anomala*, *B. megapotamica* and *B. ochracea*. *J. Essent. Oil Res.* 24, 19–24.

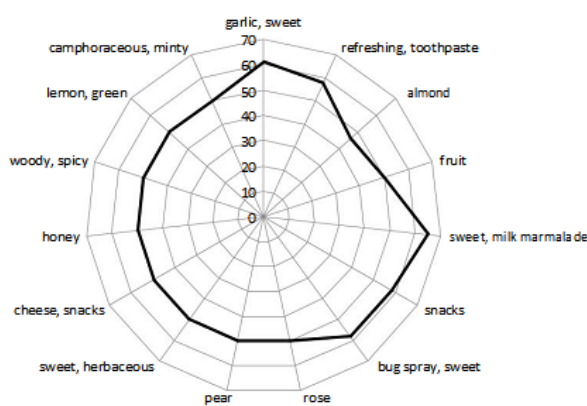
**Table 2**  
Modified Frequency data calculated (above 40) and GC-MS identification of *B. anomala* oil compounds.

MF = 40	LRI <sup>a</sup>	Compound	Description
41	1113	-Pinene	Honey
61	1120	Sabinene	Garlic, sweet
41	1178	Myrcene	Sweet, citric
58	1192	Limonene	Refreshing, toothpaste
46	1238	-Terpinene	Almond
41	1252	p-Cymene	Fuel like
41	1274	-Terpinolene	Medicine
50	1344	Perillene	Fruit
41	1459	Trans-sabinene hydrate	Burning
41	1468	-	Lavender
65	1473	-	Sweet, milk marmalade
41	1482	Linalool	Sweet
41	1490	-Campholenal	Green, woody
41	1528	-Cubebene	Antique
58	1560	Pinocarvone	Snacks
58	1575	-Caryophyllene	Bug spray, sweet
50	1579	-Elemene	Rose
41	1585	-	Fruity
41	1598	Terpinen-4-ol	Woody, earthy
41	1635	Trans-pinocarveol	Herbal
50	1638	Sabina ketone	Pear
50	1654	Safranal	Sweet, herbaceous
50	1664	-Humulene	Cheese, snacks
50	1685	-Acoradiene	Honey
50	1696	Germacrene D	Woody, spicy
41	1712	-Selinene	Soap, herbal
50	1733	Bicyclogermacrene	Lemon, green
41	1793	Verbenone	Incense, camphorous
41	1796	Cumin aldehyde	Sweet
50	1810	Myrtenol	Camphoraceous, minty
41	1819	Trans-carveol	Spicy, earth
41	1847	Cis-carveol	Fungi, humidity, wood
41	1982	-Caryophyllene oxide	Woody, spicy
41	2142	Spathulenol	Herbal, earthy

<sup>a</sup> The components are reported according their elution order on HP-INNOWax.

The MF (modified frequency) values (=40) and the compounds identification by GC-MS and linear retention index (LRIs) are shown in Table 2.

The best perceived odorants (MF = 50) were sabinene (garlic, sweet), limonene (refreshing, toothpaste), perillene (fruit), an unidentified compound with retention time 25.07 (sweet, milk marmalade), pinocarvone (snacks), -caryophyllene (bug spray, sweet), -elemene (rose), sabina ketone (pear), safranal (sweet, herbaceous), -humulene (cheese, snacks), -acoradiene (honey), germacrene D (woody, spicy), bicyclogermacrene (lemon, green) and myrtenol (camphoraceous, minty).



**Fig. 1.** Spider-web graphic representation of the best perceived odorants (MF = 50).

Fig. 1 shows the best perceived odorants (MF = 50) which represent the odor profile of *B. anomala* oil. Even when there was not good correlation between concentration (%) of compound and intensity of perception by GC-O, the different odor notes perceived in the oil described by GC-O gave a clear picture of the characteristic notes in the oil. The spider web plot of odor profile and GC-O showed (Fig. 1) the attributes perceived by the method. The information thus generated can be used to develop blends to obtain desired aroma notes.

#### 4. Conclusions

The odor analysis profiles of individual components of the *Baccharis* oil showed the dominant attributes as well as the other attributes perceived. The different odor notes perceived in the oil described by GC-O method gave a clear picture of the characteristic notes in the oil. The compounds responsible for the characteristic powerful odorants were identified by GC-MS and linear retention index.

The characterization of the oil could help in the formulation of blends. This knowledge can be applied in the preparation of designer beverages and foods, wherein the desired attributes or flavor notes present in different oils can be blended to obtain an acceptable, novel aromatic profile.

The published data and those presented here show that the essential oils from *Baccharis* rarely contain useful chemical markers from the chemotaxonomical point of view (Besten et al., 2012), but the results can be explained by supposing that *B. anomala* varies its secondary metabolites production according to the climatic conditions.

Further efforts are needed to achieve a better knowledge about chemical responses of *Baccharis* genus, in particular for *B. anomala* species, to extrinsic and intrinsic factors. The results will only be achieved after the adoption of special care in collecting and preparing the samples.

#### Acknowledgements

This work was possible thanks to the financial support of CAPES and PUCRS.

#### References

- Abad, M.J., Bessa, A.L., Ballarín, B., Aragón, O., Gonzales, E., Bemejo, P., 2006. Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 103, 338–344.
- Abad, M.J., Bemejo, P., 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *ARKIVOC* 7, 76–96.
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry Allured, 4th ed. Carol Stream, IL, USA.
- Alice, C.B., Silva, G.A.A.B., Siqueira, N.C.S., Mentz, L.A., 1985. Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul (Parte I). *Cad. Farm.* 1, 83–94.
- Barbieri Xavier, V., 2011. Investigação sobre compostos voláteis de espécies de *Baccharis* nativas do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (MSc thesis).
- Barbieri Xavier, V., Vargas, R.M.F., Cassel, E., Lucas, A.M., Santos, M.A., Mondin, C.A., Santarem, E.R., Astarita, L.V., Sartor, T., 2011. Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. *Ind. Crop. Prod.* 33, 599–604.
- Barroso, G.M., Bueno, O., 2002. Compositas: subtribo Baccharidinae. *Herbário Barbosa Rodrigues*, Itajaí.
- Besten, M.A., Jasinski, V.C.G., Costa, A.G.L.C., Nunes, D.S., Sens, S.L., Wisniewski, A., Simionatto, E.L., Riva, D., Dalmarco, J.B., Granato, D., 2012. Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female specimens of each five *Baccharis* species. *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 1041–1047.
- Budel, J.M., Duarte, M.R., 2008. Estudo farmacobotânico de partes vegetativas aéreas de *Baccharis anomala* DC., Asteraceae. *Braz. J. Pharmacogn.* 18, 761–768.
- Budel, J.M., Duarte, M.R., Döll-Boscuardina, P.M., Farago, P.V., Matzenbacher, N.I., Sartoratto, A., Sales Maia, B.H.L.N., 2012. Composition of essential oils and secretory structures of *Baccharis anomala*, *B. megapotamica* and *B. ochracea*. *J. Essent. Oil Res.* 24, 19–24.



- Cassel, E., Frizzo, C.D., Vanderlinde, R., Atti-Serafini, L., Lorenzo, D., Dellacassa, E., 2000. Extraction of Baccharis oil by supercritical CO<sub>2</sub>. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39, 4803–4805.
- Cassel, E., Vargas, R., Martínez, N., Lorenzo, D., Dellacassa, E., 2009. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Ind. Crop. Prod.* 29, 171–176.
- Dávila, M., Loayza, I., Lorenzo, D., Dellacassa, E., 2008. Searching for natural bioactive compounds in four Baccharis species from Bolivia. *Nat. Prod. Commun.* 3, 1–6.
- Dravnieks, A., 1985. Atlas of Odor Character Profiles. ASTM Data Series 61, Philadelphia, pp. 354.
- Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., Ferreira, V., 2007. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4501–4510.
- Ferreira, V., Petka, J., Aznar, M., Cacho, J., 2003. Quantitative gas chromatography–olfactometry. Analytical characteristics of a panel of judges using a simple quantitative scale as gas chromatography detector. *J. Chromatogr. A* 1002, 169–178.
- Frizzo, C.D., 2001. Baccharis uncinnella DC y Baccharis dracunculifolia DC, un modelo para el estudio de técnicas de extracción y análisis de mezclas de componentes volátiles. Universidad de la republica, Montevideo, Uruguay (PhD thesis).
- Frizzo, C.D., Serafini, L.A., Dellacassa, E., Lorenzo, D., Moyna, P., 2001. Essential oil of Baccharis uncinnella DC. from Southern Brazil. *Flavour Frag. J.* 16, 286–288.
- Frizzo, C.D., Atti-Serafini, L., Echeverriagaray Laguna, S., Cassel, E., Lorenzo, D., Dellacassa, E., 2008. Essential oil variability in Baccharis uncinnella DC and Baccharis dracunculifolia DC growing wild in Southern Brazil, Bolivia and Uruguay. *Flavour Fragr. J.* 23, 99–106.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B., 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Ethnopharmacol.* 89, 67–71.
- Herz, W., Pilotti, A.M., Soderholm, A.C., Shuhama, I.K., Vichnesky, W., 1977. New terpenoid-type diterpenoids from Baccharis trimera. *J. Org. Chem.* 42, 3913.
- Jennings, W., Shibamoto, T., 1980. Qualitative Analysis of Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. Academic Press, New York.
- Kada, T., Kaneko, K., Matsuzaki, S., Matsusaki, T., Hara, Y., 1985. Detection and chemical identification of natural bioantimutagens. *Mutat. Res.* 150, 127–132.
- Le Berre, E., Thomas-Danguin, T., Beno, N., Coureaud, G., Etievant, P., Prescott, J., 2008. Perceptual processing strategy and exposure influence the perception of odor mixtures. *Chem. Senses* 33, 193–199.
- Loayza, I., Collin, G., Gagnon, M., Deslauriers, H., Dellacassa, E., 1993. Huiles essentielles de Baccharis latifolia, B. salicifolia de Bolivia et de B. dracunculifolia en provenance d'Uruguay. *Rivista Ital. EPPoS (Numero Speciale)*, 728–735.
- Loayza, I., Abujder, D., Aranda, R., Jakupovic, J., Collin, G., Deslauriers, H., Jean, F., 1995. Essential oils of B. salicifolia, B. latifolia and B. dracunculifolia. *Phytochemistry* 38, 381–389.
- McLafferty, F.W., Stauffer, D.B., 1991. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 5th ed. Wiley, New York.
- Meilgaard, M., Civille, G.V., Carr, B.T., 1991. Sensory Evaluation Techniques, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 354.
- Oliva, M.M., Zunino, M.P., López, M.L., Soria, Y.A., Ybarra, F.N., Sabini, L., Demo, M.S., Biurun, F., Zygodlo, J.A., 2007. Variation in the essential oil composition and antimicrobial activity of Baccharis spartioides (H et A.) J. Remy from three regions of Argentina. *J. Essent. Oil Res.* 19, 509–513.
- Oliveira, S.O.D., Dal-Pizzol, F., Gosmann, G., Guillaume, D., Moreira, J.C., Schenkel, E.P., 2003. Antioxidant activity of Baccharis articulata extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. *Free Radic. Res. Commun.* 37, 555–559.
- Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Palá-Paúl, R., Sanz, J., Conejero, F., 2001. Seasonal variation in chemical constituents of Santolina rosmarinifolia L. ssp. Rosmarinifolia. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 663–672.
- Perry, N.S., Bollen, C., Perry, E.K., Ballard, C., 2003. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 651–659.
- Queiroga, C.L., Fukal, A., Marsaioli, A.J., 1990. Composition of the essential oil of vassoura. *J. Braz. Chem. Soc.* 1, 105–109.
- Richardson, A., 1999. Measurement of fragrance perception. In: Pybus, D.H., Sell, C.S. (Eds.), *The Chemistry of Fragrances*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 145–157.
- San-Juan, F., Petka, J., Cacho, J., Ferreira, V., Escudero, A., 2010. Producing headspace extracts for the gas chromatography–olfactometric evaluation of wine aroma. *Food. Chem.* 123, 188–195.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S.M., Duarte, V.G., Machado, M.I.L., Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *J. Ethnopharmacol.* 89, 277–283.
- Simionato, E., Ilha, V., Mallmann, A.S., Porto, C., Dalcol, I.I., Morel, A.F., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil from Baccharis articulata (Lam) Pers. *J. Essent. Oil Res.* 20, 366–368.
- Verdi, L.G., Brighente, I.M.C., Pizzolatti, M.G., 2005. Género Baccharis (Asteraceae): aspectos químicos, económicos e biológicos. *Quim. Nova* 28, 85–94.

## Anexo 2 - COBEQ 2014

# EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ESPÉCIES DE *Baccharis* NATIVAS DO SUL DO BRASIL: ANÁLISE OLFATOMÉTRICA E MODELAGEM MATEMÁTICA

A. T. Espírito Santo, V. B. Xavier, A. Lucas, R. M. F. Vargas e E. Cassel

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Engenharia  
Email para contato: [cassel@pucrs.br](mailto:cassel@pucrs.br)

**RESUMO** – A busca por produtos naturais faz com que se investiguem novas propriedades em matérias vegetais. O gênero *Baccharis* encontrado no sul do Brasil e seus óleos essenciais (OE) são amplamente estudados, mas a análise olfatométrica ainda é necessária para desenvolver produtos que contenham aromas diferenciados obtidos de uma fonte natural. Logo, este trabalho utiliza um equipamento desenvolvido para detectar aromas e avaliar os aromas do OE usando cromatografia a gás/olfatometria (CG/O), técnica capaz de separar os compostos de uma amostra, quantificá-los e identificar os seus aromas. O OE de *B. trimera* e *B. tridentata* foi obtido via extração por arraste a vapor em unidade laboratorial com rendimentos de extração de 0,37% e 0,26% (m/m), respectivamente. A modelagem matemática da extração foi realizada para prever rendimentos e tempos ótimos de operação, utilizando um modelo difusivo. As análises cromatográficas apresentaram compostos com aromas distintos, a se destacar os aromas mais intensos: chá na *B. trimera* e maizena na *B. tridentata*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os seres humanos conseguem interagir com qualquer objeto ou outros seres através de um ou mais de seus sentidos, normalmente, através da captação de um estímulo externo. Dentre os distintos estímulos um dos que mais se destaca é o aroma detectado pelo olfato. Baseando-se nisso, cada vez mais, as indústrias alimentícia e farmacêutica buscam aromas que sejam bem recebidos pelos seus consumidores. Uma das principais técnicas utilizadas para a avaliação de aromas é a cromatografia gasosa/olfatométrica (CG/O), por se tratar de uma técnica híbrida que combina o poder de separação da cromatografia gasosa (CG) com a seletividade e a sensibilidade específicas do “nariz” humano, conforme Goodner e Rouseff (2011).

Uma fonte reconhecida por conter aromas naturais são os óleos essenciais de diversos gêneros de plantas, já que estes são concentrados em compostos voláteis como terpenos, álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas, glicosídeos, fenóis, ácidos graxos, entre outros, segundo Czepak e Bandani (2008).

As plantas do gênero *Baccharis* pertencem à família *Asteraceae* e possuem exemplares de suas mais de 500 espécies em todo o território americano, segundo Borella et al. (2006). Pela grande concentração de espécies no Brasil e nos Andes (cerca de 90% das espécies ocorrem na América do Sul) acredita-se que esta seja a possível região de origem do gênero. No Brasil são encontradas 120 destas espécies, sendo que sua maior concentração está nos Estados da região sul, juntamente com São Paulo. Algumas espécies de *Baccharis* são amplamente utilizadas na medicina popular da América do Sul para o tratamento de inflamações, dores de cabeça, diabetes, problemas hepáticos e utilizadas, também, para casos de desintoxicação, conforme apresentado por Verdi et al. (2005).

Dentre as diversas espécies de *Baccharis*, o estudo deteve-se na avaliação dos perfis olfatométricos de apenas duas: *Baccharis trimera* e *Baccharis tridentata*, ambas nativas do Estado do Rio Grande do Sul e coletadas junto ao Centro de Pesquisas e Conservação da Natuteza (CPCN) Pró-Mata, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), no município de São Francisco de Paula. Além da análise oflatométrica por CG/O também foi realizada a modelagem matemática da curva de rendimento do óleo essencial *versus* tempo.

A modelagem matemática de extrações por arraste a vapor se faz de grande importância para projetar instalações industriais e possibilitar sua operação de forma adequada. A partir de um modelo matemático gerado, é possível simular o processo sem a necessidade da realização de novos experimentos. Além disso, a modelagem matemática também propicia estratégias alternativas para avaliar a seleção das condições de operação do processo (CASSEL et al., 2009).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### a. Extração

Para a obtenção do óleo essencial foi utilizada a técnica de arraste a vapor, método de extração bastante tradicional e muito utilizado pela indústria essencieira, devido ao fato de sua simplicidade e baixo custo se comparado a novas tecnologias como a extração por fluido supercrítico, segundo Cassel e Vargas (2006). O equipamento utilizado, em escala laboratorial, é constituído por uma caldeira onde a geração de vapor é feita através de uma resistência elétrica imersa na água, um vaso extrator, onde ocorre o contato do vapor com a matriz vegetal e um *clevenger* compreendido por um sistema de condensação e separação da mistura óleo-vapor e recirculação da água, retornando-a para o sistema de aquecimento, diminuindo assim a quantidade de água requerida para a realização da extração.

As extrações foram realizadas em duplicata com 100g das partes aéreas da planta *in natura* vegetal para cada extração. A curva do rendimento mássico (m/m) do processo (massa de óleo obtido em relação à massa de planta) em função do tempo foi obtida a partir da média das duas extrações. Estes dados foram utilizados para a realização da modelagem matemática. Também foram determinadas a densidade do material vegetal (0,4 g/mL), a semiespessura

média deste mesmo material (0,11 mm) e a altura do leito de extração (21 cm), valores estes foram considerados iguais para as duas espécies em estudo.

## b. Análise Olfatométrica

A análise do perfil olfatométrico dos óleos essenciais obtidos foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (FID) Perkin Elmer Auto System. Neste equipamento foi acoplado, na saída da coluna de separação, um *sniffing port* (porta olfatométrica) com um sistema de umidificação para tornar a análise mais agradável. Desta forma o analisador pode identificar os compostos aromáticos separados pela coluna, com tempos de retenção diferentes, assim como ocorre em outros tipos de cromatografia.

A coluna de separação utilizada para o fracionamento dos componentes do óleo essencial é uma coluna capilar de sílica HP-5MS revestida com 5% de fenil metil silox (30 m x 250 µm i.d., 0,25 µm de espessura de face). Para cada análise foram injetados 2 µL de óleo essencial diluído em ciclohexano no modo splitless, sendo que o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a uma vazão de 1 mL/min. O injetor e o detector FID foram ajustados a 250°C e o programa de temperatura utilizado foi: 60°C durante 8 minutos, aumentando para 180°C a 3°C/min, 180-250°C a 20°C/min, então 250°C por 10 minutos. Enquanto o detector olfatométrico foi mantido constante a 120°C durante toda a análise.

Para a realização da análise olfatométrica foram selecionados três avaliadores, aleatoriamente, para compensar a diferença entre os critérios individuais e minimizar anosmias (incapacidade de sentir odores) específicas, conforme apresentado por Goodner e Rouseff (2011), onde cada um desses avaliadores deveria relatar a cada vez que sentisse um odor durante a análise as seguintes informações:

- a) tempo, em relação ao início da análise, em que sentiu um determinado odor;
- b) descrição do odor;
- c) intensidade do odor em uma escala de números inteiros de 1 a 5 (sendo 1 a menor intensidade e 5 a maior intensidade).

Com os dados obtidos pelos três avaliadores foi possível uma comparação entre os resultados obtidos individualmente e a geração de uma nova grandeza, que relaciona intensidade e frequência de detecção, denominada Frequência Modificada (FM), apresentada na Equação 1. A equação da FM utilizada é a mesma proposta por Dravnieks (1985):

$$FM(\%) = \sqrt{F(\%).I(\%)} \quad (1)$$

onde F(%) é a frequência, em termos percentuais, de detecção de um aroma entre o universo de avaliadores e I(%) é a intensidade média de um atributo aromático em relação à escala, sendo 100% correspondente à média 5. Se um aroma possui 100% de FM quer dizer que o mesmo foi detectado por todos os avaliadores e com máxima intensidade.

Para a identificação da composição dos óleos essenciais de cada uma das espécies de *Baccharis*, foram realizadas análises utilizando-se um cromatógrafo gasoso da marca Agilent 7890A equipado com um espectrômetro de massas (CG/EM) da marca Agilent 5975C. No equipamento foi utilizada uma coluna capilar de sílica HP-5MS revestida com 5% de fenil metil silox (30 m x 250 µm i.d., 0,25 µm de espessura de fase). As condições do cromatógrafo utilizadas para análises foram as seguintes: temperatura da coluna no forno, 60°C durante 8 minutos, aumentando para 180°C a 3°C/min, 180-250°C a 20°C/min, então 250°C por 10 minutos; temperatura do injetor, 250°C; modo de injeção, split; razão de split 1:55; volume injetado, 0,2 µL; o gás de arraste foi hélio com vazão 0,8 mL/min; a temperatura da interface, 250°C; modo MS EI; tensão de EI, 70eV; intervalo de massas de aquisição, m/z 40-450.

### c. Modelagem Matemática

Um modelo embasado nos princípios de difusão foi utilizado para representar a transferência de massa associada à extração do óleo essencial para as espécies de *Baccharis* investigadas. Este modelo faz uso da 2ª Lei de Fick cuja solução para diferentes geometrias e condições de contorno é apresentada por Crank (1975). Em particular se considerou a difusão unidimensional em uma placa plana com concentração na superfície em equilíbrio com o meio. A solução, apresentada por Crank (1975), pode ser visualizada na Equação 2.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2L^2 \exp\left(-\frac{\beta_n^2 Dt}{l^2}\right)}{\beta_n^2 (\beta_n^2 + L^2 + L)} \quad (2)$$

sendo:

$$\beta_n \tan \beta_n = L \quad (3)$$

$$L = \frac{lk_c}{D} \quad (4)$$

onde:  $t$  é o tempo,  $M_t$  é a massa em função do tempo,  $M_\infty$  é a massa no instante infinito,  $l$  é a semiespessura da planta,  $k_c$  é o coeficiente de transferência de massa,  $D$  é o coeficiente efetivo de difusão,  $\beta_n$  são as raízes positivas da Equação 2 e  $L$  é um parâmetro adimensional.

A solução do equacionamento foi obtida usando o software *Matlab* para o ajuste dos dados experimentais, determinando assim valores numéricos para a difusividade efetiva do óleo na planta e o valor para o coeficiente de transferência de massa superficial.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações por arraste a vapor apresentaram rendimento mássico (m/m) de 0,26% e 0,37% para as espécies *B. tridentata* e *B. trimera*, respectivamente. A partir dos dados da extração foi possível realizar a modelagem matemática conforme apresentado na Figura 1.

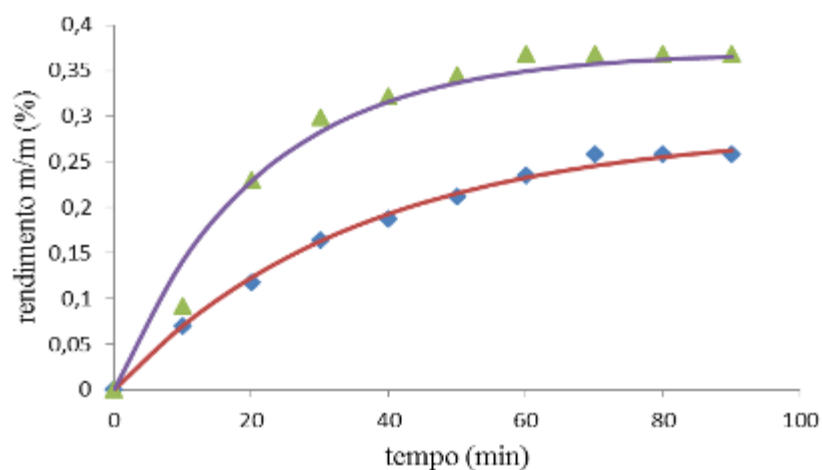


Figura 1 – Rendimento mássico em função do tempo da extração. Condições experimentais (♦ *Baccharis tridentata* e ▲ *Baccharis trimera*) e modelagem matemática (— *Baccharis tridentata* e — *Baccharis trimera*).

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) entre os dados experimentais e o modelo matemático foi de 0,984 para a *B. trimera* e 0,996 para a *B. tridentata*. Na extração envolvendo a *Baccharis trimera*, o coeficiente de transferência de massa ( $k_c$ ) determinado pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático foi de  $8,88 \times 10^{-8}$  m/s, com os parâmetros de coeficiente de difusão ( $D$ ) e o parâmetro adimensional ( $L$ ) de  $4,57 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s e 0,021 respectivamente. Para a *B. tridentata*, os valores de  $k_c$ ,  $D$  e  $L$  obtidos foram de  $5,35 \times 10^{-11}$  m/s,  $5,87 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s e 0,100 respectivamente.

A análise química dos óleos essenciais foi realizada em cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG/EM) para a identificação dos compostos e a quantificação dos mesmos nos óleos de cada uma das espécies em estudo. Na Tabela 1 estão apresentados os compostos que apresentaram área maior que 0,10% resultantes das análises dos óleos essenciais, sendo que para as duas espécies foram identificados não menos do que 90% dos constituintes.

Por sua vez, a análise cromatográfica gás/olfatometria (CG/O) foi capaz de identificar uma grande variabilidade de aromas para as duas espécies. A Tabela 2 apresenta todos compostos identificados, apresentando o aroma de cada composto percebido pelos analisadores, a intensidade média analisada pelos avaliadores dos aromas, a frequência de detecção do aroma entre o universo de avaliadores e a Frequência Modular (FM) relacionando intensidade e frequência. Também foi criada a sigla “NID” representando quando o avaliador identificou algum aroma, mas não identificou a descrição do aroma.

Tabela 1 - Análise Cromatográfica CG/EM dos óleos essenciais de *B. trimera* e *B. tridentata*

COMPOSTO <sup>a</sup>	TR <sup>b</sup> (min)	IR <sup>c</sup>	Área <sup>d</sup>	
			<i>B. trimera</i>	<i>B. tridentata</i>
β-pineno	10,46	974	5,04%	4,55%
limoneno	13,35	1028	2,27%	1,75%
γ-terpineno	14,55	1050	1,08%	-
isoborneol	20,39	1158	0,21%	1,28%
trans-carveol	23,46	1219	0,35%	3,98%
acetato de carquejila	27,44	1298	47,04%	49,42%
β-elemenol	31,50	1393	1,00%	-
germacreno D	35,26	1483	2,84%	-
β-bisaboleno	36,24	1506	1,44%	-
d-cadineno	36,96	1524	1,24%	-
palustrol	38,75	1572	8,28%	11,98%
spatuleno	39,10	1579	2,42%	4,05%
óxido de cariofileno	39,47	1584	1,06%	2,82%
viridiflorol	39,64	1594	3,04%	2,09%
ledol	40,08	1604	2,71%	2,83%
β-eudesmol	41,83	1651	2,90%	1,77%

<sup>a</sup> = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007); compostos com área ≥ 0,1%; <sup>b</sup>TR = tempo de retenção do composto na coluna cromatográfica em minutos; <sup>c</sup> IR = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos; <sup>d</sup> Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma.

Tabela 2 - Cromatografia Gasosa/Olfatometria dos óleos essenciais *B. trimera* e *B. tridentata*

	Tempo de Retenção (min)	Intensidade Média	Aroma	Frequência FM(%)
<i>B. trimera</i>	4,49	3,33	mato/erva/chá	1,00 82
	12,82	1,33	ferro/ferrugem	1,00 52
	13,35	1,67	NID	0,33 33
	15,51	0,67	cítrico	0,67 30
	17,44	0,67	queimado	0,67 30
	19,23	1,00	mato	0,67 37
	21,37	1,33	chá cidreira	0,67 42
	23,90	1,33	mato	1,00 52
	31,05	1,67	chá cítrico	0,67 47

Continuação da Tabela 2

<i>B. tridentata</i>	4,53	1,67	NID	0,67	47
	5,00	2,33	NID	0,67	56
	5,74	2,00	comida de forno	0,67	52
	6,92	2,00	maizena	1,00	63
	11,37	1,33	tinta	0,67	42
	11,68	1,33	queimado	0,67	42
	12,52	1,00	produto de limpeza	0,67	37
	14,43	0,67	alecrim	0,67	30
	15,42	1,00	margarida	0,67	37
	17,03	1,00	azeitona	0,67	37
	17,92	1,67	terra	1,00	58
	22,90	0,67	NID	0,67	30
	24,25	1,67	manga	0,67	47

A Tabela 3 apresenta os compostos identificados tanto por CG/O quanto por CG/EM, sendo que apenas o composto limoneno apresentou área maior do que 1% em relação ao total de suas amostras. Contudo apenas compostos identificados para a *B. trimera* foram identificados em ambos os métodos.

Tabela 3 - Compostos identificados por CG/EM e CG/O no OE de *B. trimera*

Tempo de Retenção (min)	Composto	Área(%)	Aroma	FM(%)
13,35	limoneno	2,27	NID	33
21,37	terpinen-4-ol	0,09	chá cidreira	42
31,05	(E)-b-damascenono	0,13	chá cítrico	47

#### 4. CONCLUSÕES

O modelo matemático utilizado adequou-se às condições da extração, sendo uma ferramenta preditiva para futuras extrações ou predições de escalonamento do processo. A ordem de grandeza do coeficiente de transferência de massa obtido está de acordo com os valores apresentados por Vargas et al. (2013).

Os resultados das análises cromatográficas das espécies em estudo apresentam compostos aromáticos com aromas distintos para cada espécie, com destaque para o aroma de chá na *B. trimera* e maizena na *B. tridentata*, já que esses apresentaram maior FM. Contudo apenas três dos aromas percebidos pelos analisadores foram identificados pelo espectrômetro



de massas, ou seja, a grande maioria dos aromas encontrados provém de constituintes minoritários no óleo essencial.

Por fim, as espécies estudadas possuem aromas que podem ser utilizados na indústria farmacêutica ou alimentícia no desenvolvimento de novos produtos. Porém é necessário separá-los, total ou parcialmente, de outros aromas que não possuam esse interesse, já que a análise olfatométrica utilizada avalia os compostos isoladamente, sem a interação entre os diferentes compostos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4 ed. Allured 2007. 804p.

BORELLA, J. C.; DUARTE, D. P.; NOVARETTI, A. A. G.; JUNIOR, A. M.; FRANÇA, S. C.; RUFATO, C. B.; SANTOS, P. A. S.; VENEZIANI, R. C. S., LOPES, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas sw *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Rev Bras Farmacognosia*, v. 16, n.4, p. 557-561, out./dez. 2006.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F. Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation. *J Mex Chem Soc*, v. 50, n. 3, p. 126-129, 2006.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MARTINEZ, N.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Ind Crop Prod*, v. 29, n. 1, p. 171-176, 2009.

CRANK, J. *The Mathematics of Diffusion*. 2 ed. Oxford: Oxford Science Publications. 1975 414 p.

CZEPAK, M. P.; BANDONI, A. *Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil: Seu Aproveitamento Industrial para a Produção de Aromas e Sabores*. 1 ed. Vitória: EDUFES, 2008. 624 p.

GOODNER, K.; ROUSEFF, R. *Gas Chromatography/Olfactometry - GC/O Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials*. 3 ed. Hoboken: Wiley, 2011. p. 228.

VARGAS, R. M. F.; BARROSO, M. S. T.; NETO, R. G.; SCOPEL, R.; FALCÃO, M. A.; SILVA, C. G.; CASSEL, E. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. using CO<sub>2</sub>. *Ind Crop Prod*, v. 50 n. 1, p. 430-435, 2013.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. *Quim Nova*, v. 28, n.1 p. 85-94, jan./fev. 2005.

## Anexo 3 – COBEQ 2015

# ANÁLISE CROMATOGRÁFICA/OLFATOMÉTRICA (CG/O) DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE MEL EXTRAÍDOS POR SPME

V. H. S. RODRIGUES, V. B. XAVIER e E. CASSEL

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Engenharia  
Email para contato: victor.rodrigues.001@acad.pucrs.br

**RESUMO** – O mel é um produto natural obtido a partir do néctar das flores e de excreções de abelhas. Suas propriedades estão diretamente vinculadas à origem botânica do néctar usado, cuja identificação depende de análise microscópica do pólen das flores existentes no mesmo. O presente estudo avalia a possibilidade de classificar o mel por cromatografia gasosa/olfatometria (CG/O), uma técnica híbrida que combina o poder de separação da CG com a seletividade e a sensibilidade específicas do nariz humano. Foram analisados dois tipos de mel: mel de Eucalipto e mel de Quitoco. Para extração dos compostos voláteis foi utilizada a técnica de SPME (*Solid-Phase Microextraction*), uma técnica de extração de amostras que apresenta vantagens como a economia de tempo e solvente. Para os experimentos foram utilizados 5g de mel, inicialmente à temperatura ambiente. A determinação aromática dos constituintes das amostras foi realizada por seis avaliadores (em triplicata) para aumentar a confiabilidade dos resultados. As análises cromatográficas apresentaram compostos com aromas distintos, a se destacar os aromas: mato/doce/floral atribuído ao composto fenil etil álcool (presente nas duas amostras), doce/morango/mel/floral (composto não identificado do mel de Eucalipto) e citral/nozes/floral (composto não identificado do mel de Quitoco).

## 1. INTRODUÇÃO

O mel é um alimento natural líquido, viscoso e adocicado. Ele é elaborado a partir do néctar das flores e de secreções de partes vivas de determinadas plantas ou ainda de excreções de insetos sugadores de plantas, no qual abelhas coletam, transformam, combinam e deixam maturar nos favos das colmeias. Açúcares (monossacarídeos) e água são seus principais constituintes. O restante são vitaminas, minerais, enzimas, compostos orgânicos aromáticos, aminoácidos livres e numerosos compostos voláteis. Esta menor fração da composição total, referente aos compostos voláteis, é responsável pelas propriedades organolépticas e nutricionais do mel. A composição química do mel é altamente dependente da sua fonte botânica (Manyi-Loh et. al., 2011).

Sabe-se que apenas uma pequena parte do grande número de compostos voláteis que ocorrem em uma matriz aromática contribui para percepção do seu odor. Além disso, essas moléculas não contribuem igualmente para o perfil de aroma global de uma amostra, portanto a resposta gerada na análise cromatográfica, não necessariamente corresponde aos resultados sensoriais obtidos pelas análises olfatométricas (Xavier, 2011). A cromatografia gasosa/olfatometria (CG/O) é a metodologia analítica indicada para tais análises, pois permite

a avaliação do odor de componentes ativos de misturas complexas, através da correlação específica com os picos cromatográficos de interesse; isso é possível porque as substâncias eluídas são percebidas simultaneamente por dois detectores: o detector do cromatógrafo e o sistema olfativo humano (van Baren, 2008). A correta identificação dos picos aromáticos ativos pode ser extremamente complicada devido às amostras apresentarem dezenas de compostos. A cromatografia gasosa/espectrometria de massas é a técnica mais utilizada na identificação dos compostos voláteis presentes nos alimentos (Goodner e Rouseff, 2011).

Dentre os diversos tipos de mel, este trabalho ateu-se a dois méis: mel de Eucalipto e mel de Quitoco. A partir da definição das amostras, a meta deste estudo foi propor e construir uma metodologia de classificação de méis como alternativa à análise microscópica de pólen. Para isso se empregou a análise de identificação dos compostos voláteis dos méis por cromatografia e a análise sensorial resultante da olfatometria.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras de mel**

Para os testes com mel, foram utilizadas amostras de mel de Eucalipto e mel de Quitoco. As amostras foram fornecidas pelo Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais da PUCRS. Elas estavam cristalizadas e apresentavam coloração dourada, sendo que a amostra do mel de Eucalipto estava levemente escura. Ambas foram mantidas a temperatura ambiente antes das análises dentro de um vial com septo.

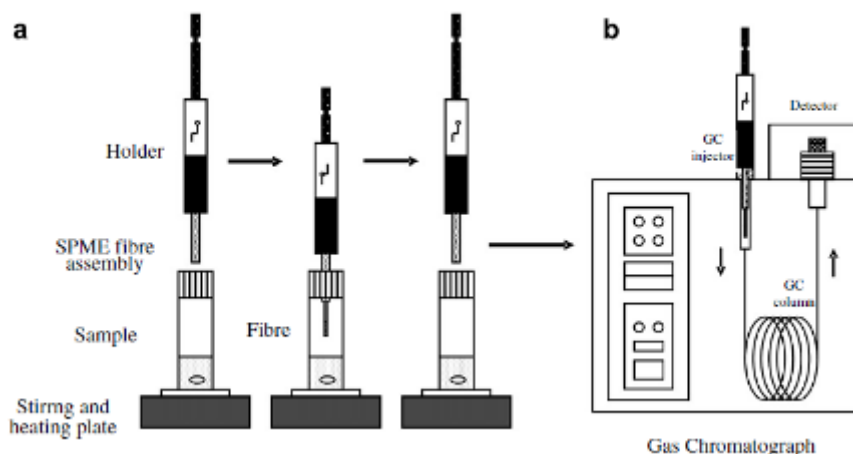
### **2.2. Microextração em Fase Sólida (SPME)**

Os compostos voláteis dos méis foram extraídos pelo método de Microextração em Fase Sólida (SPME). Na SPME utiliza-se uma fibra ótica de sílica fundida, recoberta com um adsorvente adequado. A fibra se encontra acondicionada dentro de uma espécie de agulha em um amostrador semelhante a uma seringa, ficando exposta somente no momento da extração (método *Headspace*). (Orlando et al, 2009). Para os experimentos foram utilizados 5,0 g de mel, inicialmente à temperatura ambiente. A amostra, dentro de um vial de 20 mL, foi aquecida até 70°C com o auxílio de uma placa de aquecimento, mantendo-se assim por 30 minutos; tempo esse denominado de tempo de equilíbrio. Após este período, a fase volátil é exposta à fibra por 30 minutos na temperatura de 70°C, para adsorver os compostos voláteis. Uma vez transcorrido este processo, a fibra é injetada no cromatógrafo manualmente, ficando exposta por 2 minutos aos gases eluentes do equipamento. O processo pode ser resumido através da Figura 1.

### **2.3. Análise de Cromatografia Gasosa/Olfatométria (CG/O)**

Para a realização da análise cromatográfica/olfatométrica, as amostras foram injetadas em um cromatógrafo gasoso equipado com um sistema de detecção por ionização de chama (FID) e um compartimento para avaliação sensorial (*Sniffing Port*). A coluna cromatográfica separação utilizada para o fracionamento dos compostos voláteis foi uma coluna capilar de sílica HP-5MS revestida com 5% de fenil metil silox (30 m x 250 µm i.d., 0,25 µm de espessura de face). O injetor, o olfatômetro e o detector FID estavam a 250°C. O programa de temperatura foi o seguinte: 60 °C por 4 min, aumentando a 5 °C/min até 180°C, a 20°C/min até 250°C, e a 250°C por 5 min (total: 36,50 min). A linha de transferência utilizada para

Figura 1 - Processo de Microextração em Fase Sólida (SPME): (a) etapa de adsorção dos voláteis da amostra; (b) etapa de injeção dos compostos adsorvidos no CG/O.



Fonte: Cuevas-Glory, 2007.

carrear a amostra até o compartimento de avaliação sensorial foi mantida a 250 °C. Um fluxo constante de gás auxiliar (nitrogênio) de 5mL/min foi utilizado durante a análise. O dispositivo *Sniffing Port* é equipado com um umidificador com o objetivo de reduzir a desidratação da mucosa nasal durante a análise sensorial. A metodologia proposta por van Baren (2008) foi a base para a execução das análises. A fim de se obter uma maior confiabilidade nos resultados, foram selecionados seis avaliadores, previamente treinados, para a realização da análise olfatométrica. Cada um desses avaliadores relatou as seguintes informações: tempo, em relação ao início da análise, em que sentiu um determinado aroma, descrição do aroma e intensidade do odor em uma escala de números inteiros de 1 a 5, sendo 1 a menor intensidade e 5 a maior intensidade. A partir das respostas dos avaliadores é gerada uma nova grandeza que relaciona intensidade e frequência de detecção, denominada Frequência Modificada (FM). A Equação representa a forma de cálculo da FM (Dravnieks, 1985).

$$FM (\%) = \sqrt{F(\%) \cdot I(\%)} \quad (1),$$

onde F(%) é a frequência, em termos percentuais, de detecção de um aroma entre o universo de avaliadores e I(%) é a intensidade média de um atributo aromático em relação à escala, sendo 100% correspondendo a média 5. Se um aroma possui 100% de FM quer dizer que o mesmo foi detectado por todos os avaliadores e com a máxima intensidade.

#### 2.4. Análise de Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG/EM)

Para a identificação da composição das amostras de mel foi utilizado um CG/EM. O programa de temperatura foi o mesmo utilizado no CG/O. As demais condições do cromatógrafo foram: o gás de arraste foi hélio com vazão 0,8 mL/min; a temperatura da interface, 250 °C; modo MS EI; tensão de EI, 70eV; intervalo de massas de aquisição, m/z 40-450.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da análise química de identificação e quantificação dos compostos presentes na fase volátil das amostras de mel, realizada por CG/EM, são apresentados na Tabela 1, sendo que foi definido adicionar os compostos com área maior que 1,0%.

Tabela 1 - Análise Cromatográfica CG/EM das amostras de mel

COMPOSTO <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	Área <sup>c</sup> (%)	
		<i>Eucalipto</i>	<i>Quitoco</i>
ácido 2-metil-butanóico	832	1,30	-
canfeno	944	4,96	-
benzaldeído	949	6,21	-
benzeno acetaldeído	1036	1,12	-
isobutil angelato	1046	1,00	19,60
formato de benzila	1075	5,71	16,07
óxido de trans-linalool (furanóide)	1080	-	2,83
linalol	1091	1,00	4,95
fenil etil álcool	1106	16,50	16,00
isoforona	1117	-	1,14
cânfora	1145	1,07	0,25
trans-b-terpineol	1156	1,53	1,41
1-fenil etil acetato	1192	2,45	3,43
nerol	1230	-	1,09
neral	1237	-	1,01
geraniol	1249	2,34	-
n-decanol	1263	1,00	1,36
decanoato de metila	1325	1,23	1,00
aldeído limoneno	1330	7,44	4,25
3-hidroxi-4-fenil-2- butanona	1340	-	4,88
2-fenil-etil-propanoato	1349	8,73	-
2-tridecanona	1497	1,48	-
n-pentadecano	1502	9,10	2,86
7-epi-a-eudesmol	1661	5,36	-
n-tetradecanol	1672	5,44	3,01
ocidol	1834	1,03	3,14

<sup>a</sup> = compostos identificados pela comparação de seus espectros de massa e índices de retenção com a biblioteca Adams (2007); compostos com área  $\geq 1\%$ ; <sup>b</sup>IR = índice de retenção calculado em relação a uma série de alcanos; <sup>c</sup>Área = área percentual de cada pico em relação à área total do cromatograma.

Por sua vez, a CG/O foi capaz de identificar uma grande variabilidade de aromas para as duas espécies. As Tabelas 2 e 3 apresentam os compostos identificados que apresentaram FM maior que 40. A Tabela 4 apresenta os compostos identificados tanto por CG/O quanto por CG/EM.

Tabela 2 - Cromatografia Gasosa/Olfatometria para o mel de Eucalipto

IR	Tempo (min)	Descrição do aroma	FM
832	4,95	doce	41
849	5,28	doce/morango/mel/floral	60
936	7,60	madeira/grama	43
974	8,81	doce/refrigerante	45
1015	10,08	frutal	45
1106	12,93	mato/doce/floral	45
1137	13,86	eucalipto/floral/caramelo	47
1171	14,87	cloro	41
1736	28,79	mel/floral	43

Tabela 3 - Cromatografia Gasosa/Olfatometria para o mel de Quitoco.

IR	Tempo (min)	Descrição do aroma	FM
942	7,828	linalol	45
1075	11,996	amargo/refrescante	56
1091	12,475	eucalipto/chá/camomila	60
1106	12,900	mato/doce/floral	45
1267	17,642	citral/nozes/floral	60
1408	21,404	floral/coco fruta	61

Tabela 4 - Compostos identificados por CG/EM e CG/O dos compostos de mel

Mel	IR	Composto	Área(%)	Aroma	FM(%)
Eucalipto	832	Ácido 2-metil-butanóico	1,30	doce	41
	1106	fenil etil álcool	16,50	mato/doce/floral	45
Quitoco	1075	formato de benzila	16,07	amargo/refrescante	56
	1091	linalol	4,95	eucalipto/chá/camomila	60
	1106	fenil etil álcool	16,00	mato/doce/floral	45

Os resultados das análises cromatográficas dos dois tipos de mel em estudo apresentam compostos aromáticos com aromas distintos, com destaque para o aroma de doce/morango/mel/floral encontrado para o mel de Eucalipto e coco/floral para o mel de Quitoco. Contudo apenas dois, para o mel de Eucalipto, e três, para o mel de Quitoco, dos aromas percebidos pelos analisadores foram identificados por CG/EM, ou seja, a grande maioria dos aromas encontrados provém de constituintes minoritários na amostra. Logo, os odores mais perceptíveis (maiores valores de FM) não correspondem necessariamente aos compostos majoritários presentes nos voláteis do mel. Isto pode ser observado nos compostos formato de benzila (16,07%) e linalol (4,95%) para o mel de Quitoco que apresentaram 56 e 60 de FM, respectivamente. Esta constatação é observada em outras matrizes, também analisadas por CG/O, como, por exemplo, em óleos essenciais de espécies de *Baccharis* (Xavier, 2011) e de *Mulinum spinosum* (Cav.) *Persoon* (van Baren, 2008). Alguns compostos majoritários na análise química obtiveram baixo ou nenhum aroma na análise olfatométrica, tais como: aldeído limoneno, 2-fenil-etil-propanoato e n-pentadecano (no mel de Eucalipto) e isobutil angelato (no mel de Quitoco).

## 4. CONCLUSÕES

O mel é um produto extremamente complexo e seus compostos aromáticos se apresentam em baixas concentrações. O presente estudo avaliou a possibilidade de classificar o mel por CG/O, como alternativa à análise microscópica do pólen (melissopalínologia) que é a técnica mais empregada atualmente. Segundo Cuevas-Glory et. al. (2007) e Manyi-Loh et. al. (2011), a melissopalínologia requer um analista muito experiente e é uma técnica muito demorada. A partir dos resultados se concluiu que a técnica de extração utilizada (SPME) mostrou-se eficiente na obtenção dos compostos voláteis de mel e a CG/O consolidou-se como técnica alternativa. Porém, ainda serão necessários estudos complementares para se estabelecer a técnica como forma de classificar méis, visto que se busca um ou mais compostos-chave que sejam capazes de identificar a origem do mel a partir da planta usada como fonte de matéria-prima.

## 5. REFERÊNCIAS

- DRAVNIÉKS A. *Atlas of Odor Character Profiles*, ASTM: Philadelphia, PA, p.354, 1985.
- CUEVAS-GLORY, L. F.; PINO, J. A.; SANTIAGO, L. S.; SAURI-DUCH, E. *A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey*. Food Chemistry, v. 103, p. 1032-1043, 2007.
- GOODNER, K.; ROUSEFF, R. In: *Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials. Gas Chromatography/Olfactometry - GC/O*. Wiley, p. 69-90, 2011.
- MANYI-LOH, C. E.; NDIP, N. R.; CLARKE, A. M. *Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities*. International Journal of Molecular Sciences. v. 12, p. 9514-9532, 2011
- ORLANDO, R. M.; Cordeiro, D. D.; Mathias, A. E. B.; Rezende, K. R.; Gil, E. S. *Pré-Tratamento de Amostras*. Vita et Sanitas, Trindade/Go, n. 03, p. 122-139, 2009.
- VAN BAREN, C. M. *Composición química y actividades biológicas de una especie aromática y medicinal de la estepa patagónica con potencial interés industrial: Mulinum spinosum (Cav.) Persoon*. Tese de doutorado em Farmácia e Bioquímica. Cátedra de Farmacognosia. Universidade de Buenos Aires. Buenos Aires, 2008.
- XAVIER, V. B. *Investigação sobre compostos voláteis de espécies de Baccharis nativas do Rio Grande do Sul*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil. Porto Alegre, 2011.

## Anexo 4 – Journal Separation Science

3038

*J. Sep. Sci.* 2015, 38, 3038–3046Manuel Minteguiaga<sup>1</sup>Noelia Umpierrez<sup>1</sup>Laura Farina<sup>1</sup>Manuel A. Falcao<sup>2</sup>Vanessa B. Xavier<sup>2</sup>Eduardo Casse<sup>2</sup>Eduardo Dellacassa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología de Aromas, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Laboratório de Operações Unitárias (LOPE), Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Received February 4, 2015

Revised June 13, 2015

Accepted June 14, 2015

### Research Article

## Impact of gas chromatography and mass spectrometry combined with gas chromatography and olfactometry for the sex differentiation of *Baccharis articulata* by the analysis of volatile compounds

The *Baccharis* genus has more than 400 species of aromatic plants. However, only approximately 50 species have been studied in oil composition to date. From these studies, very few take into consideration differences between male and female plants, which is a significant and distinctive factor in *Baccharis* in the Asteraceae family. *Baccharis articulata* is a common shrub that grows wild in south Brazil, northern and central Argentina, Bolivia, Paraguay and Uruguay. It is considered to be a medicinal plant and is employed in traditional medicine. We report *B. articulata* male and female volatile composition obtained by simultaneous distillation-extraction technique and analyzed by gas chromatography with mass spectrometry. Also, an assessment of aromatic differences between volatile extracts was evaluated by gas chromatography with olfactometry. The results show a very similar chemical composition between male and female extracts, with a high proportion of terpene compounds of which pinene, limonene and germacrene D are the main components. Despite the chemical similarity, great differences in aromatic profile were found: male plant samples exhibited the strongest odorants in number and intensity of aromatic attributes. These differences explain field observations which indicate differences between male and female flower aroma, and might be of ecological significance in the attraction of pollinating insects.

**Keywords:** *Baccharis articulata* / Gas chromatography with mass spectrometry / Olfactometry / Sex differentiation / Volatile organic compounds  
DOI 10.1002/jssc.201500131

### 1 Introduction

*Baccharis* genus is one of the most numerous in the Asteraceae family with almost 400 described species and 38 species reported as medicinal folk plants [1]. Aromatic plants from this genus are a very rich source of volatile organic compounds (VOCs). Two species of the *Baccharis* genus are known as producers of essential oils used in perfumery: vassoura oil (*Baccharis dracunculifolia* oil) and carqueja oil (*Baccharis trimera* or *Baccharis genistelloides* oil) [2]. Around 50

*Baccharis* species were studied by their essential oils composition, but only very few studies have considered differentiation

between sexes [3–5]. The latter is a significant and distinctive fact of *Baccharis* genus in Asteraceae family. Many explanations have been presented, but Ferracini et al. (1995) [2] hypothesize that literature contradictions between male and female volatile profiles are due to a response to circadian rhythms of the species. It is important to highlight that volatile emission from plants to the atmosphere is not a static process, but a very dynamic process that changes according to environmental alterations [2, 6, 7].

The olfactory process is a very complex interaction between key volatile chemical compounds and mucosa of epithelial receptor cells in the olfactory duct [8]. The way in which foods render aroma when they are being consumed is related, not only to direct odor detection through the nose (orthonasal perception) but an olfaction process also takes place through the mouth (retronasal perception) [8, 9].

It is a well-known fact that volatile compounds have an important role in the memory consolidation through long time periods: new memories are initially labile and they need strong reinforcements like odor clues so as to be stored in the brain memory for a long-term [8]. Physiology of aroma perception includes a cascade of transduction from odorant to cyclic adenosine monophosphate (cAMP) using G-proteins system.

**Correspondence:** Dr. Eduardo Dellacassa, Laboratorio de Biotecnología de Aromas, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química-UdelAR, Av. General Flores 2124. CP: 11800. Montevideo, Uruguay.

E-mail: edellac@fq.edu.uy

Fax: ++598 29244068

**Abbreviations:** cAMP, cyclic adenosine monophosphate; GC–O, gas chromatography with olfactometry; MF, modified frequency; SDE, simultaneous distillation-solvent extraction; VOC, volatile organic compound



This is responsible for the first line of detection of compounds in the surroundings. This trait was inherited from the ancient times when the localization of a threat (for example predators) was highly important to survive [8].

VOCs are emitted to the atmosphere by plants mediating a process of chemical communication between living organisms like herbivory, pollination, plant pathogenicity and allelopathy [10]. A remarkable characteristic of plant VOCs (aside from being part of essential oils) is the presence of scent properties. For this reason, they are employed in the flavor and fragrance industry to elaborate perfume and related cosmetic formulations [11].

*B. articulata* is a two wing stem shrub of the Caulopterae section, and is very common in south Brazil, northern and central Argentina, Paraguay, Bolivia and Uruguay [1]. *B. articulata* is broadly used by local populations for their digestive, hepatoprotective, diuretic, antirheumatic and anti-septic properties as well as for the treatment of numerous health disorders [1]. Moreover, *B. articulata* has been reported as antioxidant [12], anti-inflammatory [13] antiglycemic [14], antiviral [15], antimicrobial [16] and insect repellent [17], mostly due to aqueous extracts and essential oil [18]. In addition, there are many reports about *B. articulata* phytochemistry, being essential oils compounds [2, 3, 6, 19–21], flavonoids and clerodane type diterpenes [22] the main components.

GC with olfactometry (GC–O) uses the nose as a detection device in parallel to a physical–chemical detector (for example, flame ionization detector (FID) or mass spectrometric detector (MSD)) to obtain sensory and chemical response of aroma compounds and enables the identification of key odorants [23, 24]. GC–O has been extensively applied for the characterization of aroma impact compounds in a variety of matrices, mainly in food-related fields like wine, coffee, bread, tea, meat, cheese, mushrooms and fruits [25].

Nevertheless, very few works utilize GC–O to evaluate aromatic plants extracts and their essential oils. In the current work, we report key odorants of *Baccharis anomala* using GC–O to identify olfactory profile and GC–MS for chemical identification of volatile compounds [25]. This work used intensity and frequency of detection normalized to % scale by the formula of Dravnieks (1985) [26] to assess odorant compounds.

Sample preparation represents a critical step in the analytical procedure for the evaluation of volatile matrices, in particular for sensorial analysis. For analysis of volatile components, several extraction techniques, including simultaneous distillation-solvent extraction (SDE) [27] and SPME [29–31] have been used to different matrices. SDE, proposed by Godefroot [32], has been widely applied to analysis of volatile components in different samples. Although low recovery has been found for extracting the most volatile or heat-labile components, this technique has achieved higher recoveries and greater repeatability of volatile or semi-volatile and heat-stable components than other isolation technique such as SPME [28]. SPME is able to address the need for concentrating the components in the headspace [33]. Thus the

technique is more sensitive for the isolation of more volatile components than SDE, while less sensitive and with lower repeatability for the low volatiles than SDE.

Considering our objectives, and to select the best option to evaluate the volatile compounds representing male and female individuals in *B. articulata*, in this work we used the SDE as the extraction technique.

In addition, we report the aromatic notes and chemical profile of *B. articulata* male and female volatile extracts and the use of the results obtained as a tool for aroma differentiation between sexes. To our knowledge, this is the first report where such male/female distinction is made for GC–O experiments.

## 2 Material and methods

### 2.1 Plant material

*B. articulata*, at full flowering stage, was collected on November 2011 at a site (29 10' S 51 07' W) near Caxias do Sul (Rio Grande do Sul, Brazil). Aerial parts were carefully separated between male and female branches and extracted without drying. Voucher specimens were deposited at the herbarium of PUCRS (MPUC): *B. articulata* M. Minteguiaga. The taxonomic support was done by Prof. C. Mondin (PUCRS).

### 2.2 Extraction

The extraction procedure applied was the SDE using 120 g of fresh plant material. The experimental conditions were as reported by Zhu et al. (2008) [34]. The total time of extraction was 1 h to obtain a volatile extract that was stored at –20 C until analysis.

### 2.3 GC–MS analysis

The GC–MS analyses were performed on an Agilent 5975C MS system coupled with the gas chromatograph HP 6890 apparatus following the experimental conditions described by Xavier et al. (2013) [25]. The identification and quantification of volatile components was done by comparison of their linear retention indices (LRIs) on two columns of different polarity (determined in relation to a homologous series of *n*-alkanes) with those of pure standards or as reported in the literature. Comparison of fragmentation patterns in the mass spectra with those stored on databases [35, 36] was also performed. In the cases that pure reference compounds were not used, the identification was indicated as tentative. The percentages of each component were reported as area percentages of total compound amount in DB-5 column. Repeatability of the measuring system showed variation coefficients under 5% for all the components reported in Table 1.

**Table 1.** Percentage composition of the essential oil of *B. articulata* and linear retention indices (LRI) of the components

Compound <sup>a)</sup>	LRI <sup>b)</sup>		Identity assignment <sup>c)</sup>	% <sup>d)</sup>	
	DB-5	CW20M		Male	Female
hexanal	800	1063	A	0.69	0.13
(Z)-3-hexenol	850	1366	A	0.02	tr
(Z)-4-heptenal	893	1224	B	0.34	tr
nonane	900	900	A	0.02	0.10
heptanal	902	1167	A	0.03	tr
tricyclene	920	-	B	nd	tr
-thujene	925	1013	A	0.02	0.02
-pinene	931	1009	A	3.22	2.59
-fenchene	944	-	A	nd	0.01
camphene	946	-	A	0.03	0.03
benzaldehyde	959	1487	A	0.03	0.01
sabinene	973	1107	A	0.32	0.19
-pinene	979	1099	A	31.41	28.66
myrcene	992	1152	A	0.95	1.09
6-methyl-5-hepten-2-one	990	1146	A	nd	tr
decane	1000	1000	A	0.02	0.01
-3-carene	1003	1107	A	nd	tr
<i>p</i> -mentha-1(7),8-diene	1003	-	B	0.02	0.06
octanal	1004	1270	A	0.06	tr
-terpinene	1016	1162	A	0.05	0.04
<i>p</i> -cymene	1024	1249	A	0.03	0.03
limonene	1031	1186	A	12.92	13.05
1,8-cineole	1032	-	A	0.03	0.05
benzyl alcohol	1036	-	A	0.02	tr
(Z)- <i>o</i> -cimene	1039	1190	B	0.04	0.05
benzene acetaldehyde	1044	-	B	0.05	0.04
(E)- <i>o</i> -cimene	1050	1237	B	1.84	2.18
-terpinene	1058	1228	A	0.07	0.07
(Z)-sabinene hydrate	1068	-	A	0.02	0.02
(Z)-linalool oxide (furanoid)	1075	1448	B	0.03	tr
terpinolene	1087	1262	A	0.09	0.11
(E)-linalool oxide (furanoid)	1091	1446	B	0.04	0.01
linalool	1100	1527	A	0.16	0.16
nonanal	1105	1373	A	0.14	0.04
<i>endo</i> -fenchol	1112	-	B	0.02	0.03
(E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene	1117	-	C	0.25	0.13
(E)- <i>p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	1121	1643	B	0.13	0.09
(Z)- <i>p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	1136	-	B	0.05	0.03
(E)-pinocarveol	1137	1626	A	0.16	0.09
(E)- <i>p</i> -menth-8-en-1-ol	1141	1576	B	nd	0.03
camphene hydrate	1147	-	B	nd	0.03
citronellal	1148	1455	A	tr	0.01
pinocavone	1162	1535	B	0.10	0.06
<i>endo</i> -borneol	1165	-	A	nd	0.03
(Z)-pinocamphone	1174	1512	B	0.06	0.02
terpinen-4-ol	1177	1576	A	0.15	0.17
-terpineol	1177	1576	A	0.15	0.17
myrtenol	1185	1816	A	tr	0.02
(E)-piperitol	1190	1671	B	0.37	0.52
decanal	1196	1710	A	0.19	0.14
(E)-carveol	1200	1718	A	0.04	0.02
nerol	1207	1477	A	0.30	0.06
(Z)-3-hexenyl isovalerate	1219	-	C	0.05	0.03
neral	1230	-	A	nd	0.02
carvone	1238	1468	A	0.04	0.01
geraniol	1243	1650	A	nd	0.08

Table 1. Continued

Compound <sup>a)</sup>	LRI <sup>b)</sup>		Identity assignment <sup>c)</sup>	% <sup>d)</sup>	
	DB-5	CW20M		Male	Female
geranial	1244	-	A	nd	0.01
safrole	1257	1818	A	tr	0.05
(E)-pinocarvyl acetate	1272	-	B	nd	0.11
2-undecanone	1275	1837	A	0.57	0.07
carquejyl acetate	1288	1620	B	0.04	0.03
undecanal	1295	-	A	nd	0.01
vinyl guaiacol	1300	-	B	0.36	0.16
(2E,4E)-decadienal	1308	-	C	0.14	0.06
(Z)-3-hexenyl tiglate	1313	-	C	0.02	0.05
-elemene	1318	-	B	0.02	0.04
methyl anthranilate	1326	-	A	0.04	tr
-cubebene	1338	1460	B	0.05	0.06
eugenol	1341	-	A	0.03	0.02
-copaene	1350	-	B	0.04	0.04
-cubebene	1358	-	B	0.02	0.03
-elemene	1376	1472	B	0.18	0.20
methyl eugenol	1391	1517	A	0.20	0.12
-gurjunene	1393	1567	B	0.24	0.25
-cedrene	1406	1976	B	0.51	1.22
(E)-caryophyllene	1410	-	A	nd	0.03
-copaene	1413	-	B	nd	0.03
-guaiene	1421	1572	B	2.24	2.19
(E)-farnesene	1430	-	A	0.19	0.14
-humulene	1440	-	B	0.07	0.08
(E)-cadina-1(6),4-diene	1452	1643	B	0.07	0.07
-muurolene	1455	1641	B	0.21	0.18
dauca-5,8-diene	1476	1758	B	nd	0.19
-amorphene	1476	-	B	0.14	0.31
germacrene D	1485	1684	B	8.80	8.71
valencene	1488	-	B	0.05	0.13
(E)-muurola-4(14),5-diene	1494	-	B	0.10	tr
bicyclogermacrene	1500	1707	B	4.94	5.80
-muurolene	1502	1699	B	0.40	0.37
germacrene A	1507	-	B	0.15	tr
-bulnesene	1508	-	B	0.31	0.15
-cadinene	1516	-	B	0.39	0.50
cuparene	1520	-	B	0.10	0.13
-cadinene	1526	1732	B	1.35	1.30
(Z)-nerolidol	1528	1982	A	0.14	0.22
(E)-cadina-1,4-diene	1534	-	B	0.13	0.14
-cadinene	1540	-	B	0.06	0.07
-calacorene	1545	1882	B	0.29	0.12
elemol	1552	2048	B	nd	0.09
(E)-nerolidol	1557	2011	A	0.19	0.21
-calacorene	1566	-	C	0.16	0.11
germacrene D-4-ol	1570	2017	B	0.22	0.12
spathulenol	1582	2093	B	3.26	5.11
globulol	1588	2044	B	3.68	4.51
viridiflorol	1596	2054	B	2.26	1.23
ledol	1601	1997	B	0.58	0.40
muurola-4, 10 (14)-dien-1 -ol	1615	-	C	0.40	0.53
junenol	1622	-	B	nd	0.10
caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5 -ol	1632	2268	C	0.13	tr
cubenol	1641	2025	B	0.16	0.18
-cadinol	1646	2143	C	0.68	0.96
-cadinol	1650	2174	C	0.28	0.29

Table 1. Continued

Compound <sup>a)</sup>	LRI <sup>b)</sup>		Identity assignment <sup>c)</sup>	% <sup>d)</sup>	
	DB-5	CW20M		Male	Female
-cadinol	1652	2200	B	0.68	tr
-muurolol	1658	2162	B	0.72	1.02
cadalene	1678	-	C	0.11	0.14
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-ol	1692	2331	C	5.80	6.87
pentadecanal	1715	-	C	0.19	0.24
isobicyclogermacrenal	1740	-	B	nd	0.18
neophytadiene	1849	-	C	0.21	0.19
Total identified				96.02	95.96
Monoterpenes hydrocarbons				51.01	48.18
Oxygenated monoterpenes				2.00	2.02
Sesquiterpenes hydrocarbons				21.28	21.67
Oxygenated sesquiterpenes				19.11	21.91
Diterpenes				0.21	0.19
Aromatic compounds				1.25	1.44
Aliphatic compounds				1.16	0.55
Monoterpenes hydrocarbons				51.01	48.18

a) Peak identifications are based on comparison of LRI values on two columns with those from pure standards or reported in the literature [27, 28], and on comparison of MS with file spectra

b) Linear retention index are based on a series of n-hydrocarbons reported according to their elution order on DB-5.

c) A, identities confirmed by comparing mass spectra and retention time with those of authentic standards supplied by Aldrich (Milwaukee, WI) and Fluka (Buchs, Switzerland). B, identity tentatively assigned by comparing mass spectra with those obtained from Refs. [27, 28]. C, tentatively identified.

d) Relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages obtained by peak-area normalization, all relative response factors being taken as one

## 2.4 GC–O analysis

GC–O analyses were carried out on a Shimadzu GC-14B coupled to a Phaser Sniffing Port ODO-1 (SGE, Ringwood, Australia). The transfer line was kept at 250 °C. Nitrogen was used as auxiliary gas with a flow of 5 mL/min. The system was equipped with a humidifying device, which reduced nasal mucosa dehydration. Data were collected by GC EZChrom Software (Shimadzu, Columbia, USA). Analyses were performed on a HP-InnoWax (SGE, Australia) column (30 m x 0.32 mm id x 0.25 µm phase thickness). The temperature program was as follows: 40 °C (5 min), 40–100 °C (4 °C/min), 100–136 °C (6 °C/min), 136–220 °C (3 °C/min), 220 °C (10 min). The injector temperature was kept at 250 °C; split ratio 20:1. Injection volume: 0.5 µL (net oil), in splitless mode injection (1 min sampling time). Carrier gas: nitrogen (1 mL/min). Detector (FID), temperature was kept constant during analysis at 250 °C. A panel of six sensorial assessors composed of four females and two males (age 24–35 years) pertaining to the wine sensory panel of Facultad de Química-UdelaR carried out the sniffing of the volatile SDE extracts. Sniffing time was approximately 60 min and each assessor carried out one session per day. The panelists were asked to rate the intensity of the eluted aroma using a four-point category scale (0 = not detected; 1 = weak, hardly recognizable odor; 2 = clear but not intense odor, 3 = intense odor), half values being allowed [37]. The odorants taken as significant were

the ones in which at least three assessors sniffed. None of the assessors were anosmic and they all had vast experience in olfactometry.

The data processed were a mixture of intensity and frequency of detection (labeled as “modified frequency”, MF), which was calculated with the formula proposed by Dravnieks (1985) [26]:

$$MF \% = \left[ \frac{F \% \times I \%}{100} \right]^{1/2} \quad (1)$$

In which  $F$  (%) is the detection frequency of an aromatic attribute expressed as percentage and  $I$  (%) is the average intensity expressed as percentage of the maximum intensity. Odorants were taken into account if the MF value was higher than 40% [25]. The odorants were identified by comparison of their odors with Flavornet database [http://www.flavornet.org], chromatographic retention index in both HP-INNOWax and HP-5 column, and MS spectra with those of pure reference compounds.

## 3 Results and discussion

As can be seen in Table 1 and Fig. 1, male and female specimens showed a very complex chemical profile with slightly qualitative and quantitative differences between both sexes. In a previous work, Zunino *et al.* (2004) reported great differences in male and female *B. articulata* essential oil

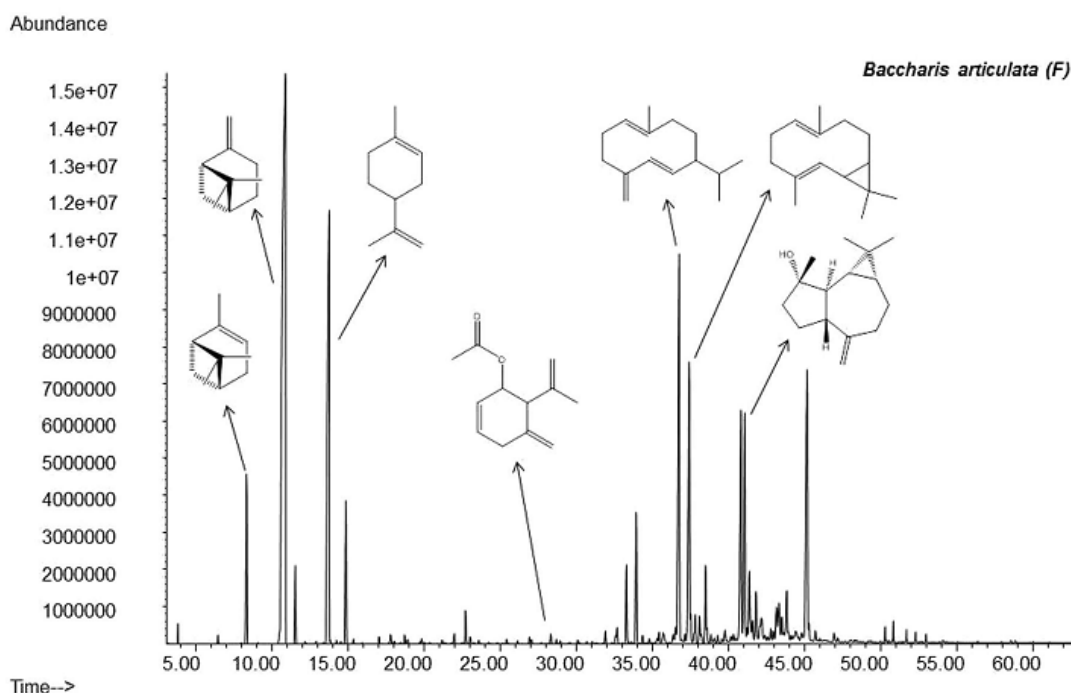


Figure 1. TIC chromatogram (DB 5) of *B. articulata* volatiles obtained by SDE.

composition [6]. These authors attribute the composition variation to the attractant role of pollinating insects to volatile compounds. In their work,  $\alpha$ -pinene was a distinctive compound with 14.7% presence in female essential oil composition and only 0.1% in male essential oil composition. Compounds such as spathulenol, (*E*)-nerolidol,  $\beta$ -caryophyllene and bicyclogermacrene were the most relevant of both oils and the relative differences in composition were not significant.

Our results showed a more complex volatile profile for *B. articulata* where  $\alpha$ -pinene (31.41 and 28.66% for male and female specimens, respectively), limonene (12.92 and 13.05%), germacrene D (8.80 and 8.71%), germacrene A (5.80 and 6.87%), bicyclogermacrene (4.94 and 5.80%) and spathulenol (3.26 and 5.11%) were the main compounds. The percentage of (*E*)-nerolidol, in our case, was small (0.19 and 0.21%). It is well known that environmental biotic and abiotic factors strongly influence the secondary metabolism expression [11], hence, the differences found in our work with respect to the works of Zunino et al. (2004, 1998) [6, 20] (plants collected in Córdoba, Argentina) may be assigned to those factors. In agreement with our results Simionatto et al. (2008) [15], Simoes Pires et al. (2005) [19] and Agostini et al. (2005) [21] reported very close essential oil chemical profiles for five populations of *B. articulata* of Rio Grande do Sul State. This behavior could indicate that the plants analyzed in the latter works and ours belong to the same chemotype, however, this situation evidence must be studied further.

Interestingly, we found a high composition on germacrene skeleton compounds such as germacrene D, germacrene A, bicyclogermacrene, germacrene A, germacrene D-4-ol and isobicyclogermacrene. All of them originate from germacryl cation and said fact would be of taxonomic and biosynthetic interest [38]. Carquejil acetate was found in both sexes, this compound is a monoterpene which was previously considered as a chemomarker for *B. trimera* [18]. Many authors have already reported essential oil composition of *B. trimera* without carquejil acetate [5]. Additionally, we have also recently found this compound in *Baccharis milleflora* (unpublished data). As can be seen in Table 2, GC–O sniffing experiments have led to the determination of a total of 46 odorants from which 34 were chemically identified. Male and female have shown very distinctive olfactory profile in spite of similar chemical profile presented in Table 1. For male specimens, 39 odorants were identified above 40% of MF, whilst for female only 20 odorants were identified with that MF value (Fig. 2). Furthermore, male odorants present higher MF values than female odorants, which was consistent with field observations of stronger smells emitted for male plants. This could explain why pollinating insects find male flowers first and then go to female flowers and exert the pollination process.

It is remarkable that there were not correlations between percentage composition and odor perception, and that it depended individually for each compound and its individual odor threshold [25]. It was the case of  $\alpha$ -pinene and limonene, main compounds of the extracts, which were not detected by

**Table 2.** M.F. values and odor description of the different odor-active compounds found in *B. articulata* male and females specimens

LRI <sup>a)</sup> CW20M	LRI <sup>a)</sup> DB-5	Compound <sup>b)</sup>	MF (%) <sup>c)</sup>		Aromatic description	
			Male	Female	Male	Female
1107	973	sabinene	58	nd	Woody	-
1152	989	myrcene	50	nd	Spicy, balsam-like	-
1237	1048	(E)- $\alpha$ -ocimene	73	53	Green, terpenic	Green, terpenic
1270	1003	octanal	62	nd	Green	-
-	-	nd	55	55	Green, nut	Green
-	-	nd	41	nd	Green, nut	-
1446	1083	(E)-linalool oxide (furanoid)	50	41	Floral, tea-like	Floral, tea-like
1487	963	benzaldehyde	50	nd	Almond, burnt sugar-like	-
-	-	nd	53	nd	Tea, nut	-
1512	1162	(Z)-pinocamphone	50	nd	Tea, new paper	-
1527	1099	linalool	58	62	Floral	Floral
1535	1161	pinocarvone	75	58	Sweet, herbal	Sweet, herbal
1567	1390	$\alpha$ -elemene	47	50	Herbal type	Herbal type
1572	1420	(E)-caryophyllene	71	41	Sweet, herbal	Sweet, herbal
1585	1107	hotrienol	53	nd	Green fresh	-
1596	1192	myrtenal	58	nd	Spicy type	-
1626	1140	(E)-pinocarveol	62	nd	Herbal type	-
1643	1180	(E)-p-mentha-2,8-dien-1-ol	41	nd	Fresh, minty	-
1664	1482	$\alpha$ -amorphene	55	nd	Green	-
1684	1481	germacrene D	69	41	Hay, woody	Hay, woody
1699	1476	$\alpha$ -muurolene	55	nd	Green	-
1707	1494	bicyclogermacrene	44	nd	Spiced	-
-	-	nd	47	nd	Butter, tea	-
1818	1255	geraniol	65	60	Sweet, floral	Sweet, floral
1837	1287	safrole	60	nd	Anise, floral	-
-	-	nd	67	nd	Sweet, anise	-
1882	1540	$\alpha$ -calacorene	44	nd	Woody type	-
1897	1567	palustrol	50	nd	Fruity	-
1944	1581	caryophyllene oxide	67	nd	Spice/herb-like	-
1948	1544	(Z)-nerolidol	41	nd	Floral, woody	-
1976	1402	methyl eugenol	62	nd	Spicy type	-
1997	1567	ledol	nd	47	-	Chemical, burnt
2054	1591	viridiflorol	76	55	Fruity, chemical	Fruity, chemical
2093	1576	spathulenol	60	67	Fruity	Fruity
-	-	nd	41	nd	Cooked vegetable	-
2143	1638	$\alpha$ -cadinol	60	nd	Spicy	-
2174	1636	$\beta$ -cadinol	nd	53	-	Spicy
2200	1652	$\gamma$ -cadinol	60	44	Herbal type	Herbal type like
-	-	nd	76	nd	Menthol, sweet, green	-
-	-	nd	nd	50	-	Woody, green
-	-	nd	nd	44	-	Green, fruity
2268	1640	caryophylla-4-(12),8(13)-dien-5-ol	nd	53	-	Woody
2331	1680	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-ol	62	50	Green	Green, floral
-	-	nd	nd	44	-	Woody
-	-	nd	53	nd	Honey, green	-
-	-	nd	nd	50	-	Chocolate

a) Linear retention reported according to their elution order on CW20M.

b) Compounds identification is based on Table 1.

c) MF, modified frequency.

olfactometry, because of the high odor thresholds for both compounds.

Stronger odorants found for male extract were viridiflorol (fruity, chemical), an un-identified compound (LRI<sub>Innowax</sub> =

2226) (menthol, sweet, green), pinocarvone (sweet herbal, burnt like), (E)- $\alpha$ -ocimene (green, terpenic), (E)-caryophyllene (sweet, herbal), germacrene D (hay, woody), an unidentified compound (LRI<sub>Innowax</sub> = 1859) (sweet, anise) and

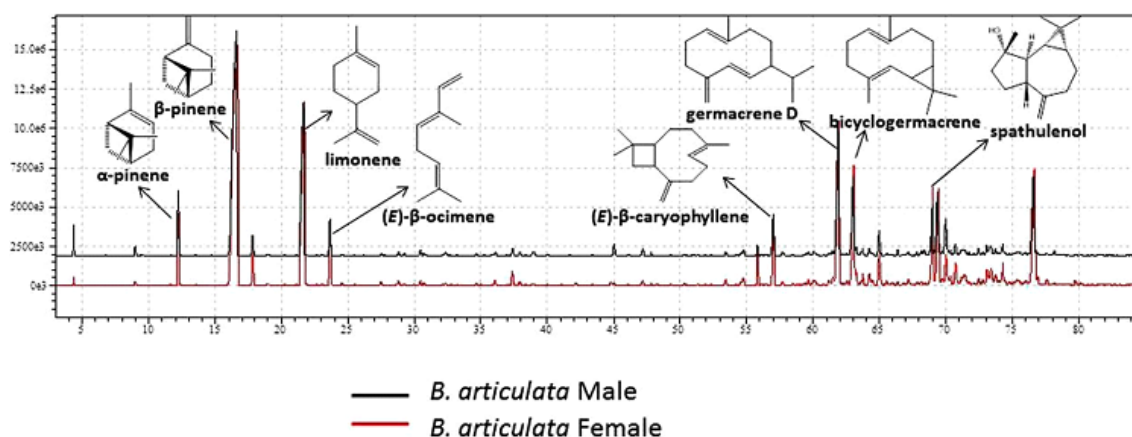


Figure 2. GC–O profile (HP-InnoW ax) of *B. articulata* volatiles obtained by SDE

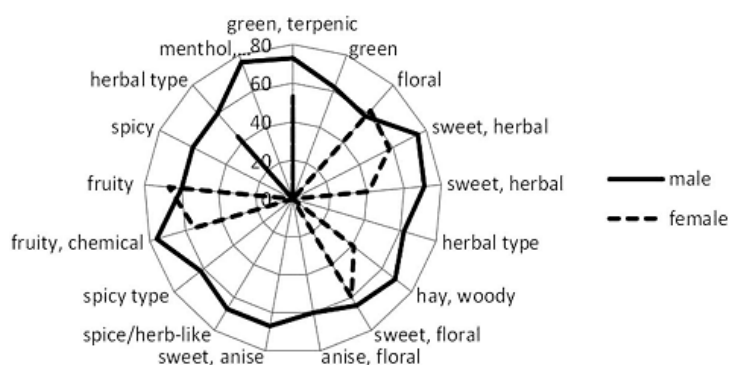


Figure 3. Aroma profiles of male and female specimens of *B. articulata*. The MF values given correspond to MF 60.

caryophyllene oxide (spice, herb-like). For female extract, the main odorants found were spathulenol (fruity), linalool (floral), geraniol (sweet, floral), pinocavone (floral, sweet herbal) and viridiflorol (fruity, chemical). The graphic representation for the main odorants (MF 60) is presented in Fig. 3 for both male and female specimens, including aromatic note and their respective responsible compounds. Figure 3 clearly shows the differences between male and female aromatic attributes. Male specimens presented a predominance of green (herb), fruity and sweet aromatic notes whilst female specimens were characterized by green and woody notes.

When the results found in the present study are compared with our previous study on *B. anomala* [25], key odorants, differences between aromatic descriptions of the same compounds were detected. Nonetheless, compounds like  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -elemene, germacrene D and spathulenol exhibited similar aromatic descriptors in both studies. Both studies were carried out with the same sensory panel showing that not only individual compounds are important for aromatic perception of volatile extracts as a whole, but matrix characteristics must also be considered.

#### 4 Concluding remarks

Although there is a growing body of theory surrounding sexual selection as it applies to plants [39], and although sexual selection is now often invoked as an explanation for the evolution of breeding systems and reproductive strategies, there have been few attempts to examine in detail the potential mechanisms underlying intrasexual competition and intersexual choice of plants. In general terms, the implications involve different aspects as the relative costs of pollen and seed production, the reproductive success of the male and female functions of plants, the form that male competition may take in higher plants and the elucidation of possible mechanisms of female choice.

Volatile components represent one of the most important factors to influence different behaviors in insects and animals, being reasonable to extrapolate the relative importance of volatiles in the interaction between plants. Although the available data do not permit us to state the importance of sexual selection in the evolution of plant reproductive characteristics, the use of complementary instrumental approaches, as those used in this work, allow to measure the VOCs contents, their differences and modifications, providing objective

results to explain the individual sexual behavior in the plants. In this study we demonstrate that male and female volatile extracts of *B. articulata* aerial parts obtained by simultaneous distillation-extraction technique showed a very similar chemical profile. On the other hand, great differences in aromatic profile were found: male plants exhibited the strongest odors in number and intensity of aromatic attributes and this might be of ecological significance in the attraction of pollinating insects. Further studies are needed to clarify the last implications.

*The authors wish to thank Prof. Claudio Mondin (PU-CRS) for herbarium support, to CAPES (Brazil), ANII and PEDECIBA (Uruguay) for financial support.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5 References

- [1] Freire, S. E., Urtubey, E., Giuliano, D. A., *Caldasia* 2007, 29, 23–38.
- [2] Ferracini, V. L., Paraiba, L. C., Leitao Filho, H. F., da Silva, A. G., Nascimento, L. R., Marsaioli, A. J., *J. Essent. Oil Res.* 1995, 7, 355–367.
- [3] Besten, M. A., Jasinski, V. C. G., Costa, A. G. L., Nunes, D. S., Sens, S. L., Wisniewski, A., Simionatto, E. L., Riva, D., Dalmarco, J. B., Granato, D., *J. Braz. Chem. Soc.* 2012, 23, 1041–1047.
- [4] Besten, M. A., Nunes, D. S., Granato, D., Sens, S. L., Wisniewski, A., Simionatto, E. L., Riva, D. J., *Essent. Oil Bear. Plants* 2014, 17, 899–905.
- [5] Lago, J. H. G., Romoff, P., Favero, O. A., Souza, F. O., Soares, M. G., Baraldi, P. T., Correa, A. G., *Biochem. Syst. Ecol.* 2008, 36, 737–740.
- [6] Zunino, M. P., Lopez, M. L., Zygadlo, J. A., Lopez, A. G., *J. Essent. Oil Res.* 2004, 16, 29–30.
- [7] Damasceno, F. C., Nicolli, K. P., Caramao, E. B., Soares, G. L. G., Zini, C. A., *J. Braz. Chem. Soc.* 2010, 21, 556–563.
- [8] Acena Munoz, L., *PhD Thesis*. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona 2011.
- [9] German J. B., Yeritzian, C., Tolstoguzov, V. B., in: Berger, R. G. (Ed.), *Flavor and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Springer Verlag, Berlin 2007, pp. 25–40.
- [10] Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C. C., Preston, C. A., *Science* 2006, 311, 812–815.
- [11] Evans, W. C., *Farmacognosia*, Interamericana-McGraw-Hill, 13<sup>th</sup> ed., Mexico D.F. 1991.
- [12] Vieira, T. O., Seifriz, I., Charao, C. C. T., deOliveira, S. Q., Creczynski-Pasa, T. B., *Braz. J. Pharmacog.* 2011, 21, 601–607.
- [13] Florao, A., Budel, J. M., Do Rocio Duarte, M., Marcondes, A., Rodrigues, R. A. F., Rodrigues, M. V. N., DeMoraes Santos, C. A., Weffort-Santos, A. M., *J. Essent. Oil Res.* 2012, 24, 561–570.
- [14] Kappel, V. D., Pereira, D. F., Cazaroli, L. H., Guesser, S. M., Blum da Silva, C. H., Schenkel, E. P., Reginatto, E. P., Silva, F. R. M. B., *Molecules* 2012, 17, 6754–6768.
- [15] Torres, C. V., Domínguez, M. J., Carbonari, J. L., Sabini, M. C., Sabini, L. I., Zanon, S. M., *Nat. Prod. Commun.* 2011, 6, 993–994.
- [16] Simionatto, E., Ilha, V., Mallmann, A. S., Porto, C., Dal-col, I. I., Morel, A. F., *J. Essent. Oil Res.* 2008, 20, 366–368.
- [17] Campos, A. C. T., Radunz, L. L., Radunz, A. L., Scariot, M. A., Reichert, F. J., Ecker, S. L., Mossi, A. J., *Cad. Agroec.* 2013, 8, 1–5.
- [18] Cariddi, L., Escobar, F., Sabini, C., Torres, C., Reinoso, A. C., Cristofolini, A., Comini, L., Nuñez Montoya, S., Sabini, L., *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 155–161.
- [19] Simoes Pires, C. A., Debenedetti, S., Spegazzini, E., Mentz, L. A., Matzenbacher, N. I., Limberger, R. P., Henriques, A. T., *Plant Syst. Evol.* 2005, 253, 23–32.
- [20] Zunino, M. P., Newton, M. N., Maestri, D. M., Zygadlo, J. A., *Planta Med.* 1998, 64, 86–87.
- [21] Agostini, F., Santos, A. C. A., Rossato, M., Pansera, M. R., Zattera, F., Wasum, R., Serafini, L. A., *Braz. J. Pharmacogn.* 2005, 15, 215–220.
- [22] Dai, J., Suttisri, R., Bordas, E., Soejarto, D. D., Kinghorn, D., *Phytochemistry* 1993, 34, 1087–1090.
- [23] Delahunty, C. M., Evres, G., Dufour, J. P., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 2107–2125.
- [24] Blank, I., in: R. Marsili (Ed.), *Flavor, Fragrance and Odor Analysis*, Marcel Dekker, New York 2002, pp. 297–331.
- [25] Xavier, V. B., Vargas, R. M. F., Minteguiaga, M., Umpierrez, N., Dellacassa, E., Cassel, E., *Ind. Crops Prod.* 2013, 49, 492–496.
- [26] Dravnieks, A., *Atlas of Odor Character Profiles*, ASTM Data Series DS 61, ASTM, Philadelphia 1985.
- [27] Selli, S., Cayhan, G. G., *Microchem. J.* 2009, 93, 232–235.
- [28] Cai, J., Liu, B., Su, Q., *J. Chromatogr. A* 2001, 930, 1–7.
- [29] Waseem, R., Hin Low, K., *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 483–501.
- [30] Adam, M., Cizkov'a, A., Eisner, A., Ventura, K., *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 764–772.
- [31] Stashenko, E., Martínez, J. R., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 2022–2031.
- [32] Godefroot, Sandra, P., Verzele, M., *J. Chromatogr. A* 1981, 203, 325–335.
- [33] Heravi, M. J., Sereshti, H., *J. Chromatogr. A* 2007, 1160, 81–89.
- [34] Zhu, M., Li, E., He, H., *Chromatographia* 2008, 68, 603–610.
- [35] McLafferty, F. W., Stauffer, D. B., *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, 5th ed., Wiley, New York 1991.
- [36] Adams, R. P., *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed., Allured, Carol Stream 2007.
- [37] Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., Ferreira, V., *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4501–4510.
- [38] Dewick, P. M., *Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*, 2nd ed., John Wiley and Sons, Chichester 2002.
- [39] Stephenson, A. G., Bertin, R. I., in: L. Real (Ed.), *Pollination Biology*, Academic Press, Orlando 1983, pp. 110–140.