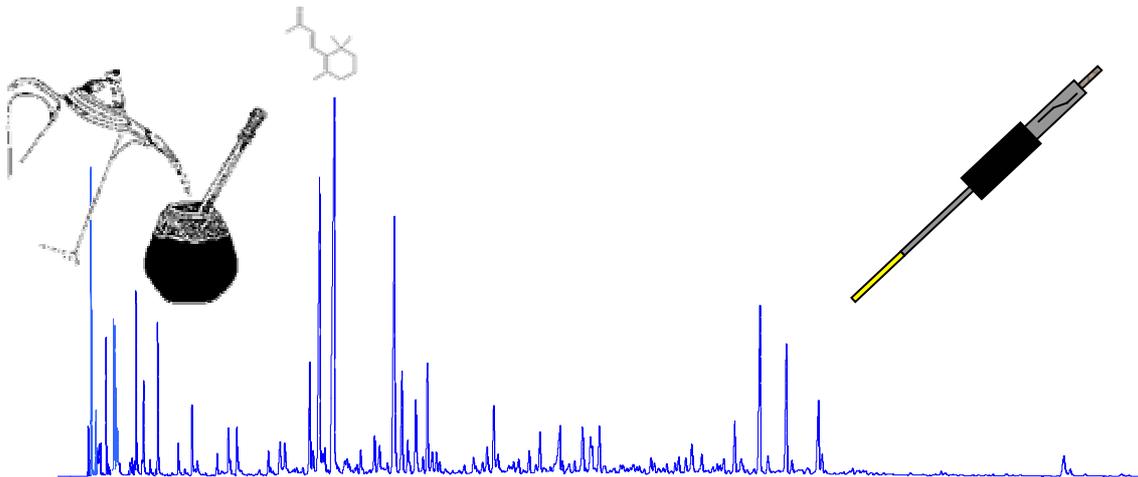




Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais

**Constituintes Voláteis e Semi-Voláteis da Erva-  
Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) por  
“Headspace”-Microextração em Fase Sólida-  
Cromatografia gasosa (HS-SPME-GC) –  
Uma Nova Metodologia Analítica.**



**HIRAM DA COSTA ARAÚJO FILHO**

Rio de Janeiro-RJ

2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Tese desenvolvida sob a orientação da  
Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan e da  
Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Maria Elisa Gonçalves de Lacerda  
para a obtenção do grau de Doutor em  
Ciências.**

Rio de Janeiro-RJ, março de 2005



**UFRJ**

**NÚCLEO DE PESQUISAS DE PRODUTOS NATURAIS**

Bloco H, CCS, 21941-590, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ

Tel./Fax (021) 2262-6791 / 2270-2683 e-mail: [posgrad@nppa.ufrj.br](mailto:posgrad@nppa.ufrj.br)

**“CONSTITUINTES VOLÁTEIS E SEMI-VOLÁTEIS DA ERVA MATE,  
Ilex paraguariensis ST.HIL. POR HEADSPACE/MICROEXTRAÇÃO EM  
FASE SÓLIDA/ CROMATOGRAFIA COM FASE GASOSA:  
UMA NOVA METODOLOGIA ANALÍTICA”**

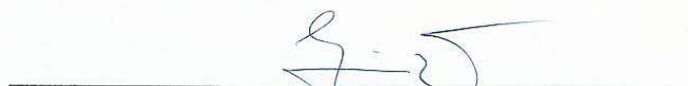
**HIRAM DA COSTA ARAUJO FILHO**

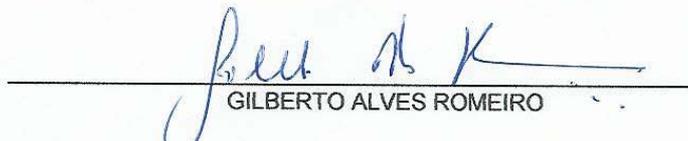
TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO NÚCLEO DE PESQUISAS DE PRODUTOS NATURAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Aprovada pelos Doutores:  
Rio de Janeiro, 23 de março de 2005.

  
\_\_\_\_\_  
MARIA AUXILIADORA COELHO KAPLAN

  
\_\_\_\_\_  
DAISE LOPES

  
\_\_\_\_\_  
FRANCISCO RADLER DE AQUIÑO NETO

  
\_\_\_\_\_  
GILBERTO ALVES ROMEIRO

  
\_\_\_\_\_  
ANTONIO JORGE RIBEIRO DA SILVA

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Araujo Filho, Hiram da Costa**

**Título: Constituintes Voláteis e Semi-Voláteis da Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) por “Headspace”-Microextração em Fase Sólida-Cromatografia gasosa (HS-SPME-GC) – Uma Nova Metodologia Analítica.**

**Rio de Janeiro. NPPN. UFRJ. 2005**

**Tese. Doutor em Ciências / Química de Produtos Naturais**

***Ilex paraguariensis***

***HS-SPME***

***Microextração em fase sólida***

***Headspace***

***DVB***

***Metodologia Analítica***

***Cromatografia gasosa***

***Erva-mate***

***Aroma***

***Chá***

***MATE***

***PDMS***

***Química***

***Tese***

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Elisa,  
o grande amor da minha vida,  
que me ajudou em todos os aspectos:  
amor, carinho, compreensão, orientação e  
incentivo.

# PENSAMENTO

As defesas de tese são tão assépticas!  
Tão puras e tão arrumadas.  
E ao mesmo tempo, tão distantes da realidade que as gerou!  
Elas não contam a história  
Dos fragorosos erros e geniais intuições  
Dos tropeções no escuro  
E do progresso sem método  
Dos inusitados acertos  
Ou do sofrimento e da vontade de desistir.  
Com início, meio e final feliz,  
As teses contam uma história que não ocorreu.  
As teses mentem.

*Reinaldo Carvalho Silva*

## AGRADECIMENTOS

À uma força poderosa, que sempre abre novas janelas na minha vida, a quem muitos como eu, chamam de Deus.

À minha família que me apoiou de todas as maneiras e concepções em todas as etapas da minha vida.

À Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Kaplan, com quem eu tive o privilégio de conviver, pela excelente orientação e, sobretudo pela amizade e confiança. Ficam expressos os meus mais profundos agradecimentos.

À Dr<sup>a</sup>. Daise Lopes e Dr. Humberto Bizzo pelos cromatogramas CG-EM obtidos na EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos e pelas valiosas sugestões e apoio logístico.

À Dr<sup>a</sup> Claudete Kunigami, Dr<sup>a</sup> Clarissa Perone e ao Marcos Gaertner pelos cromatogramas CG-EM obtidos no LANOI-INT.

Ao corpo técnico da Central Analítica do NPPN, em especial a Elenir (*in memoriam*) que me ensinou os primeiros passos com a técnica HS-SPME.

Ao colega M.Sc. Eduardo Azevedo pela valiosa ajuda na interpretação da metodologia de Análise dos Componentes Principais (ACP).

Ao colega Klaus Nietzsche da Emater-PR que colaborou no trabalho de extensão, fornecendo amostras de erva-mate cancheada originárias de diferentes tipos de cultivo e período de safra.

Ao Prof. Silvio Soriano pelas valiosas sugestões no decorrer do trabalho e pelo desenvolvimento de macros em Excel, que permitiram calcular os índices de retenção a partir dos muitos sinais presentes nos cromatogramas de um modo incrivelmente rápido.

Aos meus colegas do CEFET Química: Prof. Ademario Íris, Prof. Marcos Tadeu Couto, Prof. Jorge Fleming, Prof. Sidnei Quezada, Prof. Lucinéia Gomes, Prof. Ricardo Cassella e dentre tantos outros que me ajudaram com sugestões e palavras de incentivo.

À Lucia Helena e ao Vilmar pela agradável convivência e pela ajuda no que foi necessário durante o desenvolvimento do trabalho no Laboratório da Cotec-CEFET Química-RJ.

Ao Prof. Reinaldo Carvalho Silva (*in memoriam*) que foi o meu guru nesse plano e quiçá continuará sendo também em outros planos.

Ao NPPN em especial a Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Vera Patrocínio, Prof.Dr. Antonio Jorge e Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Sonia Costa que aprovaram o meu ingresso no curso de Doutorado e demonstraram total confiança.

Ao CEFET Química-RJ pelo uso das instalações e principalmente ao uso intensivo do cromatografo HP6890, além de total apoio logístico.

À FAPERJ pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

Lista de abreviaturas .....	<i>i</i>
Lista de Figuras .....	<i>ii</i>
Lista de Tabelas.....	<i>vi</i>
RESUMO.....	<i>viii</i>
ABSTRACT.....	<i>ix</i>

## INTRODUÇÃO

Erva-mate: aspectos fitoquímicos e sócio-econômicos .....	<i>1</i>
Análise do aroma da erva-mate .....	<i>9</i>
"Head Space"-Microextração em Fase Sólida (HS-SPME).....	<i>13</i>
Objetivos .....	<i>21</i>

## PARTE EXPERIMENTAL

Materiais.....	<i>22</i>
Preparação da amostra por HS-SPME .....	<i>23</i>
Análise Qualitativa .....	<i>25</i>
Planejamento fatorial.....	<i>25</i>
Análise de componentes principais.....	<i>26</i>
Curva de adição padrão .....	<i>26</i>

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Otimização das condições cromatográficas .....	27
Seleção das variáveis - planejamento fatorial .....	33
Condições de dessorção .....	35
Critérios para otimização das condições de extração .....	45
Efeito da quantidade de amostra .....	47
Efeito do tempo de pré-equilíbrio .....	49
Efeito do tempo de extração .....	54
Efeito da temperatura de extração.....	56
Efeito do tipo de cobertura de fibra .....	58
Comparação das amostragens seca e úmida.....	63
Precisão .....	74
Comparação do tipo de plantio e do período de safra .....	75
Identificação de alquilbenzenos Lineares (LAB) em amostras de mate tostado. ....	83
Análise de conservantes em amostras de bebidas comerciais de mate tostado. ....	98
Constituintes voláteis e semi-voláteis da Erva-mate e seus produtos correlatos .....	104
<b>CONCLUSÕES</b> .....	117
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	121
<b>ANEXO</b> .....	130

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DVB</b> .....	Divinilbenzeno
<b>CAR</b> .....	Carboxen
<b>PDMS</b> .....	Polidimetilsiloxano
<b>CW</b> .....	Carbowax
<b>CG</b> .....	Cromatografia gasosa
<b>CG-EM</b> .....	Cromatografia gasosa e detector de massas
<b>CLAE</b> .....	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
<b>HS</b> .....	Do inglês “Headspace” Espaço confinado;
<b>HS-SPME</b> .....	do inglês “Headspace – Solid Phase Microextraction” Microextração em Fase Sólida com amostragem no “headspace”;
<b>LAB</b> .....	do inglês “Linear Alkyl Benzenes” Alquilbenzenos lineares;
<b>SDE</b> .....	do inglês “Stream and Distillation Extraction” Extração e Destilação a Vapor;
<b>ACP</b> .....	Análise de Componentes Principais;
<b>E-nose</b> .....	do inglês “Eletronic Nose”; Nariz Eletrônico;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Formas de consumo da erva-mate cancheada e tostada. ....	4
Figura 02 - Consumo anual em toneladas/ano de erva-mate cancheada e tostada no Brasil (Tormen, 1995).4	
Figura 03 - Representação esquemática do processamento da erva-mate. ....	5
Figura 04 - Aparelhagem de extração e destilação a vapor (SDE) empregada na obtenção do aroma concentrado do mate cancheado e do mate tostado (Kawakami & Kobayashi, 1991). ....	10
Figura 05 - Cromatogramas do aroma concentrado do mate cancheado e do mate tostado, obtidos por SDE; (1) 1-penten-2-ol; (2) 2-butoxietanol; (3) linalol; (4) ácido hexanoico; (5) ácido octanoico; (6) ácido nonanoico; (Kawakami & Kobayashi, 1991). ....	11
Figura 06 - Equipamento básico para SPME, composto de seringa acoplada à fibra retrátil, suporte, frasco, “timer” e placa de aquecimento com agitação magnética. ....	14
Figura 07 - Dispositivo da fibra de SPME: (A) posição com a fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico de diâmetro externo 0,56 mm). (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da seção com recobrimento de 100 mm de espessura (Augusto e Valente, 2000). ....	15
Figura 08 - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para a análise por CG (Augusto & Valente, 2000). ....	15
Figura 09 - Representação esquemática do processo HS-SPME. ....	17
Figura 10- Avaliação preliminar das condições cromatográficas na coluna HP-5 obtidos com amostra de mate cancheado (MC) e três tipos de cobertura de fibra: A) PDMS/DVB; B) CAR/PDMS; C) PDMS. ....	28
Figura 11 - Avaliação preliminar das condições cromatográficas na coluna HP-INNOWAX obtidos com amostra de mate cancheado (MC) e três tipos de cobertura de fibra: A) PDMS/DVB; B) CAR/PDMS; C) PDMS. ....	28
Figura 12 - Avaliação preliminar das condições cromatográficas na coluna HP-5 obtidos com amostra de mate tostado (MT) e três tipos de cobertura de fibra: A) PDMS/DVB; B) CAR/PDMS; C) PDMS. ....	29
Figura 13 - Avaliação preliminar das condições cromatográficas na coluna HP-INNOWAX obtidos com amostra de mate tostado (MT) e três tipos de cobertura de fibra: A) PDMS/DVB; B) CAR/PDMS; C) PDMS. ....	29
Figura 14 - Comparação das áreas totais na coluna HP-5. ....	31
Figura 15 - Comparação das áreas totais na coluna HP-INNOWAX. ....	31
Figura 16 - Comparação da eficiência das fibras PDMS/DVB, CAR/PDMS e PDMS, usadas em HS-SPME, para diferentes classes de substâncias que constituem o aroma da erva-mate cancheada. 32	
Figura 17 - Comparação da eficiência das fibras PDMS/DVB, CAR/PDMS e PDMS, usadas em HS-SPME, para diferentes classes de substâncias que constituem o aroma da erva-mate tostada ..... 32	

Figura 18 - Cromatogramas das amostras MT e MC obtidos com “liner” SPME (0,75 mm) e “liner” convencional (2,0 mm), nas seguintes condições: $T = 80^{\circ}\text{C}$ ; $t_{pre} = 15$ min; $t_{ext} = 30$ min; $t_{inj} = 5$ min; $T_{inj} 280^{\circ}\text{C}$ , fibra CAR/PDMS.....	35
Figura 19 - Cromatogramas da amostra MC obtidos com a fibra PDMS/DVB em diferentes temperaturas do injetor na faixa 170 – 270°C.....	37
Figura 20 - Cromatogramas da amostra MC obtidos com a fibra CAR/PDMS em diferentes temperaturas do injetor na faixa 240 – 300°C.....	38
Figura 21 - Cromatogramas da amostra MC extraída a 80°C/50 min com PDMS/DVB, mostrando a dessorção em diferentes tempos na temperatura de 260°C.....	39
Figura 22 - Cromatogramas com ciclos de dessorção de 3 min a 280°C de amostra de mate cancheado após extração por HS-SPME com a fibra CAR/PDMS a 120°C e 60 min. ....	42
Figura 23 - Curvas de dessorção de cafeína em função do tempo com CAR/PDMS a 280°C; CAR/PDMS a 300°C; PDMS/DVB a 260°C e PDMS a 260°C.....	44
Figura 24 - Influência da quantidade de amostra na eficiência da HS-SPME com fibra DVB/CAR/PDMS para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate. ....	48
Figura 25a - Influência do tempo de pré-equilíbrio ( $t_{pre}$ ) na eficiência da HS-SPME com fibra DVB/CAR/PDMS para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate, considerando $t_{ext} = 5$ min, $T_{ext} = 80^{\circ}\text{C}$ ; 200 mg.....	51
Figura 25b - Influência do tempo de pré-equilíbrio ( $t_{pre}$ ) na eficiência da HS-SPME com fibra DVB/CAR/PDMS para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate, considerando $t_{ext} = 50$ min, $T_{ext} = 80^{\circ}\text{C}$ ; 200 mg.....	51
Figura 25c - Influência do tempo de pré-equilíbrio ( $t_{pre}$ ) na eficiência da HS-SPME com fibra DVB/CAR/PDMS para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate, considerando $t_{ext} = 60$ min; $T_{ext} = 80^{\circ}\text{C}$ ; 200 mg.....	51
Figura 26 - Cromatogramas obtidos em experiências adicionais com variação do tempo de pré-equilíbrio e a massa de amostra. Exp X: $t_{pre} = 15$ min; $m = 200$ mg. Exp Y: $t_{pre} = 15$ min; $m = 600$ mg. Exp W: $t_{pre} = 60$ min; $m = 600$ mg. Exp Z: $t_{pre} = 120$ min; $m = 600$ mg. Demais condições de extração: fibra DVB/CAR/PDMS a $T 80^{\circ}\text{C}$ ; $t_{ext} 60$ min; $t_{inj} 15$ min. As regiões do cromatograma nas quais surgem sinais das substâncias do grupo A, B, C e D encontram assinaladas.....	53
Figura 27 - Influência do tempo de extração ( $t_{ext}$ ) na eficiência de extração das fibras DVB/CAR/PDMS; CAR/PDMS; PDMS/DVB; CW/DVB e PDMS para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate, considerando $T_{ext} = 80^{\circ}\text{C}$ ; $t_{pre} = 15$ min; $m = 150$ mg. ....	55
Figura 28 - Influência da temperatura de extração na eficiência relativa HS-SPME com diferentes coberturas de fibras para quatro grupos de substâncias representativas do aroma da erva-mate. ....	57
Figura 29 - Cromatogramas típicos de amostra MC por HS-SPME com o uso de diferentes coberturas de fibra a 80°C e 60 min. O número dos sinais correspondentes aos principais analitos encontram-se na Tabela 10.....	60
Figura 30 - Comparação da recuperação ( $F_{ij}$ ) dos principais analitos do aroma da erva-mate pelas coberturas fibras CAR/PDMS; PDMS/DVB; DVB/CAR/PDMS.; CW/DVB e PDMS.....	61
Figura 31 - Influência da adição de NaCl na eficiência de extração para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate empregando a fibra DVB/CAR/PDMS.....	64

- Figura 32 - Influência da quantidade de amostra na eficiência de extração para quarto grupos de analitos do aroma da erva-mate por maceração empregando a fibra DVB/CAR/PDMS..... 65
- Figura 33 - Influência da temperatura de extração na eficiência de extração para quarto grupos de analitos do aroma da erva-mate por maceração empregando a fibra DVB/CAR/PDMS..... 65
- Figura 34 - Influência do tempo de extração na eficiência de extração para quarto grupos de analitos do aroma da erva-mate por maceração empregando a fibra DVB/CAR/PDMS..... 65
- Figura 35 - Cromatogramas da amostra MC1 obtidos por procedimentos HS-SPME seco e úmido . Em destaque os analitos que tiveram distinções mais significativas..... 67
- Figura 36 - Expansão da região dos Cromatogramas da amostra MC1 obtidos por HS-SPME a partir de procedimento úmido nas temperaturas 40°C, 60°C, 80°C e 100°C. Os analitos que tiveram distinções mais significativas encontram-se assinalados..... 68
- Figura 37 - Expansão da região dos Cromatogramas da amostra MC1 obtidos por HS-SPME a partir de amostragens secas 40°C, 60°C, 80°C, 100°C e 120°C. Os analitos que tiveram distinções mais significativas encontram-se assinalados..... 69
- Figura 38 - Curvas de resposta absoluta dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 2,4-heptadienal obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas..... 70
- Figura 39 - Curvas de resposta normalizada dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 2,4-heptadienal obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas..... 70
- Figura 40 - Curvas de resposta absoluta dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 3,5-octadien-2-ona obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas..... 71
- Figura 41 - Curvas de resposta normalizada dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 3,5-octadien-2-ona obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas..... 71
- Figura 42 - Curvas de resposta absoluta do linanol obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas..... 72
- Figura 43 - Curvas de resposta normalizada dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 2,4-heptadienal obtidas por HS-SPME a 80°C nos procedimentos úmido e seco, em função da massa de amostra..... 73
- Figura 44 - Gráfico de “loading”. Em destaque as variáveis principais. As curvas em azul e em vermelho correspondem a CP1 e CP2, respectivamente..... 79
- Figura 45 - Gráficos de escores para amostras de erva-mate cancheada em função do ano de coleta/processamento ou em função do tipo de plantio. A) considerando todas as trinta e uma variáveis B) considerando as cinco principais variáveis (ácido acético, (*E,Z*)-2,4-heptadienal, (*E,E*)-2,4-heptadienal, geranilacetona e  $\beta$ -ionona). safra 2000 em azul e safra 2003 em vermelho. Amostras oriundas dos tipos de cultivo: sombreado: 1, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 15, 16 e 17; céu aberto: 2, 3, 4, 9, 11, 14 e 18; plantio não determinado 10, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25... 81
- Figura 46 - Cromatogramas de amostras de mate tostado obtidos por HS-SPME nas seguintes condições:  $T$  80°C;  $t_{ext}$  60 min;  $t_{inj}$  15 min, :  $t_{pre}$  = 15 min; m = 150 mg..... 83
- Figura 47 - Expansão da região compreendida entre 45-75 min do cromatograma de uma amostra de mate tostado de uma amostra MT que não contém LAB..... 86
- Figura 48 - Expansão da região compreendida entre 45-75 min do cromatograma de uma amostra de mate tostado de uma amostra MT que contém LAB..... 86

Figura 49 - Cromatogramas da amostra MT contaminada por LAB obtidos por diferentes processos de extração HS-SPME: amostragens seca, úmida e a partir do chá da mesma erva.....	88
Figura 50 - Formação de LAB a partir de decomposição térmica de LAS.....	89
Figura 51 – Cromatograma obtido a partir de uma amostra de Chá Preto contaminado com LAB. ....	90
Figura 52 - Influência do tempo na extração por HS-SPME de amostra MT contaminada com LAB empregando a fibra PDMS a 100°C/100 mg.....	93
Figura 53 - Influência da massa na extração por HS-SPME de amostra MT contaminada com LAB empregando a fibra PDMS a 100°C/30 min.....	93
Figura 54 - Curva adição padrão <u>A</u> com volumes de solução padrão de LAB variados. ....	96
Figura 55 - Curva adição padrão <u>B</u> com volumes de solução padrão de LAB constantes.....	96
Figura 56 - Influência da adição de etanol na resposta dos LABs extraídos por HS-SPME. ....	97
Figura 57 – Curvas de calibração dos conservantes (ácidos benzoico e sorbico).....	99
Figura. 58 -Cromatogramas de amostras de mate pronto obtida no comercio local ajustada a diferentes valores de pH. Os sinais dos conservantes (ácidos sórbico e benzóico) estão assinalados no gráfico obtido a pH 4,0.....	101
Figura 59 – Influência do pH na extração dos conservantes (ácidos sórbico e benzóico) por HS-SPME em amostra de mate pronto comercialmente disponível.....	102
Figura 60 - Curva de log resposta (área) x pH de ácidos sórbico e benzóico extraídos de uma amostra MP por HS-SPME em várias condições de pH.....	103
Figura 61 - Curvas simuladas de log $\alpha_{HA}$ x pH. ....	103
Figura 62 - Cromatograma CG-EM da amostra MC 1 obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 80°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 150 mg.....	107
Figura 63 - Cromatograma CG-EM da amostra MC 1 obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 120°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 150 mg.....	107
Figura 64 - Cromatograma CG-EM da amostra MC 2 obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 80°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 150 mg.....	108
Figura 65 - Cromatograma CG-EM da amostra MC 2 obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 120°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 150 mg.....	108
Figura 66 - Cromatograma CG-EM da amostra MC 2 a partir do extrato obtido por SDE.....	108
Figura 67 - Cromatograma CG-EM da amostra MT 1 obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 80°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 150 mg.....	109
Figura 68 - Cromatograma CG-EM da amostra MT 2 obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 80°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 150 mg.....	109
Figura 69 - Cromatograma CG-EM da amostra MT 3 obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 80°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 150 mg.....	109
Figura 70 - Cromatograma CG-EM da amostra MT 3 obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 120°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 150 mg.....	110

Figura 71 - Cromatograma CG-EM da amostra MS obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 80°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 150 mg.....	110
Figura 72 - Cromatograma CG-EM da amostra MP obtido por HS-SPME nas condições $T_{ext}$ 80°C; $t_{pre}$ 15 min; $t_{ext}$ 60 min; 1 mL; 0,35g NaCl; pH 8.....	110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Processos de industrialização da erva-mate e seus produtos. ....	6
Tabela 02 – Percentual das áreas dos sinais relacionados com os componentes principais do aroma concentrado do mate cancheada e do mate tostado obtido por SDE (Kawakami & Kobayashi, 1991). ....	12
Tabela 03 – Principais fibras comercialmente disponíveis para HS-SPME (Augusto & Valente, 2000).....	16
Tabela 04 – Condições operacionais para experiências de otimização univariadas. ....	24
Tabela 05 – Condições operacionais da série de experiências feitas no planejamento fatorial. ....	25
Tabela 06 – Resultados obtidos com planejamento fatorial saturado ( $2_{II}^{6-3}$ ).....	34
Tabela 07 – Relação das fibras utilizadas neste trabalho e as respectivas temperaturas operacionais. ....	36
Tabela 08 – Eficiência de dessorção $AN_i$ % material total dessorvido, após ciclos de 3 min, das fibras e condições de dessorção indicadas.. ....	43
Tabela 09 – Eficiência de dessorção $AN_i$ % de cafeína dessorvida após ciclos de 3 min das fibras e condição de dessorção indicadas.....	43
Tabela 10 - Índices de retenção ( $I$ ) dos analitos selecionados a partir do aroma da erva-mate cancheada obtido por HS-SPME-GC.....	46
Tabela 11 – Valores de coeficiente de variação (CV) estimados por experiências em triplicata com as fibras estudadas nos procedimentos seco e úmido. ....	74
Tabela 12 – Amostras de erva-mate cancheada analisadas em função do tipo de cultivo (sombreado ou céu aberto) e do período de safra (2000 e 2003). ....	77
Tabela 13 - Valores das áreas dos sinais dos vinte e quatro analitos oriundos do aroma do mate cancheado por HS-SPME utilizados na análise dos componentes principais. As identificações de cada das vinte e cinco amostras analisadas encontram-se na Tabela 10.....	78
Tabela 14 - Identificação dos principais componentes do LAB por cromatografia gasosa nas condições cromatográficas utilizadas neste trabalho.....	85

Tabela 15 - Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico, para análise de LAB nas condições de programação de temperatura do forno da coluna: 40°C/4min; 2°C/min até 180°C/2min totalizando 84 min de corrida. ....	91
Tabela 16 - Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico, para análise de LAB nas condições de programação de temperatura do forno da coluna: 100°C; 4°C/min até 200°C totalizando 30 min de corrida.....	92
Tabela 17 - Parâmetros de extração por HS-SPME escolhidos para análise quantitativa de LABs em amostra de mate tostado. ....	94
Tabela 18 - Condições das curvas de adição padrão de LAB em uma amostra de mate tostado.....	95
Tabela 19 - Resultados da análise por regressão linear das curvas de adição padrão de LAB. ....	95
Tabela 20 – Constituintes voláteis e semi-voláteis de diferentes produtos da erva-mate e em diferentes temperaturas.....	111-115
Tabela 21 - Relação das substâncias identificadas por HS-SPME, oriundas de sangramento da fibra ou de resíduo de material plástico. ....	116
Tabela 22 - Percentagem de área de substâncias voláteis e semi-voláteis, além de contaminantes, resíduos de embalagens e produtos de sangramento da fibra, identificadas nos cromatogramas das amostras indicadas.....	116
Tabela 23 - Relação de algumas substâncias voláteis e semi-voláteis da erva-mate identificadas por HS-SPME-GC e seus respectivos índices de retenção e formulas estruturais. ....	130

## RESUMO

O chá da erva-mate, ou simplesmente mate, é uma bebida tradicionalmente consumida em diversos países da América do Sul. O mate é preparado por extração de folhas e ramos secos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) com água fria ou quente, denominadas respectivamente tereré e chimarrão (MC) ou na forma de chá-mate a partir do produto tostado (MT). O controle da qualidade dos diversos produtos da erva-mate demanda novos métodos analíticos. Neste trabalho foi desenvolvida uma nova metodologia para analisar os componentes voláteis e semivoláteis da erva-mate e seus produtos correlatos por microextração em fase sólida com amostragem no “headspace” acoplada à cromatografia gasosa (HS-SPME-GC). O procedimento HS-SPME foi avaliado para cinco fibras (PDMS/DVB; CW/DVB; CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS e PDMS) e os seguintes parâmetros foram estudados: quantidade de amostra; tempo de pré-equilíbrio; tempo e temperatura de extração; tempo e temperatura de dessorção; assim como a força iônica. Os procedimentos de amostragem, seco e úmido, foram comparados e a influência da temperatura e da umidade da matriz na alteração da área do linalol e na conversão do (*E,Z*)-2,4-heptadienal e da (*E,Z*)-3,5-octadien-2-ona nos isômeros (*E,E*) correspondentes, foi investigada. HS-SPME-GC associada à análise dos componentes principais (ACP) foi empregada para discriminar e classificar 25 amostras de erva-mate cancheada (MC) oriundas dos tipos de cultivos, sombreado e a céu aberto, e de safras mais antigas (2000) e mais recentes (2003). Esse processo analítico foi também utilizado para identificar 19 fenilcanos lineares (LAB) em amostras de erva-mate tostada (MT) e avaliar o teor desses contaminantes por adição padrão. O efeito da variação do pH foi avaliado em bebidas comerciais de mate tostado (MP) e seus conservantes, ácido benzóico e ácido sórbico, foram extraídos por HS-SPME e quantificados por padronização externa. A metodologia proposta neste trabalho possibilitou ainda a identificação de 181 substâncias voláteis e semivoláteis da erva-mate e seus produtos correlatos.

## ABSTRACT

The herb maté tea, or simply maté, is a traditionally consumed beverage in many South American countries. It is prepared by cold or hot aqueous extraction of dry leaves and twigs from *Ilex paraguariensis* St. Hil, (Aquifoliaceae), leading to the tereré and the chimarrão (MC), respectively, or leading to the roasted maté tea (MT). Quality control of maté products demands new analytical methods. In this research, a new methodology was developed in order to analyze the volatile and semi-volatile components of herb maté and its related products. The proposed methodology was based on Headspace Solid Phase Microextraction Gas Chromatography (HS-SPME-GC). The HS-SPME procedure was evaluated for five fibers (PDMS/DVB; CW/DVB; CAR/PDMS; DVB/CAR/PDMS and PDMS) and the optimization procedures was carried out analyzing the following parameters: sample mass; equilibration time; extraction time and temperature, desorption time and temperature as well as ionic strength. The sampling procedures, dry / wet, were compared and the influence of temperature and humidity on linalool peak area formation and (*E,Z*)-2,4-heptadienal and (*E,Z*)-3,5-octadien-2-one conversion to (*E,E*) related isomer was investigated. HS-SPME-GC associated with Principal Component Analysis (PCA) was used to discriminate and classify 25 MC samples from shaded / unshaded and older (2000) / new (2003) cultivation. This methodology was also used to identify 19 linear alkylbenzene derivatives (LAB) in roasted mate samples and to establish the amount of these contaminants using standard addition. The pH effect was investigated in commercial beverages of maté tea samples and their preservatives, benzoic acid and sorbic acid, were extracted by HS-SPME and quantified by external standardization. The analytical procedure developed in this work made possible the identification of 181 volatile and semi-volatile compounds in samples of MC, MT, soluble maté (MS) and beverage maté tea ready for consumption (MP).

---

# INTRODUÇÃO

---

## **Erva-mate: Aspectos fitoquímicos e sócio-econômicos.**

O chá da erva-mate ou simplesmente mate é uma bebida tradicionalmente consumida em diversos países da América do Sul. O mate é preparado por extração de folhas e ramos secos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) com água quente ou fria, denominadas respectivamente Chimarrão e Tereré, ou na forma de chá-mate a partir do produto tostado. A descoberta da erva-mate pela civilização ocorreu no século XVI no Paraná, onde foi travado o primeiro contato com Índios Guaranis que possuíam o hábito de beber o chá da erva-mate. Esse chá era preparado por infusão de folhas picotadas da planta dentro de uma cuia e ingerido através de um canudo de taquara, em cuja base havia um trançado de fibras para impedir a passagem de partículas sólidas. O nome científico *Ilex paraguariensis* foi dado pelo naturalista Francês Auguste de Saint Hilaire em 1822.

O mate é uma bebida estimulante e saudável. Elimina a fadiga e atua benéficamente sobre os nervos e músculos favorecendo o trabalho intelectual, principalmente devido à ação da cafeína. A ação estimulante do mate é mais prolongada que a do café não deixando, porém, efeitos colaterais ou residuais como irritabilidade e insônia. O consumo de mate favorece o aproveitamento do açúcar nos músculos e nervos, devido a influência das vitaminas do complexo B. A presença de sais minerais, juntamente com a cafeína, ajuda no trabalho cardíaco e na circulação do sangue diminuindo a tensão arterial (VALDUGA *et al.*, 2003). O mate favorece também a diurese, tem efeito digestivo e pode ser usado para suprir a sensação de fome (MAZZAFERA, 1997; CRUZ, 1982; GRAHAM, 1984). Além disso, o mate é uma fonte importante de substâncias antioxidantes e algumas das propriedades terapêuticas dessa planta são atribuídas aos altos teores de polifenóis que contém (FILLIP *et al.*, 2000; SCHINELLA *et al.*, 2000). Mais recentemente, o extrato de erva-mate mostrou atividades citotóxica e de inibição de topoisomerase II, que pode contribuir para atividade quimiopreventiva do câncer (MEJIA *et al.*, 2004).

Por outro lado, o uso do chimarrão tem sido associado como possível causa de câncer esofágico na América do Sul, onde elevadas taxas de incidência são observadas numa área que inclui o sul do Brasil, Uruguai e nordeste da Argentina (MUÑOZ *et al.* 1987; PARKIN *et al.* 1993; PROLLA *et al.* 1993; ROLÓN *et al.* 1993). Entretanto, ainda não há comprovação da ação carcinogênica dos extratos, em água e em álcool, de *Ilex*

*paraguayensis*. Pesquisas mais recentes mostraram que a temperatura elevada do mate consumido por essas populações, intensificam a incidência de carcinogênese esofágica, especialmente quando associada ao consumo de álcool e tabaco (BARROS *et al.* 2000; PROLLA *et al.* 2000).

A erva-mate ocorre naturalmente em países do cone sul da América Latina (Brasil, Argentina e Paraguai). Cerca de 80% da área de ocorrência pertencem ao Brasil, distribuindo-se entre os Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No Brasil, estende-se desde a latitude de 21° até 30°S, e longitudes de 48°30' até 56°10'W, correspondendo a uma superfície aproximada de 540.000 Km<sup>2</sup> (OLIVEIRA. & ROTTA, 1985). O setor ervateiro no Brasil está distribuído em cerca de 450 municípios, onde a erva-mate é cultivada e produzida em torno de 180 mil propriedades sendo a maioria delas de natureza familiar. Essa atividade congrega mais de 700.000 empregos e cerca de 750 empresas com uma produção anual aproximada de 650.000 toneladas de folhas e constituindo uma das principais fontes de renda e de emprego, especialmente para pequenos e médios produtores (MACCARI *et al.*, 2000).

A exploração da erva-mate é uma atividade agrícola de grande importância sócio-econômica no âmbito do Mercosul. Além disso, a exploração da erva-mate tem também grande importância ambiental, pois parte da produção de erva-mate origina-se em ervais nativos onde não se aplicam produtos químicos como defensivos agrícolas. A erva nativa representa a erva-mate colhida em condições de floresta e as demandas industriais para esse tipo de erva acentuaram-se sobremaneira nos últimos anos (MAZUCHOWSKI, 2000). Nos ervais plantados a céu aberto, pelo fato da produção destinar-se à fabricação de bebidas, o uso de defensivos agrícolas também é desaconselhado. Esse tipo de plantio (a céu aberto) tem também grande importância, pois os sistemas de produção da erva-mate solteiro e intercalado com culturas anuais proporcionam condições para que o produtor se mantenha na atividade produtiva, evitando o seu êxodo para o meio urbano (ANDRADE, 1999).

O chá estimulante da erva-mate, conhecido popularmente como chimarrão, apresenta uma forma tradicional de ser preparado e consumido com água quente em torno de 68° C. O recipiente de consumo são cuias de porongo, madeira ou em cristal. A erva-mate ocupa em média, dois terços da capacidade total da cuia e é sorvida com auxílio de

uma bomba. O consumo de erva-mate para chimarrão, ainda hoje, apresenta-se limitado às regiões onde é produzida e seu uso na forma de produtos regionais e tradicionais faz parte da cultura dessas populações (ESMELINDRO *et al.*, 2002).

O tereré é semelhante ao chimarrão, no entanto, a erva-mate é ligeiramente torrada e deixada em repouso durante cerca de oito meses em local seco para só então ser consumido com água fria. O recipiente usado para se colocar a erva é a guampa, que é um chifre cortado ao meio e preparado para ser utilizado como um copo. A bomba é o instrumento por onde o mate será sugado e geralmente é usada a de tubo chato, que se adapta melhor ao bocal da guampa, podendo ser substituída pela de tubo redondo do chimarrão (CLUBE DO TERERÉ, 2005).

A erva-mate é comercializada também na sua forma tostada e tem ampla aceitação em todo o território nacional. O chá mate tostado é um produto genuinamente brasileiro e sua produção vem evoluindo. Atualmente é apresentado ao mercado consumidor nas mais variadas e sofisticadas formas: a tradicional embalagem contendo as folhas trituradas e soltas; o mate em saquinhos contendo doses individuais ("tea bags"); o mate concentrado na forma líquida; o mate solúvel; e embalagens contendo chá mate tostado pronto para o consumo, puro ou misturado com outros chás (Figura 01).

Os Estados da região Sul do Brasil são os maiores produtores e consumidores da erva-mate cancheada para chimarrão. O maior produtor é o Estado do Paraná por causa da existência de florestas com araucária ou pinheiro, que por sua vez é o habitat natural da erva-mate. O Estado do Rio Grande do Sul é tradicionalmente o principal consumidor de chimarrão e ultimamente tem aumentado a sua produção a partir de ervais cultivados (Figura 02). A erva mate tostada em forma de chá, possui grande potencial de penetração nos estados mais quentes do país. A região Sudeste é a maior consumidora de chá mate industrializado do Paraná, absorvendo em média mais de 60% do total da produção exportada para outros estados. O consumo de mate tostado é significativamente maior no Estado do Rio de Janeiro (Figura 02), onde nasceu o hábito de consumir chá-mate gelado puro ou misturado com suco de limão nas praias cariocas. Em outros estados observa-se um crescente aumento no consumo de mate tostado. Essa tendência de aumento de consumo da erva-mate é também observada em outros países como Chile, Síria, Alemanha, Japão e Estados Unidos (TORMEN, 1995).



Figura 01 - Formas de consumo da erva-mate cancheada e tostada.

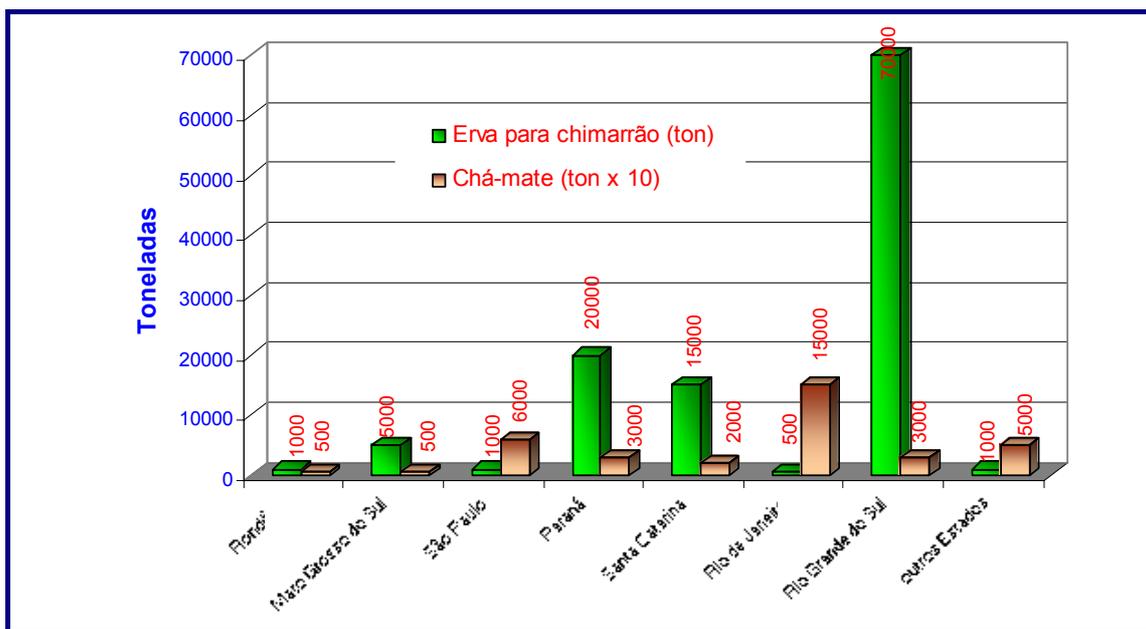


Figura 02 - Consumo anual em toneladas/ano de erva-mate cancheada e tostada no Brasil (TORMEN, 1995).

O processamento da erva-mate para chimarrão consiste basicamente de três etapas: sapeco, secagem e cancheamento (Figura 03). O sapeco é realizado junto ao fogo direto e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas do sapecador. O equipamento consiste de um cilindro metálico, perfurado e inclinado através do qual a erva colhida passa recebendo as chamas. Essa etapa tem por função a retirada da umidade superficial e inativação de enzimas (peroxidase e polifenoloxidase) que

causam a oxidação do produto. A temperatura média da erva na entrada do sapecador é de 400°C e na saída é de 65°C, o tempo de residência oscila em torno de oito minutos. A etapa de secagem pode ser realizada em dois tipos de secadores: mecânico - rotativo e de esteira. A principal diferença entre os dois tipos de secadores está relacionada com o contato da matéria-prima com a fumaça durante o processo de secagem. No secador rotativo, a fumaça entra em contato direto com o produto, e no secador de esteira, o contato é indireto, causando menores danos à matéria-prima. O tempo de residência e a temperatura média da erva nos secadores dependem das características operacionais de cada um. No secador de esteira, o tempo médio é de 3 horas e a temperatura varia entre 90°C e 110°C. No secador rotativo, o produto permanece em contato direto com a fumaça por aproximadamente 30 minutos. No entanto, a temperatura não apresenta a mesma uniformidade da utilizada no secador de esteira, sendo que na entrada do secador a temperatura média é de 350°C e na saída 110°C. O cancheamento consiste na trituração da erva após o processo de secagem. Em seguida, a erva é peneirada e o material coletado passa a denominar-se erva cancheada. Esta pode ser usada diretamente como matéria-prima para a produção de chás ou, após passar por um processo de soque, como chimarrão (ESMELINDRO *et al.*, 2002). A Figura 03 mostra a Representação esquemática do processamento da erva-mate e os diversos produtos derivados.

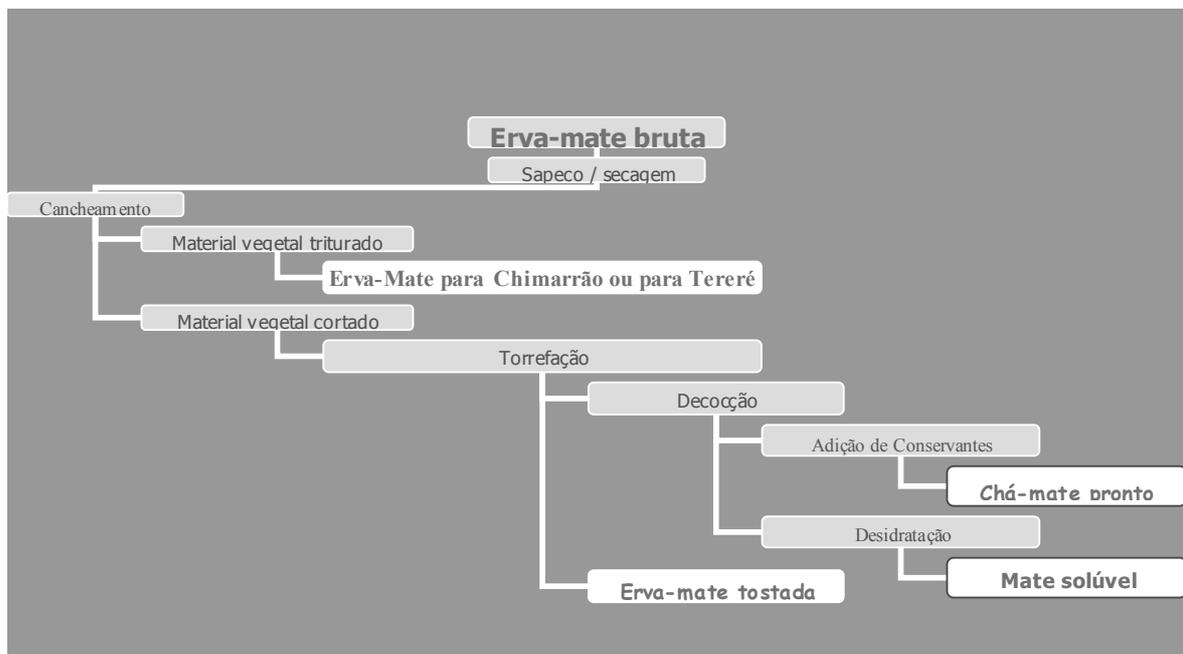


Figura 03 - Representação esquemática do processamento da erva-mate.

O sistema de processamento industrial da erva-mate é um fator importante para determinar a qualidade do produto e as suas características sensoriais. Cabe salientar que não menos importantes são os fatores naturais de clima e de solo que interferem diretamente nos componentes físico-químicos, e conseqüentemente, nas características sensoriais da erva-mate (PARANÁ, 2000; ESMELINDRO *et al.*, 2002). Uma noção de todo o potencial da planta como alimento é obtida através da caracterização da composição química da erva-mate. O detalhamento da composição química do produto é de fundamental importância, levando em consideração usos e aplicações atuais, bem como o fornecimento de opções para novos estudos e produtos. Além das novas possibilidades, ainda há muito a ser aprimorado com relação ao controle da qualidade dos produtos tradicionais. A busca de novos mercados para o mate, requer certificação como produto limpo. Os consumidores dos países desenvolvidos, com maior exigência de qualidade, pagam sobre-preço de até 30% para que sejam atestados como produtos limpos por instituições com credibilidade internacional (MEDRADO, 1997). Quanto a diferenciação de preços pagos entre a erva-mate “nativa” e a “cultivada” e/ou “forte” e a “suave”, a diferença média é de 50% a mais sobre o preço para erva-mate “nativa” e/ou “suave” com relação as demais (VALDUGA *et al.*, 2003). Na medida em que o mercado da erva-mate for ampliado, as exigências no padrão da qualidade dos produtos serão cada vez maiores. A Tabela 1 relaciona os processos de industrialização da erva mate e os diversos produtos gerados (ANTONI, 1995).

Tabela 01 – Processos de industrialização da erva-mate e seus produtos.

<b>Etapas</b>	<b>Produtos</b>
<b>(1) recebimento</b>	Erva-mate bruta
<b>(2) sapeco e secagem</b>	Erva-mate ressecada e quebrada
<b>(3) cancheamento</b>	Cancheada não padronizada Cancheada padronizada
<b>(4) torrefação</b>	Chá-mate tostado
<b>(5) torrefação / desidratação</b>	Chá-mate solúvel
<b>(6) armazenagem, embalagem e distribuição</b>	Todos os produtos comerciais

Diante deste quadro, a caracterização química e, por conseguinte, a identificação dos fatores ambientais, a tecnologia de cultivo empregada e as condições de processamento de seus produtos e derivados vêm assumindo importância crescente. O estabelecimento de técnicas de controle da qualidade e desenvolvimento de novos produtos foi um dos principais temas abordado nos dois últimos Congressos Sul-americano da Erva Mate, realizados respectivamente em Encantado-RS (2000) e em Chapecó-SC (2003). Em 1998, a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde aprovou o regulamento técnico para a fixação de identidade e qualidade para compostos da Erva-mate (BRASIL, 1998). Apesar disso tudo, os padrões de identidade e qualidade (marcadores químicos) para os diferentes produtos da erva-mate ainda não foram bem estabelecidos.

A cafeína é uma das substâncias orgânicas mais importantes da erva-mate e contribui para o sabor amargo característico desse produto. Desde a descoberta da presença de cafeína e de teobromina em extratos de mate, no século XIX, diversos trabalhos foram publicados sobre o teor desses alcalóides purínicos. Por exemplo, os teores de cafeína e de teobromina encontrados em folhas de mate foram de 0.9-1.7% e 0.5-0.9%, respectivamente (CLIFFORD & RAMIREZ-MARTINEZ, 1990). A cafeína é um importante marcador da qualidade para bebidas com propriedades estimulantes e a quantificação dessa substância tem sido utilizada no controle da qualidade durante o processamento da erva-mate e seus derivados, como o chá mate tostado e o chá mate verde (LACERDA *et al.*, 2000; SCHMALKO & ALZAMORA, 2001). O acúmulo de metilxantinas é uma característica própria da erva-mate (*I. paraguariensis*), pois outras espécies como a congonha, guavirova, pimenteira, caúna e pessegueiro bravo são com frequência descritas como adulterantes do mate e não apresentam cafeína em sua composição química segundo pesquisas já realizadas (VALDUGA, 1995; REGINATTO *et al.*, 1999). A variabilidade do teor de cafeína na erva-mate depende da procedência do produto, das condições de sombreamento, dos fatores climáticos, dos tratamentos culturais, da variedade genética da planta, de ocorrências de pragas, das condições de crescimento e poda, da idade da planta e folhas, da época de colheita, do tipo de processamento industrial e do período de armazenamento. Na bebida por infusão com água quente, a quantidade de erva, o tipo do produto (quantidade de folhas e palitos) e o processo

utilizado no seu preparo podem ser considerados como variáveis determinantes do teor de cafeína (PARANÁ, 2000; ESMELINDRO *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003). Além do mais, os teores de cafeína e de teobromina combinados mostraram ser úteis para selecionar genótipos apropriados para diferentes expectativas dos consumidores (MARX *et al.* 2003).

Além da cafeína, outros produtos naturais interessantes são encontrados na erva mate. Nesse âmbito, pesquisas fitoquímicas recentes identificaram e/ou quantificaram substâncias fenólicas (LIMA *et al.*, 2004; FILIP *et al.*, 2001; MAZZAFERA, 1997; RICCO *et al.*, 1995) e saponinas (SCHENKEL & GOSMANN, 1989; SCHENKEL *et al.*, 1995; SCHENKEL *et al.*, 1996).

Apesar dos diversos estudos realizados sobre a composição química da erva-mate, poucos trabalhos apresentados na literatura referem-se à análise da constituição química do aroma. Neste ponto cabe salientar que, se os fatores naturais e os sistemas de processamento do mate interferem diretamente nas características físico-químicas da erva-mate, conseqüentemente, são fatores importantes que determinam a qualidade do produto e suas características organolépticas, em relação aos atributos da qualidade: cor, sabor e aroma. O aroma é uma característica perceptível pelo órgão olfativo via retronasal durante a degustação e ocorre quando substâncias voláteis que se desprendem dos alimentos e bebidas sensibilizam os receptores presentes na cavidade nasal, que levam impulsos elétricos ao cérebro. O sentido do olfato é complexo e sujeito à fadiga e adaptação (MONTEIRO, 1984; TEIXEIRA *et al.*, 1987). O aroma e o sabor do chá de erva-mate apresentam variações em função do processo de sapeco e secagem, pois o binômio tempo e temperatura de processamento influencia na degradação das substâncias. O material vegetal utilizado para gerar calor no processo industrial pode conferir aromas diversos à erva-mate. Segundo SANTOS *et al.* (2003), o resultado da análise sensorial nas amostras comerciais de erva-mate para chimarrão pelo teste de ordenação permitiu detectar diferenças significativas para os atributos cor e aroma. Em outra pesquisa, nove amostras comerciais de erva-mate foram avaliadas por análise sensorial, onde os descritores de aroma e sabor, correlacionados com dimensões preferenciais, foram: impacto inicial, fumaça, papel, químico, verde, tostado, dentre outros (SANTA CRUZ *et al.*, 2003).]. Recentemente, a análise sensorial e a tecnologia de nariz eletrônico foram capazes de discriminar entre diferentes tipos de infusão com

características organolépticas similares às infusões de *I. paraguariensis* (GRIGIONI, 2004).

Grande parte das pesquisas sobre aroma em chás encontra-se mais direcionada para os produzidos a partir das folhas da *Camelia sinensis* (chá-da-Índia) como por exemplo, o estudo relacionado ao reconhecimento de padrões a partir da composição de voláteis de três categorias desse tipo de chá e correlação com a sua origem (TOGARI *et al.*, 1995).

Apesar da riqueza química da erva-mate, da sua importância e do crescente uso como alimento, pouca atenção tem sido dispensada ao conhecimento dos componentes do seu aroma e da sua variabilidade, com vistas à identificação da origem da erva-mate para proposta de padronização e controle da qualidade.

## **Análise do Aroma da Erva-Mate**

A erva-mate possui aroma característico que lembra algumas vezes fumaça, floral, madeira, material queimado e azedo, alguns dos quais são chamados de “off-flavor”. O óleo volátil, obtido por hidrodestilação tem coloração levemente amarelada e um cheiro agradável que traduz o aroma característico do mate (PECKOUT, 1943). As informações disponíveis sobre o óleo essencial de plantas do gênero *Ilex* são escassas. FESTER *et. al* (1961) publicaram a obtenção de um óleo essencial levemente dextrógiro  $\delta_{20^{\circ}\text{C}} + 0,885$  e com  $n_D = 1,447$ . MONTES (1963) descreveu um conteúdo de óleo essencial da erva-mate processada obtido por hidrodestilação inferior a 0,1%, encontrando mais de 60 componentes como ácidos alifáticos, álcoois terpênicos, aromáticos, furfural, aldeídos e cetonas. Em outra comunicação científica mais recente, os baixos rendimentos da hidrodestilação foram confirmados e os autores concluíram que mais da metade dos componentes presentes na *Ilex dumosa* são detectados na *Ilex paraguariensis*, ainda que os óleos essenciais das duas espécies apresentem diferenças significativas em sua composição (MAIOCCHI *et al*, 2003). O extrato hexânico da erva-mate e dez componentes individuais do seu aroma<sup>1</sup> mostraram atividade bactericida contra *Streptococcus mutans*, bactéria responsável pela cárie dental (KUBO *et al.*, 1993).

A constituição química do aroma da erva-mate foi analisada a partir do extrato

---

<sup>1</sup> linalol,  $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -ionona,  $\alpha$ -terpineol, ácido octanóico, geraniol, 1-octanol, nerolidol, geranilacetona e eugenol

concentrado de uma amostra de mate cancheado da Argentina e de outra amostra de mate tostado do Brasil (KAWAKAMI & KOBAYASHI, 1991). A técnica de extração usada foi extração com destilação a vapor simultânea (SDE), uma das técnicas clássicas para pré concentração de aromas. Nessa técnica, o vapor d'água é condensado e extraído continuamente pelo vapor do solvente orgânico de acordo com a aparelhagem representada na Figura 04 (SCHULTZ *et al.*, 1977).

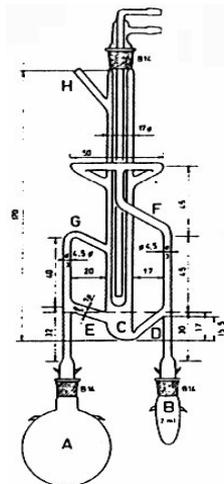


Figura 04 - Aparelhagem de extração e destilação a vapor (SDE) empregada na obtenção do aroma concentrado do mate cancheado e do mate tostado (Kawakami & Kobayashi, 1991).

A composição do aroma concentrado do chá mate elucidada pelos autores foi semelhante a do aroma do chá de *C. sinensis*. A diversidade de substâncias voláteis do mate pode ser um fator que contribui para a grande aceitação do mate como bebida em muitas partes do mundo e pode ser utilizado para obter valiosas informações sobre a qualidade do produto. Os cromatogramas obtidos nesse trabalho, a partir de cada chá mate são mostrados na Figura 05. As principais substâncias identificadas e as suas quantidades relativas, calculadas a partir da percentagem de área dos picos, estão listadas na Tabela 2. Das 196 substâncias identificadas, muitas delas são resultantes da degradação térmica dos carotenóides, ácidos graxos, degradação hidrolítica, ou formados pela reação de Maillard, durante os processos de secagem e torrefação. Dentre essas substâncias, 114 são encontradas no aroma do chá manufaturado a partir da *C. sinensis*. Os componentes majoritários identificados foram geranilacetona, (E)-6-metil-3,5-heptadien-2-ona, 6-metil-5-hepten-2-ona,  $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -ionona,  $\alpha$ -terpineol, geraniol, ácidos monocarboxílicos C<sub>2</sub> a C<sub>12</sub> e 1-penten-3-ol (Tabela 2). O aroma concentrado do mate cancheado também apresentou altos níveis de 2-butoxietanol e linalool. Todos os componentes majoritários são também componentes importantes do

chá de *C. sinensis* com exceção do 2-butoxietanol. Ainda segundo KAWAKAMI & KOBAYASHI (1991), a presença de níveis altos de 2-butoxietanol sugere que essa substância poderia ser um contaminante oriundo de algum defensivo agrícola ou produzido durante o processo de manufatura. Embora a estrutura do éter monoalquiletilenoglicol seja incomum em produtos naturais de plantas, ela foi encontrada em ambos os produtos oriundos do mate proveniente de diferentes países. Além do mais, o derivado acetilado da mesma substância, 1-acetóxi-2-propioniloxietano, foi identificado em ambas amostras. Segundo os autores, esses resultados levaram a crer que substâncias derivadas do etilenoglicol poderiam ser específicas de produtos derivados da erva-mate. Ainda nesse trabalho, os autores concluem que o esqueleto estrutural de 3,3,5-trimetilcicloexanona também parece ser característico da erva-mate.

Apesar do elegante trabalho apresentado por KAWAKAMI & KOBAYASHI, a constituição química do aroma da erva-mate ainda não foi bem estabelecida. Além disso, a técnica de Microextração em Fase Sólida com amostragem no “Headspace” (HS-SPME) foi desenvolvida a partir da década de 90 e desde então vem sendo empregada na preparação de amostras para análise cromatográfica de diversos tipos de matrizes. Aplicações mais recentes dessa técnica em estudos relacionados ao aroma de café (YANG & PEPPARD, 1994; FREITAS *et al.* 2001; BICCHI *et al.*, 1997; MARRIOT *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2004), ao aroma do cacau (AUGUSTO *et al.*, 2004) e ao aroma do chá preto (BAPTISTA *et al.*, 1999) apontam para potencial aplicação analítica dessa técnica no caso do estudo do aroma da erva-mate.

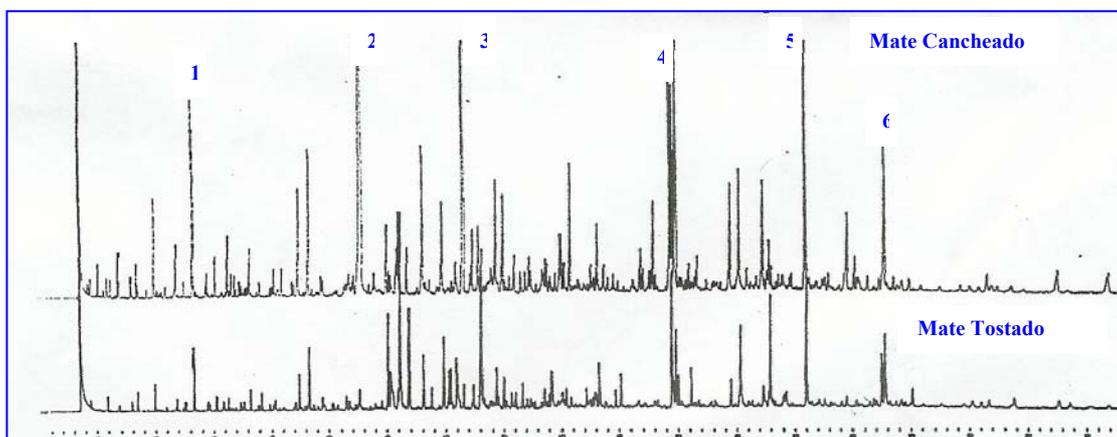


Figura 05 - Cromatogramas do aroma concentrado do mate cancheado e do mate tostado, obtidos por SDE; (1) 1-penten-3-ol; (2) 2-butoxietanol; (3) linalol; (4) ácido hexanóico; (5) ácido octanóico; (6) ácido nonanóico; (Kawakami & Kobayashi, 1991).

Tabela 02 – Percentual das áreas dos sinais relacionados com os componentes principais do aroma concentrado do mate cancheado e do mate tostado obtido por SDE (Kawakami & Kobayashi, 1991).

<b>Substância</b>	<b>Mate Cancheado (%)</b>	<b>Mate tostado (%)</b>
2-butoxietanol	9,5	1,2
linalol	7,5	0,9
geranilacetona	3,4	1,8
ácido octanóico	2,8	3,5
ácido hexanóico	2,8	3,2
1-penten-3-ol	2,5	0,9
$\alpha$ -terpineol	1,9	0,4
ácido nonanóico	1,7	2,0
geraniol	1,7	0,3
(E)-6-metil-3,5-heptadien-2-ona	1,6	1,0
6-metil-5-hepten-2-ona	1,5	1,3
2,6,6-trimetil-2-hidroxiciclohexanona	1,5	1,1
$\alpha$ -ionona	1,5	0,7
octanol	1,4	1,5
5,6-epóxi- $\beta$ -ionona	1,4	1,3
$\beta$ -ionona	1,4	1,0
6,10,14-trimetilpentadecanona	1,3	1,7
heptanol	1,3	1,5
(E,E)-2,4-heptadienal	1,3	1,0
hexanal	1,2	0,4
(E)-2-pentenol	1,1	0,8
(E)-2-hexenal	1,1	0,5

## **“Headspace”-Microextração em Fase Sólida (HS-SPME): Aplicações e Fundamentos.**

A microextração em fase sólida (SPME, do inglês "Solid Phase Micro Extraction") é uma técnica de extração de analitos relativamente nova e tem sido extensivamente aplicada em procedimentos de preparação e pré-concentração de amostras para análises cromatográficas. Desde a invenção dessa técnica (PAWLISZYN & ARTHUR, 1990), a sua aplicação tem sido intensificada em diversos campos da química e da biotecnologia. Diversas revisões incluem: novas tendências (EISERT & PAWLISZYN, 1997; KOZIEL & NOVAK, 2002), uma técnica promissora para preparação de amostras para análises ambientais (ALPENDURADA, 2000); aplicações em amostras biológicas vivas (AUGUSTO & VALENTE, 2002); um bom texto de revisão em português (AUGUSTO & VALENTE, 2000); preparação de amostras para análise de aromas em alimentos (WILKES *et al.*, 2000; KATAOKA *et al.*, 2000; MOREDA *et al.*, 2000, BULDINI *et al.*, 2002), óleos essenciais (MARRIOT *et al.*, 2001) e aplicações associadas à espectrometria de massas (VAS & VEKEY, 2004). O seu uso na caracterização de fragrâncias e aromas foi intensificado a partir do final da década 90 no sentido de melhorar as análises da fração volátil ou “headspace” de plantas.

A extração por “headspace” estático é caracterizada por ser simples e ideal para analisar substâncias voláteis de matrizes sólidas ou mais complexas. Essa técnica, contudo, não é adequada para substâncias com massa molar alta ou semi voláteis e a sua sensibilidade é limitada. Existem procedimentos de “headspace” dinâmico com maior sensibilidade, envolvendo a captura e pré-concentração de substâncias voláteis em absorventes (Carvão, Tenax, Porapak, etc). Entretanto, essa técnica exige a utilização de solventes para a etapa de dessorção ou equipamentos mais sofisticados para realizar a dessorção térmica das substâncias retidas no cartucho.

HS-SPME preserva todas as vantagens das técnicas de extração do tipo “headspace” estático e dinâmico, além de não requerer solventes orgânicos, equipamentos especiais para dessorção térmica ou nenhuma modificação especial no sistema de injeção convencional do cromatógrafo. Outrossim, o aparato SPME é mais simples, pois os analitos se equilibram com a fibra por difusão passiva, tornando desnecessário o sistema

de bombeamento de ar através de cartuchos contendo o adsorvente. SPME permite o uso de quantidades consideravelmente pequenas de amostra e tempos de extração curtos para se obter a sensibilidade requerida. Essa técnica de extração possibilita também a automação da análise. Devido a natureza das fibras, SPME é uma técnica que extrai seletivamente diferentes classes de substâncias.

O equipamento básico da SPME é simples como apresentado na Figura 06. Um bastão de fibra ótica, de sílica fundida (FS) de aproximadamente 100 mm de diâmetro é conectado a tubo de aço inoxidável que pode ser retraído para dentro da agulha de uma seringa (Figura 07). A fibra é recoberta com um filme fino de um líquido polimérico ou de um sólido adsorvente disperso em um líquido polimérico (principais tipos comerciais de cobertura de fibra na Tabela 3). Com a fibra retraída na agulha, o septo do frasco de amostra é perfurado e a fibra é exposta à atmosfera do frasco que contém a amostra (“headspace”). Dessa forma, os analitos são retidos na cobertura da fibra após determinadas condições, principalmente tempo e temperatura. Ao findar o tempo de extração, a fibra é novamente retraída, a agulha é retirada do septo e levada para o injetor do cromatógrafo. Com a fibra retraída o septo do injetor é perfurado, e só então a fibra é exposta ao fluxo do gás no injetor. Terminada a dessorção, a fibra é retraída e a agulha retirada (Figura 08). Os analitos são assim termicamente dessorvidos e transferidos para a coluna cromatográfica.



Figura 06 - Equipamento básico para SPME, composto de seringa acoplada à fibra retrátil, suporte, frasco, cronômetro e placa de aquecimento com agitação magnética.

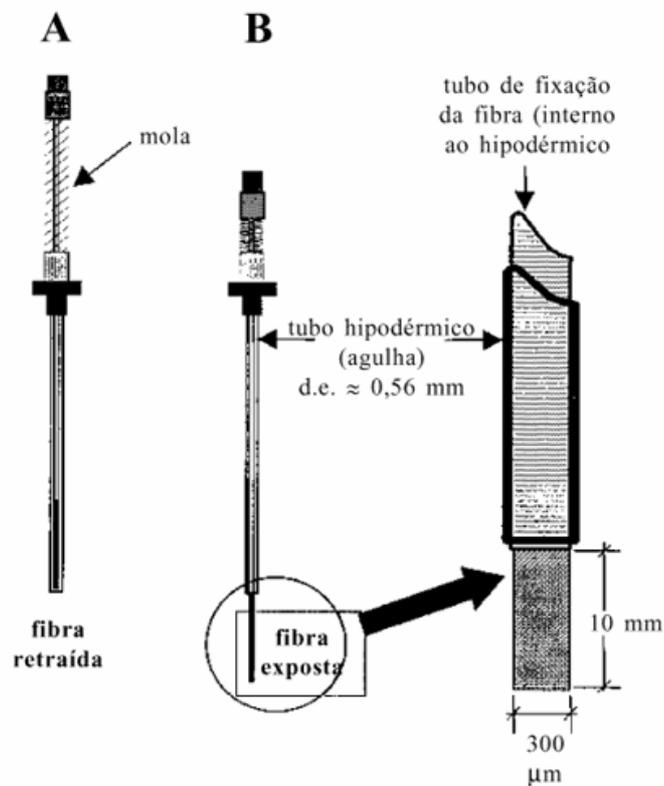


Figura 07 - Dispositivo da fibra de SPME: (A) posição com a fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico de diâmetro externo 0,56 mm). (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da seção com recobrimento de 100 mm de espessura (Augusto & Valente, 2000).

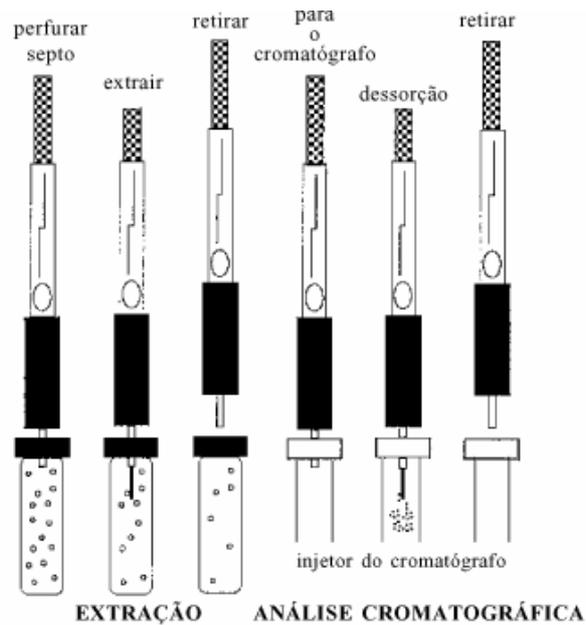


Figura 08 - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para a análise por CG (Augusto & Valente, 2000).

Os principais recobrimentos de fibra disponíveis comercialmente para HS-SPME estão relacionados na Tabela 3. As sugestões de aplicações desta tabela são necessariamente genéricas, pois as fibras relacionadas foram desenvolvidas para uso geral. Para líquidos poliméricos assim como PDMS e poliacrilato, o mecanismo físico-químico responsável pela extração é a partição, enquanto que para camadas de sólidos porosos com DVB ou CAR, o processo envolve a adsorção dos analitos na fibra.

Tabela 03 – Principais fibras comercialmente disponíveis para HS-SPME (Augusto & Valente, 2000).

Material de recobrimento	Abreviatura	$L_f/\mu\text{m}^*$	Uso recomendado
<i>Líquidos poliméricos puros</i>			
Polidimetilsiloxano	PDMS	7, 30 ou 100	Analitos não polares e semivoláteis
Poliacrilato	PA	85	Analitos polares (especialmente fenóis)
<i>Sólidos porosos</i>			
Polidimetilsiloxano / Divinilbenzeno	PDMS/DVB	60 ou 65	Analitos voláteis e semi-voláteis de baixa e média polaridades
Carbowax / Divinilbenzeno	CW/DVB	65 ou 70	Analitos voláteis e semi-voláteis de média e alta polaridades
Carboxen / Polidimetilsiloxano	CAR/PDMS	75 ou 85	Voláteis / analitos com baixa massa molar
Divinilbenzeno / Carboxen / Polidimetilsiloxano	DVB/CAR/PDMS	30	Faixa mais larga de analitos

\*  $L_f$  - espessura da camada polimérica

Os fundamentos teóricos de SPME têm sido extensivamente abordados na literatura, (PAWLISZYN, 1997 e 1999). Sob determinadas condições práticas, a massa do analito extraída é proporcional a sua concentração na matriz ( $C_o$ ), que por sua vez é base das aplicações quantitativas dessa técnica. A massa extraída depende de diversos outros parâmetros mensuráveis e/ou controláveis, assim como temperatura, tempo, quantidade de amostra. Em HS-SPME, uma amostra sólida é colocada dentro de um frasco selado. O frasco é aquecido para aumentar a pressão de vapor dos analitos, estabelecendo-se um equilíbrio entre a amostra sólida e a fase vapor. Uma fibra SPME é colocada no “headspace” sem entrar em contato com a amostra. A cobertura da fibra absorve (ou adsorve) os analitos contidos no “headspace” (Figura 09).

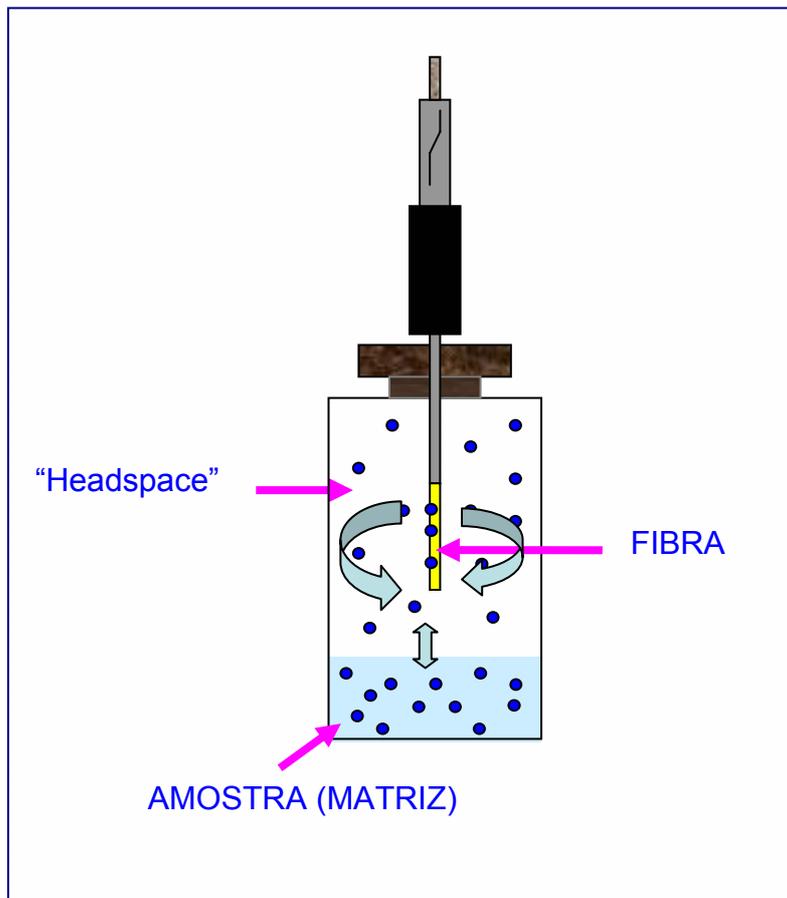


Figura 09 - Representação esquemática do processo HS-SPME.

SPME é um processo baseado em equilíbrios simultâneos em sistemas multifásicos. Um exemplo de sistema trifásico simples: cobertura polimérica da fibra em contato com os analitos contidos no “headspace” e a matriz (sólida ou líquida) geradora dos analitos. Os fundamentos da distribuição de massas na extração podem ser descritos a partir do que ocorreria num sistema ideal trifásico: antes da extração - número de moles do analito ( $n_0$ ) com uma concentração ( $C_0$ ), em um volume ( $V_m$ ) na matriz; durante a extração (sistema fechado) com exposição da fibra no headspace - número de moles na matriz ( $n_m$ ); no “headspace” ( $n_h$ ) e na fibra ( $n_f$ ). A conservação de massa no processo é expressa como:

$$n_o = n_m + n_h + n_f \quad (1)$$

A Equação (2) correlaciona as constantes de distribuição fibra-matriz,  $K_{fm} = C_f/C_m$  ( $K_{fm} = K_{SPME}$ ), fibra-”headspace”,  $K_{fh} = C_f/C_h$  e “headspace”-matriz,  $K_{hm} = C_h/C_m$ ; esta equação é rearranjada a partir da Equação (1) com as substituições dos volumes e concentrações das fases em equilíbrio, respectivamente, para a matriz, para o “headspace” e para a fibra,  $V_m$  e  $C_m$ ,  $V_h$  e  $C_h$ ,  $V_f$  e  $C_f$  (AUGUSTO & VALENTE, 2000):

$$K_{SPME} = K_{fh} K_{hm} \quad (2)$$

O princípio básico da amostragem por SPME é a partição dos analitos entre a cobertura da fibra e a matriz da amostra. Quando o equilíbrio é atingido, o coeficiente de partição pode ser definido como:

$$K_{SPME} = \frac{C_f}{C_m} \quad (3)$$

Onde  $K_{SPME}$  é o coeficiente de partição,  $C_f$  é a concentração do analito na cobertura da fibra e  $C_m$  é a concentração do analito na matriz.

Se o número de moles do analito é usado, a Equação (3) pode ser reescrita como:

$$n_f = \frac{K_{SPME} V_f C_0 V_m}{K_{SPME} V_f + K_{hm} + V_m} \quad (4)$$

Onde  $n_f$  e  $V_f$  são o número de moles sorvido pela cobertura da fibra e o volume da mesma, respectivamente.  $C_0$  é a concentração original do analito na matriz,  $V_m$  é o volume da amostra e  $K_{hm}$  é o coeficiente de partição entre o “headspace” e a matriz. A Equação (4) descreve a massa sorvida pela cobertura polimérica após o equilíbrio ser atingido.

Outro aspecto importante é a quantidade de analito a ser extraída independente da localização da fibra no sistema. Ela pode ser posicionada em qualquer ponto do “headspace” ou diretamente na matriz desde que os volumes da cobertura da fibra, do “headspace” e da matriz sejam constantes (PAWLISZYN, 1997).

Contudo, a Equação (4) está relacionada com o intervalo de tempo necessário para atingir o equilíbrio. Esse intervalo de tempo, que é fundamental do ponto de vista experimental, depende das dificuldades de transferência de massa no sistema (coeficiente de difusão). O melhor caminho para se aumentar a sensibilidade da SPME é alterar parâmetros que facilitem a difusão do analito ou que aumentem o coeficiente de partição  $K_{SPME}$ . Isso pode ser feito, por exemplo, mudando a natureza química da cobertura da fibra, modificando a matriz por ajuste do pH e/ou força iônica ou então variando a temperatura e o tempo de amostragem. Assim, a Equação (4) correlaciona a quantidade extraída do analito com os parâmetros fundamentais dos equilíbrios simultâneos e descreve o aspecto termodinâmico da SPME (ZANG & PAWLISZYN, 1993).

Analitos voláteis (alto  $K_{hm}$ ) são facilmente concentrados no “headspace”. Para analitos semivoláteis, suas baixas volatilidades podem diminuir a transferência de massa. Em alguns casos, a dessorção cineticamente controlada de voláteis a partir de amostras sólidas pode limitar a velocidade de extração. Nesses casos, são requeridos tempos longos de extração. No caso de amostras sólidas, a difusão é muito menor. Isso pode ser visto pela comparação da ordem de magnitude do coeficiente de difusão:  $10^{-6}$  em líquidos e  $10^{-8}$  a  $10^{-10}$  em sólidos, enquanto que é  $10^{-1}$  em gases (KOLB & ETTRE, 1997).

O valor da constante  $K_{fh}$  é altamente dependente da afinidade da cobertura da fibra pelos analitos e pode ser estimado pelo índice de retenção do respectivo analito na fase estacionária de uma determinada coluna cromatográfica relacionada a cobertura polimérica da fibra (PAWLISZYN, 1997). Aquelas substâncias que tiverem valores mais altos de  $K_{fh}$  terão maior capacidade de retenção na fibra.

A natureza da matriz e da cobertura da fibra, a volatilidade e a polaridade dos analitos são os principais fatores a serem considerados nessa técnica de extração. Devido a complexidade de algumas matrizes, a escolha do recobrimento da fibra e a otimização dos parâmetros relacionados à extração devem ser feitos experimentalmente. Um passo fundamental no desenvolvimento do método SPME é a determinação do melhor tempo necessário para atingir o equilíbrio dos analitos entre fibra, a amostra e o “headspace”. O tempo de equilíbrio depende de diversos fatores: afinidade entre o analito e a fibra; espessura do recobrimento da fibra (o equilíbrio é atingido mais rapidamente quanto menor for a espessura); condições de agitação da amostra (maior agitação diminui o tempo). O desenvolvimento do método analítico SPME envolve também a determinação de diversas outras condições operacionais como ajuste do pH e da força iônica; volume e quantidade da amostra; temperatura da extração; tempo e temperatura de dessorção (AUGUSTO & VALENTE, 2000).

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

- Desenvolver uma nova metodologia para analisar substâncias voláteis e semi-voláteis da erva-mate e seus produtos correlatos por “headspace”-microextração em fase sólida-cromatografia gasosa (HS-SPME-GC);

### Objetivos específicos

- Extrair os constituintes voláteis e semi-voláteis da erva-mate e seus produtos correlatos por HS-SPME;
- Identificar por CG-EM, índice de retenção (*I*) e/ou co-injeção com padrões autênticos, os principais componentes do aroma da erva-mate e seus produtos correlatos;
- Estudar a influência das principais variáveis da HS-SPME;
- Comparar o comportamento extrativo dos diferentes recobrimentos das fibras usadas em HS-SPME;
- Contribuir para o estabelecimento de padrões de identidade e qualidade da erva-mate e seus produtos correlatos a partir do aroma;
- Identificar aditivos e contaminantes em amostras comerciais de erva-mate.

---

# PARTE EXPERIMENTAL

---

## Materiais

As amostras de mate utilizadas neste trabalho de tese são de procedência variada. A codificação adotada foi **MC** para erva-mate cancheada para chimarrão; **MT** para erva-mate tostada; **MS** para mate tostado solúvel; **MP** para o mate pronto e **CP** para chá preto. O número associado ao código representa a marca ou o tipo de amostra e a letra o lote ou replicata quando for o caso<sup>2</sup>. As amostras foram obtidas no comércio local da Cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil ou enviadas por produtores rurais de regiões variadas. Por razões éticas nenhuma marca será citada, somente a localidade de origem e o tipo de plantio ou processamento quando for o caso. O mate para chimarrão utilizado foi a erva-mate cancheada com aproximadamente 70% de folhas e 30% de palitos e outras partes do ramo e foi usado sem qualquer outro tratamento prévio. O mate tostado também tem a mesma proporção de folha-palito. O mate solúvel foi processado de modo similar ao café solúvel. O mate pronto foi preparado industrialmente a partir da erva-mate tostada com adição de conservantes. Todas as amostras comerciais utilizadas foram acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados e protegidas da luz e foram analisadas no período máximo aproximado de seis meses após serem abertas.

O equipamento para SPME (seringa e fibras) foi obtido da Supelco (Bellefonte, PA, USA). As seguintes fibras foram utilizadas neste trabalho: 100 µm polidimetilsiloxano (PDMS), 65 µm polidimetilsiloxano/divinilbenzeno “stableflex” (PDMS/DVB), 70 µm carbowax/divinilbenzeno “stableflex” (CW/DVB), 85 µm carboxen/polidimetilsiloxano “stableflex” (CAR/PDMS) and 50/30 µm divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano “stableflex” (DVB/CAR/PDMS). Todas as fibras foram condicionadas antes do uso de acordo com recomendações do fabricante.

---

<sup>2</sup> Por exemplo **MC1<sub>A</sub>** e **MC1<sub>B</sub>** são amostras de mate cancheado de uma mesma marca e lotes diferentes e **MT1** e **MT2** são amostras de mate tostado de marcas diferentes.

## Condições CG

A separação dos constituintes voláteis da erva-mate por CG-DIC foi feita em cromatógrafo HP 6890 (*Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA*) equipado com detector por ionização em chama (DIC) e coluna HP-5 (30m x 0,32mm x 0,25 $\mu$ m). A programação de temperatura da coluna foi de 40°C durante 4min, seguida de programação de 2°C/min até 200°C com 2 min adicionais, totalizando 86min de corrida. O gás de arraste foi N<sub>2</sub> a um fluxo constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O injetor com ou sem divisão de fluxo operou no modo sem divisão com a válvula da purga fechada durante 3 min e com um “liner” com 0,75 mm de diâmetro. A temperatura do injetor depende da fibra usada e de modo geral, foi ajustada a 260°C para PDMS, 260°C para PDMS/DVB, 250°C para CW/DVB, 260°C para DVB/CAR/PDMS e 300°C para CAR. A temperatura do detector foi de 300°C em todos os casos com exceção das experiências de seleção para a melhor temperatura operacional.

As análises por CG-EM foram feitas em outro cromatógrafo HP6890 acoplado a um detector de massas HP5973 (*Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA*) e a uma coluna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m). O gás de arraste foi He, a um fluxo constante de 1.0 mL/min. As demais condições cromatográficas foram idênticas àquelas empregadas no sistema CG-DIC. O espectrômetro de massas operou no modo de impacto de elétrons a 70 eV. A fonte de íons foi mantida a 230°C, o analisador de massas (quadrupolo) a 150°C e a interface a 240°C. A varredura foi feita a partir de  $m/z$  29 até 370 com velocidade de 1.9 scans/s.

## Preparação da amostra por HS-SPME

O mesmo procedimento geral foi adotado em todos os testes usando HS-SPME: Uma determinada massa de amostra  $m_a$  foi acondicionada em um frasco de capacidade de 4 mL, contendo ou não 1 mL de solução de cloreto de sódio (% NaCl) e agitação magnética. A amostra foi pré-aquecida a  $T$  °C durante  $t_{pre}$  min antes da extração SPME. A seringa SPME foi inserida no frasco. O septo de silicone /PTFE ( $\phi$  11 mm) que estava tampando o frasco foi perfurado com a agulha e a fibra foi exposta ao “headspace” durante  $t_{ext}$  min. A fibra foi depois retraída para dentro da agulha e transferida para o

injetor do cromatógrafo a determinada temperatura de acordo com o tipo de cobertura de fibra usado ( $T_{inj}$ ). A fibra foi mantida exposta dentro do injetor durante  $t_{inj}$  min.

A otimização dos parâmetros SPME envolveu diversas séries de experiências, cujas condições estão na Tabela 4.

Tabela 04 – Condições operacionais para experiências de otimização univariadas.

Parâmetro otimizado	Fibra	$t_{pre}$ (min)	$t_{inj}$ (min)	$m_a$ (mg)	$T$ (°C)	$t_{ext}$ (min)	NaCl (%)	amostra gem
Tempo de pré-equilíbrio	DVB/CAR/ PDMS	Variado	15	150	80	60	-	Seca
Tempo de desorção	Variado	15	Variado	300	120	60	-	Seca
Massa de amostra	PDMS/DVB	15	15	Variado	80	60 ou 120	30	Seca ou úmida
Temperatura	Variado	15	15	150	Variado	60	30	Seca ou úmida
Tempo de extração	Variado	15	15	150	80	Variado	30	Seca ou úmida
Tipo de fibra	Variado	15	15	150	80	60	30	Seca ou úmida
Força iônica	DVB/CAR/ PDMS	15	15	150	80	60	Variado	Úmida
Procedimento de amostragem	DVB/CAR/ PDMS	15	15	150	Variado	60	30	Seco ou úmido

$m_a$ : massa de amostra;  $T_{ext}$ : temperatura;  $t_{equi}$ : tempo de pré-equilíbrio;  $t_{ext}$ : tempo de extração;  $t_{inj}$ : tempo de desorção;

Fibras: PDMS; PDMS/DVB; CW/DVB; CAR/PDMS ou DVB/CAR/PDMS;

$m_a$ : = 0.010; 0.020; 0.050; 0.10; 0.20; 0.30 ou 0.60;

$T$ : 40°C; 60°C; 80°C; 100°C; 120°C para o procedimento seco e 40°C; 60°C; 80°C e 100°C para procedimento úmido;

$t_{ext}$ : 1; 3; 5; 10; 20; 30; 60; 90 ou 120 min;

$t_{inj}$ : 0.5; 1; 3; 6; 9; 12; 15 ou 18 min;

O procedimento úmido foi realizado com a amostra de erva-mate com 1 mL de solução de NaCl sob agitação magnética;

O procedimento seco foi realizado com somente a massa de amostra de mate sem agitação.

## Precisão

A repetibilidade dessa técnica foi estimada a partir de experiências em triplicata na seguinte condição operacional para amostragem seca: fibras SPME variadas;  $m_a$  150 mg;  $T$  80°C;  $t_{equi}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min;  $t_{inj}$  15 min e na condição operacional para amostragem úmida as condições foram: fibra DVB/CAR/PDMS; solução saturada de NaCl (1 mL);  $m_a$  150 mg;  $T$  80°C;  $t_{equi}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min;  $t_{inj}$  15 min.

## Análise Qualitativa

Os índices de retenção ( $I$ ) das substâncias foram calculados baseados nos tempos de retenção ( $t_R$ ) dos respectivos analitos e aqueles obtidos numa série de  $n$ -alcanos ( $C_5$ - $C_{26}$ ) analisados nas mesmas condições. As substâncias foram identificadas por comparação dos espectros de massas com aqueles contidos na base de dados “Wiley Mass Spectral Database”, por comparação dos seus valores de  $I$  com aqueles publicados [ADAMS, 1995] ou por co-injeção de padrões autênticos, quando disponíveis. Foram considerados desvios de  $\pm 10$  unidades em relação aos valores de  $I$  correspondentes, descritos na literatura. As identificações foram consideradas tentativas quando foram baseadas somente nos dados dos espectros de massas e positivas quando foram identificadas por dois métodos.

## Planejamento fatorial

A seleção inicial dos parâmetros SPME envolveu um planejamento fatorial saturado  $2^{6-3}$  constituído por oito experiências mais três correspondendo a triplicata no ponto central, cujas condições estão na Tabela 5 usando a fibra PDMS/DVB e amostragem seca.

Tabela 05 – Condições operacionais da série de experiências feitas no planejamento fatorial.

EXPERIÊNCIA	$T_{ext}^1$ (°C)	$t_{ext}^2$ (min)	$t_{pre}^3$ (min)	AB	$t_{inj}^4$ (min)	$m_a^5$ (mg)	Agitação <sup>6</sup> (rpm)
1	40	15	10	-	3	150	0
2	80	15	10	-	1	150	1000
3	40	45	10	-	3	50	1000
4	80	45	10	-	1	50	0
5	40	15	30	-	1	50	1000
6	80	15	30	-	3	50	0
7	40	45	30	-	1	150	0
8	80	45	30	-	3	150	1000
9	60	30	20	-	2	100	500
10	60	30	20	-	2	100	500
11	60	30	20	-	2	100	500

<sup>1</sup>  $T_{ext}$ : temperatura; <sup>2</sup>  $t_{ext}$ : tempo de extração; <sup>3</sup>  $t_{pre}$ : tempo de pré-equilíbrio; <sup>4</sup>  $t_{inj}$ : tempo de dessorção; <sup>5</sup>  $m_a$ : massa de amostra; <sup>6</sup> a agitação foi feita com a amostra seca

## **Análise de Componentes Principais (ACP)**

Foram selecionados vinte e quatro analitos englobando uma variedade de componentes representativos do aroma da erva-mate cancheada. O critério usado para a escolha dos analitos foi a sensibilidade e a resolução cromatográfica. Os valores das áreas foram calculados a partir dos cromatogramas das amostras pelo sistema HP CHEMSTATION Ver. A.06.01. Os dados cromatográficos foram transferidos para uma planilha eletrônica. Uma matriz de dados de vinte e cinco linhas (amostras de mate) e vinte e quatro colunas (variáveis) foi construída e processados pelo programa “The Usrambler” v.9.1.2 (CAMO Process AS Oslo, NORWAY). Os valores das áreas dos sinais foram automaticamente centrados na média.

## **Curva de adição padrão**

Uma solução estoque de alquilbenzenos lineares (LAB) foi preparada dissolvendo 200 mg de LAB em 100,00 mL de etanol (2000 µg/mL). A partir da solução estoque foram preparadas as soluções etanólicas de LAB 1000 µg/mL, 400 µg/mL e 100 µg/mL. Alíquotas das soluções etanólicas de LAB foram transferidas com auxílio de microseringa Hamilton capacidade 50 µL para frascos contendo 80 mg de amostra de mate tostado contaminada com LAB. As demais condições de extração foram: fibra PDMS;  $T$  100°C;  $t_{\text{equi}}$  15 min;  $t_{\text{ext}}$  30 min;  $t_{\text{inj}}$  15 min. A amostra foi submetida a microextração inicialmente com o mesmo volume de solvente adicionado. A curva foi construída com mais 3 a 5 adições de solução padrão (Tabela 18).

---

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

## **Otimização das condições cromatográficas**

Antes de refinar a otimização do método HS-SPME para análise do aroma do mate, algumas experiências exploratórias foram feitas a fim de ajustar as melhores condições cromatográficas e de extração. De acordo com observações dos cromatogramas obtidos, verificou-se que a condição para programação de temperatura da coluna que mostrou melhor separação dos sinais relativos aos constituintes do aroma do mate de modo global, foi manter a 40°C por 4 min (para produzir um efeito de focalização), seguindo de taxa de aquecimento de 2°C/min até 200°C. Após essa etapa foram realizadas experiências comparativas para escolher a melhor coluna dentre as seguintes opções: coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) ou HP-INNOWAX (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm). Nesse estágio de avaliação, as demais condições cromatográficas foram as mesmas (PARTE EXPERIMENTAL) e as condições de extração foram as seguintes DVB/PDMS, CAR/PDMS e PDMS; 300 mg de amostra seca (MC ou MT), frasco com capacidade de 4 mL,  $T_{ext}$  60°C,  $t_{pre}$  30 min,  $t_{ext}$  30 min  $t_{inj}$  3 min. Os cromatogramas obtidos nessa série de experiências são apresentados nas Figuras 10, 11, 12 e 13.

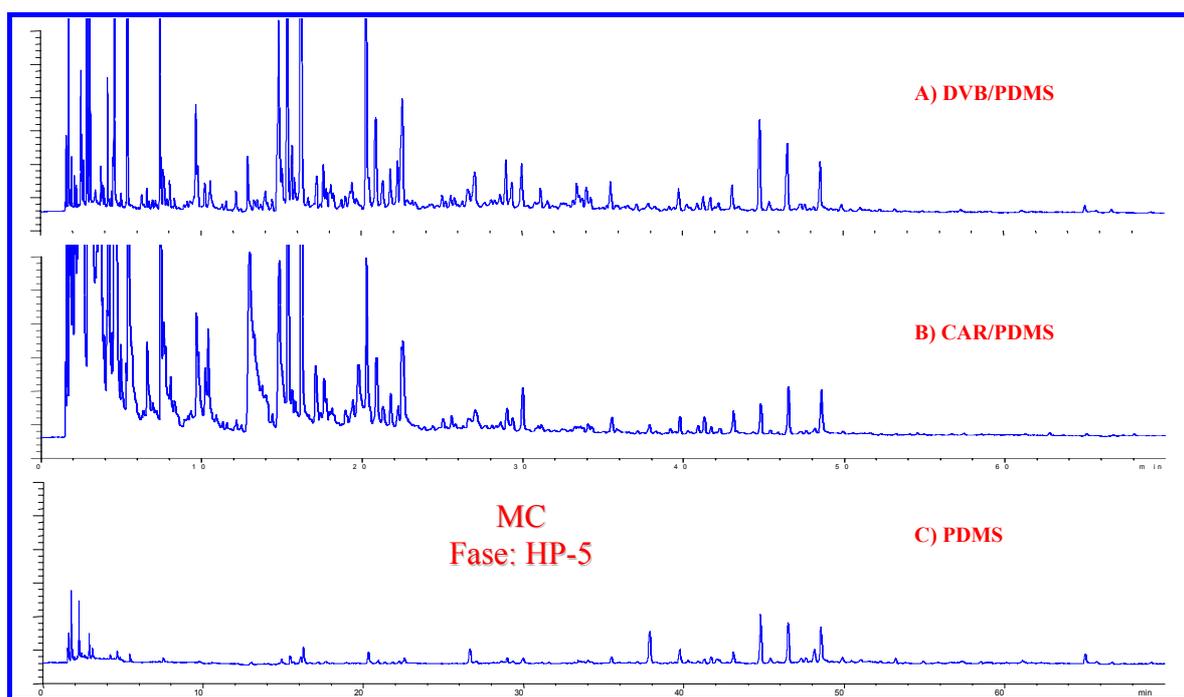


Figura 10 - Avaliação preliminar das condições cromatográficas na coluna HP-5 obtidos com amostra de mate cancheado (MC) e três tipos de cobertura de fibra: A) PDMS/DVB; B) CAR/PDMS; C) PDMS.

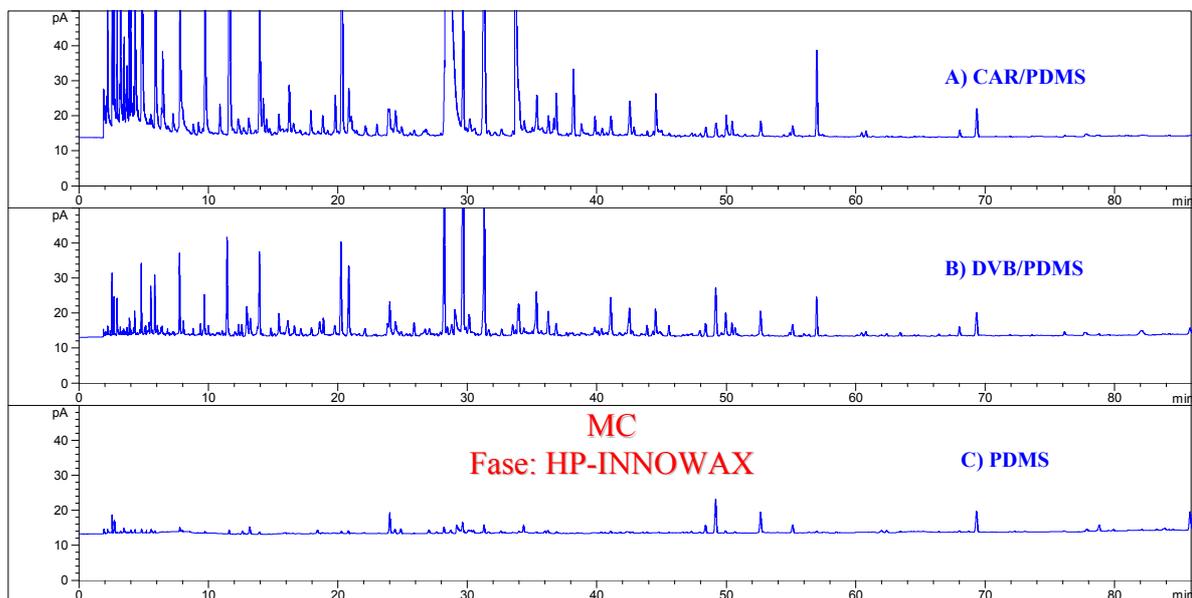


Figura 11 - Avaliação preliminar das condições cromatográficas na coluna HP-INNOWAX obtidos com amostra de mate cancheado (MC) e três tipos de cobertura de fibra: A) PDMS/DVB; B) CAR/PDMS; C) PDMS.

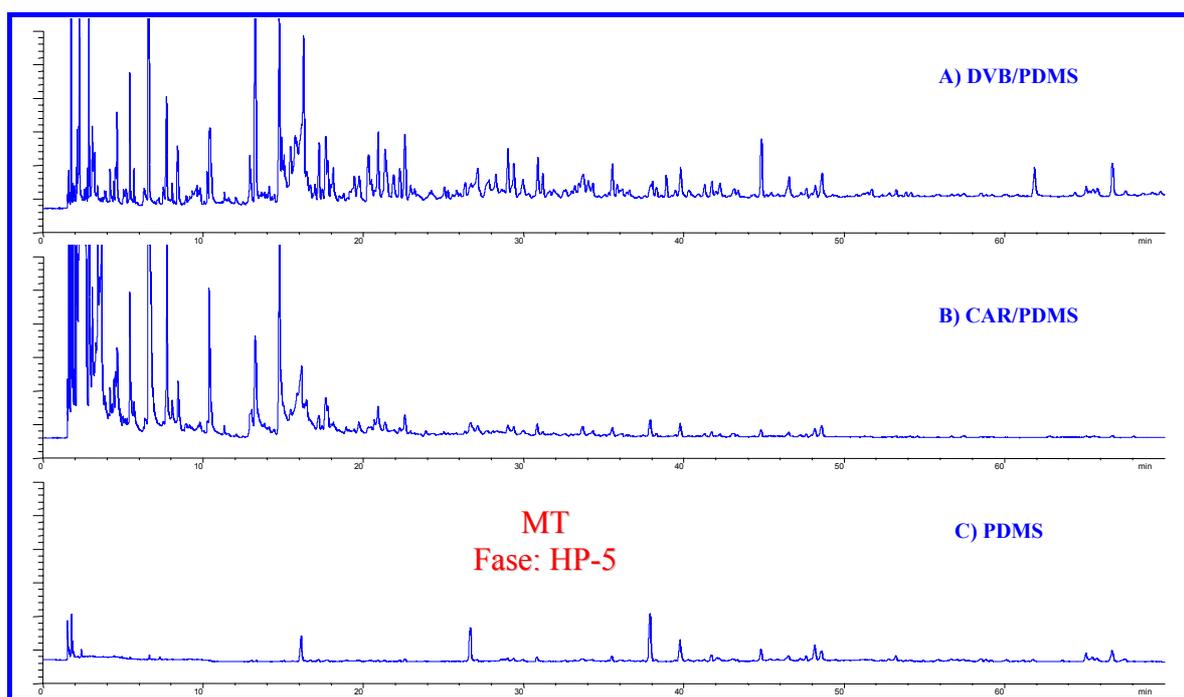


Figura 12 - Avaliação preliminar das condições cromatográficas na coluna HP-5 obtidos com amostra de mate tostado (MT) e três tipos de cobertura de fibra: A) PDMS/DVB; B) CAR/PDMS; C) PDMS.

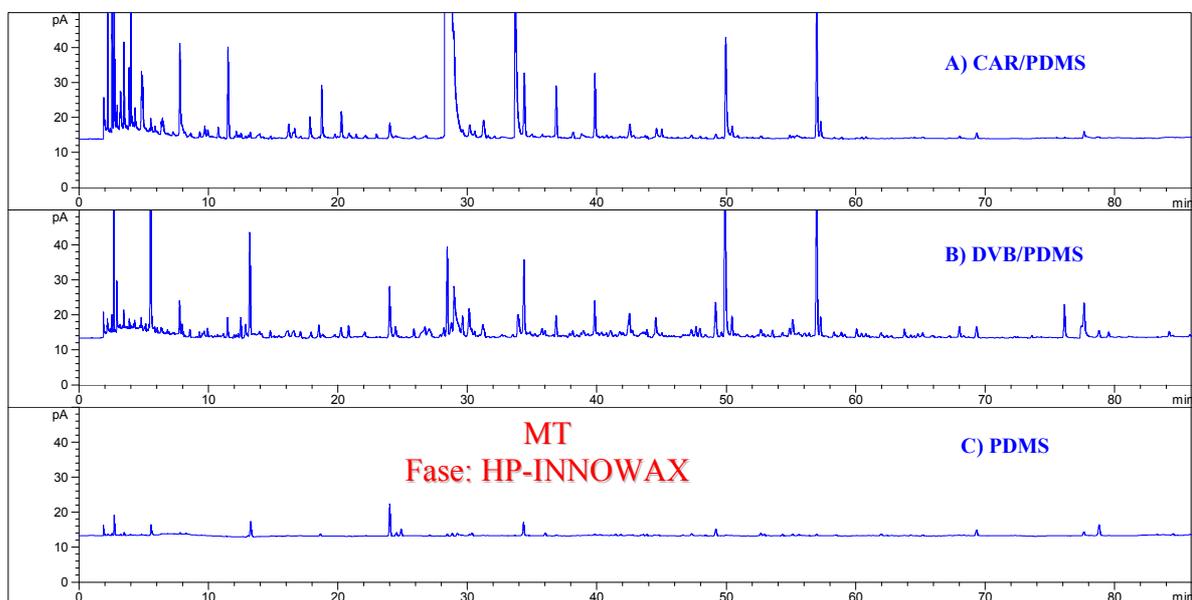


Figura 13 - Avaliação preliminar das condições cromatográficas na coluna HP-INNOWAX obtidos com amostra de mate tostado (MT) e três tipos de cobertura de fibra: A) PDMS/DVB; B) CAR/PDMS; C) PDMS.

A coluna mais polar (HP-INNOWAX) apresentou uma resolução global melhor, principalmente em relação aos sinais das moléculas menores. Mas ela não foi escolhida para desenvolver o estudo do aroma do mate neste trabalho de tese, pois os dados de índice de retenção para fase 5%fenil 95%dimetilsiloxano (equivalente a HP-5), disponíveis na literatura são mais reprodutíveis do ponto de vista analítico (ADAMS, 1995). Coluna com fase similar a HP-5 são utilizadas em diversos trabalhos na análise de voláteis por CG (MACHIELS & ISTASSE, 2003).

Em relação ao somatório das áreas dos sinais observados nos respectivos cromatogramas, os resultados quantitativos globais obtidos com o uso de ambas as colunas foram similares (Figuras 14 e 15). As fibras CAR/PDMS e PDMS proporcionam a maior e a menor eficiência de extração, respectivamente, para dois tipos de amostras de mate investigados (MC e MT). Como será discutido mais adiante, a maior soma de sinais observada com a fibra CAR/PDMS, deve-se a grande quantidade de substâncias oxigenadas C<sub>2</sub> a C<sub>6</sub> adsorvida por essa cobertura de fibra.

Nesse estágio da pesquisa, uma melhor comparação do comportamento extrativo das fibras foi feita a partir do somatório das áreas de determinadas classes de substâncias. Para melhor apresentação dos resultados, o somatório das áreas das substâncias oxigenadas leves (S.Oxig C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) foi dividido por 5. Foi então possível constatar que PDMS apresentou pouca eficiência na extração dos componentes do aroma da erva-mate verde, independente da classe química (Figura 16). Ainda na Figura 16, nota-se que quantidades elevadas de S.Oxig C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> foram obtidas na extração com CAR/PDMS. A grande capacidade de retenção dessa fibra para esse grupo de substâncias pode ser compreendida pela natureza do adsorvente carboxen 1006 (sólido altamente poroso com grande área superficial) que tem muita afinidade por moléculas pequenas (SHIREY, 2000). Por sua vez, a fibra PDMS/DVB possibilitou a extração de quantidades maiores de substâncias das classes representativas do aroma como aldeídos/cetonas C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub> (Ald-Cet) e terpenos, além de hidrocarbonetos normais C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub> (Alc). Essas substâncias, principalmente terpenos, são importantes na classificação de aromas (GARCIA *et al.*, 1998). Um comportamento similar foi observado com a amostra de mate tostado (Figura 17).

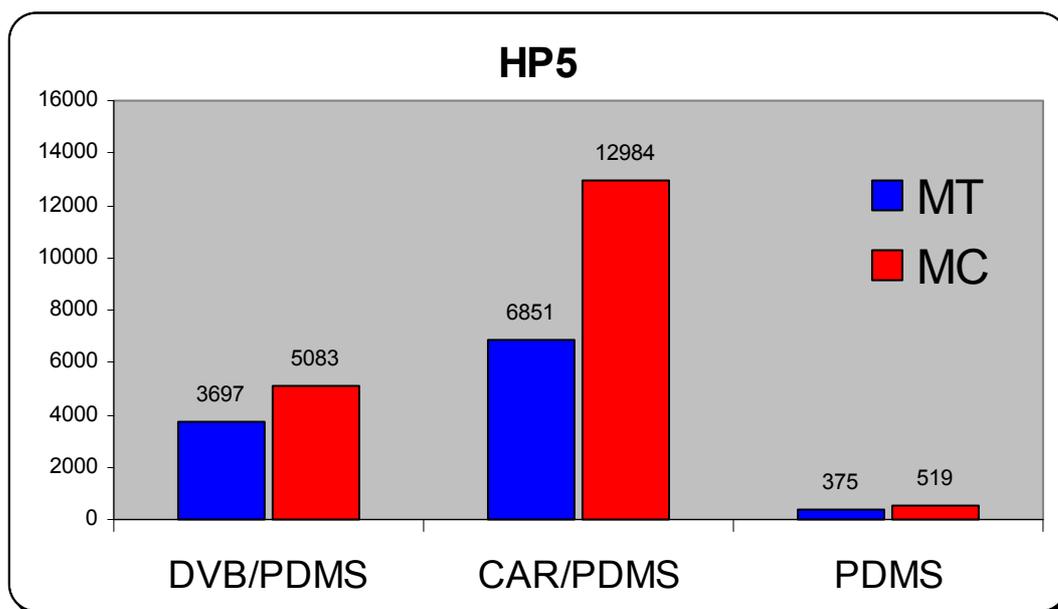


Figura 14 - Comparação das áreas totais na coluna HP-5.

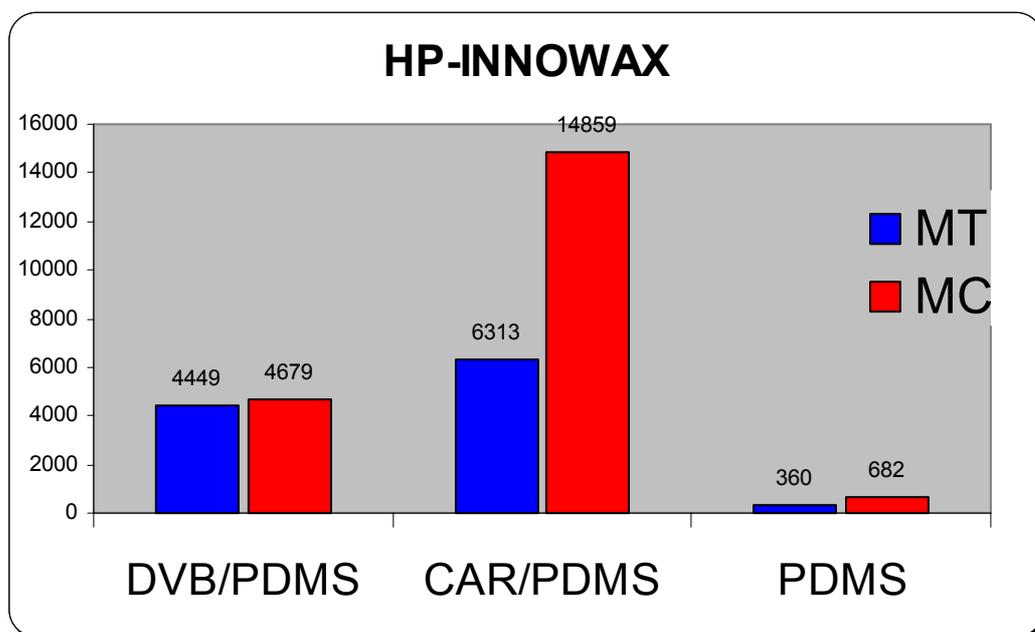


Figura 15 - Comparação das áreas totais na coluna HP-INNOWAX.

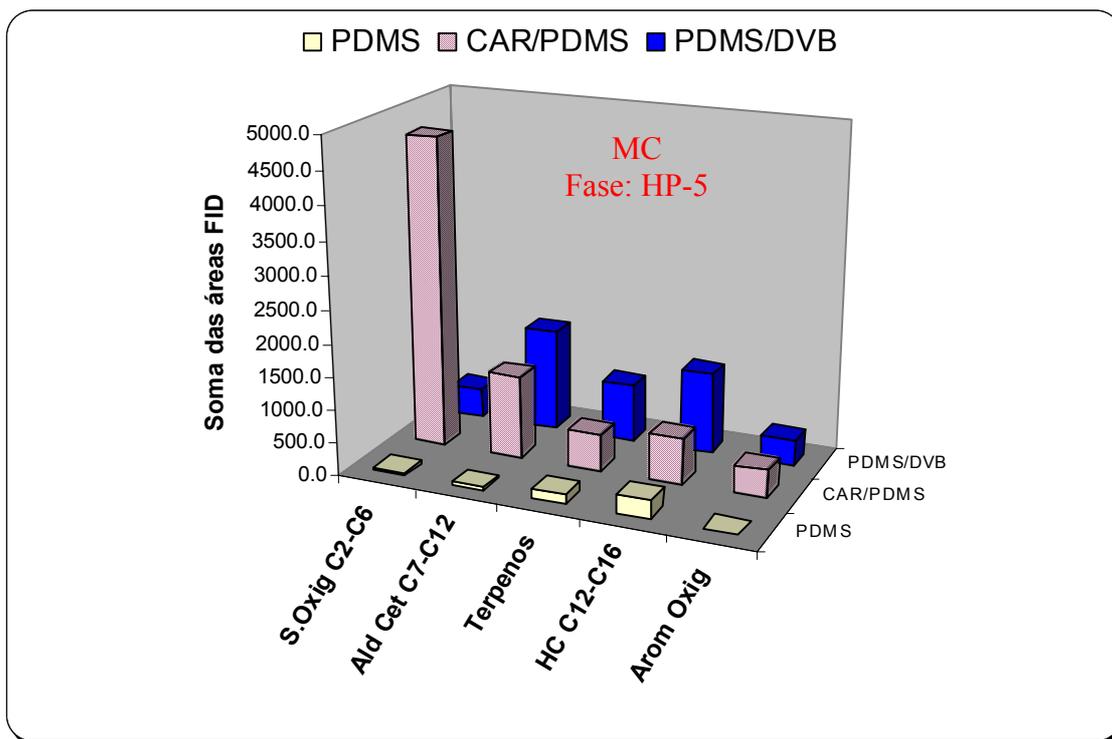


Figura 16 - Comparação da eficiência das fibras PDMS/DVB, CAR/PDMS e PDMS, usadas em HS-SPME, para diferentes classes de substâncias que constituem o aroma da erva-mate cancheada.

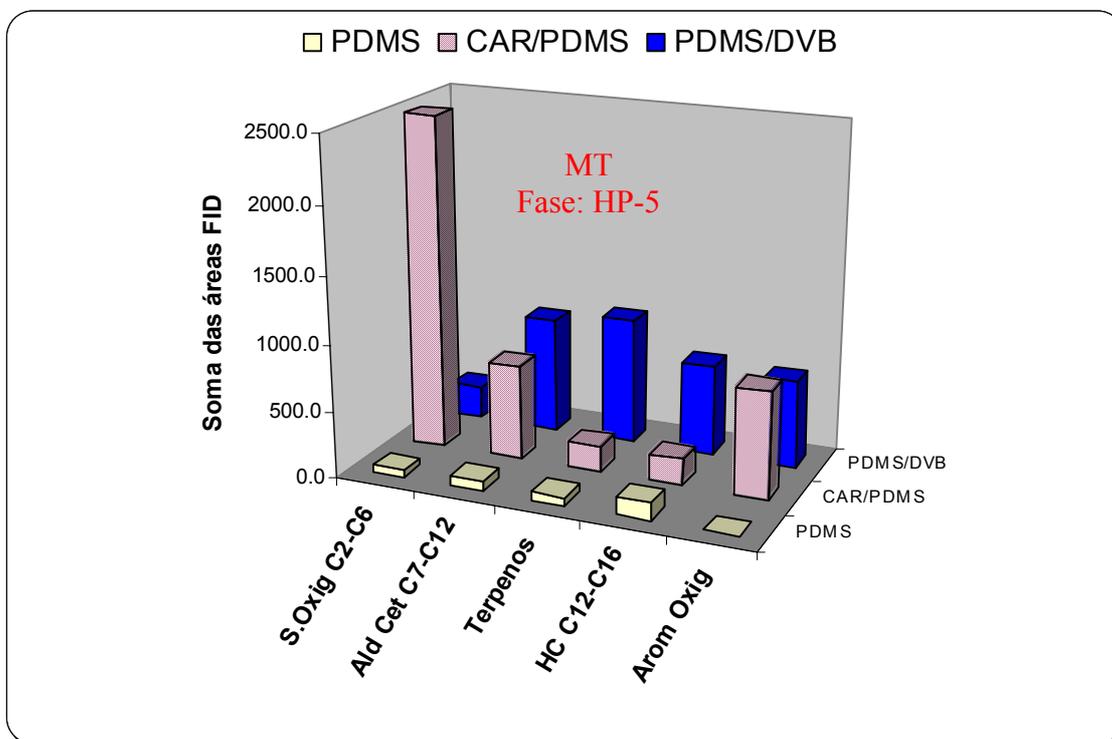


Figura 17 - Comparação da eficiência das fibras PDMS/DVB, CAR/PDMS e PDMS, usadas em HS-SPME, para diferentes classes de substâncias que constituem o aroma da erva-mate tostada

## Seleção das variáveis - planejamento fatorial

Um planejamento fatorial com dois níveis, saturado ( $2_{II}^{6-3}$ ) com oito experiências foi escolhido, a fim de fazer uma triagem das variáveis (fatores). Esse planejamento fatorial foi acrescido de experiências em triplicata no ponto central para se ter uma estimativa do erro experimental e avaliação da significância estatística dos efeitos. Os resultados obtidos, a partir dos dados da Tabela 06, permitem verificar o seguinte:

- Os parâmetros temperatura (fator 1) e tempo de extração (fator 2) foram os mais importantes, ou seja tiveram os maiores valores em módulo, sendo que o primeiro foi o mais relevante para todas as substâncias.
- Há interação significativa entre os fatores 1 e 2 com exceção das substâncias mais voláteis do grupo A<sup>3</sup> (1-penten-3-ol e hexanal, por exemplo).
- O efeito negativo da temperatura para as substâncias mais voláteis indicou que quanto menor for a temperatura maior será a resposta para esse grupo.
- O tempo de extração (fator 2) apresentou efeito pequeno para as substâncias voláteis do grupo A e mais significativo para as demais classes.
- O tempo de pré-estabilização (fator 3) mostrou efeito para  $\beta$ -ionona (grupo C) e cafeína (grupo D).
- Não foi detectado efeito para o tempo de desorção (fator 4), com exceção de pequenos efeitos para cafeína. Isso indica que o tempo de permanência da fibra no injetor na faixa de 1 a 3 min parece não ser uma variável importante, a menos que a substância seja pouco volátil.
- A massa de amostra (fator 5) na faixa de 50 a 150 mg, mostrou efeito para todas substâncias.
- A condição de agitação determina a velocidade de extração e o tempo de equilíbrio para extração em meio líquido (PAWLYSZIN, 1997), mas no presente estudo, a agitação não teve influência no rendimento da microextração (fator 6). Esse resultado está de acordo com o trabalho de FREITAS *et al* (2001), onde esse fator não foi considerado importante na amostragem de grãos de café seco por HS-SPME

Após essa série de experiências exploratórias, foram realizadas diversas séries de experiências univariadas a fim de investigar, de forma sistemática, a influência dos fatores mais importantes em intervalos mais amplos.

---

<sup>3 3</sup> Os analitos selecionados foram classificados em quatro grupos de acordo com os índices de retenção calculados: Grupo A:  $I < 900$ ; Grupo B:  $900 < I < 1200$ ; Grupo C:  $1200 < I < 1800$  e Grupo D:  $I > 1800$ .

Tabela 06 – Resultados obtidos com planejamento fatorial saturado ( $2_{II}^{6-3}$ ).

	Grupo	T	1	2	3	12	4	5	6	VAR
1-penten-3-ol	A	50.0	-59.4	-4.9	22.0	5.5	-16.1	12.2	2.3	10.8
Hexanal	A	112.2	-91.2	2.3	16.8	-4.7	1.0	25.7	-6.2	17,6
(E,Z) 2,4-heptadienal	B	108.5	-73.8	42.8	24.0	-84.4	-9.7	41.7	-25.7	18,4
(E,E) 2,4-heptadienal	B	204.9	-146.5	54.3	24.5	-85.2	-1.6	77.9	-11.3	28.4
$\alpha$ -ionona	C	113.0	90.1	31.4	18.9	-34.4	-18.0	26.5	9.5	23,8
geranil acetona	C	678.4	746.3	209.8	12.2	-84.8	-55.2	80.2	14.8	17,4
Beta-ionona	C	428.3	517.9	164.9	43.2	-18.4	-25.7	56.9	24.6	27,5
Cafeína	D	424.9	796.5	209.9	118.9	209.8	106.8	49.2	59.2	65.8

T = média das áreas dos picos nas oito experiências; **fator 1 = temperatura:** (-) 40°C (+) 80°C; **fator 2 = tempo de extração:** (-) 15 min (+) 45 min; **fator 3 = tempo de pré-estabilização:** (-) 10 min (+) 30 min; **fator 4 = tempo de dessorção:** (-) 1 min (+) 3 min; **fator 5 = massa de amostra:** (-) 50 mg (+) 150 mg; **fator 6 = agitação:** (-) 0 min (+) 1000 rpm.

VAR é a variância relacionada ao erro experimental, representa o limite estatístico para definir o efeito de um fator. Se o valor em módulo estiver menor ou na mesma ordem de grandeza que VAR, pode considerar que a variável não tem significância.

Grupo A: Volatil  $I < 900$ ; Grupo B: volatil  $900 < I < 1200$ ; Grupo C: semi-volatil  $1300 < I < 1800$ ; Grupo D: semi-volatil  $I > 1800$ .

## Condições de dessorção

O injetor com e sem divisão de fluxo requer “liner” de volume grande para acomodar a expansão de solvente introduzido na injeção. Entretanto, na injeção SPME, nenhum solvente está presente, logo quanto mais estreito for o diâmetro do “liner” menor será a expansão do vapor, melhorando a eficiência da análise cromatográfica [PAWLISZYN, 1997].

Análises comparativas de amostras de mate cancheado e de mate tostado foram feitas nas mesmas condições de extração, porém com “liner” convencional para o modo sem divisão de fluxo (d.i 2,0 mm.  $V = 0,71$  mL) versus “liner” para SPME (d.i. 0,75 mm; 0,05 mL). Após análise dos cromatogramas obtidos por HS-SPME de amostras MC e MT (Figura 18), foi possível perceber claramente que os sinais correspondentes às substâncias mais voláteis (menores  $t_R$ ) apareceram mais nítidos com o uso do “liner” SPME, devido a melhor focalização do vapor dessorvido. Os sinais das substâncias com maiores tempos de retenção apresentaram algumas diferenças, porém pouco significativas com respeito a largura da área. No geral, a utilização do “liner” 0,75 mm proporcionou maior eficiência na análise cromatográfica em comparação com o “liner” convencional de 2,0 mm, mostrando com isso que a sua utilização na técnica SPME é imprescindível.

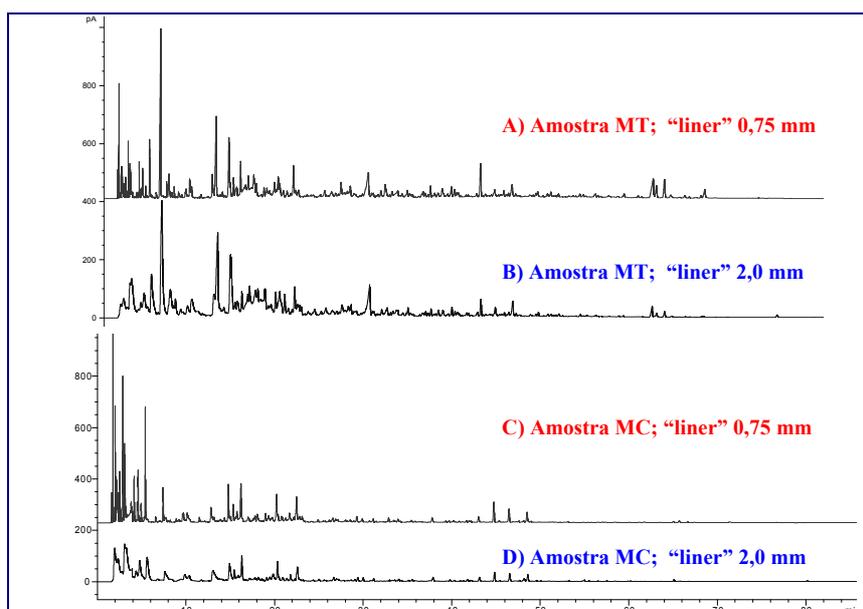


Figura 18 - Cromatogramas das amostras MT e MC obtidos com “liner” SPME (0,75 mm) e “liner” convencional (2,0 mm), nas seguintes condições:  $T = 80^{\circ}\text{C}$ ;  $t_{pre} = 15$  min;  $t_{ext} = 30$  min;  $t_{inj} = 5$  min;  $T_{inj} 280^{\circ}\text{C}$ , fibra CAR/PDMS.

O ajuste da temperatura de dessorção ( $T_{inj}$ ) é importante para garantir um processo de dessorção eficiente. Assim sendo,  $T_{inj}$  deve ser a maior possível para minimizar os resíduos presentes na fibra após a etapa de dessorção, com o compromisso de evitar temperaturas excessivamente altas, a ponto de danificar a cobertura da fibra. As Figuras 19 e 20 mostram os cromatogramas obtidos após extrações nas mesmas condições de uma amostra de mate chimarrão com as fibras PDMS/DVB e CAR/PDMS e dessorções em temperaturas variadas. Com a fibra PDMS/DVB foi possível notar cromatogramas praticamente idênticos nas temperaturas de 190°C; 210°C; 230°C; 250°C e 270°C, o que não ocorreu na temperatura de 170°C na qual houve perda de resposta de alguns sinais (Figura 19). Com a fibra CAR/PDMS, os cromatogramas foram praticamente idênticos nas temperaturas de 260°C; 280°C e 300°C e a perda de resposta ficou mais evidente nas temperaturas de 220°C e 240°C (Figura 20).

Como a erva-mate é uma matriz complexa, cujo aroma é constituído por centenas de substâncias voláteis e semi-voláteis, foram escolhidas temperaturas 10°C a 20°C menor ou igual à temperatura máxima recomendada pelo fabricante das fibras, para realizar os estudos subsequentes (Tabela 7). As temperaturas selecionadas obedeceram a um compromisso que permita a dessorção térmica eficiente e o aumento do tempo de vida útil da fibra.

Tabela 07 – Relação das fibras utilizadas neste trabalho e as respectivas temperaturas operacionais.

Cobertura de fibra	Espessura da camada	$T_{inj}$ adotada	Faixa operacional recomendada
PDMS	100 $\mu\text{m}$	260°C	200-270°C
CW/DVB	70 $\mu\text{m}$	250°C	200-260°C
PDMS/DVB	65 $\mu\text{m}$	260°C	200-270°C
CAR/PDMS	85 $\mu\text{m}$	300°C	240-300°C
DVB/CAR/PDMS	50/30 $\mu\text{m}$	260°C	230-270°C

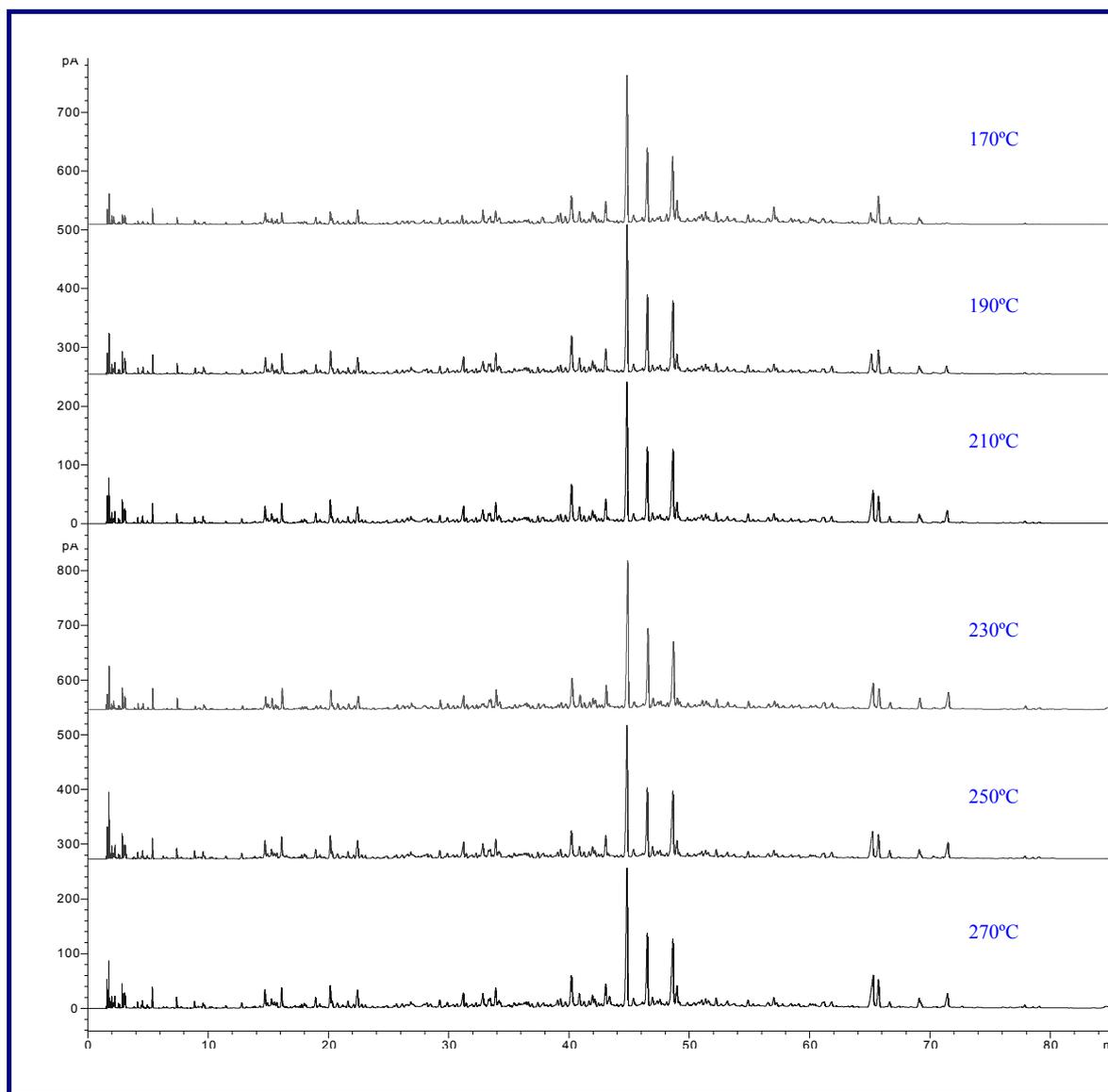


Figura 19 - Cromatogramas da amostra MC obtidos com a fibra PDMS/DVB em diferentes temperaturas do injetor na faixa 170 – 270°C.  $m = 200$  mg;  $T = 80^\circ\text{C}$ ;  $t_{pre} = 15$  min;  $t_{ext} = 60$  min;  $t_{inj} = 5$  min.

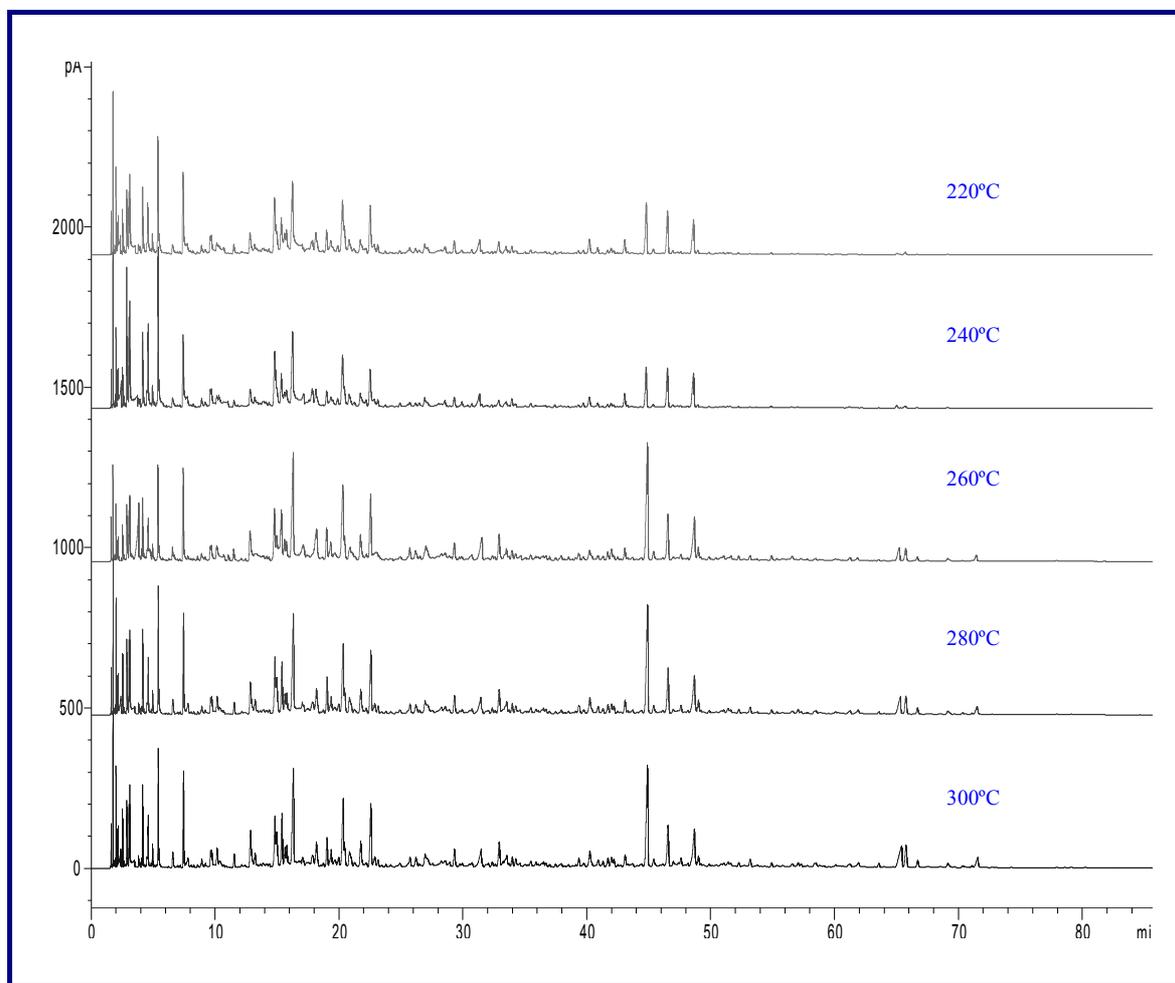


Figura 20 - Cromatogramas da amostra MC obtidos com a fibra CAR/PDMS em diferentes temperaturas do injetor na faixa 220 – 300°C.  $m = 200 \text{ mg}$ ;  $T = 80^\circ\text{C}$ ;  $t_{pre} = 15 \text{ min}$ ;  $t_{ext} = 60 \text{ min}$ ;  $t_{inj} = 5 \text{ min}$ .

A repetibilidade da etapa de dessorção foi investigada em diversos tempos com a fibra PDMS/DVB e com o injetor aquecido a 260°C (Figura 21). Os cromatogramas obtidos foram muito semelhantes, com CV médio de 12,7% indicando que nesse intervalo o tempo de dessorção não afeta significativamente a precisão.

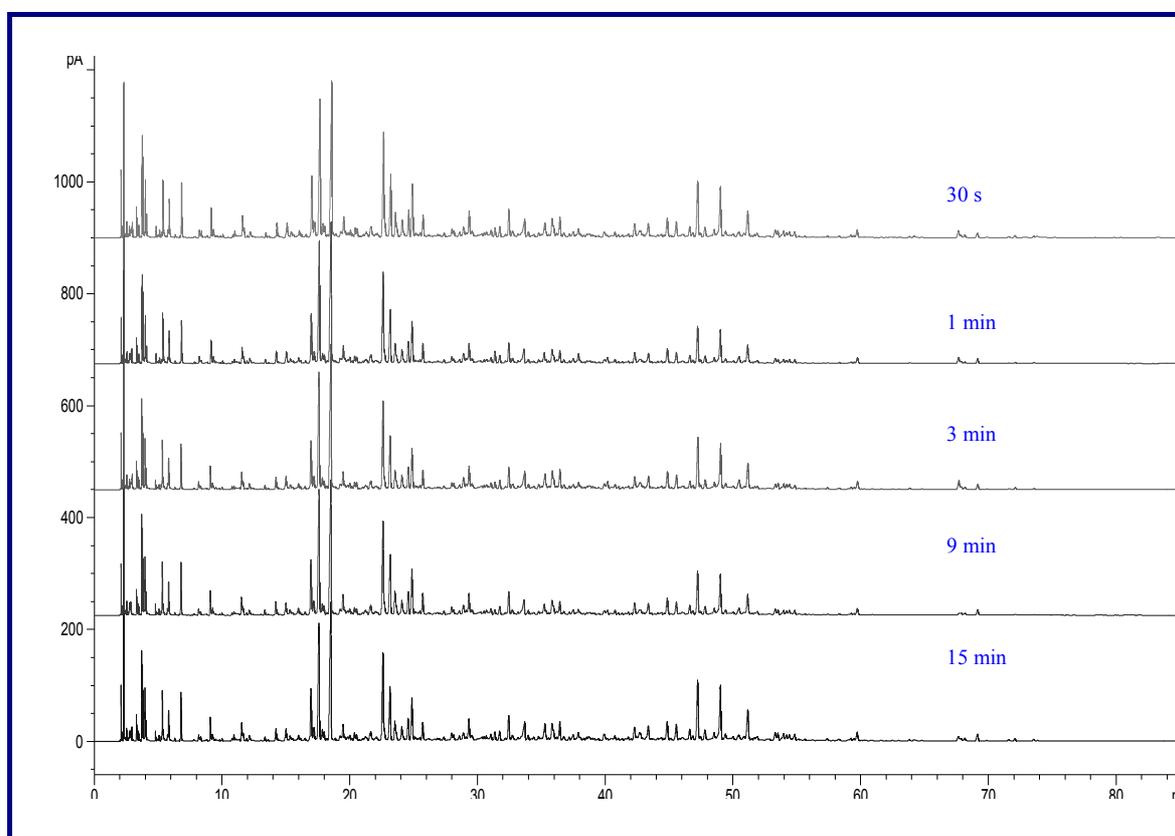


Figura 21 - Cromatogramas da amostra MC extraída a 80°C/60 min com PDMS/DVB, mostrando a dessorção em diferentes tempos na temperatura de 260°C.

Numa avaliação mais criteriosa do tempo de dessorção, o aroma da amostra MC foi extraído a 120°C e 60 min com cada uma das fibras PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS, utilizadas neste trabalho <sup>4</sup> e, em seguida, a respectiva fibra foi submetida à dessorções sucessivas na porta do injetor. O monitoramento dos sinais após ciclos de dessorção de 3 min indicou a presença de resíduos de substâncias na fibra. A percentagem das substâncias dessorvidas após a permanência da fibra no injetor foi calculada a partir da soma das áreas de um determinado cromatograma em relação ao somatório das áreas dos sinais de todos os cromatogramas, obtidos com a respectiva fibra após 18 min de dessorções sucessivas. As Tabelas 8 e 9 exibem os dados da eficiência de dessorção em termos de  $AN_i$ , que é definido a seguir:

$$AN_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^3 A_i} \times 100$$

Onde  $AN_i$ , é a razão da área em percentagem;  $A_i$  é a área ou a soma das áreas do (s) sinal (is) monitorados após cada passo de dessorção;  $\sum_{i=1}^3 A_i$  é a área total após 18 min ou 6 passos de dessorção sucessivos na temperatura selecionada.

Dessa forma foi possível constatar que um tempo inicial de 3 min não foi suficiente para dessorver totalmente o material global extraído, mas os valores de  $AN_i > 90\%$  (Tabela 8) indicaram eficiências de dessorção aceitáveis (Pawliszyn, 2004). As fibras CAR/PDMS e PDMS proporcionaram eficiências de dessorção menores, devido a primeira fibra conter basicamente Carboxen 1006, que é um forte adsorvente e a segunda ter a maior espessura de camada (Tabela 7). As demais fibras investigadas, PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS, foram bem mais eficientes.

Mas o efeito da etapa de dessorção pôde ser mais bem evidenciado, nessa série de experiências, pelo monitoramento da área residual de um marcador, no caso em questão a cafeína. A Figura 22 mostra os cromatogramas obtidos após sucessivas etapas de dessorção, nos quais a cafeína gerou o maior sinal residual. Analisando os dados da Tabela 09 verifica-se que a fibra CAR/PDMS dessorveu do total extraído de cafeína,

<sup>4</sup> Para essa série de experiências, as extrações foram feitas a 120°C e 60 min. Essa condição favorece a adsorção de substâncias que tem mais afinidade pela cobertura da fibra (alto  $K_{df}$ ), como a cafeína.

somente 67% a 280°C e 82% a 300°C após 3 min. Isso prova que tempos de dessorção maiores são efetivamente necessários para prevenir resíduos de injeções anteriores, principalmente quando substâncias com maior afinidade pela cobertura da fibra, como a cafeína, estiverem adsorvidas em grande quantidade. As curvas de dessorção relacionadas com a percentagem do sinal residual de cafeína em função do tempo de dessorção para cada fibra estão representadas na Figura 23. É notável que a cobertura da fibra CAR/PDMS dessorveu a cafeína de forma mais lenta do que as demais fibras. Ainda com respeito aos resultados obtidos com CAR/PDMS, a temperatura de 300°C foi mais eficiente do que a 280°C, evidentemente por causa do processo de dessorção ser mais rápido na temperatura maior. Esse resultado contribuiu para a escolha de 300°C como temperatura operacional para essa fibra no decorrer do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa. É interessante destacar que apesar das coberturas das fibras PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS terem extraído a cafeína cerca de dez vezes mais do que CAR/PDMS, essas fibras foram igualmente mais eficientes no processo de dessorção (Tabela 9), facilitando tanto a entrada, quanto a saída de cafeína.. Isso deve ter acontecido por causa da espessura, do tipo de interação envolvida e principalmente da maior porosidade do divinilbenzeno (DVB). No geral, os sinais residuais de cafeína após 15 min de dessorção foram considerados desprezíveis do ponto de vista analítico para as fibras PDMS/DVB (0,07%) e DVB/CAR/PDMS (0,20%). Além desse tempo, a percentagem residual de cafeína na fibra decresce lentamente (Figura 23), por isso não vale a pena estender demasiadamente o tempo de dessorção a fim de poupar termicamente a fibra, evitando desgastes desnecessários. Conforme foi verificado anteriormente, a precisão das análises foi satisfatória com a fibra PDMS/DVB (Figura 21), mostrando que é possível operar com tempos menores para essa fibra sem prejuízos na qualidade dos resultados. Isso vale também para DVB/CAR/PDMS.

Com o objetivo de padronizar as experiências subseqüentes, foi escolhido um tempo de dessorção de 15 min no modo sem divisão de fluxo, a fim de garantir um processo de dessorção mais eficiente. Contudo a utilização de coberturas de fibra, como CAR/PDMS e PDMS, cujos processos de dessorção foram mais lentos, exige maior atenção, pois após algumas injeções sucessivas, as análises subseqüentes poderiam ser prejudicadas. Por isso é recomendável estender um pouco mais o tempo de dessorção ou condicionar novamente a fibra na porta do injetor antes da análise, para não acumular resíduos que possam interferir nas análises subseqüentes, principalmente se substâncias de altos  $K_{fh}$  em altas concentrações estiverem presentes na fibra.

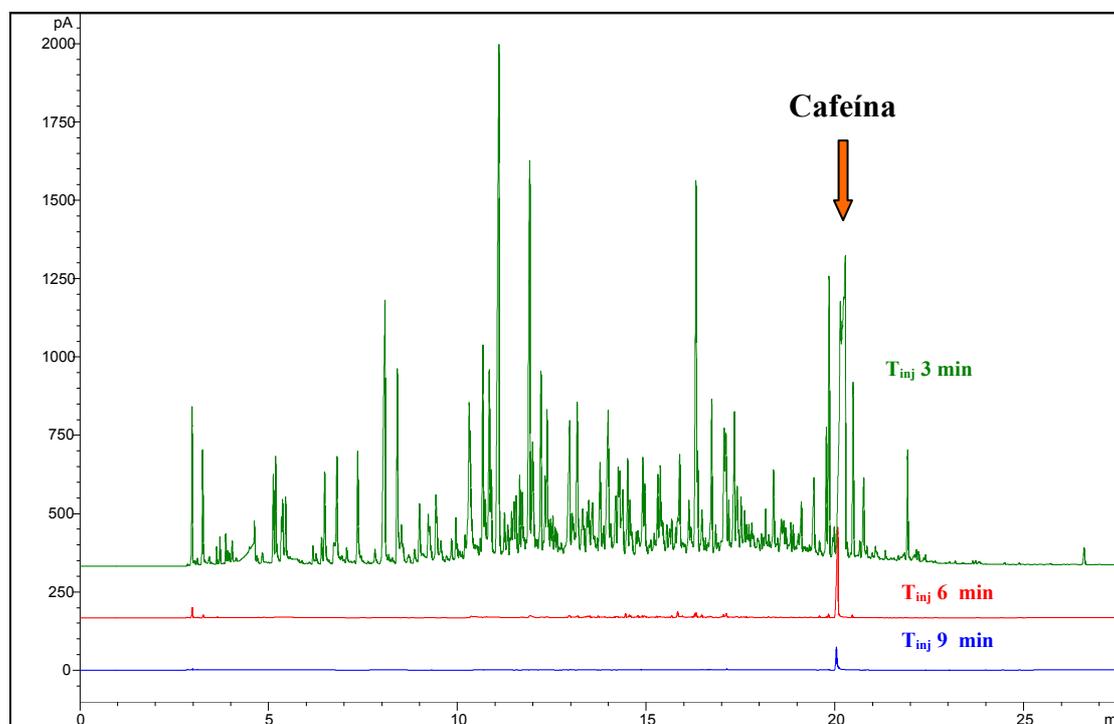


Figura 22 - Cromatogramas com ciclos de dessorção de 3 min a 280°C de amostra de mate cancheado após extração por HS-SPME com CAR/PDMS a 120°C e 60 min.

Tabela 08 – Eficiência de dessorção  $AN_i$  % material total dessorvido, após ciclos de 3 min, das fibras e condições de dessorção indicadas.

tempo (min)	CAR/PDMS 85 $\mu$ m 280°C		CAR/PDMS 85 $\mu$ m 300°C		PDMS/DVB 65 $\mu$ m 260°C		DVB/CAR/PDMS 50-30 $\mu$ m 260°C		PDMS 100 $\mu$ m 260°C	
	Área dessorvida	$AN_i$ (%)	Área dessorvida	$AN_i$ (%)	Área dessorvida	$AN_i$ (%)	Área dessorvida	$AN_i$ (%)	Área dessorvida	$AN_i$ (%)
3	106.079	95,9	122.367	95,8	40.907	99,3	59.623	99,8	17.370	97,3
6	2.603	2,3	2.636	2,1	146	0,30	-	-	345	1,9
9	1.129	1,0	1.211	0,95	49	0,10	-	-	59	0,33
12	398	0,36	666	0,52	34	0,08	-	-	40	0,22
15	331	0,30	480	0,38	26	0,06	99	0,2	33	0,19
18	117	0,20	444	0,27	26	0,06	-	-	12	0,07
$\Sigma$	110.658	100	127.804	100	41.190	100	59.722	100	17.858	100

Tabela 09 – Eficiência de dessorção  $AN_i$  % de cafeína dessorvida após ciclos de 3 min das fibras e condição de dessorção indicadas.

tempo (min)	CAR/PDMS 85 $\mu$ m 280°C		CAR/PDMS 85 $\mu$ m 300°C		PDMS/DVB 65 $\mu$ m 260°C		DVB/CAR/PDMS 50-30 $\mu$ m 260°C		PDMS 100 $\mu$ m 260°C	
	Área dessorvida	$AN_i$ cafeína (%)	Área dessorvida	$AN_i$ cafeína (%)	Área dessorvida	$AN_i$ cafeína (%)	Área dessorvida	$AN_i$ cafeína (%)	Área dessorvida	$AN_i$ cafeína (%)
3	1.266	74,2	1.500	83,0	10.367	99,4	10.781	99,8	1682	88,9
6	193	11,3	144	7,9	24	0,23	-	-	92,4	4,9
9	130	7,6	79	4,4	12	0,12	-	-	51	3,0
12	60	3,5	46	2,5	9	0,09	-	-	32	1,7
15	36	2,1	23	1,3	7	0,07	16	0,20	23	1,2
18	21	1,2	15	0,81	6	0,06	-	-	12	0,60
$\Sigma$	1.707	100	1.807	100	10.425	100	10.797	100	1.892	100

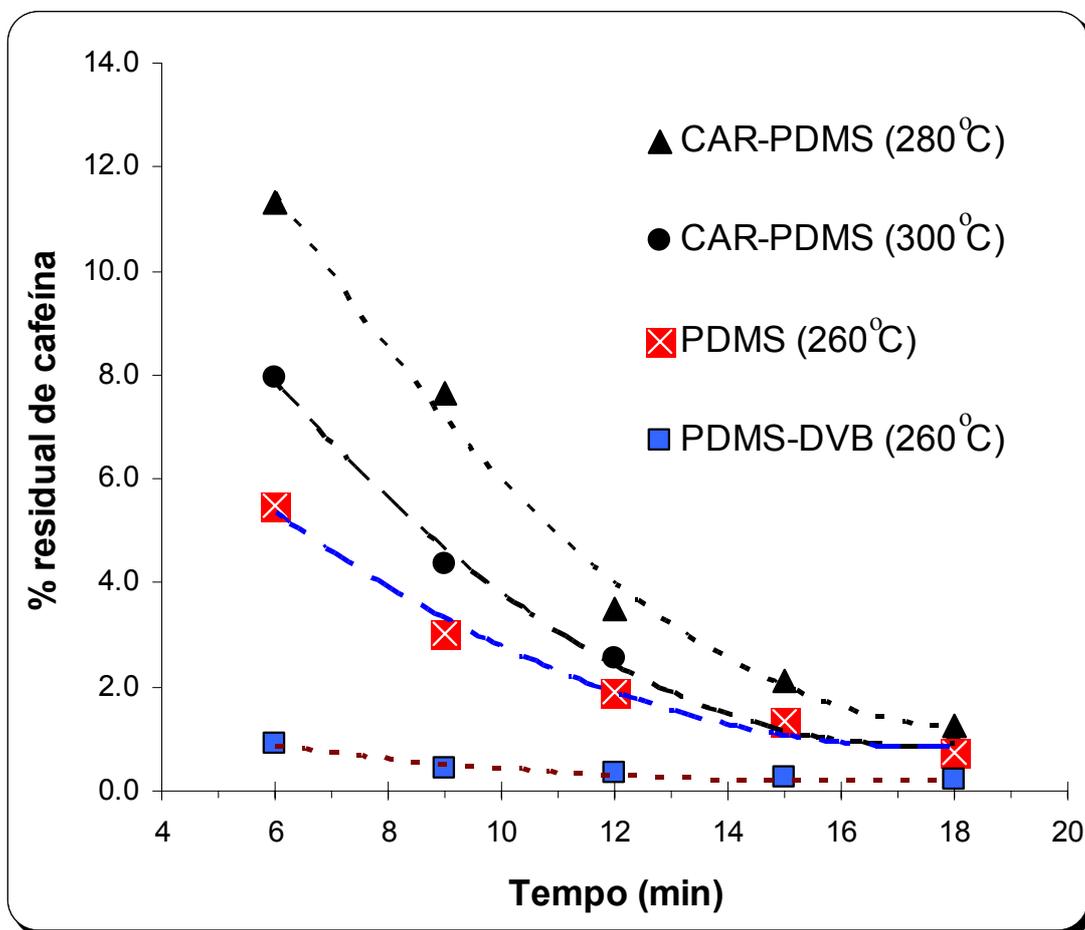


Figura 23 - Curvas de desorção de cafeína em função do tempo com CAR/PDMS a 280°C; CAR/PDMS a 300°C; PDMS/DVB a 260°C e PDMS a 260°C.

## Critérios para otimização das condições de extração

A matriz erva-mate exerce efeito importante sobre o processo e a eficiência de extração por HS-SPME. Portanto, a otimização e o desenvolvimento de métodos HS-SPME devem ser feitos com a presença da matriz.

Para simplificar a avaliação dos cromatogramas obtidos a partir das séries de experiências visando a otimização do método HS-SPME, vinte e quatro analitos foram selecionados, englobando uma variedade de componentes representativos do aroma da erva-mate cancheada. O critério usado para a escolha dos analitos foi a sensibilidade e a resolução cromatográfica. Os analitos foram classificados como voláteis e semi-voláteis e agrupados de acordo com os seus índices de retenção  $I$  (Tabela 10).

As áreas dos sinais correspondentes a um determinado grupo ( $A_N$ ) foram normalizadas pela média de acordo com a expressão 6:

$$A_N = \frac{A_X}{A_P} \quad (6)$$

Onde  $A_X$  é média das áreas dos sinais relativos às substâncias do grupo X num determinado procedimento e  $A_P$  é a média das áreas de todos os grupos no respectivo procedimento. Dessa forma as variações correspondentes a um determinado grupo em diferentes concentrações são apresentadas numa escala normalizada.

Tabela 10 - Índices de retenção (*I*) dos analitos selecionados a partir do aroma da erva-mate cancheada obtido por HS-SPME-GC.

nº	analito	<i>I</i> obs	t <sub>R</sub> (min)	grupo
<u>1</u>	Ácido acético <sup>b*</sup>	596	2,88	A
<u>2</u>	1-penten-3-ol <sup>b*</sup>	676	3,66	A
<u>3</u>	1-penten-3-ona <sup>b*</sup>	682	3,73	A
<u>4</u>	pentanal <sup>a*</sup>	699	3,91	A
<u>5</u>	( <i>E</i> )-2-pentenal <sup>a*</sup>	753	5,25	A
<u>6</u>	hexanal <sup>a*</sup>	802	6,71	A
<u>7</u>	( <i>E</i> )-2-hexenal <sup>a*</sup>	855	9,00	A
<u>8</u>	6-metil-5-hepten-2-ona <sup>a*</sup>	989	16,92	B
<u>9</u>	( <i>E,Z</i> )-2,4-heptadienal <sup>a*</sup>	998	17,48	B
<u>10</u>	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal <sup>a*</sup>	1014	18,37	B
<u>11</u>	( <i>E,E</i> )-3,5-octadien-2-ona <sup>b*</sup>	1092	24,04	B
<u>12</u>	linalol <sup>a*</sup>	1098	24,53	B
<u>13</u>	dodecano <sup>b</sup>	1200	31,31	C
<u>14</u>	decanal <sup>a*</sup>	1206	31,69	C
<u>15</u>	β-ciclocitral <sup>b</sup>	1217	32,41	C
<u>16</u>	3-etil-4-metil-2,5-diona-(1H)-pirrol <sup>b</sup>	1238	33,77	C
<u>17</u>	1 ou 2 metilnaftaleno	1280	36,42	C
<u>18</u>	α-copaeno <sup>a</sup>	1370	42,25	C
<u>19</u>	α-ionona <sup>a*</sup>	1424	45,55	C
<u>20</u>	geranilacetona <sup>a*</sup>	1454	47,24	C
<u>21</u>	β-ionona <sup>a*</sup>	1485	49,02	C
<u>22</u>	diidroactinidiolido <sup>b*</sup>	1519	51,18	C
<u>23</u>	cafeína <sup>c</sup>	1830	67,70	D
<u>24</u>	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona <sup>c*</sup>	1846	68,14	D

<sup>a</sup> Valores de *I* publicados por ADAMS (1995).

\* substância descrita como componente do aroma da erva-mate (KAWAKAMI & KOBAYASHI, 1991).

Grupo A: volátil *I* < 900; Grupo B: volátil 900 < *I* < 1200; Grupo C: semi-volátil 1300 < *I* < 1800; Grupo D: semi-volátil *I* > 1800.

## Efeito da quantidade de amostra

A influência da quantidade de amostra foi investigada usando 60 min de extração a 80°C e procedimento de amostragem seca. O número de moles de analitos sorvidos na fibra SPME depende da quantidade de amostra e também do volume da fase gasosa (PAWLISZYN, 1997). Um aumento na quantidade de amostra dentro do frasco, acompanhado de um decréscimo de volume do “headspace”, resulta em maior massa de substâncias sorvidas pela fibra. As curvas de resposta relativa de quatro grupos de analitos<sup>5</sup> em função da massa da amostra são representadas na Figura 24. Esse efeito foi observado até aproximadamente 100 mg de amostra em frasco de 4 mL e a partir desse ponto o equilíbrio foi atingido. Contudo, houve efeito diferenciado dependendo da volatilidade dos analitos, pois na medida em que a massa da amostra aumentou, a resposta para os componentes mais voláteis (Grupos A e B) continuou a ser intensificada, enquanto que a resposta para os menos voláteis (grupos C e D) diminuiu de forma suave. Esse resultado está de acordo com o estudo sobre a análise do aroma de lúpulo por HS-SPME (KAVACEVIC *et al.*, 2001) no qual a recuperação de mirceno (monoterpeno mais volátil) foi maior com o aumento de massa de amostra, enquanto que a de humuleno (sesquiterpeno menos volátil) foi menor.

Dessa forma, foi escolhida massa de amostra de 150 mg para as experiências subsequentes, desde que o equilíbrio em função da massa foi atingido no intervalo de 100 mg a 200 mg.

---

<sup>5</sup> Os analitos selecionados foram classificados em quatro grupos de acordo com os índices de retenção calculados: Grupo A:  $I < 900$ ; Grupo B:  $900 < I < 1200$ ; Grupo C:  $1200 < I < 1800$  e Grupo D:  $I > 1800$ .

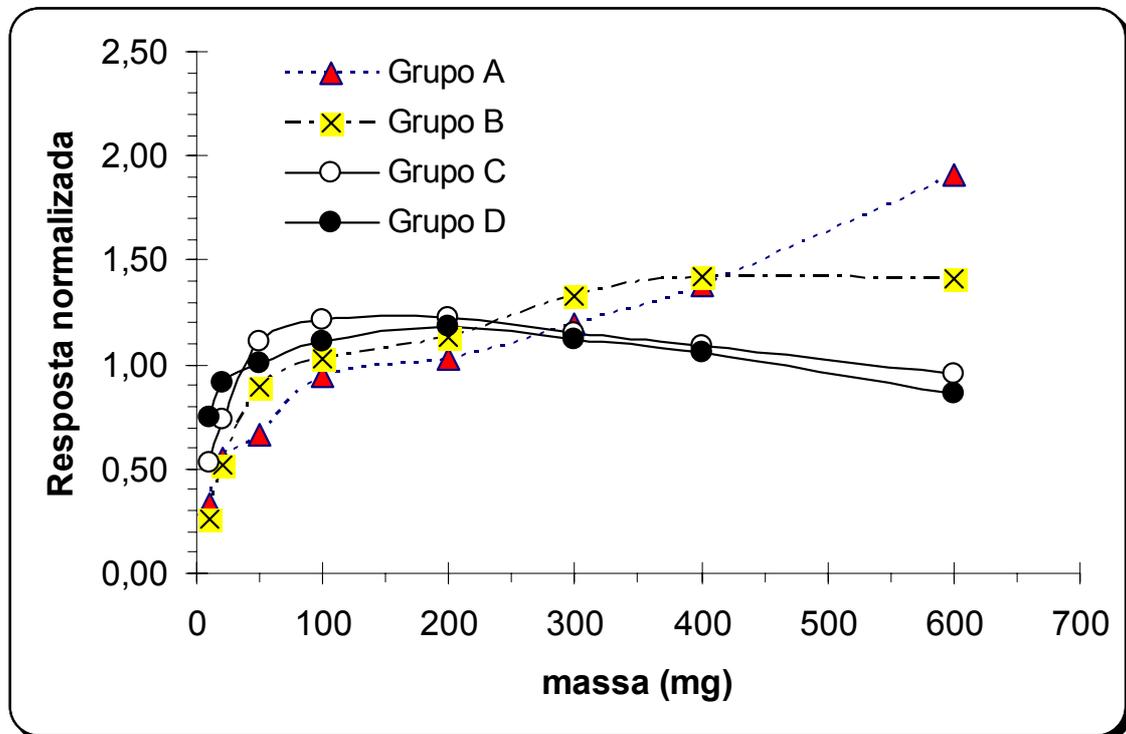


Figura 24 - Influência da quantidade de amostra na eficiência da HS-SPME com fibra PDMS/DVB para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate.

## Efeito do tempo de pré-equilíbrio

O tempo de pré-equilíbrio ( $t_{pre}$ ) é o tempo necessário para equilibrar termicamente a matriz com o “headspace” antes da exposição da fibra. Esse tempo está relacionado somente com  $K_{hm}$  e não com  $K_{fh}$ , haja vista que, até então, a fibra ainda não estava presente no processo. O planejamento fatorial executado previamente, mostrou que existe efeito para esse fator entre 10 min e 30 min, para a extração de algumas substâncias semi-voláteis (Tabela 6).

Para evidenciar esse efeito foram construídas curvas univariadas das respostas relativas aos grupos<sup>6</sup> A, B, C e D em função do  $t_{pre}$  (Figura 25 a-c), mantendo as demais condições constantes, principalmente a temperatura de extração ( $T_{ext}$ ) e o tempo de exposição da fibra no “headspace” ( $t_{ext}$ ). Para um tempo de exposição curto ( $t_{ext} = 5$  min), o efeito do  $t_{pre}$  é significativo para todos os grupos com a eficiência da extração aumentando na medida em que o  $t_{pre}$  torna-se mais estendido. Isso pode ser compreendido devido ao equilíbrio  $K_{fh}$  ser atingido de forma muito mais rápida do que  $K_{hm}$  (ROBERTS *et al.*, 2000), ou seja, o equilíbrio “headspace”-matriz ainda não foi atingido até  $t_{pre} \leq 90$  min. No momento que a fibra é exposta no “headspace”, o equilíbrio  $K_{fh}$  é rapidamente atingido, fazendo com que a resposta dependa fundamentalmente do  $t_{pre}$ . Por outro lado, se a fibra fica um tempo maior no “headspace”, o tempo de pré-equilíbrio passa a ser um parâmetro significativo somente para os grupos de substâncias menos voláteis. A comparação dos resultados obtidos com  $t_{ext}$  mais estendidos (50 min e 60 min), mostrou que a eficiência da extração para as substâncias mais voláteis (grupos A e B) não dependeu do  $t_{pre}$  enquanto que a eficiência da extração para as menos voláteis (grupos C e D) passou a ficar dependente somente quando o  $t_{pre}$  foi superior a 15 min, não havendo, portanto a partir daí nenhum ganho significativo de resposta. De forma similar, Augusto *et al.* (2004) constataram que um tempo de pré-equilíbrio de 15 min é suficiente para garantir o equilíbrio amostra/“headspace” na análise de alquilpirazinas numa mistura não homogênea de água e licor de cacau.

<sup>6</sup> Os analitos selecionados foram classificados em quatro grupos de acordo com os índices de retenção calculados: Grupo A:  $I < 900$ ; Grupo B:  $900 < I < 1200$ ; Grupo C:  $1200 < I < 1800$  e Grupo D:  $I > 1800$ .

De modo geral, o tempo de pré-equilíbrio não afetou o resultado quando o equilíbrio matriz/fibra ( $K_{SPME}$ ) foi atingido no tempo de extração ótimo (50-60 min). De forma similar, FROST *et al.* (2003) também não acharam efeito significativo para  $t_{pre}$  na faixa de 1 min a 30 min na análise de fármacos por HS-SPME, pois as experiências foram feitas com a fibra exposta durante 20 min, que por sua vez era o tempo ótimo de extração ( $t_{ext}$ ). É possível que a presença da fibra esteja induzindo volatilização adicional das substâncias a partir da matriz, enriquecendo o “headspace” quando o equilíbrio  $K_{hm}$  ainda não tiver sido atingido. Isso está de acordo com estudo de ROBERTS *et al.* (2000) no qual foi demonstrado que o rendimento da microextração de analitos voláteis com alto  $K_{hm}$  e de baixo a moderado  $K_{fh}$  independe se a fibra é colocada no “headspace” na presença e na ausência da matriz, o que não ocorre com analitos semi-voláteis que tem mais afinidade pela cobertura da fibra. Sendo assim, a presença da fibra diminui o tempo necessário para atingir o equilíbrio, mas não é recomendável colocar a amostra no frasco e começar imediatamente a extração com a fibra, pois a matriz precisa estar em equilíbrio térmico. Portanto, para eliminar variações quanto ao tempo de pré-equilíbrio, os estudos subsequentes foram realizados com um tempo de 15 min antes da exposição da fibra no “headspace”.

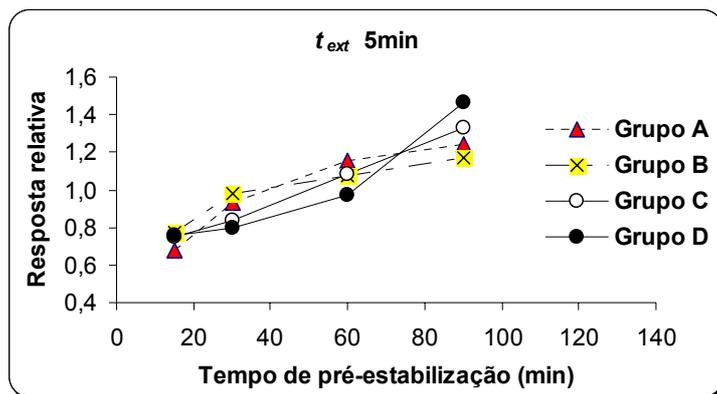


Figura 25a - Influência do tempo de pré-equilíbrio ( $t_{pre}$ ) na eficiência da HS-SPME com fibra DVB/CAR/PDMS para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate, considerando  $t_{ext} = 5 \text{ min}$ ,  $T_{ext} = 80^\circ\text{C}$ ; 200 mg.

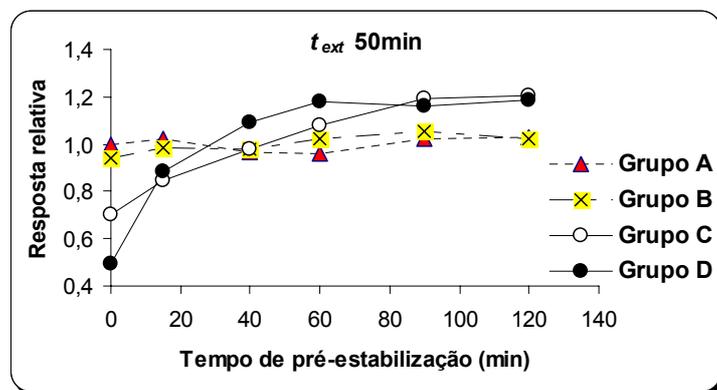


Figura 25b - Influência do tempo de pré-equilíbrio ( $t_{pre}$ ) na eficiência da HS-SPME com fibra DVB/CAR/PDMS para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate, considerando  $t_{ext} = 50 \text{ min}$ ,  $T_{ext} = 80^\circ\text{C}$ ; 200 mg.

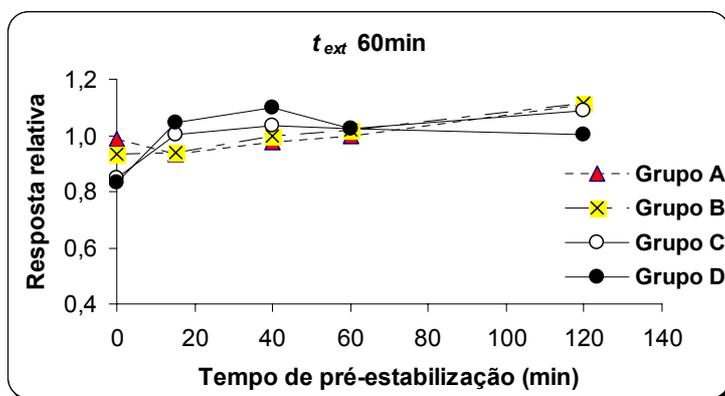


Figura 25c - Influência do tempo de pré-equilíbrio ( $t_{pre}$ ) na eficiência da HS-SPME com fibra DVB/CAR/PDMS para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate, considerando  $t_{ext} = 60 \text{ min}$ ,  $T_{ext} = 80^\circ\text{C}$ ; 200 mg.

Se a quantidade de amostra for aumentada, o tempo necessário para atingir o equilíbrio térmico pode ser ainda maior. Para demonstrar isso, foram realizadas experiências adicionais com a fibra DVB/CAR/PDMS a  $T$  80°C e  $t_{ext}$  60 min e quantidades de amostra e tempos de pré-equilíbrio variáveis. De acordo com a Figura 26, os sinais oriundos dos componentes mais voláteis (grupos A e B) praticamente não foram alterados por mudanças nos fatores: quantidade de amostra e  $t_{pre}$  em todas as experiências adicionais, X, Y, W e Z. No entanto, os sinais gerados pelos menos voláteis (grupos C e D) sofreram alterações significativas. Observando a Figura 26 foi possível notar que a experiência X forneceu maior resposta para os grupos semi-voláteis C e D em comparação com a experiência Y cuja massa de amostra é maior (200 mg na Exp X versus 600 mg na Exp Y), sendo o mesmo  $t_{pre}$  (15 min). Já nas experiências W e Z, em que a quantidade de amostra foi maior (igual da Exp Y), porém quando os tempos de pré-equilíbrio foram mais estendidos (60 e 120 min, respectivamente), forneceram respostas equivalentes à experiência X para o grupo C. Com respeito ao grupo D em que as substâncias têm as maiores  $K_{fh}$  e menores  $K_{hm}$ , é de se esperar que o tempo de pré-equilíbrio necessário seja maior (PAWLISZYN, 1997), haja vista que houve o surgimento de novos sinais relativos a substâncias desse grupo nas experiências W e Z. Isso significa que o tempo de exposição da fibra de 60 min, empregado nessa série de experiências, ainda não foi o suficiente para permitir que o equilíbrio das substâncias menos voláteis fosse atingido. Em suma, quanto maior for a massa da amostra, maior será o tempo de extração necessário para analitos semi-voláteis.

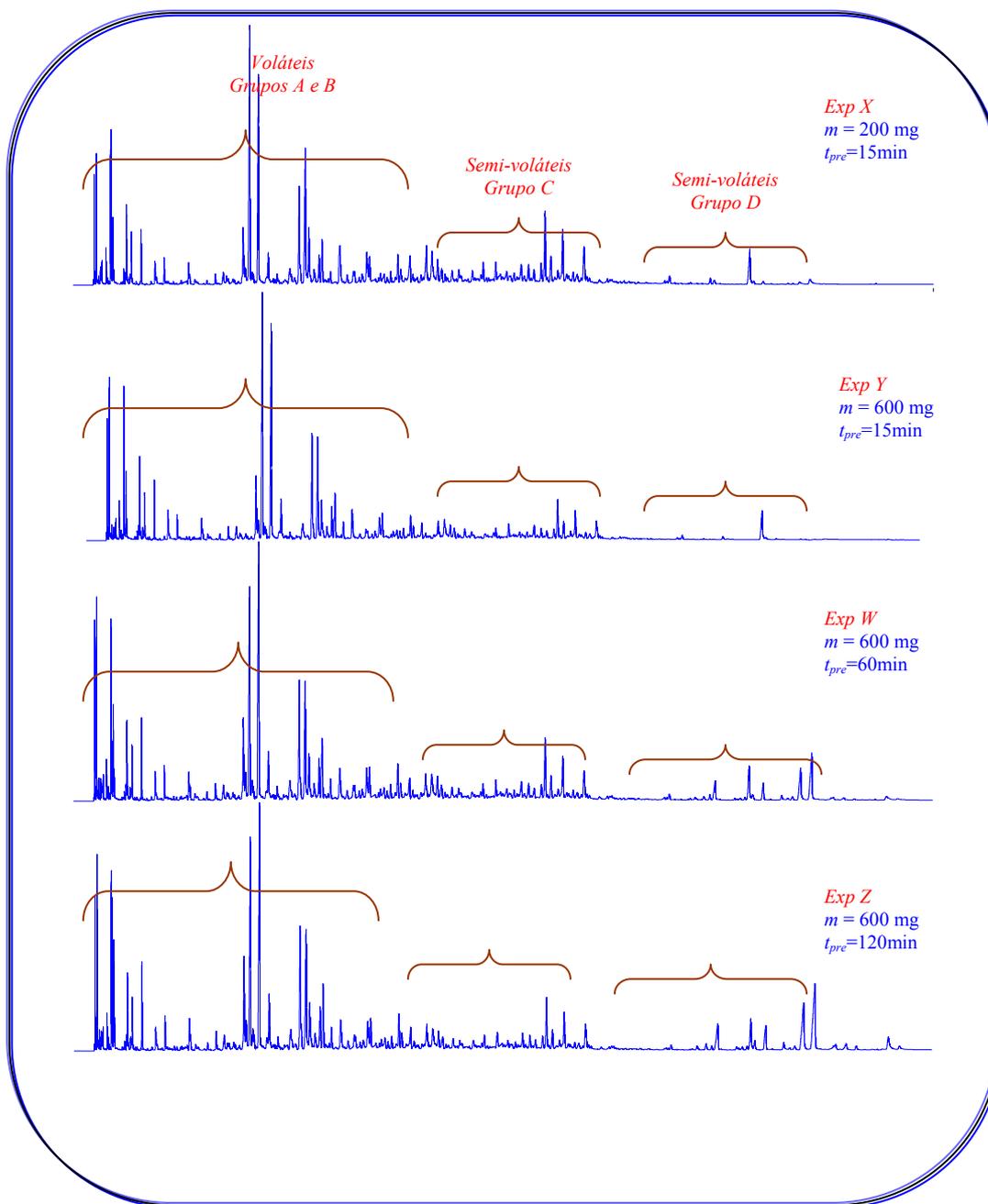


Figura 26 - Cromatogramas obtidos em experiências adicionais com variação do tempo de pré-equilíbrio e a massa de amostra. Exp X:  $t_{pre} = 15$  min;  $m = 200$  mg. Exp Y:  $t_{pre} = 15$  min;  $m = 600$  mg. Exp W:  $t_{pre} = 60$  min;  $m = 600$  mg. Exp Z:  $t_{pre} = 120$  min;  $m = 600$  mg. Demais condições de extração: fibra DVB/CAR/PDMS a  $T 80^{\circ}\text{C}$ ;  $t_{ext} 60$  min;  $t_{inj} 15$  min. As regiões do cromatograma nas quais surgem sinais das substâncias dos grupos A, B, C e D foram assinaladas.

## Efeito do tempo de extração

Com o objetivo de avaliar o tempo requerido para os analitos atingirem o equilíbrio entre a matriz e a fibra, as curvas de resposta em função do tempo de extração ( $t_{ext}$ ) foram avaliadas na faixa de 1 a 120 min com cinco diferentes coberturas de fibra (Figura 27). Em todas as experiências, antes de colocar a fibra dentro do frasco e avaliar o  $t_{ext}$ , considerou-se um tempo de pré-aquecimento de 15 min para permitir o equilíbrio térmico da matriz dentro do frasco com a temperatura de amostragem (80°C) no procedimento seco. O perfil da amostragem foi dependente, principalmente, da volatilidade dos analitos (HAMM *et al.*, 2003). A resposta relativa para o grupo A, a partir das extrações com as coberturas de fibra adsorptivas (PDMS/DVB, CW/DVB, CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS), foi reduzida após ~3 min até atingir o equilíbrio na faixa de 10 a 30 min, enquanto houve aumento de resposta nesse intervalo de tempo para as substâncias menos voláteis, demorando mais para o equilíbrio ser atingido. É conhecido que para amostras contendo mistura complexa de substâncias, a competição molecular pelos sítios ativos durante a extração é inevitável e pode influenciar nos resultados (ROBERTS *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2003). Provavelmente estaria ocorrendo o efeito competitivo entre os analitos com processo de re-ocupação dos sítios de adsorção disponíveis na fibra especialmente em tempos longos (KANAVOURAS *et al.*, 2005). O efeito competitivo mencionado não foi observado com o uso de PDMS e no geral as substâncias tiveram comportamento cinético semelhante com esse tipo de fibra. No geral, o equilíbrio foi atingido em aproximadamente 60 min com exceção das substâncias do grupo D que equilibraram no tempo aproximado de 120 min. Isso seria esperado para substâncias com baixo coeficiente de partição entre a cobertura, o “heaspace” e a matriz ( $K_{hm}$ ) (ZANG & PAWLISZYN, 1993).

A eleição de um tempo de extração ótimo e em condições de equilíbrio para todos os analitos do aroma da erva-mate é virtualmente impossível. Um tempo excessivamente prolongado (>90 min) não é interessante do ponto vista prático. Assim, um tempo de extração de 60 min foi considerado mais adequado para análise global, uma vez que a maior parte dos analitos atingiu o equilíbrio nessa condição de extração.

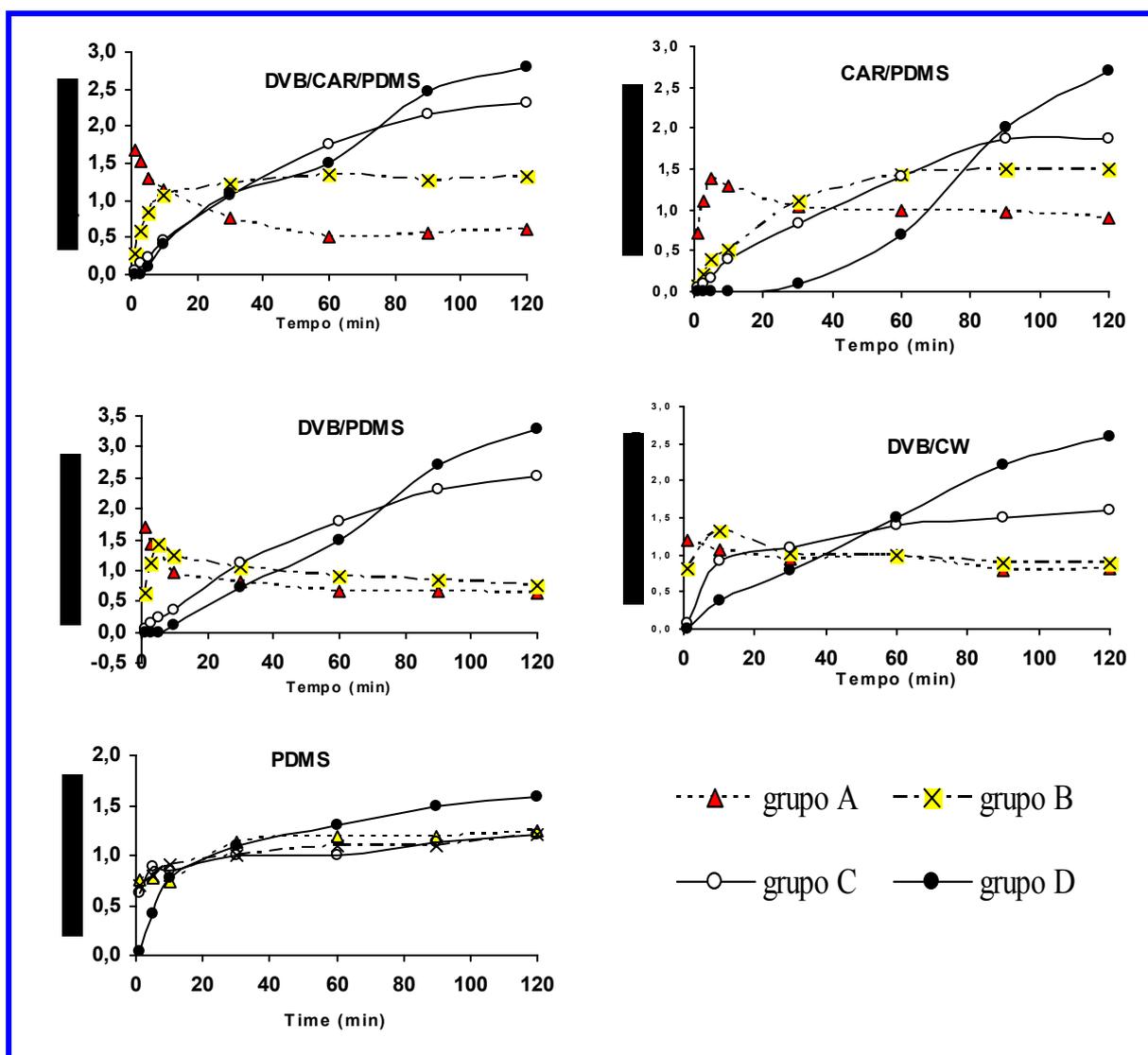


Figura 27 - Influência do tempo de extração ( $t_{ext}$ ) na eficiência de extração das fibras DVB/CAR/PDMS; CAR/PDMS; PDMS/DVB; CW/DVB e PDMS para quatro grupos de analitos do aroma da erva-mate, considerando  $T_{ext} = 80^{\circ}\text{C}$ ;  $t_{pre} = 15$  min;  $m = 150$  mg.

## Efeito da temperatura de extração

O efeito da temperatura de extração foi avaliado a 40°C, 60°C, 80°C, 100°C e 120°C com cinco diferentes fibras no procedimento seco. Nesse estágio de avaliação, o tempo de extração foi de 60 min. Os resultados obtidos revelaram que a quantidade de analito recuperada foi fortemente afetada pela temperatura (Figura 28). Em geral, as coberturas de fibras que extraem por adsorção (PDMS/DVB, CW/DVB, DVB/CAR/PDMS e CAR/PDMS) forneceram incrementos de recuperação crescentes dos componentes do aroma do mate com o aumento da temperatura, passando por um máximo e decrescendo suavemente com aumento posterior da temperatura. O efeito de dessorção térmica dos analitos mais voláteis para o “headspace” associado aos efeitos de competição dos analitos pelos sítios de adsorção poderia explicar esse fenômeno (HAMM *et al.*, 2003). O desempenho da fibra PDMS foi afetado pela temperatura em menor extensão, diferentemente das demais fibras, provavelmente por causa do mecanismo de absorção, característico de fibras com camada polimérica líquida (PAWLISZYN, 1997).

A melhor sensibilidade para a maior parte das substâncias voláteis ocorreu na faixa de 40°C a 60°C. Como as substâncias mais voláteis têm maior  $K_{hm}$  do que as menos voláteis, atingem o “headspace” em maior concentração em temperaturas mais baixas. Para substâncias semi-voláteis a melhor faixa de temperatura foi de 80°C a 100°C. Nesse caso, deve-se considerar que geralmente, as substâncias menos voláteis têm mais afinidade pela cobertura da fibra do que as mais voláteis ( $K_{fh}$  maior), logo o aumento da temperatura permite que as substâncias menos voláteis atinjam o “headspace” e assim irão interagir melhor com a cobertura da fibra do que as mais voláteis.

Foi também observado que algumas substâncias com menor pressão de vapor do grupo D, como a cafeína, não atingiram o máximo na faixa de temperatura investigada nesse trabalho. Se a temperatura fosse aumentada para valores maiores do que 120°C, o rendimento de recuperação poderia aumentar também. Contudo, isso não representaria vantagem analítica, pois um aumento demasiado na temperatura poderia induzir mudanças na composição do “headspace” com a formação de artefatos (FREITAS *et al.*, 2001). Temperaturas menores são preferíveis para prevenir degradação de substâncias termolábeis. Portanto, para observar melhor ambos os tipos de analitos (voláteis e semi-

voláteis) e para minimizar a formação de artefatos, as temperaturas escolhidas para as experiências subsequentes foram de 80°C ou 100°C.

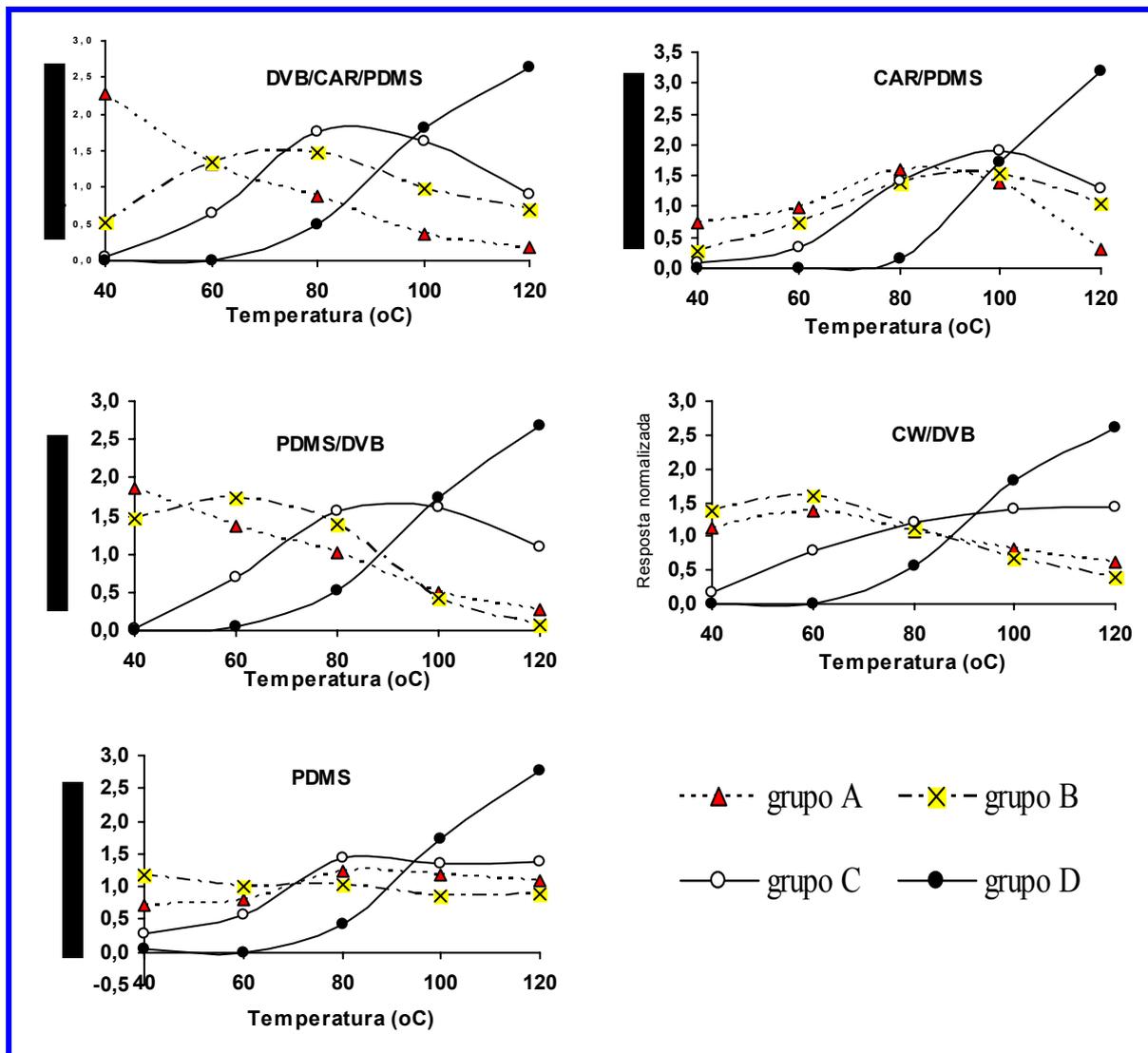


Figura 28 - Influência da temperatura de extração na eficiência relativa HS-SPME com diferentes coberturas de fibras para quatro grupos de substâncias representativas do aroma da erva-mate.

## Efeito do tipo de cobertura de fibra

O desempenho de cinco diferentes tipos de cobertura de fibra (PDMS, CW/DVB, CAR/PDMS, PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS) foi comparado, baseado na recuperação de diversos analitos selecionados com diferentes grupos funcionais e volatilidades (Tabela 10). Nas mesmas condições experimentais, espera-se que a eficiência de recuperação dos analitos seja afetada predominantemente pela capacidade de concentração de cada tipo de cobertura SPME. A condição experimental escolhida foi 60 min de extração a 80°C com 15 min de pré-equilíbrio e 150 mg de massa da amostra, a fim de obter a recuperação da maioria dos componentes do aroma do mate sob condições de equilíbrio e com intensidades de sinais suficientemente altas. A Figura 29 mostra os cromatogramas típicos do aroma do mate usando as coberturas de fibra selecionadas nas condições estabelecidas. A comparação do desempenho individual de cada analito foi baseada na função de resposta  $F_{ij}$  (HAMM *et al.*, 2003).  $F_{ij}$  é a razão da área do sinal do analito  $i$  obtido com o uso de uma determinada fibra  $j$ , pela média das áreas dos sinais do analito  $i$  obtidas com o uso de todas as fibras. As funções comparativas de resposta  $F_{ij}$  para cada analito com as cinco fibras são mostradas graficamente na Figura 30.

A quantidade global extraída usando a fibra, PDMS, uma cobertura líquida não polar foi a menor se comparada com as outras fibras com coberturas sólidas porosas. Outros estudos comparativos também mostram que a fibra PDMS teve capacidade de extração global significativamente menor do que outras fibras. Como por exemplo, na análise do aroma do licor de cupuaçu (AUGUSTO *et al.*, 2004) e do café expresso (ROBERTS *et al.*, 2000).

A fibra CW/DVB apresentou também baixa capacidade de extração, pois esse tipo de fibra tem pouca afinidade pela maioria dos componentes do aroma da erva-mate por causa da sua característica mais polar. Na Figura 30 é possível constatar que essa fibra mostrou capacidades de concentração equivalentes às demais fibras somente para o ácido acético 1 e para 3-etil-4-metil-2,5-diona-(1H)-pirrol 16 que por sua vez são analitos de características polares. Mesmo assim nesses casos, a eficiência de extração da fibra CW/DVB, calculada, em termos de  $F_{ij}$ , não foi maior do que das outras fibras de natureza menos polar, PDMS/DVB, CAR/PDMS e DVB/CAR/PDMS.

Sendo assim, as fibras CW/DVB e PDMS não mostraram vantagens analíticas em termos de sensibilidade devido à menor capacidade de extração global. Por outro lado, no presente estudo, essas fibras mostraram boa capacidade de recuperação para alguns analitos, especialmente para a cafeína (sinal 23, Figura 29), o que está de acordo com outros estudos relacionados com essa substância (HAWTHORNE *et al.*, 1992; KUMAZAWA *et al.*, 1999; PAWLISZYN *et al.*, 1997). Além do mais, como ficou demonstrado neste trabalho, o efeito de competição foi menos pronunciado com o uso da fibra PDMS. Por isso, a fibra PDMS não deve ser descartada baseada somente no critério da eficiência de extração global da fibra, pois ela apresenta outras vantagens e é uma alternativa interessante para a análise da erva-mate caso o componente alvo seja a cafeína, por exemplo.

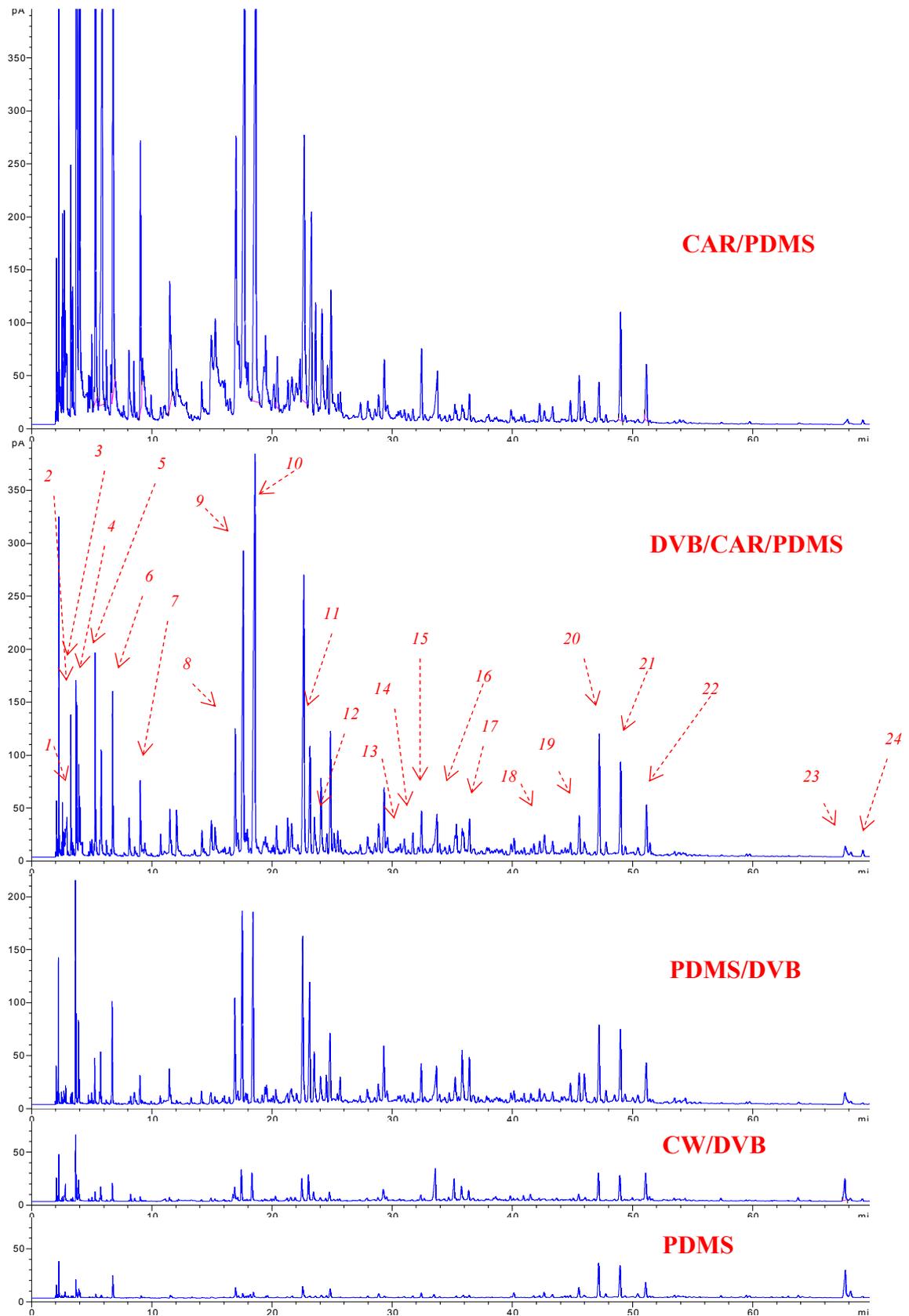


Figura 29 - Cromatogramas típicos de amostra MC por HS-SPME com o uso de diferentes coberturas de fibra a 80°C e 60 min. Os números dos sinais correspondentes aos principais analitos encontram-se na Tabela 10.

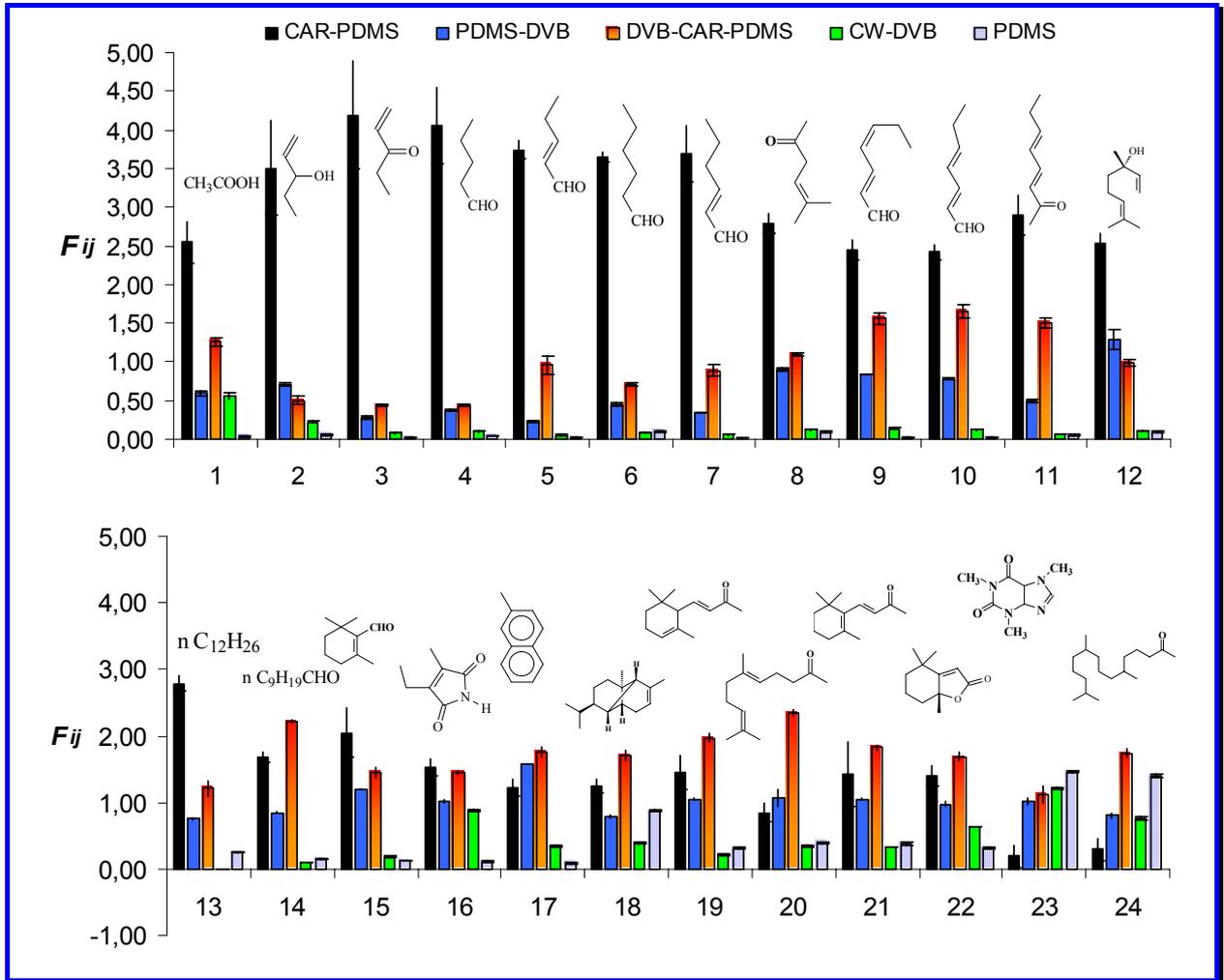


Figura 30 - Comparação da recuperação ( $F_{ij}$ ) dos principais analitos do aroma da erva-mate pelas fibras: CAR/PDMS; PDMS/DVB; DVB/CAR/PDMS.; CW/DVB e PDMS.

Os resultados comparativos mostraram que a fibra CAR/PDMS adsorveu fortemente substâncias com massas moleculares menores ( $C_2$ - $C_6$ ), como por exemplo, as substâncias do grupo A (1 a 11). Esse efeito foi demonstrado ter sido primariamente devido a microporosidade dessa fibra e não somente a polaridade (STUART, 1999). Isso também está de acordo com SHIREY (2000) que mostrou na extração de pequenas moléculas com cobertura CAR/PDMS que o efeito de porosidade excedeu o efeito de polaridade e da espessura do filme. Embora a resposta global tenha sido satisfatória para a maioria dos componentes do aroma da erva-mate, a fibra CAR/PDMS mostrou o pior resultado de  $F_{ij}$  para a cafeína (23). Foi observado também com o uso dessa fibra, efeito de cauda nos sinais cromatográficos, principalmente, aqueles gerados por substâncias mais fortemente retidas na fibra. Esse efeito deve ter sido provocado pela etapa de dessorção mais lenta, de acordo com dados publicados para esse tipo de fibra (ROBERTS *et al.*, 2000; LÓPEZ-TAMAMES *et al.*, 2003; AUGUSTO *et al.*, 2004).

As fibras PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS mostraram bons resultados de recuperação para classes de componentes representativos do aroma, principalmente terpenos. Esses resultados estão de acordo com diversos outros estudos (BICCHI *et al.*, 2000; ROBERTS *et al.*, 2000; HAMM *et al.*, 2003; LÓPEZ-TAMAMES *et al.*, 2003; CAVALLI *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Contudo, a última fibra apresentou o melhor desempenho global principalmente para a maior parte dos analitos dos grupos C e D com  $I > 1200$  (Figura 30). Essa fibra mostrou também boa capacidade de extração para a cafeína (23). A fibra DVB/CAR/PDMS consiste de uma camada de PDMS/DVB sobre uma camada de CAR/PDMS e o seu desempenho global foi devido a presença de dois adsorventes (DVB e CAR) (MACHIELS & ISTASSE, 2003).

Em linhas gerais foi possível perceber que a afinidade dos analitos pela cobertura da fibra depende não somente da polaridade, pois permeabilidade e volatilidade, além do fenômeno de competição pelos sítios ativos são aspectos importantes que devem ser levados em consideração na seleção da melhor fibra para uma dada amostra. Por essa razão, devido a erva-mate ser uma amostra complexa, os procedimentos experimentais aplicados no estudo das variáveis foram fundamentais para escolher as melhores condições de extração e a cobertura de fibra mais adequada.

## **Comparação das amostragens seca e úmida**

O método HS-SPME é muito utilizado para amostras em meio aquoso, pois a água não tem afinidade pelas fibras SPME comercialmente disponíveis, logo a sua presença não provoca saturação dos sítios de adsorção em grande escala. Outra vantagem disso é que a entrada de água no cromatógrafo é minimizada, melhorando a vida útil do equipamento e da coluna. No caso da erva-mate, além do procedimento seco, a microextração pode ser feita também por maceração em solução aquosa (procedimento úmido). Além dos parâmetros já mencionados neste trabalho, outras variáveis devem ser levadas em consideração na amostragem úmida, como agitação e ajuste da força iônica da solução. Neste trabalho, todas as amostragens úmidas foram feitas com agitação magnética para favorecer processos de difusão, diminuindo dessa forma o tempo necessário para atingir o equilíbrio.

A difusão dos analitos da solução aquosa para a fase gasosa pode ser promovida pela alteração da força iônica da solução. O efeito do decréscimo da solubilidade de substâncias orgânicas com adição de sal é conhecido como “salting out”. No geral, a adição de sal no meio melhora a eficiência da extração de substâncias orgânicas, visto que, provoca aumento nos coeficientes de atividade da maioria dos analitos e deslocamento do equilíbrio da extração por diminuição da solubilidade (PAWLISZYN, 1997). A Figura 31 mostra o efeito da adição de sal na resposta relativa dos grupos de substâncias investigadas no presente estudo com DVB/CAR/PDMS a 80°C, durante 60 min sob agitação magnética. Foi observado aumento de resposta para os grupos A e B com o aumento da força iônica (efeito de “salting out”). Por outro lado, os analitos dos grupos C e D tiveram comportamento inverso, ou seja, o aumento da força iônica provocou diminuição de resposta (efeito “salting in”). De um do geral os efeitos “salting out” foram mais significativos do que os efeitos “salting in” na amostra analisada. Por isso e por razões práticas, as amostragens úmidas foram feitas com solução saturada de NaCl nas experiências subseqüentes.

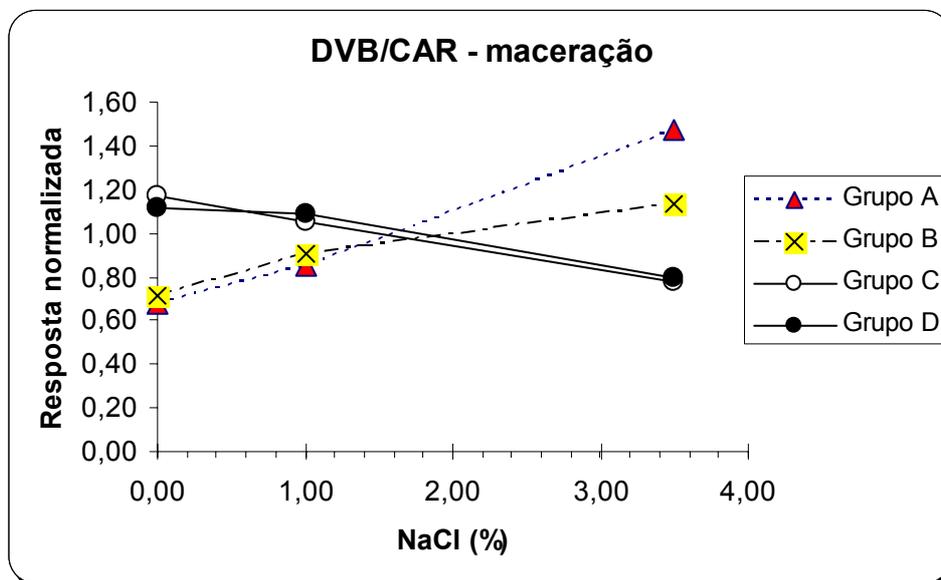


Figura 31 - Influência da adição de NaCl na eficiência de extração para 4 grupos de analitos do aroma da erva-mate empregando a fibra DVB/CAR/PDMS.

Amostras de mate foram então preparadas a partir de procedimento de maceração com solução saturada de NaCl com a fibra DVB/CAR/PDMS. As Figuras 32, 33 e 34 mostram o efeito da massa de amostra, do tempo de extração e da temperatura, respectivamente, na amostragem úmida com a fibra DVB/CAR/PDMS. No geral, os comportamentos extrativos foram similares aos dos procedimentos secos correspondentes.

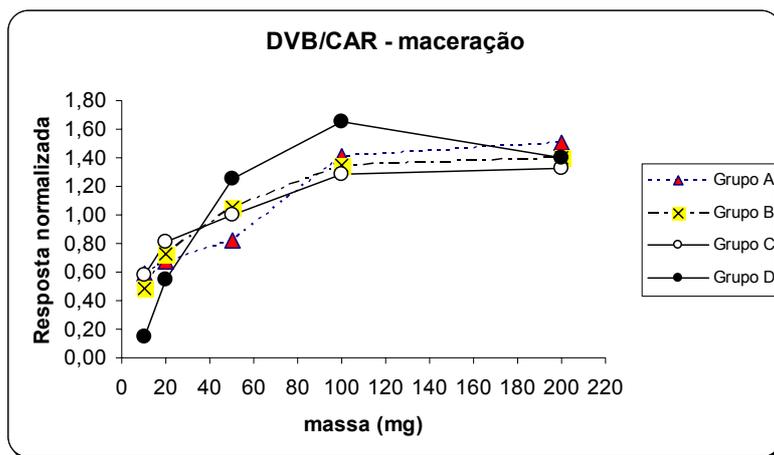


Figura 32 - Influência da quantidade de amostra na eficiência de extração para 4 grupos de analitos do aroma da erva-mate por maceração empregando a fibra DVB/CAR/PDMS.

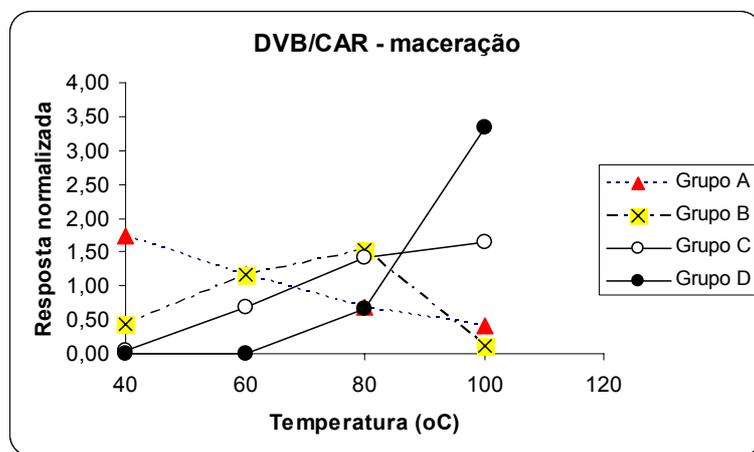


Figura 33 - Influência da temperatura de extração na eficiência de extração para 4 grupos de analitos do aroma da erva-mate por maceração empregando a fibra DVB/CAR/PDMS.

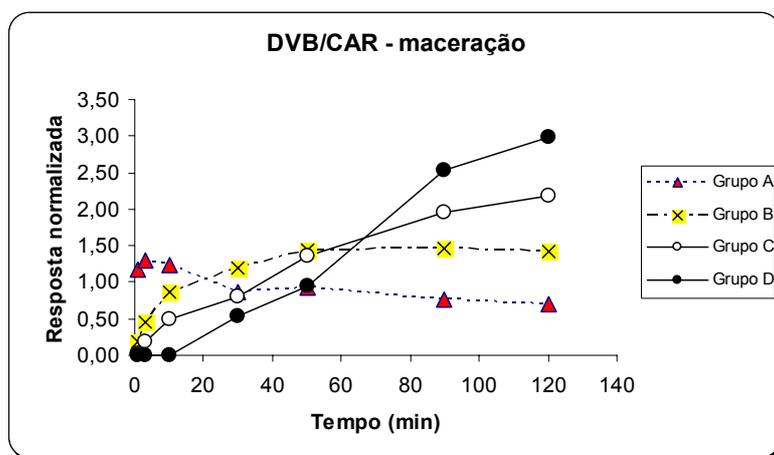


Figura 34 - Influência do tempo de extração na eficiência de extração para 4 grupos de analitos do aroma da erva-mate por maceração empregando a fibra DVB/CAR/PDMS.

A Figura 35 mostra os cromatogramas obtidos por ambos os procedimentos (seco e úmido) a 80°C/60 min. Cabe frisar que esses procedimentos foram qualitativamente similares, mas apresentaram modificações significativas na intensidade de alguns sinais: Os analitos do grupo A, principalmente, ácido acético, *E*-2-butenal, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-ona, pentanal, 2-etilfurano, *E*-2-pentenal e *Z*-2-penten-1-ol, tiveram maior resposta no procedimento seco porque provavelmente a presença de vapor d'água deve diminuir a permeabilidade dos componentes mais voláteis na cobertura da fibra. De acordo com isso, recentemente foi constatado que o aumento da umidade relativa do ar provocou diminuição da eficiência de extração de monoterpenos, no monitoramento de emissões biogênicas de folhas de eucalipto (PAWLISZYN, 2004). Os outros analitos que tiveram alterações significativas foram os isômeros *E,E*- e *E,Z*- do 2,4-heptadienal; os isômeros *E,E*- e *E,Z*- da 3,5 octadien-2-ona e linalol.

A comparação dos procedimentos foi feita inicialmente numa mesma temperatura (80°C), mas as informações obtidas em relação ao comportamento desses analitos foram muito mais ricas e interessantes quando a temperatura variou. As Figuras 36 e 37 mostram a expansão da região do cromatograma onde apareceram os sinais desses analitos obtidos por amostragens úmida e seca, respectivamente, em diversas temperaturas.

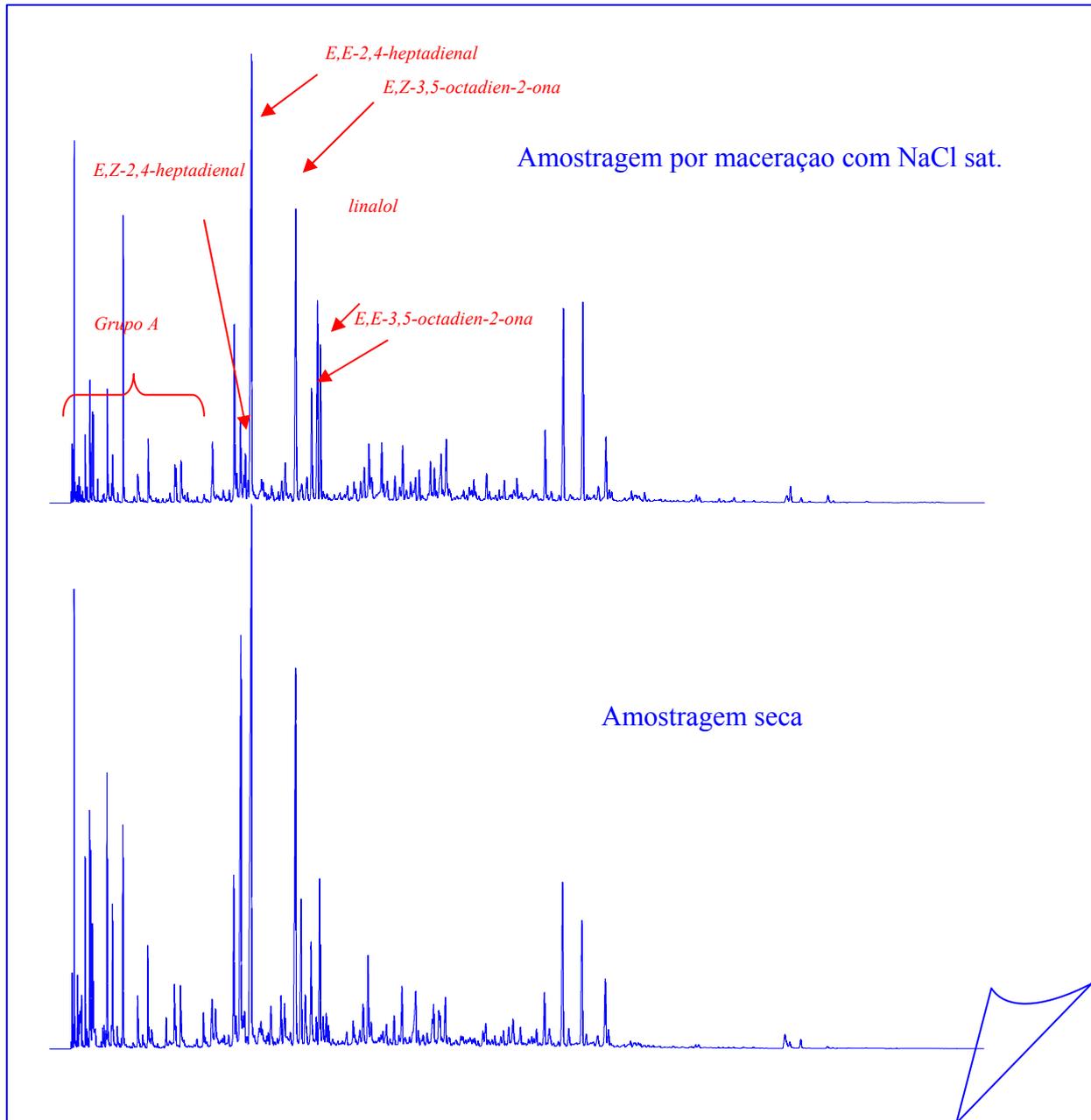


Figura 35 - Cromatogramas da amostra MC1 obtidos por procedimentos HS-SPME seco e úmido. Em destaque os analitos que tiveram distinções mais significativas.

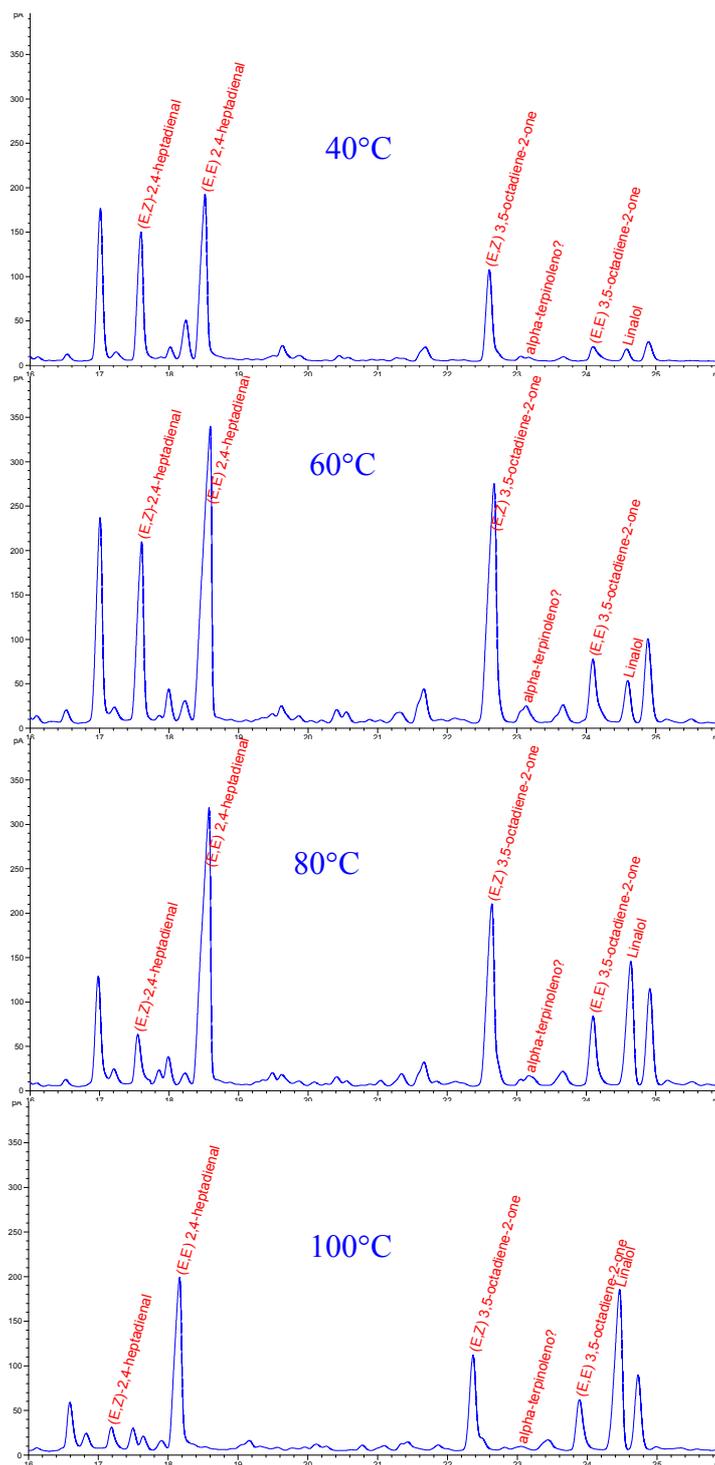


Figura 36 - Expansão da região dos Cromatogramas da amostra MC1 obtidos por HS-SPME a partir de procedimento úmido nas temperaturas 40°C, 60°C, 80°C e 100°C. Os analitos que tiveram distinções mais significativas encontram-se assinalados.

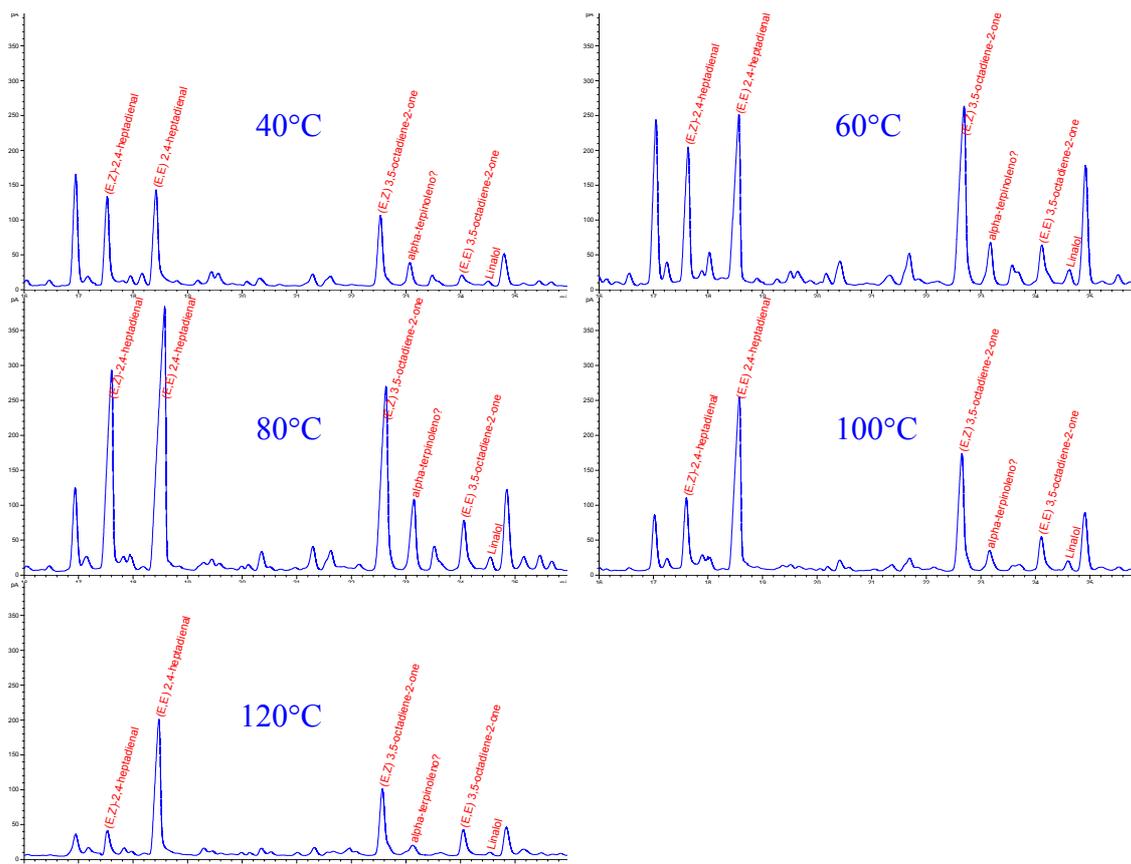


Figura 37 – Expansão da região dos Cromatogramas da amostra MC1 obtidos por HS-SPME a partir de amostragens secas 40°C, 60°C, 80°C, 100°C e 120°C. Os analitos que tiveram distinções mais significativas encontram-se assinalados.

As Figuras 38 e 39 mostram as curvas de resposta dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 2,4-heptadienal com amostragens úmida a 40°C, 60°C, 80°C e 100°C e seca a 40°C, 60°C, 80°C e 100°C e 120°C. Uma análise comparativa das curvas, permitiu evidenciar o fato que o isômero *E,Z*- foi sendo gradualmente convertido no isômero *E,E*- com o aumento da temperatura em ambos tipos de amostragem. A curva da resposta normalizada (Figura 39) evidenciou mais ainda esse comportamento, pois nesse caso a mudança da resposta do analito provocada pela variação de temperatura, devido a fenômenos de termodessorção e/ou competição, não foi levada em consideração. No procedimento úmido, a isomerização térmica foi intensificada, provavelmente pela presença de água no sistema, desde que numa mesma temperatura a proporção relativa do isômero *E,E*- foi maior no procedimento úmido.

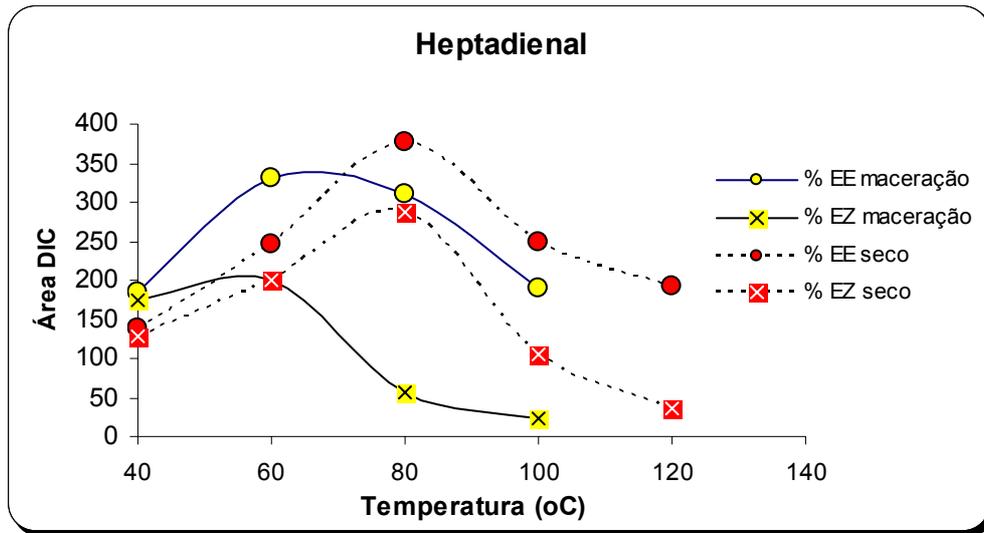


Figura 38 - Curvas de resposta absoluta dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 2,4-heptadienal obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas.

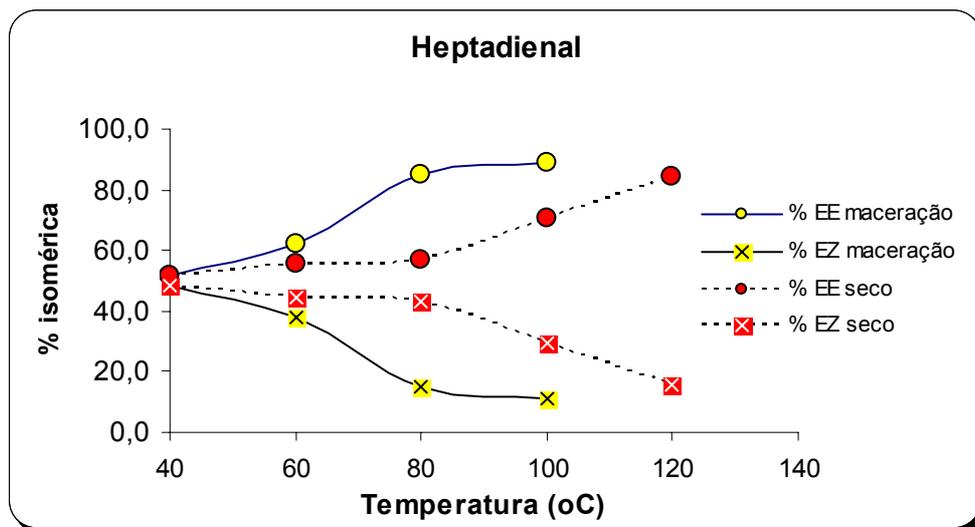


Figura 39 - Curvas de resposta normalizada dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 2,4-heptadienal obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas.

Foi observado também comportamento similar entre as proporções relativas dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 3,5-octadien-2-ona, mas de modo bem menos intenso (Figuras 40 e 41).

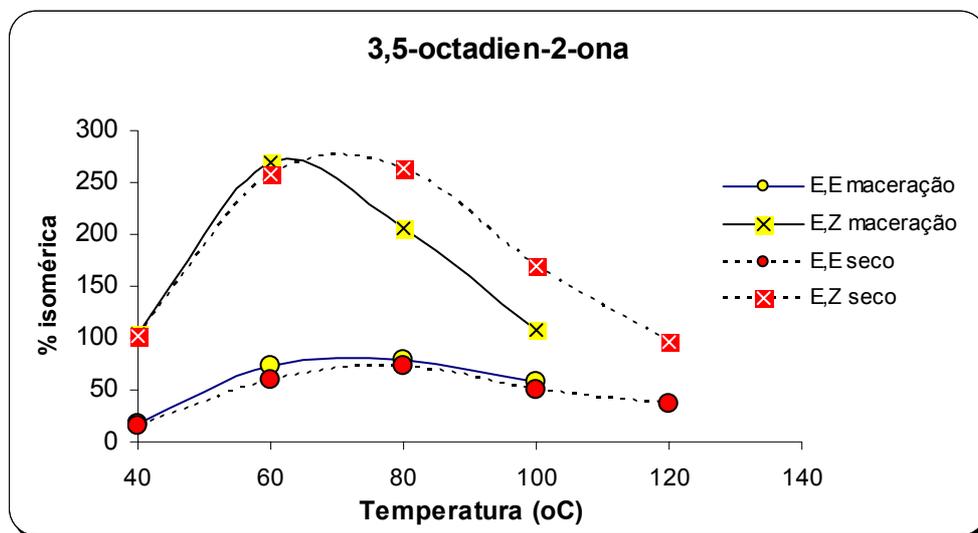


Figura 40 - Curvas de resposta absoluta dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 3,5-octadien-2-ona obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas.

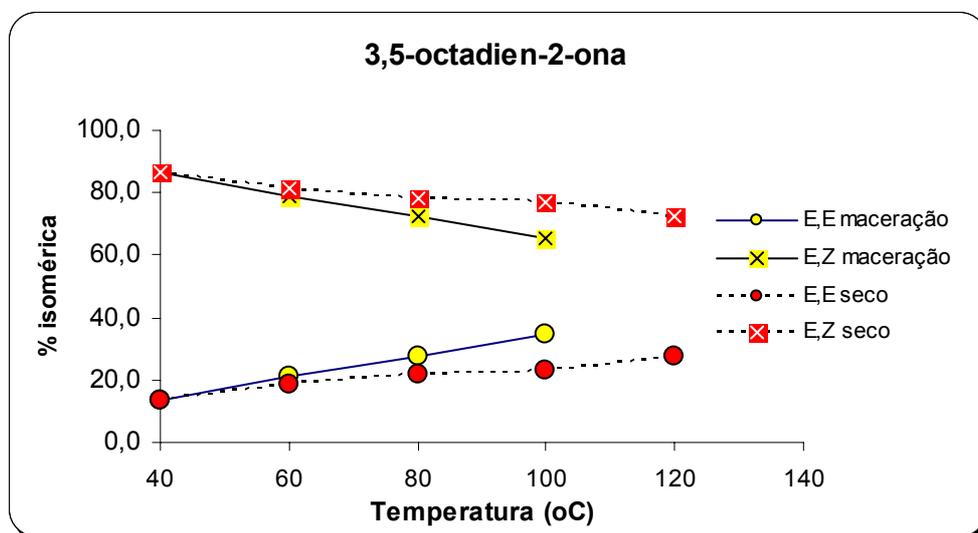


Figura 41 - Curvas de resposta normalizada dos isômeros *E,Z*- e *E,E*- do 3,5-octadien-2-ona obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas.

Outra distinção significativa foi o conteúdo de linalol aumentado no procedimento úmido. A Figura 42 mostra a curva de resposta do linalol com amostragens úmida a 40°C, 60°C, 80°C e 100°C e seca a 40°C, 60°C, 80°C e 100°C e 120°C. Comparando-se os dois procedimentos numa mesma temperatura, percebe-se que a área do linalol a 40°C no procedimento úmido foi somente 1,5 vezes maior do que no procedimento seco, enquanto que a 100°C foi ~10 vezes maior. Isso ocorreu provavelmente por causa da formação de linalol por hidrólise de glicosídeos associados a monoterpenos (YANO *et al.*, 1990). Outra hipótese seria a formação de linalol por rearranjo de monoterpenos presentes na matriz (ZABARAS & WYLLIE, 2002).

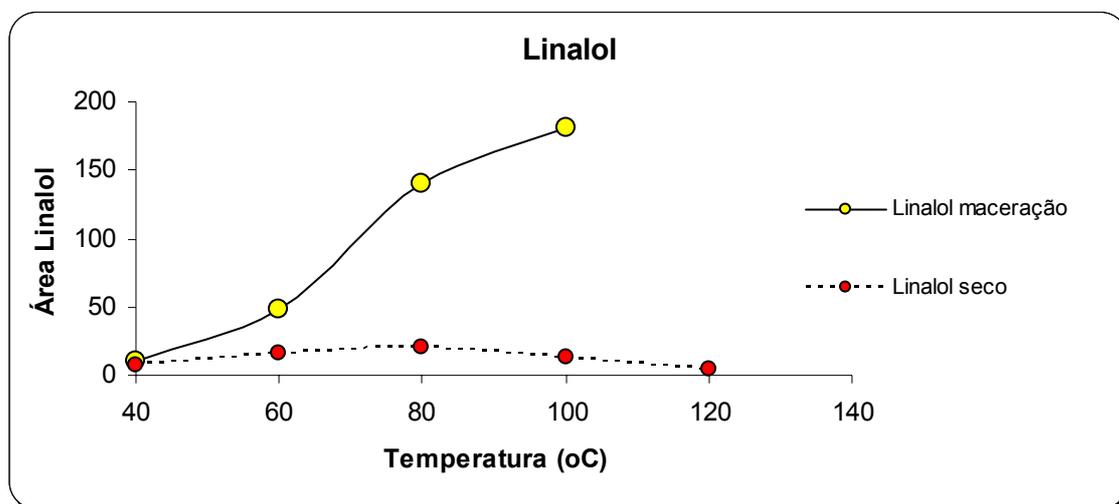


Figura 42 - Curvas de resposta absoluta do linalol obtidas por HS-SPME nos procedimentos úmido e seco em diversas temperaturas.

A Figura 43 apresenta o gráfico das proporções isoméricas do 2,4-heptadienal em função da massa de amostra, considerando  $T = 80^{\circ}\text{C}$  e  $t_{ext}$  60 min. Nesse caso foi possível verificar que fenômeno de isomerização ocorre quando a massa é bem pequena. É notável que a proporção  $E,Z$  :  $E,E$  foi de  $\sim 35$  : 65 com 10 mg de amostra e à medida em que a massa aumentou, essa proporção foi alterada até estabilizar em aproximadamente 16 : 84 quando a massa foi maior ou igual a 50 mg. Considerando que as experiências foram feitas na mesma temperatura é possível que essas transformações estejam ocorrendo no “headspace” por influência da acidez relacionada aos sítios ativos nas paredes do frasco. Isso prova que a formação de artefatos depende também da escolha do procedimento de amostragem como um todo e não somente da temperatura.

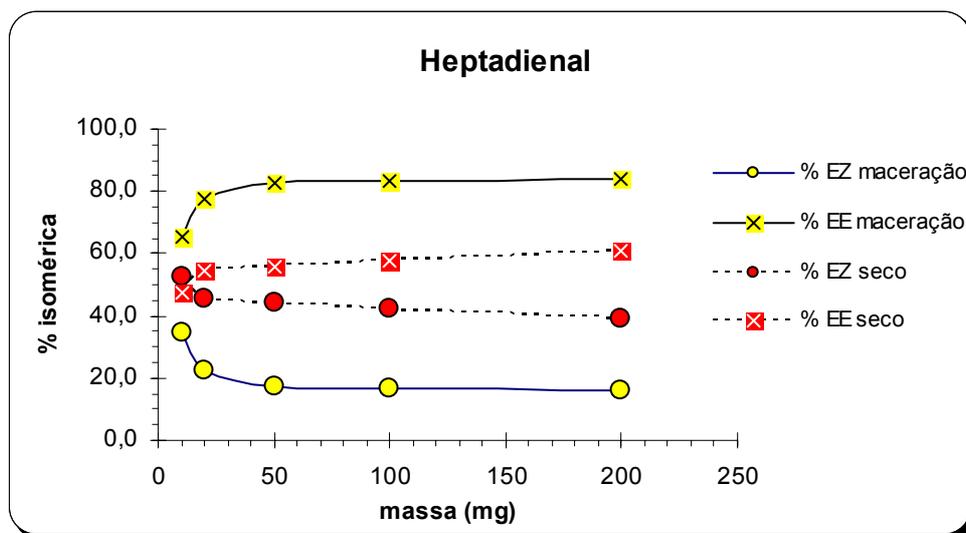


Figura 43 - Curvas de resposta normalizada dos isômeros  $E,Z$ - e  $E,E$ - do 2,4-heptadienal obtidas por HS-SPME a  $80^{\circ}\text{C}$  nos procedimentos úmido e seco, em função da massa de amostra.

## Precisão

A repetibilidade do método foi estimada em experiências em triplicata com cada uma das fibras no procedimento seco e com a fibra DVB/CAR/PDMS no procedimento úmido. (Tabela 11). No geral, os coeficientes de variação (CV) foram satisfatórios e similares ao de outras publicações (ROBERTS *et al.*, 2000; STUART & MILLER, 1999; YANG, & PEPPARD 1994). Os maiores valores de CV encontrados com as fibras PDMS e CAR/PDMS no procedimento seco podem ter sido devidos à baixa capacidade de concentração da primeira e ao efeito de cauda observado com a segunda.

Tabela 11 – Valores de coeficiente de variação (CV) estimados por experiências em triplicata com as fibras estudadas nos procedimentos seco e úmido.

	CV médio (%)	Maior valor de CV (%)	Menor valor de CV (%)
PDMS em procedimento seco	12,3	26,0	3,8
CW/DVB em procedimento seco	8,4	17,2	1,9
CAR/PDMS em procedimento seco	10,2	17,5	2,0
PDMS/DVB em procedimento seco	6,1	26,1	0,4
DVB/CAR/PDMS em procedimento seco	6,5	19,0	2,2
DVB/CAR/PDMS em procedimento úmido	8,2	15,5	4,2

### **Comparação do tipo de plantio e do período de safra.**

O uso de análises multivariadas em combinação com processos quimiométricos de reconhecimento de padrões tem sido muito difundido na classificação de amostras de alimentos (MORGANO *et al.*, 1999). Nesse âmbito encontram-se na literatura diversos estudos relacionados à discriminação por categoria e origem de amostras de chá (*Camelia sinensis*) baseados no teor de metais (MARCOS *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-CÁCERES *et al.*, 2001; MOREDA-PIÑERO *et al.*, 2003), no conteúdo de metilxantinas e polifenóis (LIU *et al.*, 1987; VALERA *et al.*, 1996) e no perfil cromatográfico do aroma extraído por SDE (TOGARI *et al.*, 1995). Além disso, a discriminação das variedades Arábica e Robusta de café foi objeto de estudos quimiométricos a partir dos dados cromatográficos do aroma por HS-SPME-GC (BICCHI *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2003). Baseado nesses precedentes, os cromatogramas resultantes do aroma da erva-mate por HS-SPME-GC poderiam também trazer consigo valiosas informações a serem aplicadas no controle da qualidade. Com esse intuito, essa parte da tese refere-se ao estudo preliminar de classificação da erva-mate cancheada quanto ao tipo de cultivo e outros atributos da qualidade.

O erval nativo é caracterizado por árvores de erva-mate com sombreamento ou nível de radiação solar parcial devido ao tipo de cobertura por outras espécies arbóreas. A produção característica de erva-mate nativa e sombreada resulta numa bebida com sabor mais suave e preferida pelos consumidores. A tendência dos produtores é continuar investindo no erval nativo, plantando mais erva-mate nessa área e, ao mesmo tempo, árvores, frutíferas ou não, nas áreas de plantio a céu aberto para sombreamento. Essa é uma prática que os produtores, grandes ou pequenos, estão adotando para melhorar a qualidade da erva-mate e conseguir um preço melhor pela produção (MAZUCHOWSKI, 2000). O cultivo sombreado em florestas de araucárias tem despertado interesse também como atividade auto-sustentável. O manejo da erva-mate tem potencial para melhorar a formação florestal, inclusive na regeneração de espécies ameaçadas e vulneráveis, tanto da flora como da fauna. Um dos projetos do Consórcio pela Biodiversidade em Sistemas Agrícolas Familiares está sendo desenvolvido pela AS-PTA (Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa), no centro-sul do estado do Paraná, no qual muitos agricultores vêm se dedicando ao cultivo e manejo da erva-mate e de outros recursos da biodiversidade nativa da floresta de araucária, em particular os recursos fitoterápicos. Esse projeto caracteriza-se pelo monitoramento

econômico dos sistemas agrícolas, com base no manejo agro-ecológico, ou seja, o plantio sem uso de agrotóxicos e fertilizantes solúveis, com utilização intensiva de adubos verdes. Estima-se que nesta região cerca de cinco mil famílias já estejam atuando com práticas agro-ecológicas (FUNBIO).

A escassez de matéria-prima para a produção de chimarrão e chá fez com que a erva-mate passasse a ser cultivada em monocultura a partir da década de 60, alterando severamente as características dos produtos e do ecossistema original (ALVES *et al.*, 2000). O cultivo a céu aberto é mais comum, pois sua rentabilidade ainda é maior do que a do erval nativo e sombreado, mas com o problema de pragas grandemente agravado (BORGES *et al.*, 2003). Portanto, existe no mercado a erva-mate nativa sombreada e a erva-mate cultivada tradicionalmente a céu aberto. Quanto a diferenciação de preços pagos, a média é de 50% a mais para erva-mate “nativa” e/ou “suave” sobre as demais (VALDUGA *et al.*, 2003).

Dentro dessa ótica, a análise do aroma por HS-SPME-GC poderia auxiliar na classificação das amostras em função do tipo de plantio, para quiçá, possibilitar a criação de um selo de qualidade, viabilizando dessa forma a valorização do produto oriundo do cultivo orgânico. Assim sendo, 25 amostras de erva-mate para chimarrão oriundas de dois tipos de cultivos: sombreado e a céu aberto, e de safras mais antiga (2000) e mais recente (2003) foram analisadas pelo método HS-SPME proposto neste trabalho. As respectivas identificações das amostras, gentilmente cedidas por produtores rurais e empresas que comercializam erva-mate, por intermédio da EMATER-PR, encontram-se na Tabela 12.

A ferramenta quimiométrica utilizada neste trabalho para verificar a similaridade entre diferentes amostras de erva-mate cancheada de acordo com a forma de cultivo e o período de safra foi a Análise dos Componentes Principais (ACP). Esse método quimiométrico consiste numa redução de dimensões da matriz de dados original, permitindo visualizar facilmente as informações, a fim de descobrir em que medida uma amostra é diferente da outra e quais variáveis contribuem mais para essa diferença (MORGANO *et al.*, 1999).

Todas as vinte e cinco amostras foram analisadas nas mesmas condições HS-SPME (DVB/CAR/PDMS, 80°C durante 60 min, 150 mg) e as áreas dos sinais de vinte e

quatro analitos foram compiladas por ACP (Tabela 13). A dimensão foi então reduzida para 5 componentes principais, que por sua vez explicam 95% da variância total do conjunto de dados.

Tabela 12 – Amostras de erva-mate cancheada analisadas em função do tipo de cultivo (sombreado ou céu aberto) e do período de safra (2000 e 2003).

<b>Código</b>	<b>Origem</b>	<b>Classe</b>	<b>Safra</b>
1	São Mateus do Sul – PR	Erval Nativo Sombreado	2000
2	Imbituva – PR	Erval plantado a céu aberto	2000
3	Xaxim – Sc	Erval plantado a céu aberto	2000
4	Vessasiano correa – RS	Erval plantado a céu aberto	2000
5	Bituruna – PR	Erval Nativo sombreado	2003
6	Imbituva – PR	Erval Nativo sombreado	2003
7	São Mateus do Sul – PR	Erval Nativo sombreado	2003
8	Mallet – PR	Erval Nativo sombreado	2003
9	Lapa – PR	Erval Plantado a céu aberto*	2003
10	Comercial – Argentina	não determinado	cons. até 2005
11	Quedas do Iguaçu – PR	Erval plantado a céu aberto	2000
12	Rebouças – PR	Erval Nativo sombreado	Maio/2003
13	Rebouças – PR	Erval Nativo sombreado	Outubro/2003
14	Rebouças – PR	Erval Plantado a céu aberto*	Outubro/2003
15	São Mateus do Sul – PR	Erval nativo sombreado	2003
16	São João do Triunfo – PR	Erval Nativo sombreado	2003
17	Cruz Machado – PR	Erval Nativo sombreado	2003
18	São João do Triunfo – PR	Erval céu aberto	2003
19	Comercial – SC	não determinado	2003
20	Comercial – Paraguai	não determinado	2003
21	Comercial – SC	não determinado	2003
22	Comercial – RS	não determinado	2003
23	Comercial – PR	não determinado	2003
24	Comercial – SC	não determinado	2003
25	Comercial – RS	não determinado	2000

\*mudas oriundas de São Mateus do Sul

Tabela 13 - Valores das áreas dos sinais dos vinte e quatro analitos oriundos do aroma do mate cancheado por HS-SPME utilizados na análise dos componentes principais. As identificações de cada uma das vinte e cinco amostras analisadas encontram-se na Tabela 12.

Amostras MC	0	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
<b>Analitos</b>																										
ácido acético	902,4	1038,9	1121,5	1008,8	198,4	107,2	122,8	108,0	232,7	280,4	802,5	220,8	92,0	58,7	147,2	114,1	337,5	188,3	154,0	371,9	106,2	63,0	68,1	73,6	427,0	
1-penten-3-ol	25,9	22,4	24,8	33,0	205,0	192,3	151,3	174,8	87,2	83,9	33,0	77,9	153,9	140,4	156,4	212,5	337,2	134,0	116,3	133,2	102,4	148,0	172,7	127,5	17,4	
1-penten-3-ona	22,8	25,3	32,9	36,0	122,7	142,7	100,3	131,9	87,7	39,3	26,5	92,0	244,7	221,0	130,0	174,1	169,8	158,2	93,1	40,2	187,8	224,9	217,4	224,1	17,6	
n-pentanal	26,1	28,2	30,4	41,4	104,3	128,9	128,0	102,9	105,0	67,6	60,8	119,7	174,7	140,8	93,2	139,5	145,3	135,2	203,0	96,2	114,3	172,8	185,4	143,8	30,0	
(E)-2-pentenal	54,1	95,5	74,7	97,6	170,0	184,3	138,7	169,8	132,1	77,0	100,0	116,9	212,5	201,0	128,1	186,9	257,3	160,5	116,4	105,6	180,7	195,3	203,4	167,0	47,6	
hexanal	88,9	139,3	118,0	96,2	113,5	152,0	173,2	126,8	96,8	151,8	141,0	70,6	104,9	96,8	97,4	131,0	265,8	140,6	201,4	377,4	147,1	179,9	179,1	101,6	109,2	
(E)-2-hexenal	67,2	129,9	161,5	197,9	114,5	123,0	144,3	108,6	139,1	63,3	137,7	93,6	97,3	89,9	124,3	136,1	198,7	133,1	136,0	83,0	103,6	99,3	133,3	68,6	66,2	
6-metil-5-hepten-2-ona	246,7	582,8	366,4	458,2	433,7	578,4	519,8	368,1	530,8	379,8	535,7	778,9	429,1	360,8	638,2	614,7	526,4	612,0	493,6	699,2	470,0	468,9	522,0	399,0	287,5	
(E,Z)-2,4-heptadienal	166,4	204,5	218,4	183,8	717,8	1064,7	847,1	955,4	582,7	308,3	224,3	630,9	1110,0	1041,6	1108,8	1366,6	1451,0	1098,2	617,7	207,0	1093,5	1255,2	1367,9	971,8	157,0	
(E,E)-2,4-heptadienal	249,2	608,4	579,6	379,8	1542,0	1719,4	1529,1	1685,0	1407,2	733,8	810,5	1006,1	1250,5	1182,7	1667,0	1896,6	2353,8	1195,4	964,8	687,6	1120,3	1411,6	1392,6	959,6	328,0	
(E,E)-3,5-octadien-2-ona	135,7	235,6	217,9	224,0	108,5	184,0	155,9	146,5	133,4	302,9	211,6	100,4	89,7	76,2	151,4	169,4	361,9	142,3	120,7	446,4	173,1	167,5	121,6	107,5	257,3	
linalol	152,9	188,4	275,1	214,8	94,1	206,1	317,4	114,4	274,7	176,1	228,1	179,9	173,2	165,2	175,2	264,8	263,4	183,1	351,9	250,1	380,0	223,9	215,4	241,1	103,0	
dodecano	64,5	105,3	136,8	103,3	115,8	177,7	221,3	122,2	149,9	58,4	92,8	131,9	136,7	113,6	175,3	160,9	174,0	143,0	77,3	92,9	136,4	29,9	87,8	119,5	196,4	
decanal	91,8	103,7	126,4	124,8	285,5	178,7	156,6	138,1	178,1	215,1	97,5	171,3	281,0	273,8	159,4	212,3	249,7	219,2	141,3	288,1	158,4	95,0	130,9	180,8	196,3	
β-ciclocitral	98,3	109,1	217,9	152,6	151,0	250,1	272,8	256,6	191,5	122,1	173,6	172,6	216,3	169,9	253,4	339,9	358,2	249,7	240,5	177,5	232,8	199,8	248,1	149,3	57,4	
metilnaftaleno	196,0	334,3	327,7	365,0	624,9	369,3	178,1	328,0	248,5	298,9	427,0	325,1	86,4	52,5	264,2	244,5	340,7	291,1	114,3	300,6	207,4	134,9	145,7	210,2	255,6	
3-etil-4-metil-1H-pirrol-2,5-diona	287,8	481,7	452,8	227,1	177,3	290,1	168,2	296,2	156,4	387,0	470,2	82,3	95,6	75,2	337,7	250,1	381,5	236,2	134,5	432,1	211,3	192,2	195,9	121,9	293,8	
α-copaeno	100,9	98,8	107,1	138,0	232,5	224,7	154,9	163,7	195,9	113,6	148,6	243,2	454,2	380,7	110,0	211,0	129,6	182,8	0,0	125,7	285,9	182,5	298,6	258,6	105,1	
α-ionona	218,2	223,9	272,6	282,6	241,9	196,5	144,1	272,3	178,0	506,8	382,7	143,8	181,9	165,1	187,2	204,5	251,6	138,7	175,6	418,3	232,2	139,9	178,7	224,9	385,7	
geraniacetona	1236,8	1278,7	1396,1	1831,0	739,3	617,4	492,9	730,9	555,0	1279,6	1804,9	410,0	350,8	274,1	673,2	583,9	913,7	602,5	540,7	1707,5	590,3	497,7	532,8	429,9	1722,0	
β-ionona	780,6	772,5	802,3	878,4	595,2	529,3	385,2	758,9	476,0	695,5	1102,3	340,2	290,8	270,3	493,3	513,5	702,5	407,5	480,0	1015,3	652,1	482,8	484,1	412,9	813,1	
dihidroactinolido	136,5	141,9	181,3	211,6	344,1	350,9	290,0	370,8	273,0	748,5	718,6	292,4	397,3	383,5	392,0	353,9	378,7	260,7	302,0	1001,6	449,8	409,5	415,8	365,2	1395,3	
cafeína	107,9	147,1	192,9	107,3	103,2	123,5	81,4	398,2	167,5	123,0	191,9	99,4	267,6	194,4	170,0	121,6	164,3	140,7	254,1	151,0	150,8	148,2	256,0	256,8	150,1	
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	121,3	119,7	145,5	137,2	35,5	38,6	29,9	43,2	41,7	142,9	98,1	27,0	16,9	0,0	30,9	30,3	36,5	26,3	43,6	237,6	36,5	32,0	40,0	18,3	384,0	

A contribuição de cada variável original na componente principal é representada pelo “loading” e quanto mais próximo o valor módulo estiver de 1, maior será sua influência na CP. Na Figura 44 estão assinaladas as variáveis mais importantes com maiores valores de “loading”: ácido acético, (E,Z)-2,4-heptadienal, (E,E)-2,4-heptadienal, geranilacetona e  $\beta$ -ionona.

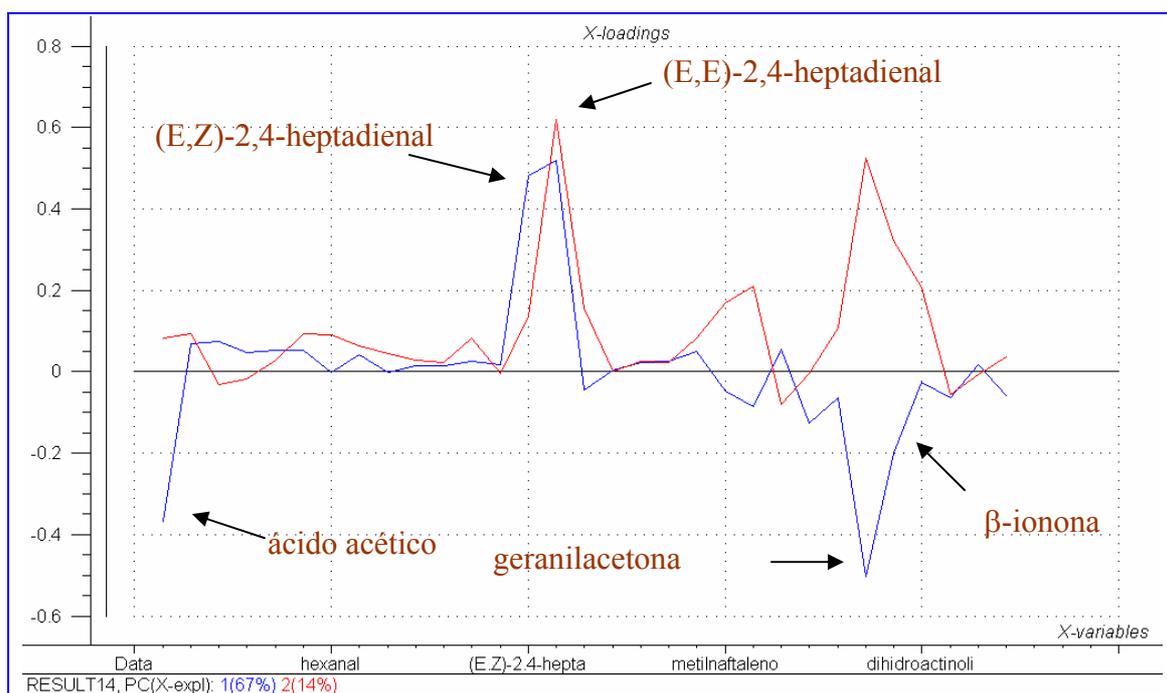


Figura 44 - Gráfico de “loading”. Em destaque as variáveis principais. As curvas em azul e em vermelho correspondem a CP1 e CP2, respectivamente.

Observando a variância de cada um dos CP na legenda do gráfico de “loadings” é possível verificar que a primeira componente explica 67% da variância e a segunda componente explica 14% (Figura 44). Evidentemente as demais componentes (CP 3, CP 4 e CP 5) explicam, em conjunto, 19% da variância restante do sistema.

Os gráficos de escores representados na Figura 45 comparam CP 1 e CP 2. Esse gráfico representa um plano no espaço das variáveis onde 81% de toda variância do sistema é explicada. Numa avaliação visual foi possível observar a formação de dois grupos (“clusters”) relacionados ao período da safra ou ao envelhecimento da erva: safra de 2000 (em azul, nos quadrantes,  $y+/x-$ , e  $y-/x-$ ) e safra de 2003 (em vermelho, nos quadrantes  $y+/x+$ , e  $y-/x+$ ). Das amostras comerciais analisadas, todas que são de 2003 apareceram no quadrante  $x+$ , o que indica um comportamento característico de amostras novas. Todas as amostras de 2000 (0, 1, 2, 4, 11, 25) se situaram no quadrante  $x-$ , juntamente com as amostras comerciais oriundas da Argentina (10) e do Paraguai (20), significando que essas duas últimas amostras estão mais envelhecidas do que as demais amostras comerciais. A amostra 25 foi adquirida em março de 2001 no início deste trabalho de tese e foi re-analisada em dezembro/2003 juntamente com as todas as outras amostras. O seu comportamento foi similar ao das amostras da safra de 2000 e condizente com uma erva-mate mais envelhecida. A quantidade de ácido acético foi muito maior nas amostras mais velhas, significando que essa substância é um indicador de discriminação importante. Isso está de acordo com o estudo relacionado a formação de ácidos de cadeia curta no envelhecimento do café (ROBERTS, 2000). Mas o ácido acético não foi o único indicador, pois essa variável ao ser retirada do conjunto não modificou a discriminação observada por safra após refazer o gráfico de escores.

Ao refazer o gráfico de escores somente com as cinco variáveis mais importantes (Figura 45 B) o resultado foi praticamente o mesmo do que o resultado obtido anteriormente com as 31 variáveis originais (Figura 45 A). Isso significa que basta somente medir as áreas dos cinco analitos principais (ácido acético, (*E,Z*)-2,4-heptadienal, (*E,E*)-2,4-heptadienal, geranilacetona e  $\beta$ -ionona) para alcançar o resultado esperado em termos de classificação por safra.

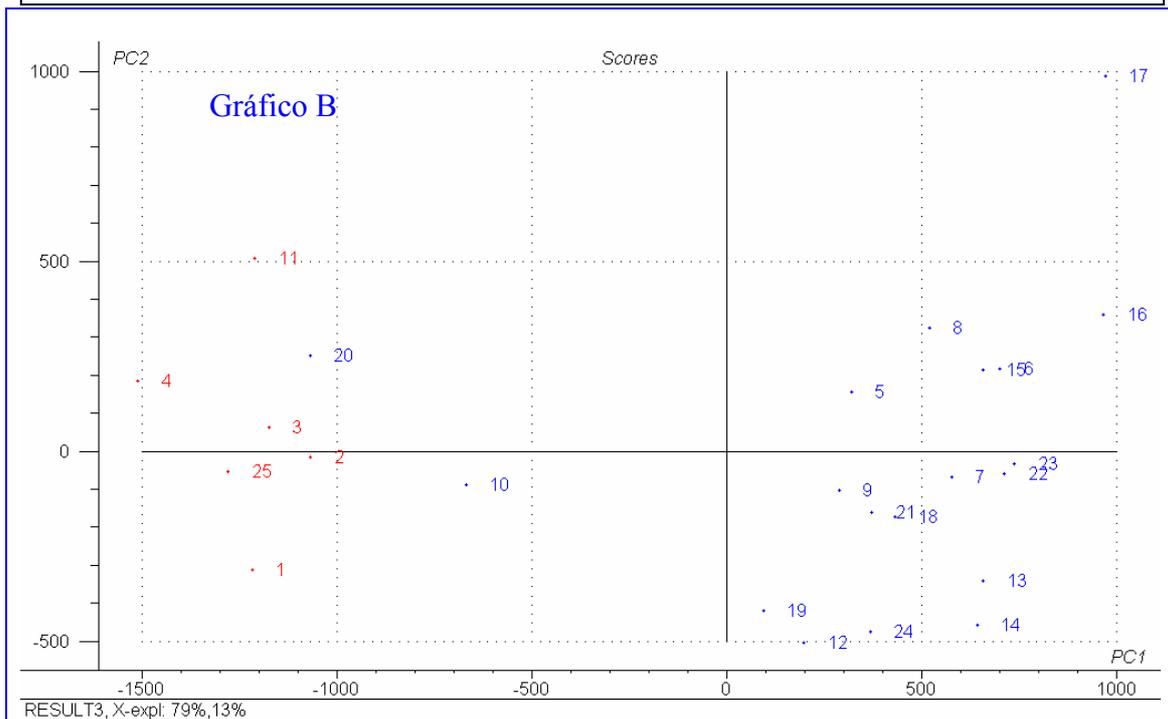
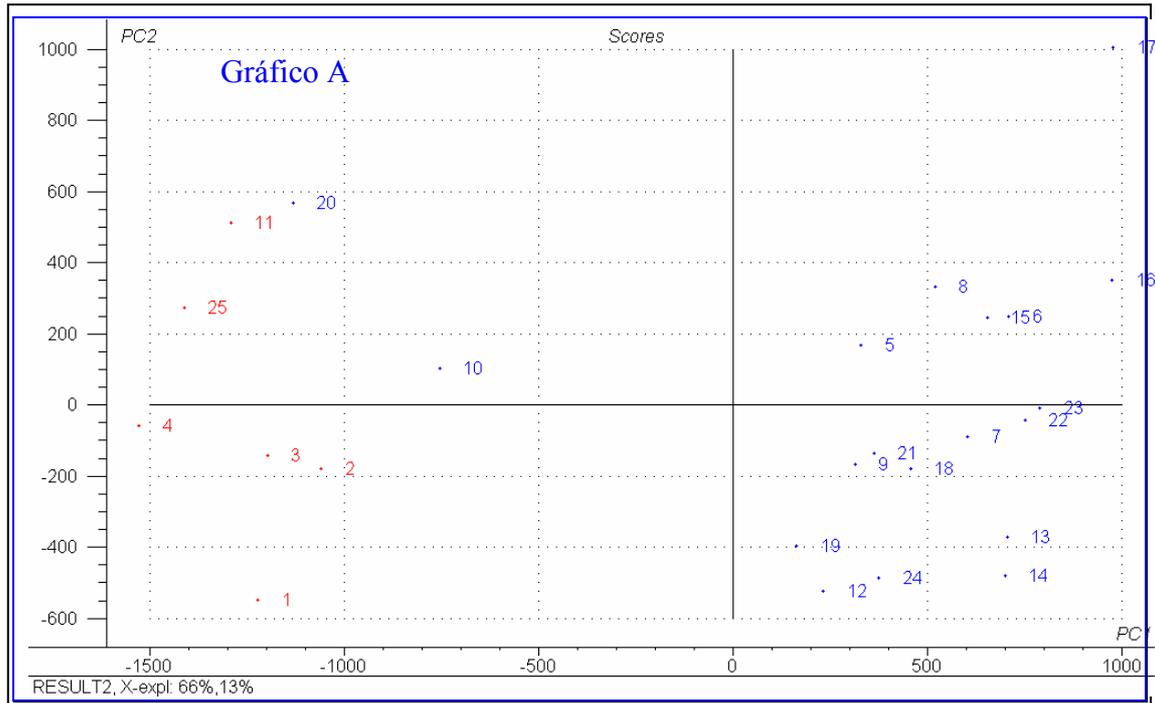


Figura 45 - Gráficos de escores para amostras de erva-mate cancheada em função do ano de coleta/processamento ou em função do tipo de plantio. A) considerando todas as trinta e uma variáveis B) considerando as cinco principais variáveis (ácido acético, (*E,Z*)-2,4-heptadienal, (*E,E*)-2,4-heptadienal, geranilacetona e  $\beta$ -ionona). safra 2000 em azul e safra 2003 em vermelho. Amostras oriundas dos tipos de cultivo: sombreado: 1, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 15, 16 e 17; céu aberto: 2, 3, 4, 9, 11, 14 e 18; plantio não determinado 10, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25.

Infelizmente, não foi possível identificar claramente padrões para as amostras oriundas de cultivo sombreado e a céu aberto. As amostras 12, 13 e 14 de Rebouças-PR parecem ter características distintas das demais, formando um grupo a parte, mas sem significado algum com respeito ao tipo de cultivo, pois 12 e 13 correspondem a cultivo sombreado e 14 a cultivo a céu aberto. Numa abordagem otimista, é possível supor que as amostras 9 e 18 da safra 2003 tiveram comportamento parecido e tenderam a formar um grupo relacionado ao cultivo a céu aberto juntamente com uma amostra comercial (MC 21). A amostra de Cruz Machado (17) se destacou de todas as outras, podendo ser inclusive um resultado a ser descartado (“outlier”) ou então ela seria de progênie peculiar.

Em conclusão, a metodologia HS-SPME-GC associada a Análise dos Componentes Principais (ACP) demonstrou ser útil para rápida discriminação e classificação de amostras de erva-mate baseada na comparação do perfil cromatográfico dos seus principais constituintes voláteis e semi-voláteis. Resultados satisfatórios na caracterização da safra (2000/2003) foram alcançados usando detector por ionização em chama e por essa razão o método proposto tem potencial para ser implantado em laboratórios de controle da qualidade a fim de verificar o prazo de validade da erva-mate durante o período de estocagem. Quanto ao tipo de cultivo, não foi possível obter uma discriminação clara das amostras analisadas com os resultados obtidos, contudo, seria conveniente repetir as análises, aumentando-se o número de amostras e tomando-se mais cuidado na seleção da progênie e no tipo de processamento utilizado para se chegar a uma conclusão mais plausível.

### Identificação de LAB em amostras de mate tostado.

A metodologia proposta neste trabalho foi aplicada na análise de amostras de mate tostado. A Figura 46 apresenta os cromatogramas obtidos a partir de amostras comercialmente disponíveis, na melhor condição de extração previamente determinada. Os diferentes perfis cromatográficos das amostras de mate tostado foram bem diferentes entre si, mais ainda do que os perfis observados entre as amostras de mate cancheado. As diferenças observadas de modo global podem ser atribuídas aos diferentes processos de torrefação industrial utilizados pelas marcas analisadas. No caso da amostra MS deve-se levar em consideração que além da etapa de torrefação, o processamento envolveu uma etapa adicional de desidratação da erva-mate tostada, o que explica o cromatograma obtido com poucos sinais característicos com perda de substâncias voláteis.

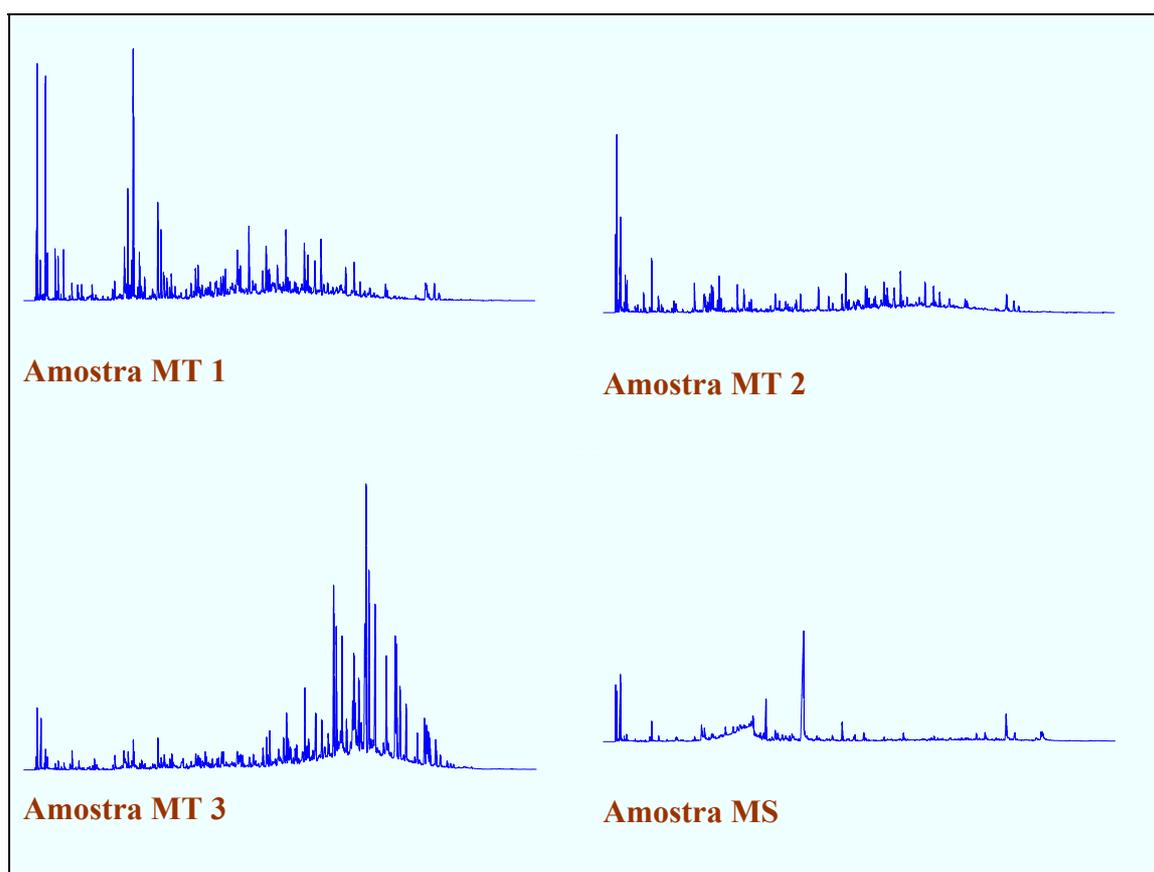


Figura 46 - Cromatogramas de amostras de mate tostado obtidos por HS-SPME nas seguintes condições:  
 $T$  80°C;  $t_{ext}$  60 min;  $t_{inj}$  15 min, :  $t_{pre}$  = 15 min;  $m$  = 150 mg.

Ainda na Figura 46 foi possível perceber, como característica peculiar da amostra MT 3, o surgimento de diversos sinais correspondentes a substâncias do grupo D ( $I > 1200$ ). Essas substâncias foram identificadas por CG-EM como um grupo de hidrocarbonetos isoméricos conhecidos como alquilbenzenos lineares (LAB = “linear alkylbenzene”) (Tabela 14). Até onde se sabe, não existe registro na literatura científica da presença dessas substâncias em alimentos e nem tão pouco os LABs são produtos naturais. Portanto, a presença dessas substâncias em alimentos é indesejada e considerada uma contaminação.

O LAB é um óleo constituído de *n*-parafinas com cadeia alquílica entre 10 e 13 átomos de carbono e grupamento fenila nas posições 2, 3, 4, 5 ou 6. O processo de manufatura consiste numa primeira etapa, na desidrogenação de *n*-parafinas levando às  $\alpha$ -monoolefinas lineares correspondentes na faixa de corte compreendida entre  $C_{10}$ - $C_{13}$ , em presença de catalisador heterogêneo. Na segunda etapa ocorre a alquilação do benzeno por essas mesmas olefinas, em presença de um catalisador homogêneo, o ácido fluorídrico-HF, formando assim o LAB com cadeia alquílica entre 10 e 13 átomos de carbono. Esse óleo é o intermediário petroquímico básico para a produção de alquilbenzeno linear sulfonado - LAS (tensoativo mais utilizado na formulação de detergentes) e também pode ser usado industrialmente em formulação de tintas.

A análise de LABs em detergente sintético envolve procedimentos dispendiosos, manipulação de solventes e geração de resíduos mais tóxicos que o analito (extração liq.-liq., SPE) para que seja feita a quantificação. Recentemente, CARVALHO & PENTEADO (2003) propuseram um método rápido para a identificação de LABs nos detergentes comerciais por CG-EM usando SPME por imersão, sendo que a fibra PDMS 30  $\mu$ m forneceu o melhor resultado.

Essas substâncias (LABs) são semi-voláteis e podem ser extraídas também por HS-SPME podendo ser, conseqüentemente, identificadas por CG-EM. As Figuras 47 e 48 mostram os cromatogramas de uma amostra contaminada e de outra não contaminada com LAB com expansão nas respectivas regiões onde normalmente apareceram sinais desses contaminantes. Os espectros de massas relativos aos sinais tiveram correlação de mais de 98% com a base de dados espectrais. A identificação dos LABs foi inequívoca pois associado a isso, os índices de retenção calculados ( $I$ ) estão de acordo com valores publicados na literatura (HEIZEN & YUNES, 1993). A característica dos valores dos

índices de retenção calculados, foram típicos de séries homólogas, ou seja, a cada aumento de uma unidade de carbono na série o índice aumentou em ~100 unidades. Por exemplo, na seguinte série: 4-fenildecano; 4-fenilundecano; 4-fenildodecano e 4-feniltridecano os índices calculados foram 1546, 1645, 1745 e 1845, respectivamente (Tabela 14).

Tabela 14 - Identificação dos principais componentes do LAB por cromatografia gasosa nas condições cromatográficas utilizadas neste trabalho.

Nome trivial	Nome IUPAC	Série	t <sub>R</sub> (min)*	t <sub>R</sub> (min)**	I ***
5-fenildecano	1-butilhexilbenzeno	C10	52,0	15,7	1537
4-fenildecano	1-propilheptilbenzeno	C10	52,4	15,9	1546
3-fenildecano	1-etiloctilbenzeno	C10	52,6	16,4	1558
2-fenildecano	1-metilnonilbenzeno	C10	53,5	17,3	1597
6-fenilundecano	1-pentilhexilbenzeno	C11	57,3	18,1	1625
5-fenilundecano	1-butilheptilbenzeno	C11	57,5	18,2	1636
4-fenilundecano	1-propiloctilbenzeno	C11	57,9	18,5	1645
3-fenilundecano	1-etilnonilbenzeno	C11	59,0	19,0	1664
2-fenilundecano	1-metildecilbenzeno	C11	60,9	19,9	1699
6-fenildodecano	1-pentilheptilbenzeno	C12	62,4	20,6	1729
5-fenildodecano	1-butiloctilbenzeno	C12	62,6	20,7	1734
4-fenildodecano	1-propilnonilbenzeno	C12	63,2	21,0	1745
3-fenildodecano	1-etildecilbenzeno	C12	64,2	21,6	1765
2-fenildodecano	1-metilundecilbenzeno	C12	66,1	22,5	1802
6-feniltridecano	1-pentiloctilbenzeno	C13	67,3	23,0	1827
5-feniltridecano	1-butilnonilbenzeno	C13	67,6	23,2	1834
4-feniltridecano	1-propildecilbenzeno	C13	68,1	23,5	1845
3-feniltridecano	1-etilundecilbenzeno	C13	69,2	24,2	1867
2-feniltridecano	1-metilundodecilbenzeno	C13	71,0	25,0	1905

\*condições cromatográficas: 40°C/4 min -2°/min - 200°C/2 min.

\*\*condições cromatográficas: 100°C - 4°/min - 220°C min.

\*\*\*Índices de retenção (Kovats) para coluna do tipo DB5, foram calculados a partir dos tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares conforme está descrito na PARTE EXPERIMENTAL..

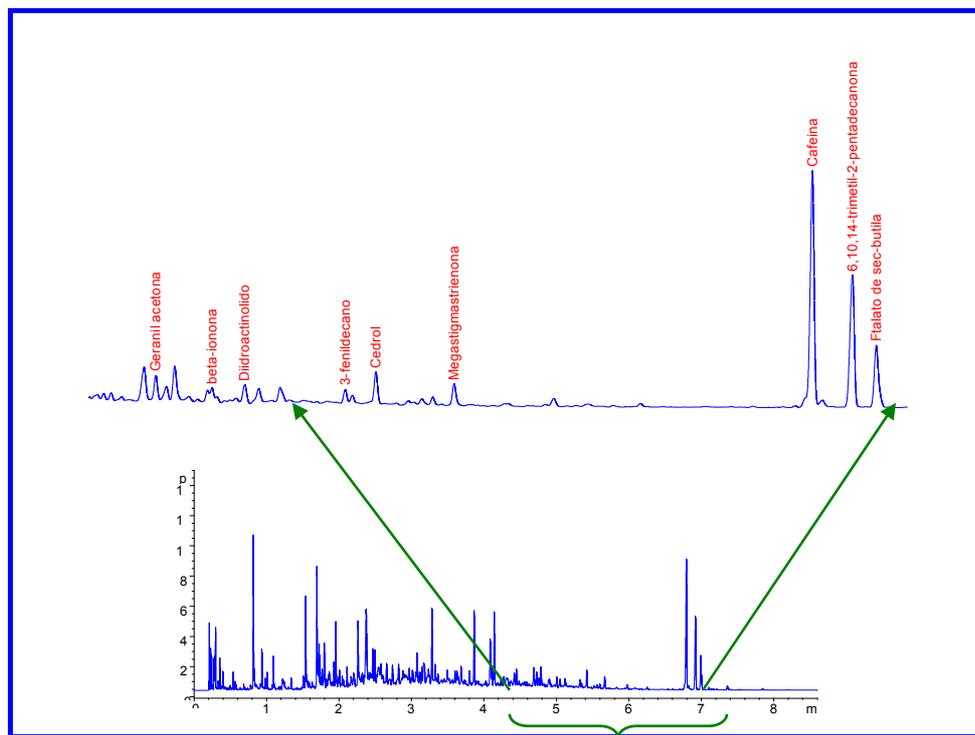


Figura 47 - Expansão da região compreendida entre 45-75 min do cromatograma de uma amostra de mate tostado de uma amostra MT que não contém LAB.

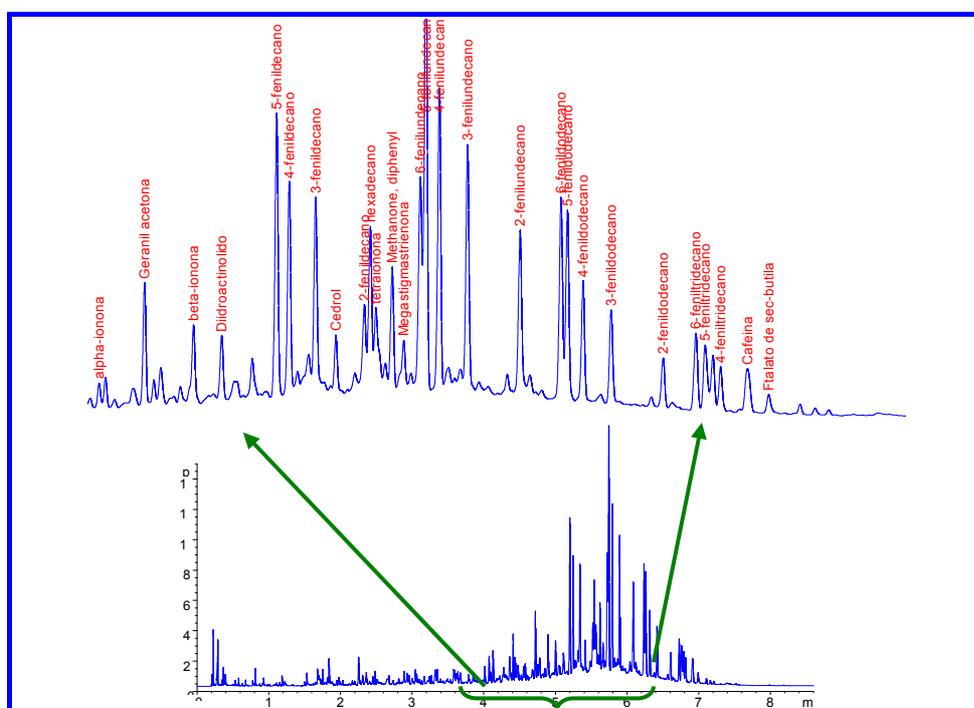


Figura 48 - Expansão da região compreendida entre 45-75 min do cromatograma de uma amostra de mate tostado de uma amostra MT que contém LAB.

O comportamento extrativo desses hidrocarbonetos aromáticos por HS-SPME foi bastante interessante. A Figura 49 apresenta os cromatogramas de uma determinada amostra de mate tostado contaminada com LAB, nas mesmas condições de extração SPME, exceto a preparação que feita por três processos distintos:

- Amostragem seca;
- Amostragem por maceração em solução de NaCl saturada (úmida);
- Amostragem da solução oriunda da decocção da mesma erva a 80°C durante 20 min, seguida de filtração.

Ao analisar os cromatogramas, foi possível notar que a amostragem seca recuperou os LABs com maior eficiência, provavelmente devido à característica hidrofóbica dessas substâncias. Já a análise do extrato aquoso ou o chá preparado por decocção com água, revelou que procedimento de HS-SPME não recuperou praticamente nenhuma quantidade de LAB a partir da matriz. Isso reforça o argumento relacionado à solubilidade dos LABs em água. Dessa forma, provavelmente seja possível que chá feito com a erva “contaminada” não contenha essas substâncias em quantidades mensuráveis, minimizando com isso a sua ingestão pelos consumidores de chá mate.

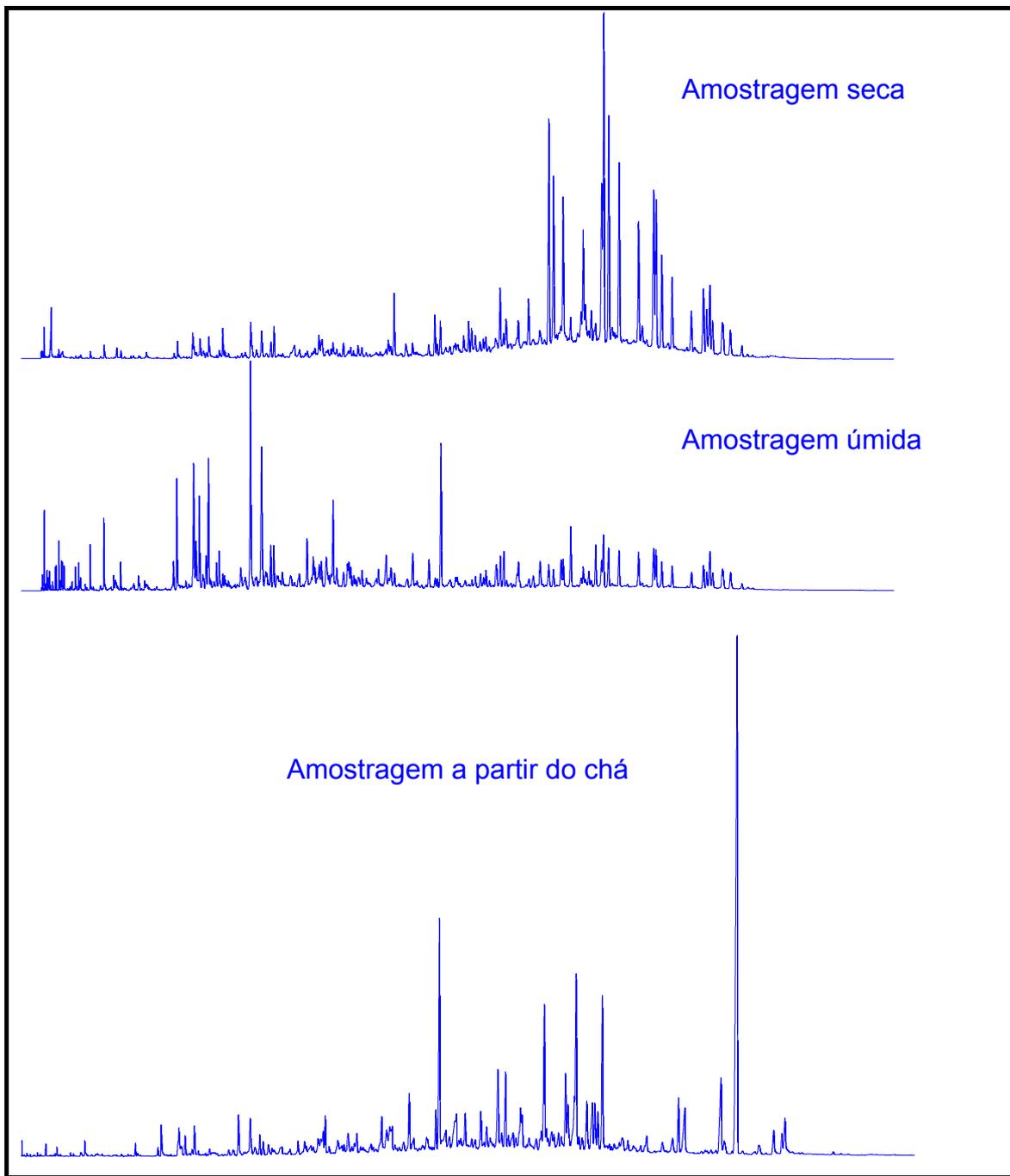


Figura 49 - Cromatogramas da amostra MT contaminada por LAB obtidos por diferentes processos de extração HS-SPME: amostragens seca, úmida e a partir do chá da mesma erva.

A identificação por si só não permite determinar qual foi a origem dessa contaminação. A incorporação, intencional ou incidental, de detergente na matriz é uma das hipóteses a ser investigada. A hipótese de contaminação das amostras analisadas com detergente devido à limpeza mal executada dos fornos e outros equipamentos industriais com detergente sintético, é bastante plausível, pois ambos produtos investigados foram submetidos a torrefação no processamento, possibilitando a dessulfonação do LAS, resultando no LAB agregado na matriz. A contaminação com detergente é bastante plausível, pois o LAS sofre dessulfonação com o calor resultando no LAB, revertendo a reação de síntese do LAS mostrada na Figura 50. Portanto, se o mate verde estivesse contaminado com LAS o processo de queima da erva-mate poderia gerar LAB no produto tostado resultante.

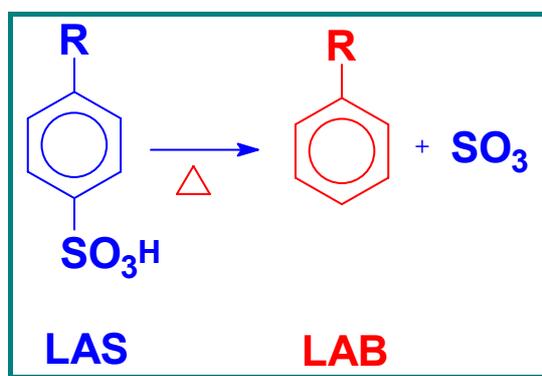


Figura 50 - Formação de LAB a partir de decomposição térmica de LAS

Deve-se ressaltar que esse tipo de contaminação não é comum, pois somente em alguns lotes de mate tostado de uma determinada marca, foi constatada a presença de LAB. Foi possível também identificar, por essa mesma técnica, os LABs em uma amostra de chá-preto (Figura 51) mostrando com isso que esse tipo de contaminação não é exclusivo da erva-mate. Segundo a legislação, a erva-mate não pode conter qualquer aditivo, ainda mais contaminantes desse tipo (BRASIL, 1998). A empresa que produz a marca contaminada foi comunicada e informou que não tinha, até então, conhecimento desse problema. Após rastreamento feito de diversos lotes a partir do método analítico por HS-SPME desenvolvido neste trabalho, o setor da garantia da qualidade da empresa tomou as devidas providências e conseguiu resolver o problema. A partir daí não foram mais identificados lotes contaminados dessa marca no mercado do Rio de Janeiro. Cabe frisar que sem o método analítico HS-SPME seria muito difícil realizar essa análise como controle da qualidade.

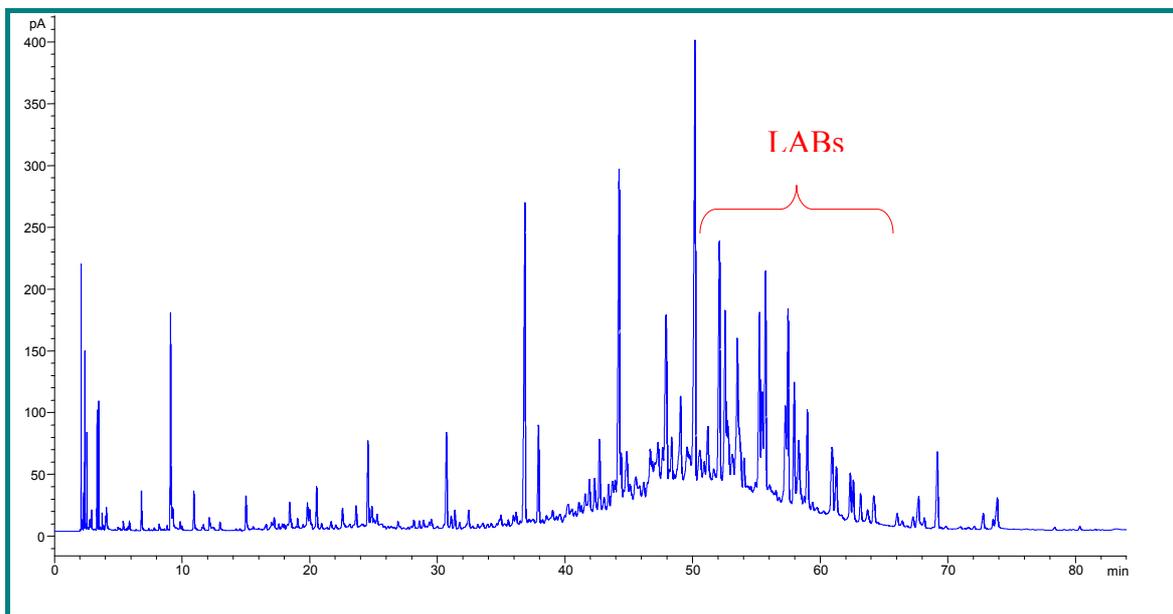


Figura 51 – Cromatograma obtido a partir de uma amostra de Chá Preto contaminado com LAB.

Para realizar a análise quantitativa de LAB, as condições cromatográficas foram alteradas de acordo com os parâmetros de adequabilidade do sistema (Tabelas 15 e 16). A taxa de aquecimento do forno da coluna foi aumentada a fim de diminuir o tempo de análise de 84 min para 30 min sem perda de resolução dos sinais dos analitos (LABs). Quanto ao fator de retenção ( $k$ ), os resultados obtidos na condição cromatográfica anterior estavam distribuídos entre 25,0 e 32,0 (Tabela 15), enquanto que na nova condição cromatográfica, os valores de  $k$  passaram a se situar entre 6,84 e 10,25 (Tabela 16) dentro do intervalo ótimo recomendado para  $k$  por BRUCE *et al.*, 1998.

Os LABs selecionados como analitos para o estudo quantitativo e que tiveram  $R_s > 2$  e  $\alpha > 1,01$  (em relação ao pico adjacente), foram: 5-fenildecano; 4-fenildecano; 3-fenildecano; 4-fenilundecano; 3-fenilundecano; 2-fenilundecano; 4-fenildodecano; 3-fenildodecano e 2-fenildodecano.

Tabela 15 - Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico, para análise de LAB nas condições de programação de temperatura do forno da coluna: 40°C/4min; 2°C/min até 180°C/2min totalizando 84 min de corrida.

<b>PARÂMETROS *</b>						
<b>LABs</b>	<b><math>t_R</math></b>	<b><math>I</math></b>	<b><math>n</math></b>	<b><math>k'</math></b>	<b><math>R_s</math> **</b>	<b><math>\alpha</math> **</b>
5-fenildecano	52,00	1537	2,58 10 <sup>6</sup>	25,0	-	-
4-fenildecano	52,45	1546	2,71 10 <sup>6</sup>	25,2	3,70	1,01
3-fenildecano	52,75	1558	1,06 10 <sup>6</sup>	25,4	1,87	1,01
2-fenildecano	53,5	1597	2,93 10 <sup>6</sup>	25,7	1,22	1,01
6-fenilundecano	57,3	1625	2,73 10 <sup>6</sup>	27,6	1,65	1,00
5- fenilundecano	57,5	1636	3,46 10 <sup>6</sup>	27,7	1,65	1,00
4- fenilundecano	57,9	1645	3,33 10 <sup>6</sup>	28,0	4,01	1,01
3- fenilundecano	59,0	1664	3,57 10 <sup>6</sup>	28,5	1,89	1,01
2- fenilundecano	60,9	1699	3,56 10 <sup>6</sup>	29,4	15,6	1,03
6-fenildodecano	62,34	1729	1,80 10 <sup>6</sup>	30,2	1,44	1,00
5- fenildodecano	62,57	1734	1,81 10 <sup>6</sup>	30,3	1,44	1,00
4- fenildodecano	63,14	1745	3,83 10 <sup>6</sup>	30,6	3,72	1,01
3- fenildodecano	64,16	1765	4,17 10 <sup>6</sup>	31,1	8,25	1,02
2- fenildodecano	66,05	1802	4,56 10 <sup>6</sup>	32,0	15,7	1,03

\* Parâmetros de adequabilidade dos sistema: tempo de retenção ( $t_R$ ), índice de retenção ( $I$ ), número de pratos teóricos ( $n$ ), fator de retenção ( $\kappa'$ ), resolução ( $R_s$ ), fator de separação ( $\alpha$ ).

\*\* Os parâmetros  $R_s$  e  $\alpha$  estão relacionados no cromatograma da amostra de mate tostado com sinais adjacentes.

Tabela 16 - Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico, para análise de LAB nas condições de programação de temperatura do forno da coluna: 100°C; 4°C/min até 200°C totalizando 30 min de corrida.

<b>PARÂMETROS *</b>						
<b>LABs</b>	<b><math>t_R</math></b>	<b><math>I</math></b>	<b><math>n</math></b>	<b><math>k'</math></b>	<b><math>R_s</math> **</b>	<b><math>\alpha</math> **</b>
5-fenildecano	15,68	1537	5,56 10 <sup>5</sup>	6,84	-	-
4-fenildecano	15,90	1546	9,19 10 <sup>5</sup>	6,95	3,38	1,02
3-fenildecano	16,39	1558	3,93 10 <sup>5</sup>	7,19	6,49	1,03
2-fenildecano	17,33	1597	1,26 10 <sup>6</sup>	7,67	1,88	1,01
6-fenilundecano	18,13	1625	6,50 10 <sup>5</sup>	8,06	1,16	1,01
5- fenilundecano	18,22	1636	6,58 10 <sup>5</sup>	8,11	1,16	1,01
4- fenilundecano	18,48	1645	1,22 10 <sup>6</sup>	8,24	3,71	1,02
3- fenilundecano	19,01	1664	1,30 10 <sup>6</sup>	8,50	2,02	1,01
2- fenilundecano	19,94	1699	1,28 10 <sup>6</sup>	8,97	2,36	1,01
6-fenildodecano	20,60	1729	9,12 10 <sup>5</sup>	9,30	1,34	1,00
5- fenildodecano	20,72	1734	9,24 10 <sup>5</sup>	9,36	1,34	1,00
4- fenildodecano	21,02	1745	1,55 10 <sup>6</sup>	9,51	4,15	1,02
3- fenildodecano	21,56	1765	1,55 10 <sup>6</sup>	9,78	3,47	1,01
2- fenildodecano	22,50	1802	1,76 10 <sup>6</sup>	10,25	3,54	1,01

\* Parâmetros de adequabilidade dos sistema: tempo de retenção ( $t_R$ ), índice de retenção ( $I$ ), número de pratos teóricos ( $n$ ), fator de retenção ( $k'$ ), resolução ( $R_s$ ), fator de separação ( $\alpha$ ).

\*\* Os parâmetros  $R_s$  e  $\alpha$  estão relacionados no cromatograma da amostra de mate tostado com sinais adjacentes.

Após determinar as condições ótimas de separação cromatográfica dos LABs por CG a próxima etapa do processo foi o ajuste das condições de extração HS-SPME. Sendo assim duas séries de experiências univariadas foram realizadas, nas quais procedeu-se a variação do tempo de extração e da massa da amostra, respectivamente, a fim de ajustar as condições de equilíbrio e sensibilidade. Com respeito ao tempo e a massa, as condições de equilíbrio foram atingidas em 30 min e 80 mg em frasco 4 de mL (Figuras 52 e 53, respectivamente). Essas e as demais condições de extração HS-SPME encontram-se na Tabela 17.

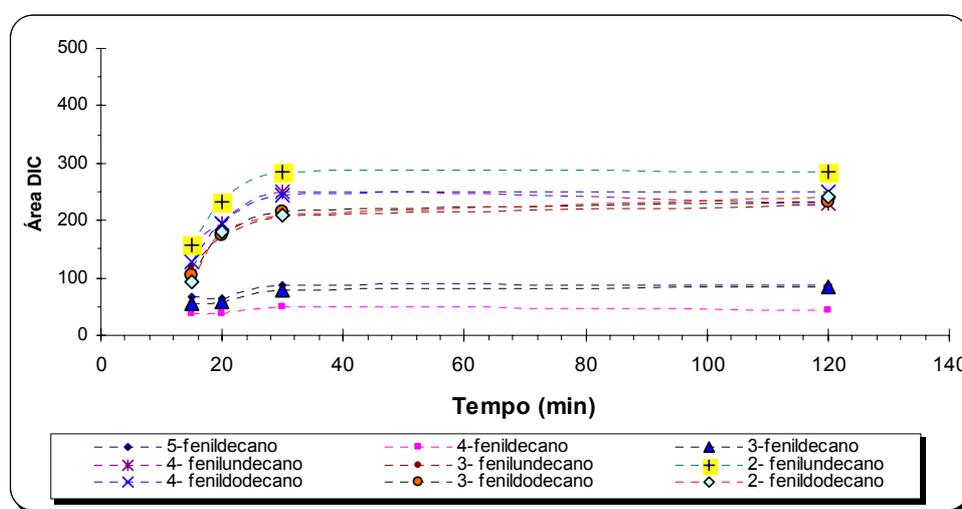


Figura 52 - Influência do tempo de extração dos LABs por HS-SPME de amostra de mate tostado contaminada empregando a fibra PDMS a 100°C/100 mg.

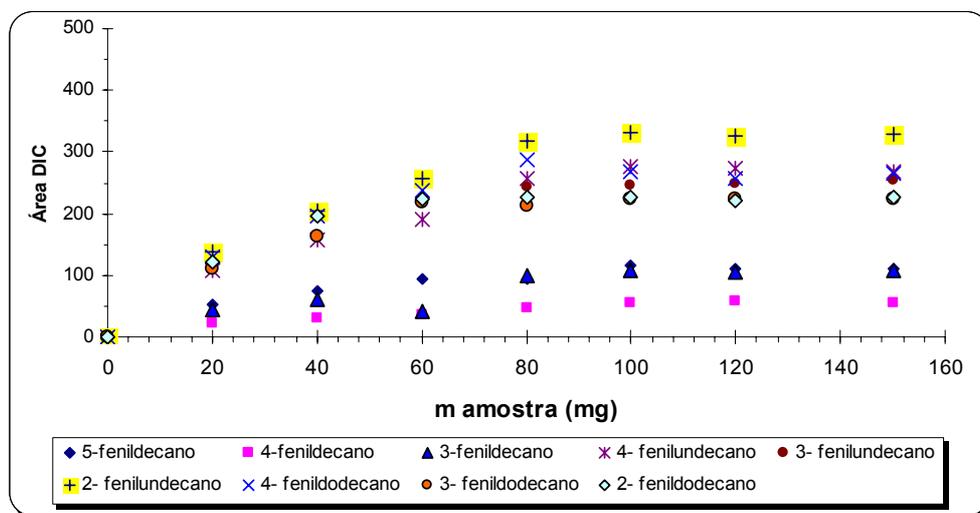


Figura 53 - Influência da massa na extração dos LABs por HS-SPME de amostra de mate tostado contaminada empregando a fibra PDMS a 100°C/30 min.

Tabela 17 - Parâmetros de extração por HS-SPME escolhidos para análise quantitativa de LABs em amostra de mate tostado.

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição</b>	<b>Critérios para escolha</b>
Fibra	PDMS 100 µm	Apresentou boa eficiência de extração devido a sua natureza apolar que é similar a dos analitos.
Amostragem	seca	O rendimento de recuperação, nas mesmas condições, foi maior do que no processo úmido
Temperatura	100°C	Permite maior sensibilidade para os analitos semi-voláteis
Tempo de extração	30 min	Condição de equilíbrio atingida para todos os analitos a partir de observação experimental (Figura 52).
Tempo de pré-equilíbrio	15 min	Parâmetro previamente otimizado com amostra MC.
Massa em vial 4 ml	80 mg	Condição de equilíbrio atingida para todos os analitos a partir de observação experimental (Figura 53).

A transferência dos analitos da matriz para o “headspace” é a etapa determinante na velocidade do processo HS-SPME. Algumas propriedades da matriz, como viscosidade e lipofilicidade, afetam o processo de extração em larga extensão. A erva-mate é uma matriz complexa e certamente causará efeito de matriz nesse tipo de processo analítico. O método de adição padrão foi escolhido para determinar o teor de LAB na amostra MT por causa do forte efeito de matriz da erva-mate. As Figuras 54 e 55 mostram as curvas construídas a partir de adição de solução estoque de LAB em etanol. A curva A foi construída a partir de incrementos de volumes variados de 10 a 40 µL da solução estoque de LAB (Tabela 18). Essa curva de calibração apresentou dispersão dos pontos quando quantidades pequenas foram adicionadas, o que acarretou em perda de linearidade com valores de  $R^2$  muito afastados da unidade (Tabela 19). Isso pode ser atribuído à variação dos volumes da solução-padrão adicionados.

A curva B (Figura 55) foi obtida após refazer as experiências de adição padrão, tomando-se o cuidado de adicionar incrementos maiores e volumes regulares (Tabela 19). Além disso, foi acrescentado o mesmo volume de etanol na amostra sem padrão para que o ponto de partida da curva estivesse igualmente sob influência do solvente. Os valores dos coeficientes de correlação da curva B superiores a 0,99, demonstram que a linearidade melhorou significativamente devido ao fato de que o volume de solvente ter sido constante e minimizando dessa forma o efeito do solvente.

Tabela 18 - Condições das curvas de adição padrão de LAB em uma amostra de mate tostado.

Adição padrão	CURVA A			CURVA B		
	Conc LAB (µg/ml)	Vol. adic. (µL)	Massa adic. (µg)	Conc LAB (µg/ml)	Vol. adic. (µL)	Massa adic. (µg)
1	0	0	0	0	25	0
2	100	10	1,0	-	-	-
3	100	25	2,5	100	25	2,5
4	100	40	4,0			
5	1000	10	10	400	25	12,5
6	1000	25	25	1000	25	25

Tabela 19 - Resultados da análise por regressão linear das curvas de adição padrão de LAB.

LAB	Coeficiente angular "Slope"		Coeficiente linear Intercessão		Coeficiente de correlação (r <sup>2</sup> )	
	Curva A	Curva B	Curva A	Curva B	Curva A	Curva B
5-fenildecano	33.9	32.3	233.9	108.6	0.6710	0.9985
4-fenildecano	25.7	24.5	149.7	65,6	0.6980	0.9971
3-fenildecano	25.4	24.7	167.0	97,9	0.7944	0.9997
4-fenilundecano	86.5	85.4	427.5	262,9	0.9033	0.9999
3-fenilundecano	79.1	77.1	378.6	269,2	0.9267	0.9987
2-fenilundecano	79.2	78.6	415.4	299,3	0.9440	0.9994
4-fenildodecano	97.3	96.5	396.3	306,9	0.9564	0.9998
3-fenildodecano	87.1	82.9	234.6	247,5	0.9030	0.9991
2-fenildodecano	72.0	70,8	331.1	253,2	0.9398	0.9994

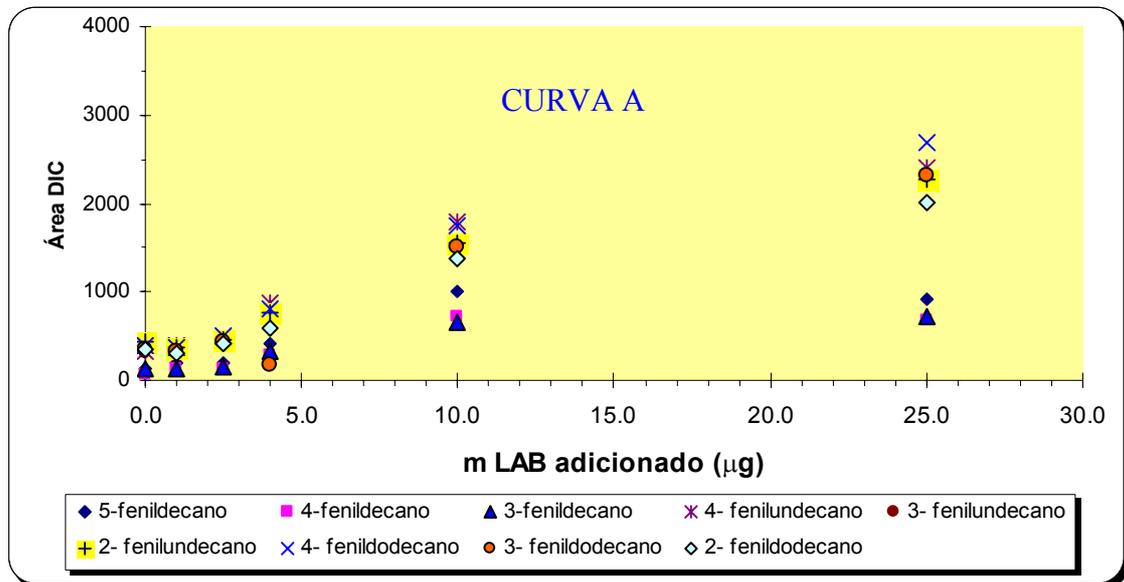


Figura 54 - Curva adição padrão A com volumes de solução padrão de LAB variados.

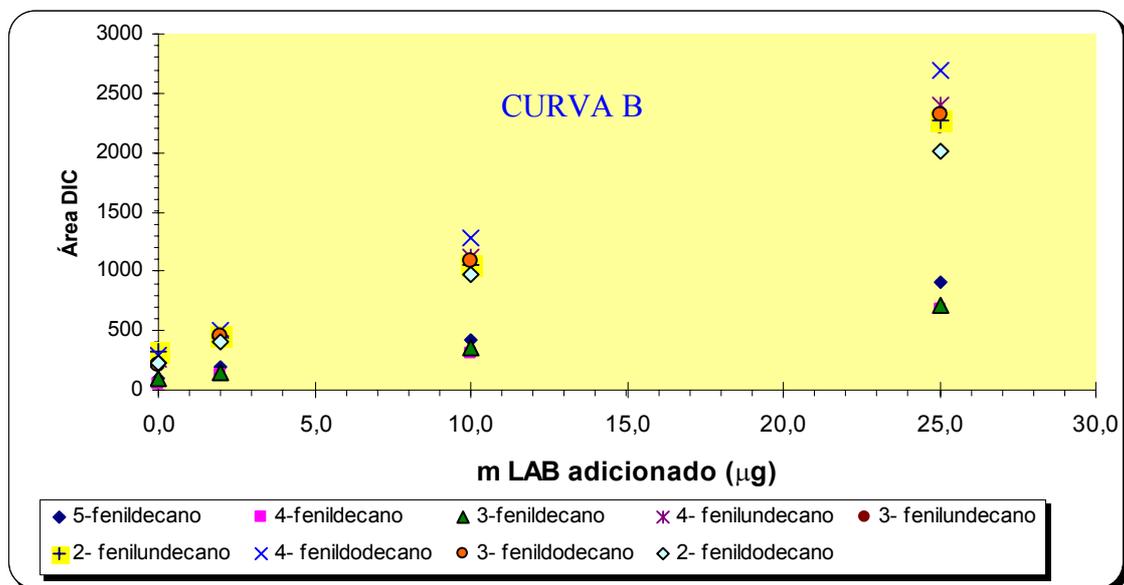


Figura 55 - Curva adição padrão B com volumes de solução padrão de LAB constantes.

Para demonstrar o efeito do solvente foram feitas experiências com adição de volumes de etanol na matriz. A curva relativa aos valores de área médios dos LABs em função do volume de etanol revelou que a adição de etanol provocou uma diminuição significativa da resposta (Figura 56).

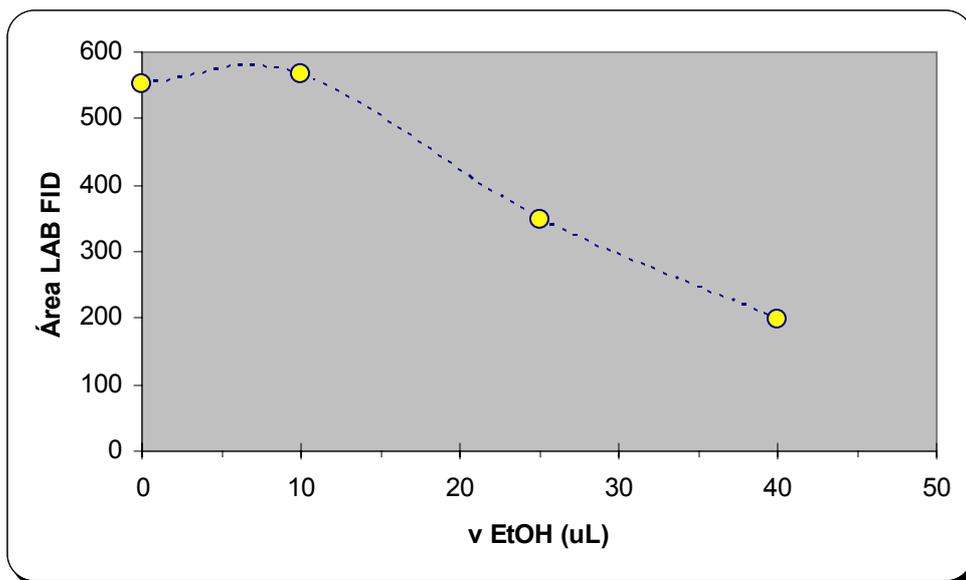


Figura 56 - Influência da adição de etanol na resposta dos LABs extraídos por HS-SPME.

A concentração de LAB na amostra de mate tostado foi enfim calculada a partir dos coeficientes da curva de adição padrão B e da massa de amostra. O valor médio encontrado foi  $46 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$ .

O método de HS-SPME-GC mostrou resultados qualitativos excepcionais na detecção de contaminantes (LABs) em amostras de mate tostado e de chá preto. Em termos quantitativos, os resultados foram promissores, mas ainda precisam ser validados a partir de comparação com um método de extração tradicional.

## **Análise de conservantes em amostras de bebidas comerciais de mate tostado.**

O mate é uma bebida de padrão complexo que se degrada com muita facilidade. Os ácidos sórbico e benzóico são utilizados em conjunto como conservantes, a fim de aumentar o tempo de prateleira das bebidas prontas. Essas substâncias são adicionadas na bebida como sais correspondentes de potássio ou de sódio. A Resolução nº101 de 1994 do mercosul; anexo A, recomenda a seguinte codificação para esses conservantes: benzoato de sódio INS 211, benzoato de potássio INS 212; sorbato de sódio INS 201; sorbato de potássio INS 202. O mate pronto tem pH ajustado entre 4,0-4,5 com ácido cítrico, o que permite a formação parcial dos ácidos sorbico e benzóico. As fibras HS-SPME podem então capturar os ácidos voláteis no “headspace”.

Os ácidos sórbico (pK 4,8) e benzóico (pK 4,2) são fracos. A variação do pH do meio provoca a alteração do equilíbrio. Quanto maior for o pH maior será a formação dos sais correspondentes, provocando a diminuição das áreas relativas aos ácidos. Para conversão total das espécies na forma ácida ou não dissociada, o pH ser ajustado a pelo menos 2 unidades abaixo do pK do analito (PAWLISZYN, 1997).

No Brasil, os teores máximos permitidos para refrescos e refrigerantes, de acordo com a tabela 1 da resolução nº4 de 34 de novembro de 1988 do Ministério da Saúde, são de 0,01 g/100mL e 0,05 g/100mL de ácido sórbico e ácido benzóico, respectivamente, no produto a ser consumido (psc).

As curvas de calibração (área do sinal *versus* concentração do padrão) obtidas a partir de quatro pontos de concentrações de cada padrão, encontram-se na Figura 57. Com respeito à linearidade, os valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) calculados (0,9899 para ácido benzóico e 0,9912 para ácido sórbico) foram considerados satisfatórios do ponto de vista analítico. Esse resultado a priori foi surpreendente, pois era esperado que os sinais cromatográficos de cauda frontal característicos de adsorção de ácidos carboxílicos na fase estacionária pudessem de alguma forma prejudicar a linearidade (Figura 58).

Os valores significativamente negativos dos coeficientes lineares indicam que os limites de detecção e quantificação para os analitos não são muito baixos. De fato, os limites de detecção e de quantificação estimados foram respectivamente, de 0,00075 g/100 mL e 0,0025 g/100 mL para o ácido sórbico e de 0,0013 g/100 mL e 0,0043 g/100 mL para o ácido benzóico<sup>7</sup>. Contudo isso não representa um grande problema analítico, por que o limite de quantificação está cerca de 4 a 10 vezes menor do que limite máximo estabelecido pela legislação.

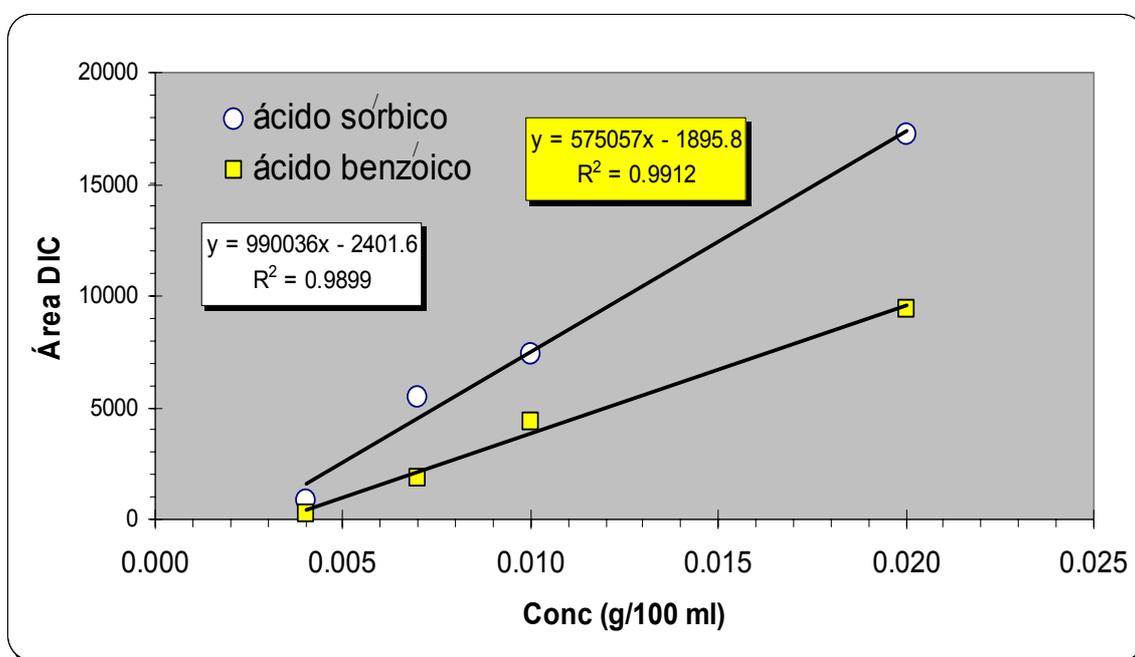


Figura 57 – Curvas de calibração dos conservantes (ácidos benzóico e sórbico).

<sup>7</sup> Os limites de detecção foram estimados a partir dos valores de áreas obtidos no pH 8 multiplicados por 3 e divididos, respectivamente, pelo coeficiente angular da curva de calibração. Os limites de quantificação foram estimados a partir dos valores de áreas obtidos no pH 8 multiplicados por 10 e divididos, respectivamente, pelo coeficiente angular da curva de calibração.

Uma análise preliminar de uma amostra de mate comercial por padronização externa, a partir dos coeficientes obtidos nas curvas de calibração (Figura 57) revelou concentrações de 0,013 g/100mL de ácido sórbico e 0,062 g/100mL de ácido benzóico. Os valores obtidos estão na mesma ordem de grandeza dos limites recomendados pela legislação, sendo que o teor do último está um pouco acima desse limite. Contudo esses resultados devem ser interpretados com reserva, pois o método ainda não foi validado. Para validar esse método seria necessário avaliar mais criteriosamente a reprodutibilidade, a recuperação dos analitos, os limites de detecção e quantificação e realizar a comparação dos resultados de diversas amostras com outros métodos analíticos tradicionalmente usados no controle da qualidade desses conservantes, como por exemplo, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Titulação Potenciométrica.

A Figura 58 mostra os cromatogramas resultantes da variação do pH da amostra. Como era previsto, o aumento do pH provocou a diminuição dos sinais correspondentes aos conservantes. A alteração das concentrações relativas das espécies não dissociadas (HA) e dissociadas ( $A^-$ ) no equilíbrio ácido-base explica esse fenômeno. Evidentemente, somente HA atingirá o “headspace” por causa da sua maior volatilidade e será capturado pela fibra. Assim quanto menor for o pH, maior será a concentração da espécie não dissociada na solução, no “headspace” e na fibra, e conseqüentemente, maior será a área do sinal cromatográfico correspondente. O efeito do pH pode ser visualizado também nas curvas relativas às áreas dos sinais dos ácidos benzóico e sórbico em função do pH (Figura 59).

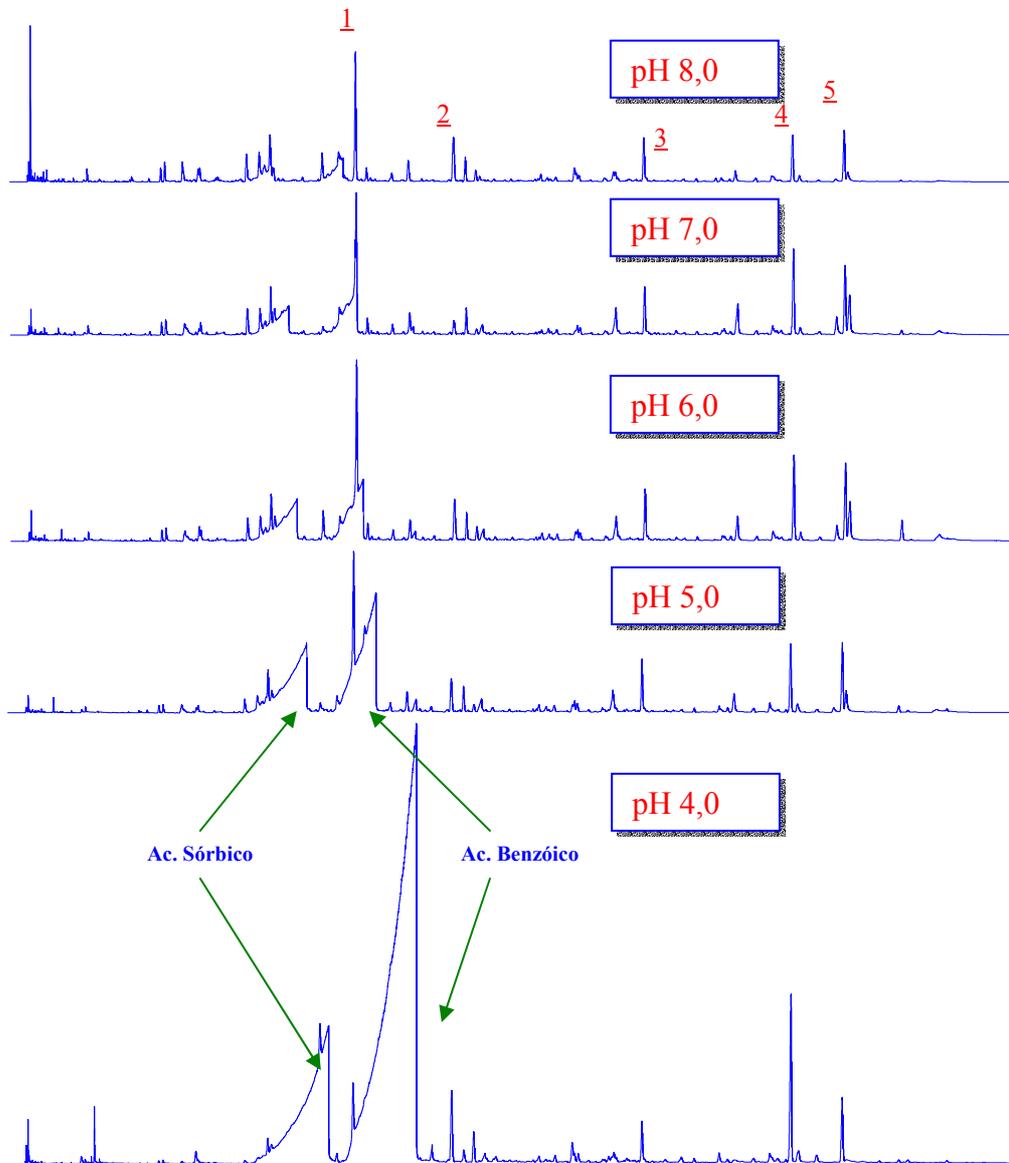


Figura. 58 -Cromatogramas de amostras de mate pronto obtida no comércio local ajustada a diferentes valores de pH. Os sinais dos conservantes (ácidos sórbico e benzóico) estão assinalados no gráfico obtido a pH 4,0.

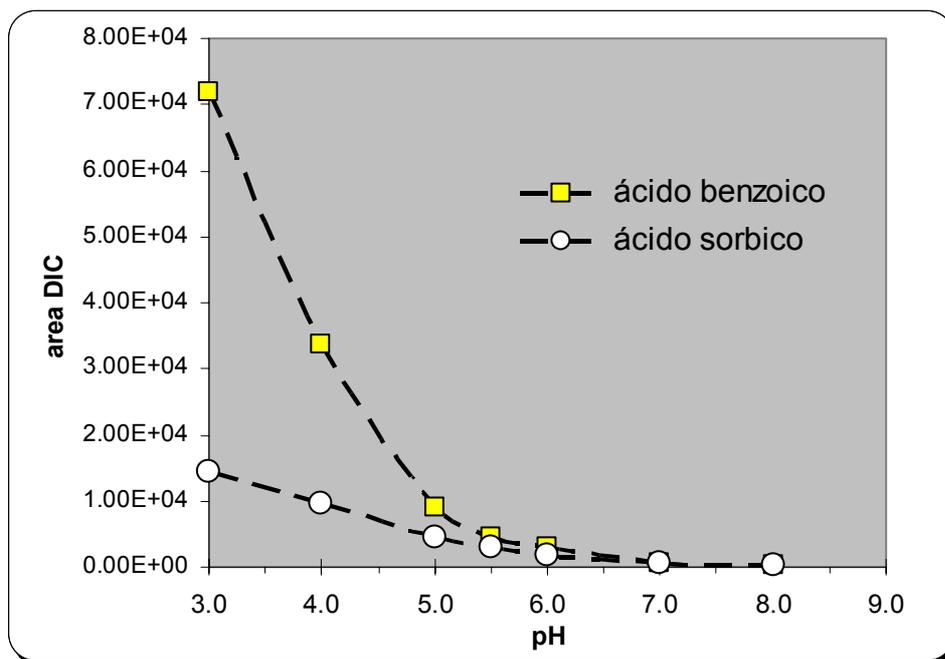


Figura 59 – Influência do pH na extração dos conservantes (ácidos sórbico e benzoico) por HS-SPME em amostra de mate pronto comercialmente disponível.

As seções lineares das curvas do log da área em função do pH apresentaram coeficientes de determinação de 0,9910 e 0,9980, respectivamente, para os ácidos sórbico e benzoico o que representa linearidades satisfatórias (Figura 60). Os desvios de linearidade esperados, ocorreram a partir de valores de pH abaixo do pK. Por exemplo, o desvio na curva do ácido sórbico (pK 4,8) ocorreu abaixo do pH 5 enquanto que no caso do ácido benzoico (pK 4,2) o desvio ocorreu abaixo do pH 4. As curvas simuladas do  $\log \alpha_{HA}$  em função do pH corroboraram esse comportamento (Figura 61).

Resultados promissores foram obtidos neste estudo preliminar para dosar ácido benzoico e de ácido sórbico por padronização externa em amostras MP. O processo HS-SPME é muito simples, relativamente rápido e necessita de poucas etapas de preparação da amostra (no caso em questão um simples ajuste de pH e adição de sal). Contudo o método quantitativo proposto ainda precisa ser validado a partir de comparação com métodos quantitativos tradicionais.

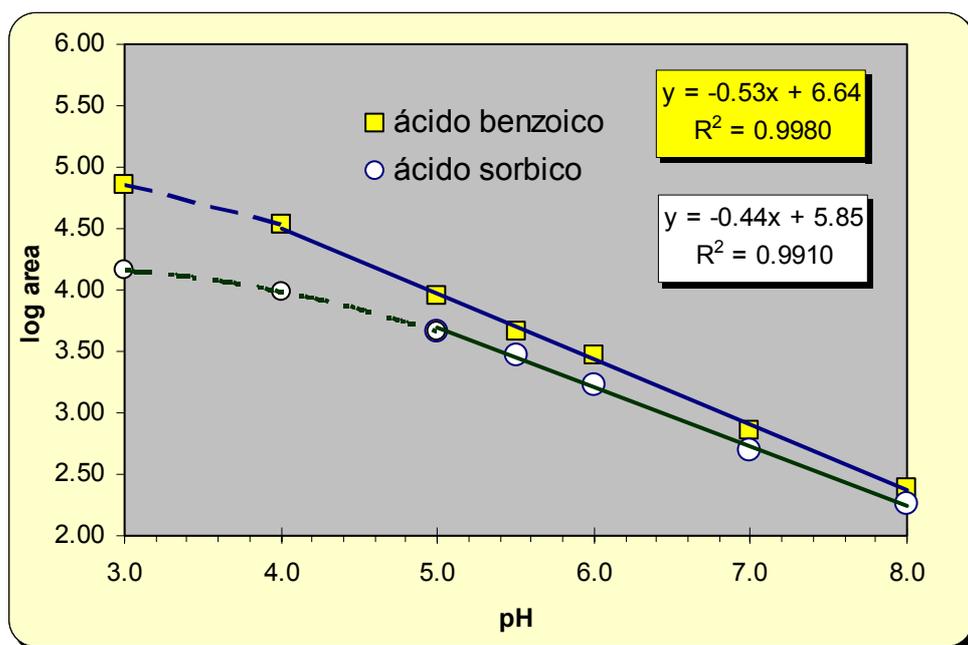


Figura 60 - Curva de log resposta (área) x pH de ácidos sórbico e benzoico extraídos de uma amostra MP por HS-SPME em várias condições de pH.

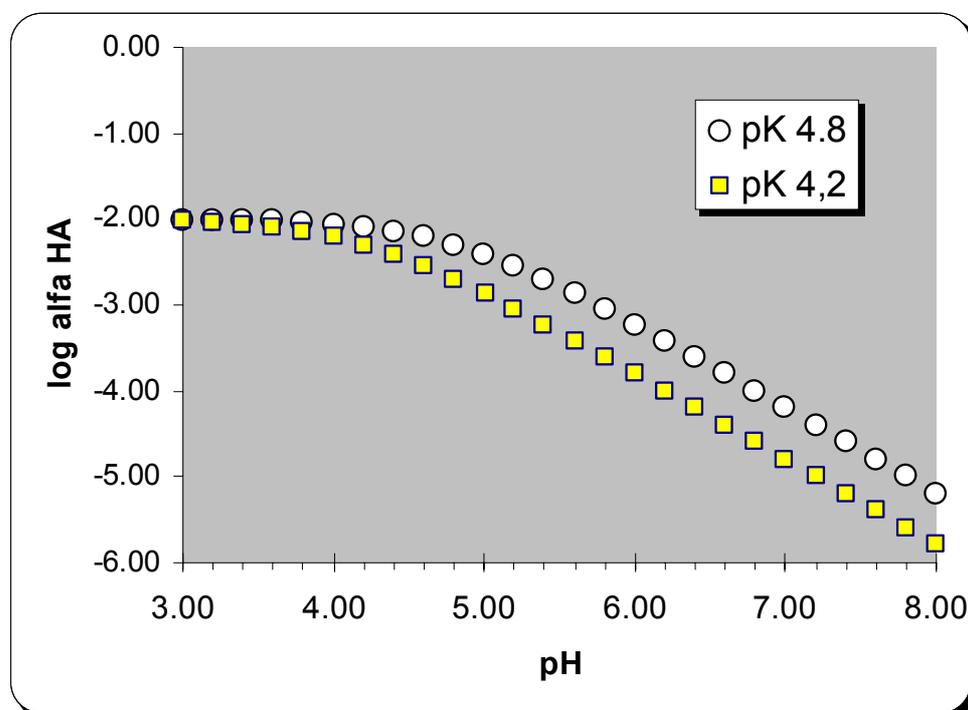


Figura 61 - Curvas simuladas de log  $\alpha_{HA}$  x pH.

## Constituintes voláteis e semi-voláteis da erva-mate e seus produtos correlatos.

O método analítico desenvolvido neste trabalho foi aplicado em amostras de erva-mate cancheada (MC), erva-mate tostada (MT), mate solúvel (MS) e bebida de mate pronta para consumo (MP), a fim de determinar a natureza das substâncias extraídas. As condições de extração SPME foram: fibra DVB/CAR/PDMS;  $T_{ext}$  80°C ou 120°C;  $t_{ext}$  60 min;  $t_{pre}$  15 min;  $m_a$  150 mg no procedimento seco<sup>8</sup>. As amostras MC 1 e MC 2 e MT 3 foram analisadas em duas temperaturas (80°C ou 120°C) e as outras somente a 80°C. A amostra MC 2 foi também avaliada por SDE.

As Figuras 62-72 mostram os cromatogramas CG-EM resultantes dessa etapa do trabalho. As substâncias identificadas por espectrometria de massas, as suas quantidades relativas calculadas a partir do percentual de área, e os respectivos índices de retenção, estão listados na Tabela 20. Dessa forma foi possível identificar 181 substâncias, considerando que os espectros de massas correspondentes tiveram correlação >90% com a base de dados espectrais. O procedimento de identificação foi complementado, quando possível, pela comparação dos  $I$  calculados com os valores de  $I$ , para fase DB5, disponíveis na literatura (ADAMS, 1995) ou por co-injeção com padrão autêntico. Em determinadas amostras foram identificadas também substâncias que não são originárias da erva-mate, como 5 ciclosiloxanos, 2 ftalatos oriundos de sangramento da fibra e de resíduo de embalagem plástica, respectivamente (Tabela 21). Além disso, foram também identificados nas amostras MT 1 e MT 3, 19 LABs oriundos possivelmente de contaminação por detergente (Tabela 12).

Várias informações importantes puderam ser obtidas a partir dos dados da Tabela 20. Desde que o trabalho mais importante até agora publicado sobre o aroma da erva-mate foi o de KAWAKAMI & KOBAYASHI (1991), algumas considerações relevantes puderam ser feitas a partir da comparação dos resultados obtidos neste estudo com dos referidos autores.

Os seguintes aspectos estão de acordo com a referência citada:

- Os derivados furânicos formados a partir de reação de Maillard de carboidratos com ácido aminados (BALTES et al., 1989), furfural, 5-metilfurfural e furanometanol, apareceram em quantidades maiores nas amostras de mate tostado.
- Em relação aos derivados fenólicos, o conteúdo de eugenol foi significativamente maior em MT 1, MT 2 e MT 3.

<sup>8</sup> No caso da amostra MP por ser líquida, foi necessário ajustar o pH para 8,0. Em seguida foram transferidos 1,0 mL para vial contendo 0,35g de NaCl. As demais condições de amostragem foram as mesmas,

- O linalol foi um dos componentes majoritários no aroma do mate cancheado obtido por SDE (Tabela 2) segundo a referência citada. No presente trabalho o linalol foi majoritário somente na amostra MC 2 extraída também por SDE. Nas outras amostras analisadas, inclusive MC 2, extraída por HS-SPME, o conteúdo de linalol foi cerca de 10 vezes menor. Esses resultados sugerem que o linalol foi produzido como artefato, demonstrando que o calor e a umidade favorecem a sua formação (Figura 42).

Entretanto alguns resultados não estão em concordância com a referência citada:

- Butoxietanol foi o componente majoritário nas duas amostras analisadas (cancheada e tostada) pelos autores referidos. No entanto neste trabalho, essa substância não foi detectada ou surgiu em traços somente em algumas amostras (MC 2, MT 1 e MT 3). Essa observação confirma que o butoxietanol pode ser efetivamente um artefato ou um contaminante de origem químico-agrícola como foi sugerido e não uma substância característica da erva-mate (KAWAKAMI & KOBAYASHI, 1991).
- Das 181 substâncias identificadas no aroma da erva-mate no presente trabalho, 79 estavam entre as 196 descritas na referência citada. Contudo vale ressaltar que as técnicas de extração foram diferentes e a SDE utilizada pelos autores em questão pode gerar artefatos.

As amostras de mate tostado MT 1, MT 2 e MT 3 tiveram perfis cromatográficos globais significativamente diferentes entre si (Figuras 67, 68, 69). Por exemplo, as substâncias fenólicas *o*-guaiacol; metoxicarvacrol; (*E*)-aldeído cinâmico; (*E*)-anetol e timol apareceram exclusivamente na amostra MT 3. Interessante o fato da amostra MT 3 apresentar também o par de monoterpenos,  $\alpha$ -turjeno e sabineno, de esqueleto bicíclico [3,1,0] ao invés do par  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, de esqueleto bicíclico [3,1,1] encontrado nas outras amostras analisadas neste trabalho, sugerindo que possivelmente possa ter ocorrido um rearranjo estrutural durante o processamento. As quantidades relativas de terpin-4-ol e  $\alpha$ -terpineol foram cerca de 10 vezes maiores na amostra MT 2, provavelmente essas substâncias forma formadas por oxidação do  $\alpha$ -terpinoleno. Esses resultados sugerem que os produtos formados, bem como as suas intensidades relativas são provenientes, em grande parte, da etapa de torrefação da amostra. Fatores como umidade da amostra, temperatura do forno e o tempo em que a amostra é submetida ao calor são decorrentes do processo de cada indústria.

A variação da temperatura de extração no método HS-SPME proporcionou novas informações qualitativas principalmente em relação às substâncias semi-voláteis. Dessa forma, a amostragem feita a 120°C com as amostras MC 1, MC 2 e MT 3 (Figuras 63, 65, 70) possibilitou a identificação

de teobromina e de diversos sesquiterpenos, além de ácidos e ésteres graxos que por sua vez não foram detectados ou surgiram como traços na amostragem feita com temperatura menor (80°C).

Em relação a amostra de mate solúvel (MS) foram observados pouquíssimos componentes voláteis e semi-voláteis que se mostraram presentes em outras amostras de erva-mate. Os componentes comuns foram furfural, fenol, 3-etil-4-metil-(1*H*)-pirrol-2,5-diona, *n*-decanal, vanilina, geranilacetona, além de cafeína e hidrocarbonetos lineares C16, C17 e C18 (Tabela 20). Esse perfil cromatográfico mais pobre pode ter sido devido as etapas de extração, de desidratação e de tratamento térmico durante o processamento industrial.

A amostra de mate pronto (MP) também apresentou um perfil cromatográfico pobre. O cromatograma da amostra comercial a pH 4 inclusive mostrou teores muito altos dos conservantes, ácidos benzóico e sórbico (Figura 58). Por essa razão, a análise qualitativa dos componentes do aroma desse produto foi feita ajustando-se o pH da amostra para 8, a fim de que os sinais dos conservantes não mascarassem os sinais de componentes do aroma. Desconsiderando os sinais dos conservantes, dos produtos de sangramento da fibra e dos resíduos de embalagem, curiosamente, os constituintes majoritários identificados na amostra de mate pronto foram etil- ou dimetilbenzaldeído (16,8%) e benzofenona (7,51%) que por sua vez não foram detectados em qualquer outro produto do mate.

Os dados da Tabela 21 mostram que os sinais de derivados de silicone, oriundos de sangramento da fibra e os sinais de ftalatos oriundos de resíduos de embalagens apresentaram-se de um modo bastante intensificado nas amostras MS e MP (Figuras 71 e 72). Isso deve ter ocorrido por causa do efeito de competição menos pronunciado nessas amostras cujos perfis cromatográficos foram mais pobres, haja vista que esses produtos foram preparados por procedimento de decocção, que evidentemente provoca perdas significativas principalmente de substâncias voláteis. De fato, o cromatograma da amostra MT 3 obtido por HS-SPME a partir do chá sem a presença da matriz apresentou o sinal de ftalato bastante intensificado, mais do que quando essa mesma amostra foi submetida a extração por HS-SPME com a presença da erva (Figura 49).

Em suma, foi possível identificar, dependendo da amostra analisada, 53% - 85% dos sinais cromatográficos, desconsiderando os adulterantes do cromatograma (Tabela 22). Esses resultados demonstram a validade do método utilizado.

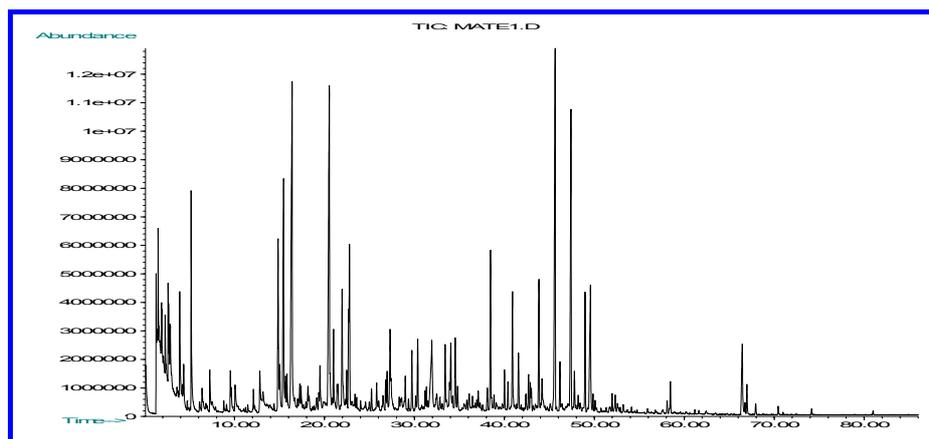


Figura 62 - Cromatograma de íons totais da amostra MC 1 obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  80°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 150 mg.

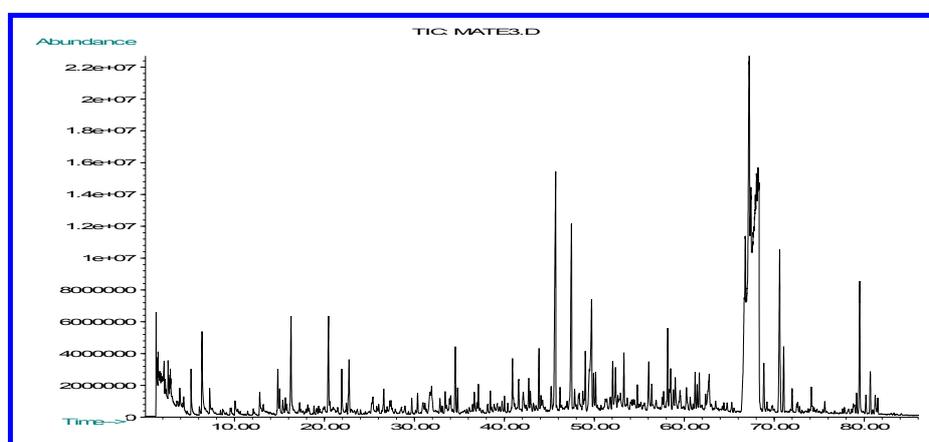


Figura 63 - Cromatograma de íons totais da amostra MC 1 obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  120°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 150 mg.

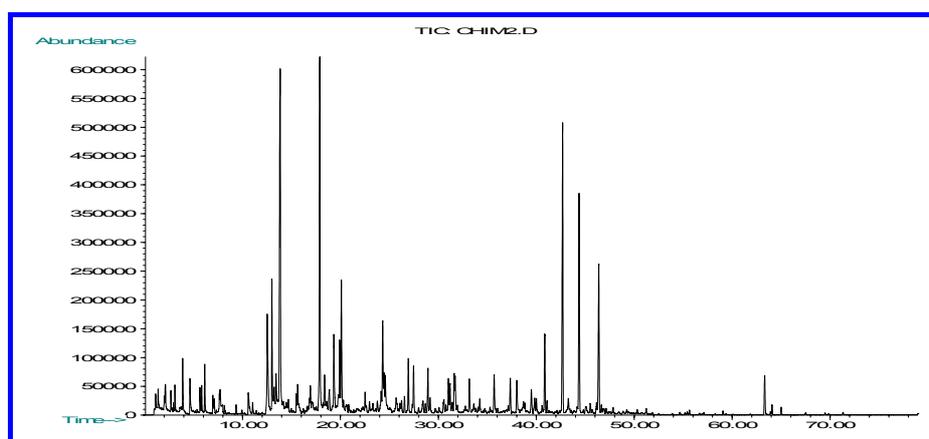


Figura 64 - Cromatograma de íons totais da amostra MC 2 obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  80°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 150 mg.

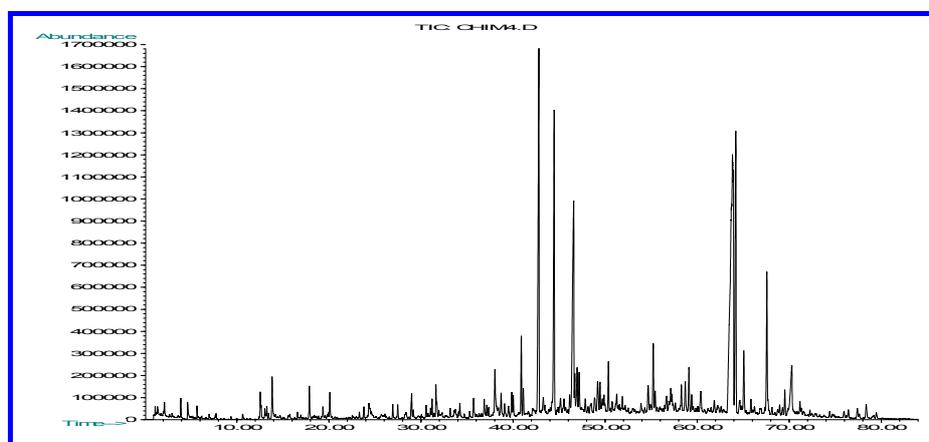


Figura 65 - Cromatograma de íons totais da amostra MC 2 obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  120°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 150 mg.

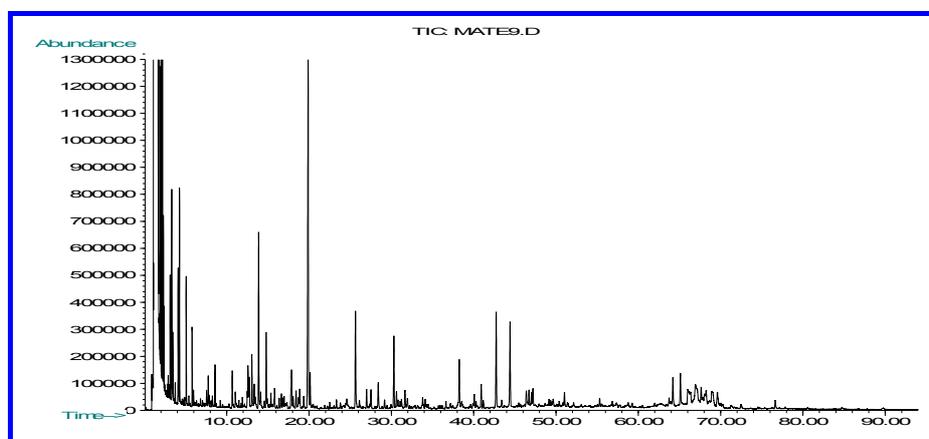


Figura 66 - Cromatograma de íons totais da amostra MC 2 a partir do extrato obtido por SDE.

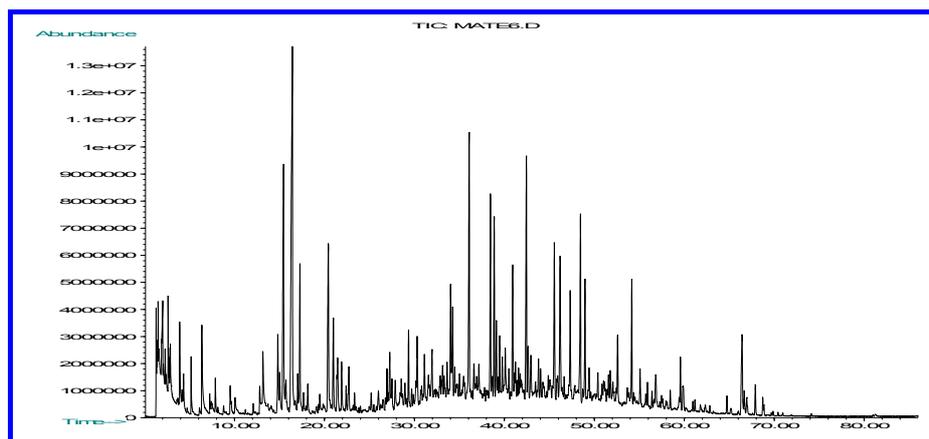


Figura 67 - Cromatograma de íons totais da amostra MT 1 obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  80°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 150 mg.

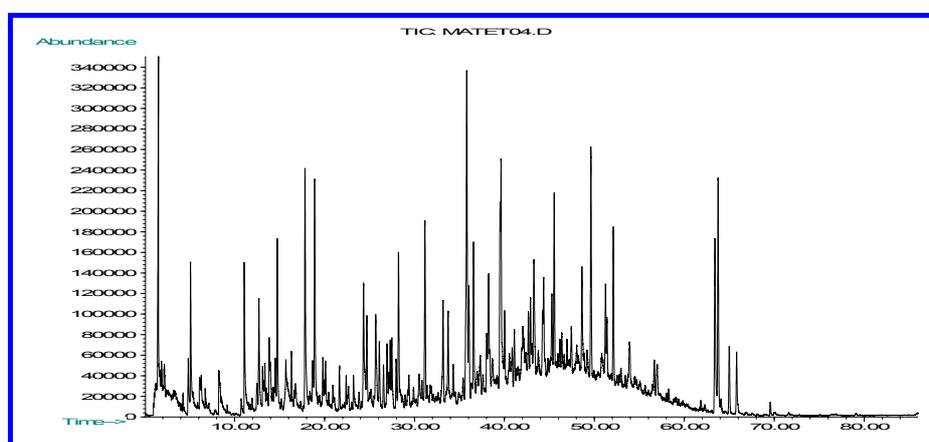


Figura 68 - Cromatograma de íons totais da amostra MT 2 obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  80°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 150 mg.

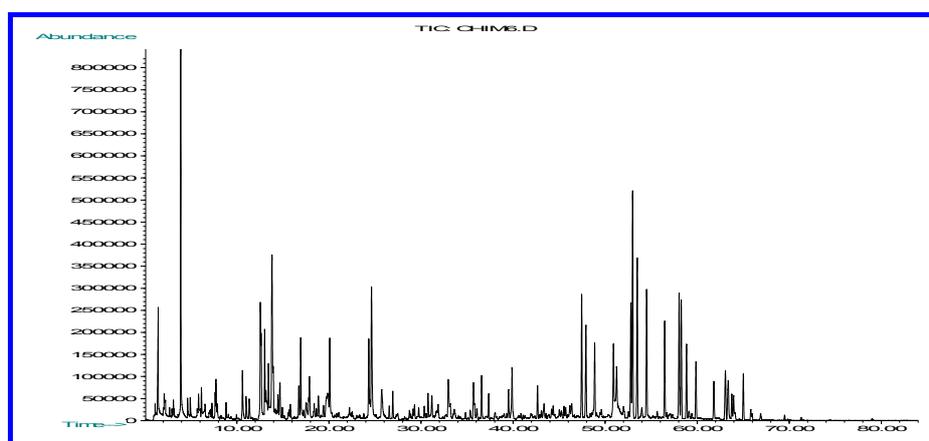


Figura 69 - Cromatograma de íons totais da amostra MT 3 obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  80°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 150 mg.

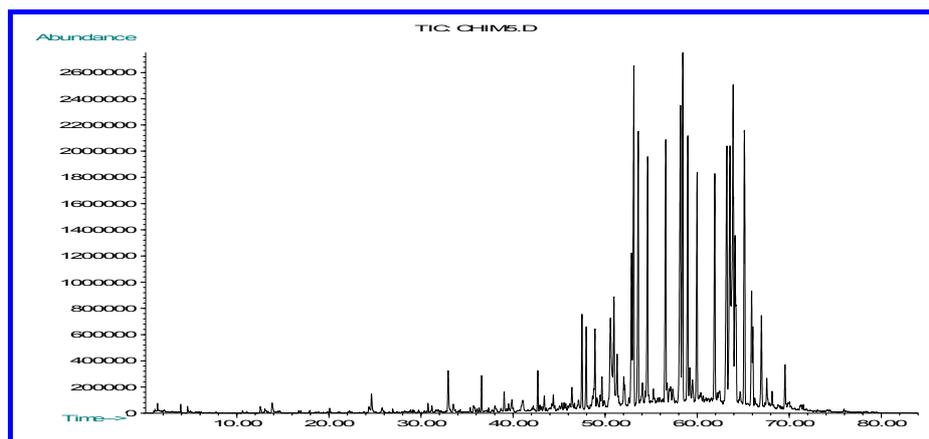


Figura 70 - Cromatograma de íons totais da amostra MT 3 obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  120°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 150 mg.

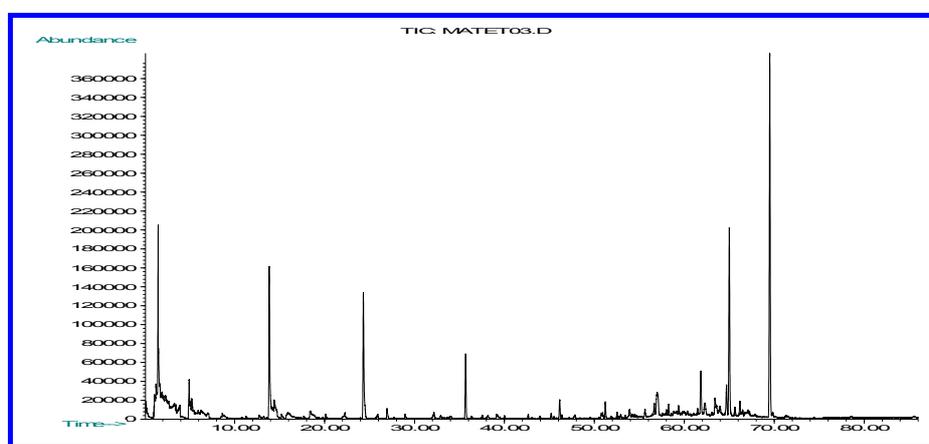


Figura 71 - Cromatograma de íons totais da amostra MS obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  80°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 150 mg.

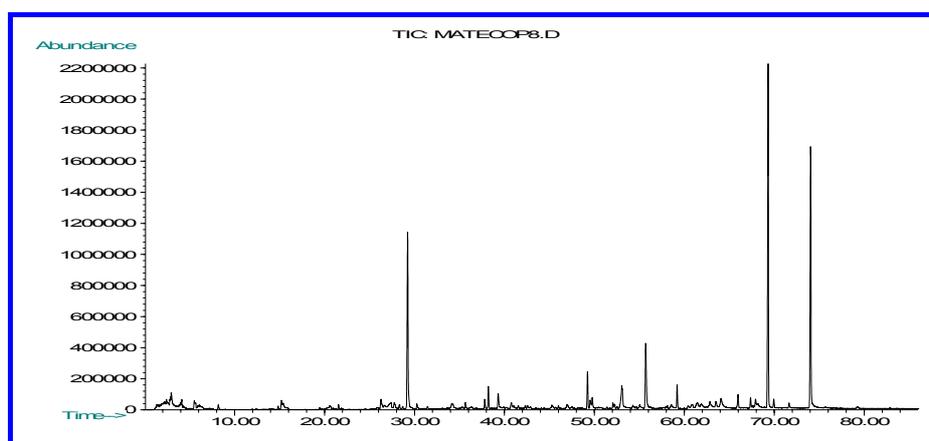


Figura 72 - Cromatograma de íons totais da amostra MP obtido por HS-SPME nas condições  $T_{ext}$  80°C;  $t_{pre}$  15 min;  $t_{ext}$  60 min; 1 mL; 0,35g NaCl; pH 8.

Tabela 20 – Constituintes voláteis e semi-voláteis de diferentes produtos da erva-mate e em diferentes temperaturas  
(parte 1/5).

SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	IR		AMOSTRAS											
	Calc **	Lit ***	MC1 80°C	MC1 <sup>A</sup> 120°C	MC2 80°C	MC2 120°C	MC2 <sup>A</sup> SDE	MT1 <sup>A</sup> 80°C	MT2 80°C	MT3 80°C	MT3 120°C	MS <sup>A</sup> 80°C	MP <sup>B</sup> 80°C	
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1. acetaldeído	442	-	-	0,35	1,05	-	-	-	0,34	-	-	-	-	-
2. Etanol	465	-	K	0,09	-	-	-	-	0,10	-	-	-	-	-
3. Propanal	448	-	K	1,23	0,47	-	-	-	1,17	-	-	-	-	-
4. ácido acético	596	-	K	0,10	0,31	0,42	0,36	-	0,29	2,40	2,01	-	7,04	0,50
5. (E)-2-butenal	657	-	K	0,13	0,09	-	-	-	0,05	-	-	-	-	-
6. 2-metilbutanal	662	-	-	0,03	-	-	0,05	0,05	-	-	-	-	-	-
7. 1-penten-3-ol	676	-	K	1,89	0,48	0,50	0,07	0,81	1,69	-	0,05	-	-	-
8. 1-penten-3-ona	682	-	K	0,85	0,17	0,40	-	0,32	0,10	-	-	-	-	-
9. n-pentanal	696	697	K	0,78	0,18	0,43	0,09	0,50	0,55	0,05	0,11	-	-	-
10. 2-etilfurano	701	-	K	0,19	0,13	0,05	0,15	0,39	0,40	-	-	-	-	-
11. Ác. propanoico	703	-	K	-	-	0,10	-	-	-	0,09	0,15	-	-	-
12. 3-penten-2-ona	739	-	-	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13. 2-metil-2-butenal	742	-	K	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14. (E)-2-pentenal	753	-	K	0,60	0,07	0,23	0,08	-	0,59	-	-	-	-	-
15. n-pentanol	-	-	K	0,22	0,06	-	-	-	0,14	-	-	-	-	-
16. Tolueno	764	-	K	-	-	0,42	-	-	0,09	-	-	-	-	-
17. (Z)-2-pentenol	771	-	K	0,81	0,22	-	-	-	0,57	-	-	-	-	-
18. 3-metil-2-butenal	784	-	-	0,07	-	-	-	0,05	0,11	-	-	-	-	-
19. n-hexanal	802	800	K	1,51	0,25	0,94	0,31	1,93	0,76	0,01	2,41	0,08	-	-
20. 2-hexanol	-	-	K	-	-	-	-	2,42	-	-	-	-	-	-
21. acetato de butila	-	-	-	-	-	-	-	0,41	-	-	-	-	-	-
22. furfural	834	830	K	0,07	0,17	-	-	1,72	0,37	1,09	0,36	0,02	0,96	-
23. (E)-2-hexenal	855	854	K	0,56	0,13	0,36	0,20	0,99	0,29	-	0,05	0,01	-	-
24. furanometanol	859	-	K	-	0,06	-	-	0,10	0,13	0,26	-	0,01	-	-
25. ácido pentanoico	861	-	K	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-	-
26. (Z) 3-hexen-1-ol	862	857	K	-	-	-	-	0,30	-	-	-	-	-	-
27. etilbenzeno	868	-	K	0,09	-	0,47	-	0,18	-	-	0,27	-	-	-
28. p-xileno	869	-	-	0,07	-	1,01	0,04	0,19	0,29	0,29	0,48	0,01	-	-
29. 1-acetiloxi-2-propanona	886	-	-	-	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-
30. 1-acetil-1-cilcoexeno	886	-	-	0,14	0,04	0,18	0,07	-	0,09	-	0,01	0,01	-	-
31. xileno	890	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-	0,07	-	-	0,31
32. 2-heptanona	893	889	K	0,29	-	-	-	-	-	-	0,23	-	-	-
33. (Z)-4-heptenal	901	-	-	0,67	0,05	0,25	0,03	0,49	0,33	0,01	0,03	-	-	-
34. heptanal	903	899	K	0,17	0,04	0,65	0,07	0,22	0,09	-	0,41	0,01	-	-
35. 2-butoxietanol	908	-	K	-	-	0,05	-	0,13	-	0,32	-	-	-	-
36. (E,E)-2,4-hexadienal	912	909	K	0,10	-	0,12	0,01	0,28	0,13	-	0,18	-	-	-
37. α-turjeno	927	931	-	-	-	-	-	-	-	-	0,28	-	-	-
38. α-pineno	933	939	K	0,12	0,03	0,05	-	0,13	0,11	0,10	0,08	-	-	-
39. (E)-2-heptenal	954	-	-	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40. benzaldeído	961	961	K	0,47	0,12	0,43	0,15	0,79	0,41	0,13	1,28	0,04	-	0,06
41. 5-metilfurfural	966	962	K	0,26	0,03	0,23	0,02	0,29	0,53	1,17	0,55	0,02	-	0,05
42. sabineno	972	976	-	-	-	-	-	-	-	-	0,56	-	-	-

Tabela 20 – Constituintes voláteis e semi-voláteis de diferentes produtos da erva-mate e em diferentes temperaturas obtidos por HS-SPME-GC. Continuação (parte 2/5).

SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	IR			AMOSTRAS										
	Calc **	Lit ***		MC1 80°C (%)	MC1 <sup>A</sup> 120°C (%)	MC2 80°C (%)	MC2 120°C (%)	MC2 <sup>A</sup> SDE (%)	MT1 <sup>A</sup> 80°C (%)	MT2 80°C (%)	MT3 80°C (%)	MT3 120°C (%)	MS <sup>A</sup> 80°C (%)	MP <sup>B</sup> 80°C (%)
43. β-pineno	975	980	K	0,17	-	0,06	-	0,19	0,08	-	-	-	-	-
44. n-heptanol	977	969	K	-	-	0,20	-	0,14	-	-	-	-	-	-
45. 1-octen-3-ol	982	978	K	0,14	-	0,11	-	0,12	-	-	-	-	-	-
46. 1,2,4-trimetilbenzeno	988	-	-	-	-	0,31	-	-	-	-	0,03	-	-	-
47. 6-metil-5-hepten-2-ona	989	989	K	2,54	0,40	1,62	0,33	1,38	1,86	0,32	0,85	0,03	0,05	0,13
48. fenol	990	-	K	-	-	1,41	0,05	-	0,20	0,77	1,91	0,11	0,15	-
49. 2-pentilfurano	992	-	K	0,56	0,19	0,92	-	0,71	0,66	-	-	-	-	-
50. (E,Z)-2,4-heptadienal	998	-	K	5,20	0,04	2,70	0,11	1,25	2,78	0,27	1,25	-	-	-
51. α-felandreno	1001	1005	K	-	-	0,50	-	-	-	-	0,23	-	-	-
52. octanal	1004	1001	K	0,21	0,05	0,78	0,12	0,35	-	-	0,87	0,01	-	0,02
53. (E,E)-2,4-heptadienal	1014	-	K	5,26	0,24	8,71	1,11	3,59	6,93	0,06	0,80	0,09	-	0,31
54. α-terpineno	1018	1018	-	0,07	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-
55. 1,3,5-trimetilbenzeno	1020	-	-	-	-	0,14	-	-	0,05	0,21	0,09	-	-	-
56. p-cimeno	1023	1026	K	0,12	0,12	0,11	0,02	0,21	0,31	0,42	0,36	0,01	-	-
57. limoneno	1027	1031	K	0,31	0,05	0,27	0,09	1,62	1,28	1,39	0,94	0,04	-	-
58. eucaliptol	1030	1033	K	0,34	0,08	-	-	0,26	-	-	-	-	-	-
59. álcool benzílico	1034	1032	K	0,23	-	0,10	-	0,40	0,08	-	-	-	-	-
60. (Z)-β-ocimeno	1039	1040	-	0,21	0,03	0,24	-	0,26	0,17	1,07	-	-	-	-
61. salicilaldeído	1041	1041	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	-
62. fenilacetaldeído	1044	1043	K	-	-	0,03	0,05	0,64	-	-	-	-	-	-
63. 3-octen-2-ona	1045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27	-	-	-
64. 4-dimetil-3,5-furandiona	1041	-	-	0,45	0,12	-	-	-	0,59	-	-	-	-	-
65. (E)-β-ocimeno	1050	1050	-	0,06	0,08	0,16	0,04	0,26	-	0,44	-	-	-	-
66. γ-terpineno	1059	1062	K	-	-	0,80	-	0,29	-	0,22	0,65	0,04	-	-
67. (E)-2-octenal	1061	-	-	0,71	0,12	0,40	0,06	0,27	0,48	-	1,54	0,04	-	-
68. acetilpirrol	1067	1068	-	-	0,07	0,05	0,03	-	0,28	0,01	-	-	-	-
69. (E)-4-thurjenol	1070	1062	-	-	-	-	-	-	-	-	0,55	-	-	-
70. (Z)-óxido de linalila + (E,Z) 3,5-octadien-2-ona	1074	1074	K	4,97	0,47	9,96	0,88	1,31	2,91	-	0,57	0,04	-	0,15
71. 2-ciclohexen-1-ona	1081	-	-	3,90	0,17	-	-	-	2,00	-	0,37	0,01	-	-
72. ácido sórbico	1086	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23
73. o-guaiacol	1087	1086	K	-	-	-	-	-	-	-	0,42	0,03	-	-
74. α-terpinoleno	1087	1088	K	-	-	-	-	0,36	-	0,50	0,13	-	-	-
75. (E)-óxido de linalila	1088	1088	K	1,50	0,08	0,66	0,08	0,56	0,72	2,09	0,12	-	-	0,25
76. (E,E)-3,5-octadien-2-ona	1092	-	K	0,83	0,15	1,91	0,25	0,37	0,75	-	0,16	0,01	-	0,14
77. linalol	1098	1098	K	0,51	0,14	0,14	0,04	10,9	0,35	0,42	0,30	0,01	-	0,29
78. nonanal + 6-metil-3,5-heptadien-2-ona	1102	1098	K	1,76	0,37	3,37	0,66	0,96	0,80	-	1,54	0,06	-	0,14
79. (E,E)-2,4-octadienal	1109	-	K	-	-	0,20	-	0,09	-	-	-	-	-	-

Tabela 20 – Constituintes voláteis e semi-voláteis de diferentes produtos da erva-mate e em diferentes temperaturas obtidos por HS-SPME-GC. Continuação (parte 3/5).

SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	IR		AMOSTRAS											
	Calc **	Lit ***	MC1 80°C	MC1 <sup>A</sup> 120°C	MC2 80°C	MC2 120°C	MC2 <sup>A</sup> SDE	MT1 <sup>A</sup> 80°C	MT2 80°C	MT3 80°C	MT3 120°C	MS <sup>A</sup> 80°C	MP <sup>B</sup> 80°C	
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
80. isosforona	1115	1118	-	-	-	0,26	-	-	0,42	0,20	-	-	-	-
81. alloocimeno	1128	1129	-	-	-	-	-	-	-	0,31	-	-	-	-
82. neo-allocimeno	1140	1142	-	-	-	-	-	-	-	0,23	-	-	-	-
83. 4-cetoisoforona	1144	1142	-	0,19	-	0,39	0,03	0,19	0,31	0,08	0,09	0,01	-	-
84. 1,2,3,4-tetrametilbenzeno	1146	-	-	-	-	0,06	-	0,06	-	0,19	-	-	-	-
85. (E,E) ou (E,Z)-2,6-nonadienal	1154	-	K	0,11	0,06	0,24	0,16	0,25	0,42	-	-	-	-	-
86. acetato de benzila	1160	1163	K	-	-	0,09	0,01	0,14	0,16	-	0,17	0,02	-	-
87. (E)-2-nonenal	1162	-	K	0,16	-	0,31	-	0,19	-	-	-	-	-	-
88. 1-fenilpropanona	1173	-	K	1,95	0,09	-	0,20	-	1,20	-	-	-	-	-
89. terpin-4-ol	1174	1177	-	-	-	-	-	2,58	-	3,41	0,31	0,14	-	-
90. naftaleno	1177	1179	K	0,32	0,07	0,41	0,06	0,59	0,49	0,80	0,08	-	-	-
91. ácido benzóico	1182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,99
92. p-metilacetofenona	1182	1182	-	0,06	0,13	-	-	-	0,46	-	0,08	-	-	-
93. etil ou dimetilbenzaldeído	1184	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,8
94. α-terpineol	1189	1189	K	-	-	-	-	-	-	1,28	0,14	-	-	-
95. salicilato de metila	1189	1190	K	0,17	0,06	0,58	0,13	-	0,19	1,11	-	-	-	-
96. safranal	1192	-	K	0,25	0,03	0,17	0,08	0,31	0,34	0,56	-	-	-	-
97. butirato de hexila	1196	1191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,28
98. dodecano	1200	1199	-	-	0,01	0,42	0,05	-	0,49	0,34	0,29	0,01	-	0,14
99. n-decanal	1206	1204	K	0,25	0,08	1,42	0,37	0,49	0,23	0,63	0,64	0,06	0,65	-
100. (E,E)-2,4-nonadienal	1213	-	-	0,15	0,02	0,08	0,03	-	-	-	0,03	-	-	-
101. β-ciclocitral	1217	-	K	1,11	0,27	1,10	-	0,50	0,58	0,63	-	-	-	-
102. nerol	1228	1228	K	0,07	-	0,11	-	0,78	0,74	-	-	-	-	-
103. pulegona	1236	1237	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	0,02	-	-
104. 3-etil 4-metil-1H-pirrol-2,5-diona	1238	-	-	2,85	0,49	1,20	-	-	0,84	0,11	0,08	0,04	0,23	-
105. neral	1242	1240	K	0,39	-	0,42	0,18	0,29	1,00	-	0,18	0,03	-	-
106. metoxicarvacrol	1244	1244	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,02	-	-
107. piperitona	1251	1252	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	0,04	-	-
108. geraniol	1256	1255	K	0,12	0,19	0,11	-	1,91	0,49	-	-	-	-	-
109. acetato de linalila	1260	1257	-	-	-	-	-	-	-	-	0,26	0,03	-	-
110. 3-etenil-4-metil-1H-pirrol-2,5-diona + (E)-2-decenal	1263	-	-	1,98	0,07	0,13	0,36	0,50	0,36	-	0,09	0,02	-	-
111. (E)-aldeído cinâmico	1266	1266	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54	0,14	-	-
112. geranial	1270	1270	K	3,19	0,10	0,63	0,42	0,33	2,04	-	0,67	0,10	-	0,12
113. (1 ou 2)-metilnaftaleno	1280	-	-	2,14	-	0,27	0,01	0,05	1,04	0,20	0,13	-	-	-
114. (E)-anetol	1282	1283	-	-	-	-	-	0,40	-	-	0,23	0,01	-	-
115. (1 ou 2)-metilnaftaleno	1294	-	-	0,17	-	0,12	0,06	0,12	0,55	-	0,04	-	-	-
116. tímol	1297	1290	-	-	-	-	-	-	-	-	1,10	0,96	-	-

Tabela 20 – Constituintes voláteis e semi-voláteis de diferentes produtos da erva-mate e em diferentes temperaturas obtidos por HS-SPME-GC. Continuação (parte 4/5).

SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	IR		AMOSTRAS										
	Calc **	Lit ***	MC1 80°C	MC1 <sup>d</sup> 120°C	MC2 80°C	MC2 120°C	MC2 <sup>d</sup> SDE	MT1 <sup>d</sup> 80°C	MT2 80°C	MT3 80°C	MT3 120°C	MS <sup>d</sup> 80°C	MP <sup>B</sup> 80°C
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
117. tridecano	1300	1299	-	0,21	-	1,02	0,25	-	2,53	1,11	0,10		0,42
118. carvacrol	1307	1298	-	-	-	-	-	-	-	1,02	0,44	0,17	-
119. (E,E)-2,4-decadienal	1316	1314	K	0,56	0,03	0,08	0,12	0,25	0,34	-	0,07	0,02	-
120. hidrocarboneto ramificado	1328	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	-	-
121. 1,1,6-trimetiltetralina	1343	-	-	0,34	0,18	0,02	0,10	0,14	0,18	3,61	-	-	-
122. 1,2,3,4-tetraidro-1,1,6-trimetilnaftaleno	1349	-	-	0,20	-	0,03	0,09	0,09	1,65	1,00	-	-	-
123. 2,6-dimetoxifenol	1353	1348	-	0,53	0,26	0,04	0,12	-	0,89	0,19	0,02	0,08	0,02
124. eugenol	1356	1356	K	0,20	0,10	0,02	0,08	0,22	0,90	1,44	1,09	0,58	-
125. α-copaeno	1370	1376	-	1,04	0,18	0,98	0,24	0,15	-	-	0,64	0,08	-
126. ac decanoico	1384	-	K	-	-	-	0,14	-	-	-	-	-	0,59
127. (E)-β-damascenona	1385	1380	-	-	0,11	0,01	-	-	0,75	1,72	-	-	0,21
128. 1,7- ou 2,6-dimetilnaftaleno	1389	-	K	0,82	0,01	0,24	-	1,72	0,30	0,74	0,03	0,06	-
129. jupineno	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	0,04	-	-	-
130. vanilina	1394	1391	-	0,37	0,34	0,03	0,45	-	0,60	-	0,10	0,32	0,27
131. tetradecano	1400	1399	-	0,25	-	0,80	0,41	0,14	2,48	1,49	0,73	0,14	0,22
132. dodecanal	1406	1407	K	0,30	0,11	0,47	0,61	-	-	-	0,02	-	-
133. (E)-α-damascona	1412	1390	-	-	-	-	-	0,38	0,78	-	-	-	-
134. β-cariofileno	1413	1418	-	0,76	0,11	-	-	-	-	-	1,68	0,25	-
135. α-ionona	1424	1426	K	1,58	0,48	2,29	2,08	0,64	0,57	0,47	0,09	0,42	-
136. (E)-isoeugenol	1446	1447	K	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,50
137. geranilacetona	1454	1453	K	4,71	1,76	8,51	13,6	2,65	2,03	1,06	0,79	0,64	0,21
138. hidrocarboneto ramificado	1465	-	-	0,54	0,10	-	-	-	1,75	-	-	-	-
139. sesquiterpeno não determinado	1469	-	-	-	-	0,07	0,04	-	-	-	-	0,05	-
140. hidrocarboneto ramificado	1471	-	-	-	-	-	-	-	0,49	-	-	-	-
141. ar-curcumeno	1479	1483	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	0,06	-
142. β-ionona	1484	1485	K	4,45	1,95	6,38	9,93	2,72	1,79	1,15	0,20	0,17	0,11
143. α-muroleno	1492	1499	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	0,07	-
144. pentadecano	1500	1500	-	0,28	0,16	0,23	0,46	0,11	2,38	1,97	0,26	0,10	-
145. α-amorfenol	1503	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-
146. diidroactinidiolido	1519	-	K	3,13	2,32	4,61	9,76	0,69	0,62	0,94	0,37	0,44	0,81
147. (Z)-nerolidol	1531	1534	-	0,26	0,27	-	1,22	-	-	-	-	-	-
148. megastigamatrieno na (isôm.)	1553	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
149. hidrocarboneto ramificado	1559	-	-	-	-	-	-	-	0,34	-	-	-	-
150. (E)-nerolidol	1563	1564	K	0,34	0,53	0,12	1,18	0,30	-	-	-	-	-
151. 3-metilpentadecano	1571	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-

Tabela 20 – Constituintes voláteis e semi-voláteis de diferentes produtos da erva-mate e em diferentes temperaturas obtidos por HS-SPME-GC. Continuação (parte 5/5).

SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	IR		AMOSTRAS											
	Calc **	Lit ***	MC1 80°C	MC1 <sup>A</sup> 120°C	MC2 80°C	MC2 120°C	MC2 <sup>A</sup> SDE	MT1 80°C	MT2 80°C	MT3 80°C	MT3 120°C	MS <sup>A</sup> 80°C	MP <sup>B</sup> 80°C	
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
152. megaestigamtrieno na (isôm.)	1573	-	-	-	-	-	-	0,37	1,03	2,37	0,15	0,45	-	-
153. cariofileno oxido	1573	1581	-	0,19	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-
154. (E,E)-pseudoionona	1585	-	-	0,14	0,32	-	1,37	0,21	-	-	-	-	-	-
155. hexadecano	1600	1600	-	0,13	0,01	0,20	0,57	0,23	1,23	1,18	-	0,69	0,79	-
156. megaestigamatrieno na (isôm.)	1607	-	-	-	-	-	-	0,21	0,13	0,77	0,95	0,12	-	0,40
157. benzofenona	1618	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,51
158. megaestigamatrieno na (isôm.)	1620	-	-	-	-	-	-	-	-	1,59	-	-	-	0,14
159. 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído	1651	1656	-	-	0,32	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-
160. ácido tridecanoico	1668	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43
161. Heptadecano	1700	-	-	0,07	-	-	0,59	0,26	0,58	0,33	0,02	-	3,13	-
162. tetradecanoato de metila	1721	-	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
163. (E,Z)-farnesal	1741	1742	-	-	0,15	-	1,04	0,34	-	-	-	-	-	-
164. hidrocarboneto ramificado	1771	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-	-	-	-
165. ácido tetradecanoico	1773	-	-	-	-	-	0,96	-	-	-	-	-	-	1,35
166. (-) loliolide	1762	-	-	-	3,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
167. 1-octadeceno	1793	1793	-	-	-	-	0,13	-	-	-	-	-	-	-
168. octadecano	1800	-	-	-	0,08	-	0,46	0,32	0,15	-	-	-	2,66	-
169. tetradecanal	1815	-	-	-	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
170. cafeína	1830	-	-	2,87	35,9	1,21	22,5	0,26	0,76	1,75	0,80	4,13	1,28	0,68
171. neofitadieno (isôm.)	1838	-	-	-	-	-	-	0,21	0,64	2,03	0,54	-	-	-
172. 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1846	-	K	0,28	4,98	0,26	7,12	0,97	0,29	-	0,01	1,23	-	0,11
173. teobromina	1856	-	-	-	0,10	-	0,37	-	-	-	-	0,01	-	-
174. neofitadieno (isôm.)	1881	-	-	-	0,57	-	0,38	-	0,33	0,58	-	1,23	-	-
175. nonadecano	1901	-	-	-	0,13	-	0,34	-	-	-	-	-	-	-
176. farnesilacetona C	1917	-	-	0,15	1,70	-	4,75	0,81	0,10	-	-	8,22	-	-
177. hexadecanoato de metila	1926	-	-	-	0,73	-	0,22	0,26	0,08	-	-	3,31	-	-
178. ácido. hexanoico	1972	-	-	-	4,63	-	2,67	-	-	-	-	0,05	-	-
179. fitol	2105	1949	K	-	0,14	-	0,28	0,10	-	-	-	-	-	-
180. ocatadecanoato de metila	2113	-	-	-	6,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
181. neofitadieno (isôm.)	2131	-	-	-	0,50	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-

\* MC = mate cancheado; MT = mate tostado; MS = mate solúvel; MP = mate pronto; \*\* Índice de retenção calculado; \*\*\* IR segundo Adams (1995); A = as condições de extração foram DVB/CAR/PDMS / 80°C ou 120°C / 60 min / 150 mg. B = as condições de extração foram DVB/CAR/PDMS / 80°C / 60 min / 150 mg / 0,35 g NaCl / pH 8. C = o percentual não foi calculado devido à baixa eficiência cromatográfica dos sinais nessa região. K = componente do aroma da erva-mate segundo Kawakami & Kobayashi (1991). Os traços representam que a substância não pode ser identificada ou não foi detectada (% < 0,01)

Tabela 21 - Relação das substâncias identificadas por HS-SPME, oriundas de sangramento da fibra ou de resíduo de material plástico.

	<i>IR</i>		<i>MC1</i> 80 °C	<i>MC1</i> 120 °C	<i>MC2</i> 80 °C	<i>MC2</i> 120 °C	<i>MC2</i> SDE	<i>MT1</i> 80 °C	<i>MT2</i> 80 °C	<i>MT3</i> 80 °C	<i>MT3</i> 120 °C	<i>MS</i> 80 °C	<i>MP</i> 80 °C
<b>1</b> Hexametil ciclotrisiloxano	826	*	0,17	0,10	0,72	0,48	-	0,84	0,83	0,37	0,12	1,76	0,11
<b>2</b> Octametil ciclotetrasiloxano	990	*	-	-	-	-	-	-	-	1,00	0,20	11,0	-
<b>3</b> Ciclododecametil ciclopentasiloxano	1167	*	1,34	0,74	-	-	-	1,21	1,88	1,48	0,03	9,35	0,54
<b>4</b> Dodecametil ciclohexasiloxano,	1339	*	0,07	0,21	1,02	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5</b> Tetradecametil cicloheptasiloxano	1509	*	0,05	0,06	-	-	-	0,05	-	0,06	0,07	-	-
<b>6</b> Tetracosametil ciclododecasiloxano	1679	*	0,39	0,42	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-
<b>7</b> Ftalato de isobutila	1865	* *	0,12	3,65	0,24	1,96	1,52	0,25	1,41	1,25	6,30	13,9	21,2
<b>8</b> Ftalato de di-butila	1959	* *	-	0,09	-	0,70	0,99	-	0,02	0,13	0,84	29,1	25,2

\* sangramento da fibra; \*\* resíduo de material plástico; MC = mate canheado; MT = mate tostado; MS = mate solúvel; MP = mate pronto.

Tabela 22 - Percentagem de área de substâncias voláteis e semi-voláteis, além de contaminantes, resíduos de embalagens e produtos de sangramento da fibra, identificadas nos cromatogramas das amostras indicadas.

Amostras	Substâncias identificadas adulterantes do cromatograma			
	totais – adult. (% área)	LABs (% área)	produtos de sangramento (% área)	resíduos de embalagem (% área)
MC 1 – 80°C	85	-	2,0	0,1
MC 1 - 120°C	82	-	1,5	3,7
MC 2 - 80°C	79	-	2,7	0,2
MC 2 - 120°C	84	-	0,4	2,6
MC 2 – SDE	64	-	-	2,5
MT 1 - 80°C	75	1,4	2,1	0,2
MT 2 - 80°C	52	-	2,7	1,4
MT 3 - 80°C	65	41	1,9	1,4
MT 3 - 120°C	53	42	0,2	7,1
MS - 80°C	54	0,1	32	29
MP – pH 8	61	-	0,6	46

---

## CONCLUSÕES GERAIS

---

- O procedimento de microextração em fase sólida com amostragem no “headspace” associado à cromatografia gasosa (HS-SPME-GC) mostrou-se adequado para a extração e a determinação de substâncias voláteis e semi-voláteis da erva-mate e seus produtos correlatos;
- Os perfis da amostragem da erva-mate por HS-SPME em função da massa, do tempo e da temperatura foram dependentes, principalmente, da volatilidade dos analitos;
- Os parâmetros de extração que propiciaram sensibilidade global mais adequada e a maior parte dos analitos em condição de equilíbrio, foram: massa de amostra de 150 mg; tempo de pré-equilíbrio de 15 min, tempo de extração de 60 min e temperatura de extração 80°C;
- Em linhas gerais foi possível constatar que a afinidade dos analitos pela cobertura da fibra depende não somente da polaridade, pois permeabilidade e volatilidade, além do fenômeno de competição pelos sítios ativos das fases, são aspectos importantes que devem ser levados em consideração na seleção da melhor fibra a ser utilizada para uma dada amostra;
- A fibra DVB/CAR/PDMS apresentou a melhor eficiência de extração global principalmente para os analitos dos grupo C e D com  $I > 1200$ ;
- Os analitos mais voláteis (grupo A) foram extraídos com maior eficiência em tempos curtos de extração (1 a 3 min) na faixa de 40°C a 60°C e quando a fibra CAR/PDMS foi utilizada;
- A comparação dos procedimentos de amostragem, seco e úmido, em diversas temperaturas revelou que o calor e a umidade influenciaram no processo de formação de linalol, de isomerização do 2,4-heptadienal e da 3,5-octadien-2-ona;
- A metodologia HS-SPME-GC associada à Análise dos Componentes Principais (ACP) demonstrou ser útil para rápida discriminação e classificação de amostras de erva-mate baseada na comparação do perfil cromatográfico dos seus principais constituintes voláteis e semi-voláteis. Resultados satisfatórios na caracterização das safras 2000/2003 foram alcançados usando detector por ionização em chama e por essa razão o método proposto tem potencial para ser implantado em laboratórios de controle da qualidade a fim de verificar o prazo

de validade da erva-mate durante o período de estocagem. Quanto ao tipo de cultivo, não foi possível obter uma discriminação clara das amostras analisadas a partir dos resultados obtidos;

- O procedimento analítico usado neste trabalho mostrou resultados qualitativos excepcionais na identificação de 181 substâncias voláteis e semi-voláteis em amostras e erva-mate tostada (MT), de erva-mate cancheada (MC), mate solúvel (MS) e de mate pronto para consumo (MP);
- O procedimento analítico usado neste trabalho foi empregado com sucesso para identificar a presença de contaminantes como Alquilbenzenos lineares (LABs) em amostras MT e de chá preto (CP), além de resíduos de embalagens;
- Resultados promissores foram obtidos na determinação dos teores de LAB por adição-padrão em amostras MT e de ácido benzóico e de ácido sórbico por padronização externa em amostras MP. Contudo os métodos quantitativos propostos ainda precisam ser validados a partir de comparação com outros métodos tradicionais.
- As análises efetuadas revelaram que teores relativamente aumentados de derivados furânicos e de eugenol nas amostras MT estão condizentes com informações já publicadas. Da mesma forma, o conteúdo de linalol foi relativamente maior na amostra MC extraída por SDE do que a recuperação dessa substância na mesma amostra por HS-SPME. Ao contrario do que foi publicado (KAWAKAMI & KOBAYASHI, 1991), o butoxietanol não foi detectado ou surgiu em traços em algumas amostras, sugerindo que esse produto possa ser efetivamente um artefato ou um contaminante de origem químico-agrícola.
- A otimização da HS-SPME descrita neste trabalho mostrou que essa técnica de preparação pode ser convenientemente aplicada para avaliar amostras de erva-mate e de seus produtos correlatos e ser usada como uma ferramenta útil no controle da qualidade.

- **Quanto aos resultados obtidos :**
  - ✓ **Resultados qualitativos excepcionais;**
  - ✓ **Resultados quantitativos promissores;**
- **Com relação ao método proposto:**
  - ✓ **Precisão e Sensibilidade adequadas;**
  - ✓ **Simplicidade**
  - ✓ **Custo relativamente baixo;**
  - ✓ **Requer pouca amostra;**
  - ✓ **Dispensa o uso de solventes;**
  - ✓ **Seletividade  $\Rightarrow$  depende principalmente da temperatura e do tipo de fibra;**
- **Com relação às condições analíticas:**
  - ✓ **Para análise global da fração volátil da erva-mate;**
    - ✓ **Fibra DVB/CAR/PDMS;  $T_{ext}$  80°C;  $t_{ext}$  60 min;  $t_{equi}$  15 min;  $t_{inj}$  15 min;  $m_{am}$  150 mg;**
  - ✓ **Para análise de LAB em MT;**
    - ✓ **Fibra PDMS;  $T_{ext}$  100°C;  $t_{ext}$  30 min;  $t_{equi}$  15 min;  $t_{inj}$  15 min;  $m_{am}$  80 mg;**
  - ✓ **Para análise de conservantes em MP**
    - ✓ **Fibra PDMS;  $T_{ext}$  100°C;  $t_{ext}$  30 min;  $t_{equi}$  15 min;  $t_{inj}$  15 min; NaCl sat.  $pH$  4,0;**
- **Quanto aos procedimentos seco x úmido:**
  - ✓ **Resultados qualitativos similares;**
  - ✓ **Aumento da temperatura e da umidade intensifica:**
    - ✓ **O conteúdo de Linalol;**
    - ✓ **A isomerização (E,Z)  $\Rightarrow$  (E,E) do 2,4-heptadienal e da 3,5-octadien-2-ona;**

## **Perspectivas do método HS-SPME-GC na análise da erva-mate:**

- **Uso efetivo no Controle da qualidade:**
  - ✓ **Selo de qualidade e de pureza da erva-mate baseado no perfil cromatográfico do aroma;**
  - ✓ **Identificação e determinação do teor de adulterantes e aditivos nos diversos produtos da erva-mate;**
- **Método analítico auxiliar no desenvolvimento de novos produtos da erva-mate.**

---

## REFERÊNCIAS

---

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/ mass spectroscopy**, Allured Publishing Corporation, Illinois, 1995.
- ALPENDURADA, M.F. Solid Phase Microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v.889, p.3-14, 2000.
- ALVES, L.A.F.; SANTANA, D.L.Q.; NEVES, P.M.O.J.; OLIVEIRA, R.C. Ácaros fitófagos da erva-mate: situação atual e perspectivas de controle. **In 2º Congresso Sul-Americano da Erva-mate**. Encantado RS. Anais, p.39-42, 2000.
- ANDRADE, F. M. Exploração e utilização do recurso *Ilex paraguariensis* St. Hil., erva-mate, seus impactos sócio-econômicos atuais e potencialidades de manejo sustentável,. **In: I Seminário Nacional de Recursos Florestais da Mata Atlântica**. São Paulo, Ed. dos Organizadores, p.24-33, 1999.
- ANTONI, V.L. A estrutura competitiva da indústria ervateira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Administração. 1995.
- ARAUJO, H.C., LACERDA, M.E.G., KAPLAN, M.A.C., LOPES, D., BIZZO, H. Investigações sobre os Componentes do Aroma da Erva-Mate Verde por SPME-CGC Usando Diferentes Fibras. **Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Porto Alegre, Brasil, 2002.
- ARAUJO, H.C., LACERDA, M.E.G., KAPLAN, M.A.C., LOPES, D., BIZZO, H. Investigação dos principais componentes do aroma da erva-mate cancheada e tostada por HS-SPME-GC. **Anais do 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latino Americano de Química**, Salvador, Brasil, 2004.
- ARAUJO, H.C., LACERDA, M.E.G., KAPLAN, M.A.C., LOPES, D., BIZZO, H. Influência dos parâmetros de extração na amostragem do aroma da erva-mate por microextração em fase sólida com a fibra DVB/PDMS. **Anais do III Congresso Sul-Americano da Erva-Mate**, Chapecó, Brasil, p.31, 2003.
- AUGUSTO, F.; OLIVEIRA, A.M.; PEREIRA, N.R.; MARSAIOLI, Jr. A Studies on the aroma of cupuassu liquor by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1025, p.115–124, 2004.
- AUGUSTO, F., PINI, G.F., BRITO, E.S., GARCIA, N.H.P., VALENTE, A.L.P. Headspace solid phase microextraction (HS-SPME) method for the chromatographic determination of alkylpyrazines in cocoa samples, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, p.267-271, 2004.
- AUGUSTO, F., VALENTE A.L.P. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v.23, p.523-530, 2000.
- AUGUSTO, F., VALENTE A.L.P. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. **Trends in analytical chemistry**, v.21, p.428-438, 2002.

BALTES, W.; KUNERT-KIRCHERT, J.; REESE, G. Model reaction on generation of thermal aroma compounds. In *Thermal Generation of Aromas*; ACS Symposium Series 409; Parlimente, T.H., McGorin, R.J., Ho, C.-T., Eds.; **American Chemical Society**; Washington, DC, , pp 143-155, 1989.

BAPTISTA, J.A.B., TAVARES, J.F.P., CARVALHO, R.C.B. Comparative study and partial characterization of Azorean green tea polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.12, p.273-287, 1999.

BAPTISTA, J.A.B., TAVARES, J.F.P., CARVALHO R.C.B. Comparison of polyphenols and aroma in red wine from Portuguese mainland versus Azores Islands. **Food Research International**, v.34, p.345-355, 2001.

BARROS, S.G.S., GHISOLFI, E.S., LUZ, L.P., BARLEM, G.G., VIDAL, R.M., WOLFF, F.H., MAGNO, V.A., BREYER, H.P., DIETZ, J., GRUBER, A.C., KRUEL, C.D.P., PROLLA, J.C. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.37, p.25-30, 2000.

BICCHI, C.P., DRIGO, S., RUBIOLO, P. Influence of fiber coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v.892, p.469-485, 2000.

BICCHI, C.P., PANERO, O.M., PELLEGRINO, G.M., VANNI, A.C. Characterization of roasted coffee and coffee beverages by solid-phase microextraction-gas chromatography and principal component analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.4680-4686, 1997.

BORGES, L.R., LAZZARI, S.M.N., LAZZARI, F.A. Comparação dos sistemas de cultivo nativo e adensado de erva mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., quanto à ocorrência e flutuação populacional de insetos. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.47, p.563-568, 2003.

BRASIL. Portaria nº 234, de 25 de marco de 1998. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para Erva-Mate. **Diário oficial da União**, Brasília DF, 29 jun 1998.

BRUCE, P., MINKKINEN, P., RIENKKOLA, M.L Practical method validation sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, v.128, p.93-106, 1998.

BULDINI, P.L., RICCI, L., SHARMA, J.L Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.975, p.47–70, 2002.

CARVALHO, L.F.R., PENTEADO, J.C.P. Identificação de LABs em Detergente utilizando SPME-GC- MS. **Anais da 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas, MG, 2003.

CAVALLI, J.F., FERNANDEZ, X., LIZZANI-CUVELIER, L., LOISEAU, A.M. Comparison of Static Headspace, Headspace Solid Phase Microextraction, Headspace Sorptive Extraction, and Direct Thermal Desorption Techniques on Chemical

Composition of French Olive Oils, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7709-7716, 2003.

CHO, H.-J., BAEK, K., LEE, S.-H., YANG, J.-W. Competitive extraction of multi-component contaminants in water by carboxen-polydimethylsiloxane fiber during solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.988, p.177-184, 2003.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v.35, p.13-21, 1990.

CLUBE DO TERERE <http://www.clubedoterere.com.br/erva/> acessado em 11/02/2005.

CRUZ, G. L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**, 2nd ed., Bertrand Brasil, Rio de Janeiro, desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. Curitiba: Ed. do autor, 2000. Série PADCT III, n. 1. 160 p, 1982.

EISERT, R.; PAWLINSZYN, J. **Critical Review Anal. Chem.** v.27, p.103, 1997.

ESMELINDRO, M. C., TONIAZZO, G., WACZUK, A., DARIVA, C., OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da Erva-Mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, p.193-204, 2002.

ESMELINDRO, M.C., TONIAZZO, G., DARIVA, C., OLIVEIRA, D., LOPES, D. The Effects of Manufacturing Steps on the Chemical Characteristics of the Extracts from SCFE of Mate Tea Leaves. **Chemical Engineering Transactions**, v.2, p.241-246, 2002.

FERNANDEZ-CACERES, P.L., MARTIN, M.J., PABLOS, F., GONZALEZ, A.G. Differentiation of Tea (*Camellia sinensis*) Varieties and Their Geographical Origin According to their Metal Content, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4775-4779, 2001.

FESTER, G., MARTINUZZI, E., RETAMAR, J., RICCIARDI, A. Aceites Esenciales de la República Argentina – **Academia Nacional de Ciencias**- Córdoba - Argentina. 1961.

FILIP, R., LOPEZ, P., GIBERTI, G., COUSSIO, J., FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v.72, p.774-778, 2001.

FILIP, R., LOTITO, S.B., FERRARO, G., FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species, **Nutrition Research**, v.20, p.1437-1446, 2000.

FREITAS, A.M.C., PARREIRA, C., VILAS-BOAS, L. The Use of an Electronic Aroma-sensing Device to Assess Coffee Differentiation and Comparison with SPME Gás Chromatography-Mass Spectrometry Aroma Patterns. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.513-522, 2001.

FREITAS, A.M.C., PARREIRA, C., VILAS-BOAS, L. Comparison of two SPME fibers for differentiation of coffee by analysis of volatile compounds. **Chromatographia**, v.54, p.647-652, 2001.

- FROST, R.P., HUSSAIN, M.S., RAGHANI, A.R. Determination of pharmaceutical process impurities by solid phase microextraction gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v.26, p.1097-1103, 2003.
- GARCIA, D.C; REICHENBACHER, M; DANZER, K; HURLBECK, C; BARTZSCH, C; FELLER, K.H. Analysis of Wine Bouquet Components using Headspace Solid-Phase Microextraction-Capillary Gas Chromatography. **J. High Resol. Chromatogr.** v.21, p.373-377, 1998.
- GRIGIONI G.; CARDUZA F.; IRURUETA M.; PENSEL N. Flavour characteristics of *Ilex paraguariensis* infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**; v.84, p.427-432, 2004.
- HAMM, S., LESELLIER, E., BLETON, J., TCHAPLA, A. Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum. **Journal of Chromatography A**, v.1018, p.73-83, 2003.
- HAWTHORNE, S.B., MILER, D.J., PAWLISZYN, J., ARTHUR C.L. Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers. **Journal of Chromatography A**, v.603, p.185-191, 1992.
- HEIZEN, V.E.F., YUNES, R.A. Correlation between gas chromatographic retention indices of linear alkylbenzene isomers and molecular connectivity indices. **Journal of Chromatography A**, v.654, p.183-189, 1993.
- KANAVOURAS, A., KIRITSAKIS, A., HERMANDEZ, R.J. Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase microextraction. **Food Chemistry**, v.90, p.69-79, 2005.
- KATAOKA, H., LORD, H.L., PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.880, p.35-62, 2000.
- KAVACEVIC, M., KAC, M. Solid-Phase microextraction of hop volatiles potential use of for determination and verification of hop varieties. **Journal of Chromatography A**, v.918, p.159-167, 2001.
- KAWAKAMI, M., KOBAYASHI, A. Volatile constituents of green maté and roasted maté, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.1275-1279, 1991.
- KIM, T.H., LEE, S.M., KIM, Y.S., KIM, K.H. OH S., LEE, H.J. Aroma dilution method using GC injector split ratio for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction. **Food Chemistry**, v.83, p.151-158, 2003.
- KOLB, B.; ETTRE, L. *Static Headspace-Gas Chromatography. Theory and Practice*, edsPWiley-VCH, Inc., New York, NY, 1997, 31 P.
- KOZIEL, J.A., NOVAK, I. Sampling and sample-preparation strategies based on solid-phase microextraction for analysis of indoor air. **Trends in analytical chemistry**, v.21, p.840-850, 2002.

KUBO, I., MUROI, H., HIMEJIMA, M. Antibacterial activity against streptococcus mutans of mate tea flavor components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.107-111, 1993.

KUMAZAWA, T., SENO, H., LEE X.P., ISHII, A., WATANABE-SUZUKI, K., SATO, K., SUZUKI, O. Extraction of methylxanthines from human body fluids by solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v.387, p.53-60, 1999.

LACERDA, M.E.G., ARAUJO, H.C., KAPLAN, M.A.C. Comparative evaluation of methyl xanthine percentages in commercial samples of black tea and maté tea. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p.17-21, 2000.

LIMA, V.L.A.G., MELO E.A., LIMA, D.E.S. Teor de Compostos Fenólicos Totais em Chás Brasileiros, **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, p.187-190, 2004.

LIU, X.; VAN ESPEN, P.; ADAMS, F.; YAN, S.H.; VANBELLE, M. Classification of Chinese tea samples according to origin and quality by principal component techniques. **Analytica Chimica Acta**, v.200, p.421-430, 1987.

LÓPEZ-TAMAMES E., VICHI, S., CASTEWLLOTE, A.I., PIZZALE, L., CONT, L.S., BUXADERAS, S. Analysis of virgin olive volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. **Journal of Chromatography A**, v.983, p.19-33, 2003.

MACCARI, A.J., SANTOS, A.P.R. Produtos alternativos e desenvolvimento de tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. MCT/CNPq/PADCT, Curitiba, PR, 2000.

MACHIELS, D., ISTASSE, L. Evaluation of two commercial solid-phase microextraction fibers for the analysis of target aroma compounds in cooked beef meat. **Talanta**, v.61, p.529-537, 2003.

MAIOCHI, M., OCAMPO, A., AVANZA, J. Estudio comparativo de aceites esenciales de *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa* procesadas. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**. Universidad Nacional del Nordeste, Resumen E-64, 2003.

MARCOS, A.; FISCHER, A.; REA, G.; HILL S.J. Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.13, p.521-525, 1998.

MARRIOTT, P.J., RYAN, D., SHELLIE, R., TRANCHIDA, P., CASILLI, A., MONDELLO, L. Analysis of roasted coffee bean volatiles by using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.57–65, 2004.

MARRIOTT, P.J., SHELLIE, R., CORNWELL, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v.936, p.1–22, 2001.

MARX, F., ANSSENS, M.J.J., URFER, P., SCHERER, R. Caffeine and Theobromine Composition of Mate (*Ilex paraguariensis*) Leaves in Five Plantations of Misiones, Argentina. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.58, p.1–8, 2003.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Manual de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Empresa Paranaense de Assistência técnica e Extensão Rural. Emater, Paraná, 1989,104 p.

MAZUCHOWSKI, J.Z Alternativas para o incremento da produtividade de ervais nativos. *in: II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate*, Encantado, Brasil, Ed. Dos organizadores. p.6-9, 2000.

MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.6, p.149-151, 1994.

MAZZAFEA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v.60, p.67-71, 1997.

MEDRADO, M.J.S. **Anais do I Congresso Sulamericano da erva-mate**, 1997.

MEJIA, E.G., RAMIREZ-MARES, M.V., CHANDRA, S. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v.554, p.53–65, 2004.

MONDELLO L., CASILLI A., TRANCHIDA P.Q., DUGO P., FESTA S., DUGO G. Comprehensive multidimensional GC for the characterization of roasted coffee beans, **Journal of Separation Science**, v.27, p.442-450, 2004.

MONTEIRO, C.L.B. **Técnicas de avaliação sensorial**. 2. ed. Curitiba: CEPPA, 1984, 101 p.

MONTES, A. Aceite esencial de Yerba mate elaborada, – **Anales de la Sociedad Científica Argentina**, 19-43, 1963.

MOREDA, W., CERT, A., PEREZ-CAMINO, M.C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v.881, p.131–148, 2000.

MOREDA-PIÑERO, A., FISCHER, A., HILL, S.J. The classification of tea according to region of origin using pattern recognition techniques and trace metal data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.195-211, 2003.

MORGANO, M.A., QUEIROZ, S.C.N., FERREIRAN, M.M.C. Aplicação da análise exploratória da diferenciação de vegetais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, p.73-79, 1999.

MUÑOZ, N., VICTORIA, C.G., CRESPI, M., SAUL, C., BRAGA, N.M., CORREA, P. Hot maté drinking and precancerous lesions of the oesophagus: an endoscopic survey in southern Brazil. **International Journal of Cancer**, v.39, p.708-9, 1987.

OLIVEIRA, Y.M.M., ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), **X Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais**. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – CNPF/EMBRAPA, p.17-35, 1985.

PARANÁ Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba, 2000,160 p. (Série PADCT III, n. 1).

- PARKIN, D.M., PISANI, P., FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. **International Journal of Cancer**, v.54, p.594-606, 1993.
- PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction – Theory and Practice, Wiley-VCH, New York, USA. 1997, Pawliszyn J. (1999) Application of Solid Phase Microextraction, RSC, Cambridge, UK,.
- PAWLISZYN, J., Liu, X., PAWLISZYN, R., WANG, L. On-site monitoring of biogenic emissions from *Eucalyptus dunnii* leaves using membrane extraction with sorbent interface combined with a portable gas chromatograph system. **Analyst**, v.129, p.55-62, 2004.
- PAWLISZYN J., YANG M.J., ORTON M.L. Quantitative determination of caffeine in beverages using a combined SPME-GC/MS Method. **Journal of Chemical Education**, v.74, p.1130-1132 1997.
- PECKOUT, G. Herva Mate. **Revista da Flora Medicinal**, v.10, p.520, 1943.
- PROLLA, J.C., DIETZ, J., DA COSTA, L.A. Diferenças geográficas na mortalidade por câncer de esôfago no Rio Grande do Sul. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.39, p.217-20, 1993.
- PROLLA, J.C., DIETZ, J., DIEHL, A.S., FURTADO, C. D., FURTADO, A.D. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, p.207-211, 2000.
- REGINATTO, F.H., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., ATHAYDE, M.L. Methylxanthines accumulation in *Ilex* Species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.10, p.443-446, 1999.
- RICCO, R.A., WAGNER, M.L., GURNI, A.A. Estudio comparativo de flavonóides en especies austrosudamericanas del genero *Ilex*. In: Erva-mate: **biologia e cultura no Cone Sul**. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, p.243-249, 1995.
- ROBERTS, D.D., POLLIEN, P., MILO, C. Solid-Phase Microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2430-2437, 2000.
- ROCHA, S., MAEZTU, L., BARROS, A., CID, C., COIMBRA, M.A. Screening and distinction of coffee brews based on headspace solid phase microextraction/gas chromatography/principal component analysis; **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, p.43-51, 2004.
- RODRIGUEZ, M.A., FRIAS, S., COND, J.E., PÉRZ-TRUJILLO, J.P. Optimisation of a solid-phase microextraction procedure for the determination of triazines in water with gas chromatography–mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v.1007, p.127-135, 2003.

- ROLÓN, P.A., CASTELLSAGUEE, X., BENZ, M., MUNOZ, N. Hot and cold mate drinking and esophageal cancer in Paraguay. **Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention**; v.4, p.595-605, 1993.
- RUIZ, J., GARCIA-ESTEBAN, M., ANSORENA, D., ASTIASARAN, I. Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME), **Talanta**, v.64, p.458-466, 2004.
- SANTA CRUZ, M.J., GARITTA, L.V., HOUGH, G. Sensory Descriptive Analysis of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis* Saint Hilaire), a South American Beverage. **Food Science and Technology International**; v.8, p.25-31, 2002.
- SANTA CRUZ, M.J., GARITTA, L.V., HOUGH, G. Relationships of consumer acceptability and sensory attributes of Yerba mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hilarie) using preference mapping. **Food Science and Technology International**, v.9, p.347-352, 2003.
- SANTOS, K.A.; FREITAS, R.J.S.; RUCHER, N.G.A.; SANTOS, M.A., RAPACCI, M.; Determinação de cafeína por CLAE em erva-mate para chimarrão. **III Congresso Sul-Americano da Erva-Mate**, Chapecó, Brasil, p.37, 2003.
- SANTOS, K.A.; FREITAS, R.J.S.; WASZCZYNSKYJ, N. Aplicação do teste de ordenação para avaliação sensorial da erva-mate para chimarrão. **III Congresso Sul-Americano da Erva-Mate**, Chapecó, Brasil, p.38, 2003.
- SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G. A new saponin from maté, *Ilex-paraguariensis*. **Journal of Natural Products**. v.52, p.1367-1370, 1989
- SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., KRAEMER, K.H., GUILLAUME, D., TAKETA, A.T.C. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v.42, p.1119-1122, 1996.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; HEINZMANN, B. M.; MONTANHA, J.A.; ATHAYDE, M.L.; TAKEDA, A.C. Saponinas em Espécies do Gênero *Ilex*. In *Erva-Mate: Biologia e Cultura no Cone Sul*; Winge H., Ferreira A.G., Mariíta J.E.A., Tarasconi L.C., Eds.; Universidade/UFRGS: Porto Alegre, Brazil; 1995, 251-256 pp.
- SCHINELLA, G.R., TROIANI, G., DÁVILA, V., BUSCHIAZZO, P. M., TOURNIERI, H. A. Antioxidant Effects of an Aqueous Extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.269, p.357-360, 2000.
- SCHMALKO, M.E.; ALZAMORA, S.M. Color, chlorophyll, caffeine and water content variation during yerba maté processing. **Drying Technology**, v.19, p.599-610, 2001.
- SCHULTZ, T. H.; FLATH, R. A.; MON, T. R.; EGGLING, S. B.; TERANISHI, R. Isolation of volatile compounds from a model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.25, p.446-449, 1977.

SHIREY, R. Optimization of extraction conditions for low-molecular weight analytes using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatographic Science**, v.38, p.109-115, 2000.

STUART, J.D., MILLER, M.E. Comparison of gas-sampled and SPME-Sampled static headspace for the determination of volatile flavor components, **Analytical Chemistry**, v.71, p.23-27, 1999.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E.M.; BARBETTA, P.A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 180 p, 1987.

TOGARI, N., KOBAYASHI, A, AISCHIMA, T. Pattern recognition applied to gás chromatographic profiles of volatile components in three tea categories, **Food Research International**, v.28, p.495-502, 1995.

TORMEN, M.J. Economia ervateira brasileira. em: **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**, eds. Winge, H., Ferreira, A.G., Mariath, J.E.A., Tarasconi L.C., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 1995, p.27-40.

VALDUGA, A.T., FINZER, J.RD., MOSELE, S.H Processamento de erva-mate, EdIFAPES, Erechim, RS, 2003, 184 p.

VALDUGA, E. Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate. Curitiba, 1995, 97 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

VALERA, P.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A.G. Classification of tea samples by their chemical composition using discriminant analysis. **Talanta**, v.43, p.415-419, 1996.

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.

WILKES, J.G., CONTE, E.D., KIN, Y., HOLCOMB, M., SUTHERLAND, J.B., MILLER, D.W. Sample preparation for the analysis of flavor and off-flavor in foods. **Journal of Chromatography A**, v.880, p.3-33, 2000.

YANG, X., PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v.42, p.1925-1930, 1994.

YANO, M., OKADA, K., KUBOTA, K., KOBAYASHI, A. Studies on the precursors of monoterpenes alcohols in tea leaves. **Agric. Biol. Chem** , v.54, p.1023-1028, 1990.

ZABARAS, D., WYLLIE, S.G. Rearrangement of *p*-menthane terpenes by Carboxen during HS-SPME. **Journal of Separation Science**, v.25, p.685-690, 2002.

ZANG, Z., PAWLISZYN, J. Headspace Solid-Phase Microextraction, **Analytical Chemistry**, v.65, p.1843-1852, 1993.

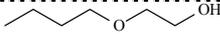
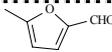
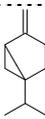
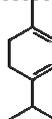
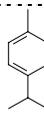
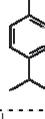
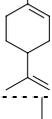
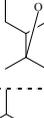
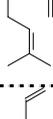
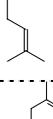
FUNBIO <http://www.funbio.org.br> acessado em 19/02/2005.

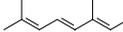
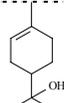
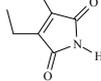
---

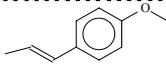
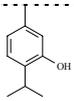
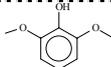
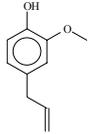
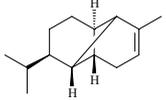
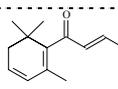
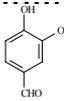
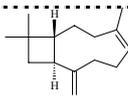
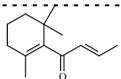
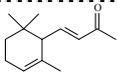
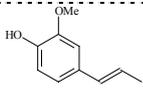
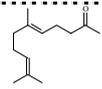
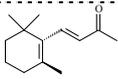
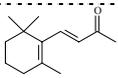
# ANEXO

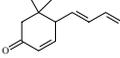
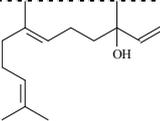
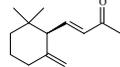
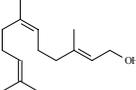
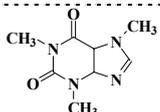
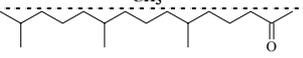
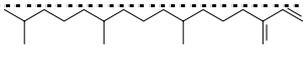
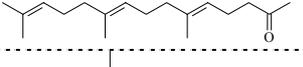
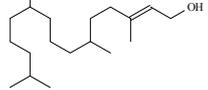
---

Tabela 23 - Relação de algumas substâncias voláteis e semi-voláteis da erva-mate identificadas por HS-SPME-GC e seus respectivos índices de retenção e formulas estruturais.

Substâncias	I <sub>obs</sub>	I <sub>lit</sub>	
1-acetil-1-ciclohexeno	886		
2-butoxietanol	908		
$\alpha$ -turjeno	927	931	
$\alpha$ -pineno	933	939	
5-metilfurfural	966	962	
sabineno	972	976	
$\beta$ -pineno	975	980	
$\alpha$ -felandreno	1001	1005	
$\alpha$ -terpineno	1018	1018	
<i>p</i> -cimeno	1023	1026	
limoneno	1027	1031	
eucaliptol (1,8-cineol)	1030	1033	
Z- $\beta$ -ocimeno	1039	1040	
E- $\beta$ -ocimene	1050	1050	
$\gamma$ -terpineno	1059	1062	

(E)-4-thurjenol	1070	1068	
(Z)-óxido de linalila	1074	1074	
$\alpha$ -terpinoleno	1087	1088	
Guaiacol orto	1087	1086	
(E)-óxido de linalila	1088	1088	
linalol	1098	1098	
isosforona	1115	1118	
neo-alloocimeno	1140	1142	
4-cetoisosforona	1144	1142	
terpin-4-ol	1174	1177	
$\alpha$ -terpineol	1189	1189	
safranal	1192		
$\beta$ -ciclo citral	1217		
nerol	1228	1228	
pulegona	1236	1237	
1H-pirrol 2,5-diona-3-etil 4-metil	1238		
neral	1242	1240	

geraniol	1256	1255	
E-anetol	1282	1283	
timol	1297	1290	
1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno (tetralina)	1343		
1,2,3,4-tetraidronaftaleno	1349		
2,6-dimetoxifenol	1353	1348	
eugenol	1356	1356	
$\alpha$ -copaeno	1370	1376	
E- $\beta$ -damascenona	1385	1380	
vanilina	1394	1391	
(Z)-cariofilleno	1406	1404	
E- $\beta$ -damascona	1409	1409	
$\alpha$ -ionona	1424	1426	
Isoeugenol	1446	1447	
geranilacetona	1454	1453	
Megastigmatrienona 4 - (tetraionona)	1474		
$\beta$ -ionona	1484	1485	

$\alpha$ -muuroлено	1492	1499	
diidroactinolido	1519		
megastigmastrienona (isom.)	1553 1573 1620		
E-nerolidol	1563	1564	
E,Z pseudoionona ( $\gamma$ -ionona)	1585		
E,Z-farnesal	1741	1742	
Cafeína	1830		
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1846		
neofitadieno (isom.)	1838 1881 2131		
farnesilacetona C	1917		
fitol	2105	1949	

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)