

ALEXANDER ALVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE ORGANOSSULFURADOS EM
DIFERENTES CULTIVARES DE ALHO (*Allium sativum* L.) E
CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

**Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
Co-Orientador: Prof. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi**

**Araraquara
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ALEXANDER ALVES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE ORGANOSSULFURADOS EM
DIFERENTES CULTIVARES DE ALHO (*Allium sativum* L.) E
CEBOLA (*Allium cepa* L.)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
Co-Orientador: Prof. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Araraquara
2009

ALEXANDER ALVES DA SILVA

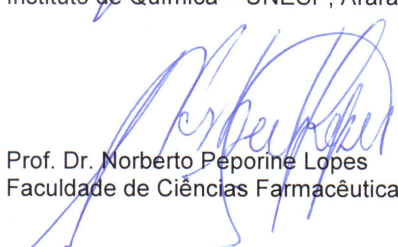
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 27 de maio de 2009.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Drª Marcia Ortiz Mayo Marques
Instituto Agrônômico de Campinas – IA, Campinas

Dedicatória

Aos meus pais pelo apoio irrestrito em todos os momentos de minha vida. Aos meus irmãos Elisangela, Anderson e Patrícia pelo carinho, apoio e confiança que tiveram em mim no decorrer do curso.

À minha namorada Carine que soube tão bem compreender os meus momentos de ausência em função deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meus passos, me dando forças e vontade de vencer todos os obstáculos.

Aos meus pais Antonio e Maria que me deram a vida, carinho, apoio, boa educação e compreensão nos momentos mais difíceis, além de sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Elisangela, Anderson e Patrícia, que sempre estiveram ao meu lado apoiando-me nas minhas decisões, conquistas ou momentos difíceis.

A minha namorada Carine pelo amor, carinho, companheirismo, paciência e pela ajuda em tudo, durante o desenvolvimento deste trabalho e principalmente nos momentos mais difíceis

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro pela dedicação e paciência, amizade, e incentivo no decorrer dos trabalhos.

A Professora Mary Rosa Rodrigues de Marchi, pela co-orientação, ensinamentos, amizade e pela colaboração durante este trabalho.

Aos amigos moradores e ex-moradores da República Arapuca pela amizade e pelos bons momentos de convivência e diversão.

Ao Guilherme Julião Zocolo pela paciência, atenção e ajuda na realização de alguns experimentos.

Ao meu amigo Marcelo e a todos os outros amigos de Guairá, minha cidade natal.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pelo espaço cedido para a realização das análises no Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Aos técnicos Cristina e Tomas do Departamento de química orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Aos professores Dr. Clóvis A. Ribeiro e Dr. José Roberto Ernandes pela bolsa indústria cedida.

A Luciana Polesi pela amizade e principalmente pela atenção e ensinamentos.

Ao Alberto Alecio pela amizade e ajuda nas análises.

A todos os amigos do laboratório Cryca.

As empresas Temperalho (Indústria, Comercio, Importação e Exportação - Ltda) de Iacanga – SP, Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé Ltda - São José do Rio Pardo – SP, pelas amostras cedidas.

A todas as bibliotecárias pela amizade e eficiência atendimento.

*Se fazer fosse tão fácil quanto saber o que seria bom
fazer, as capelas seriam igrejas, e as choupanas dos
pobres, palácios de príncipes.
William Shakespeare*

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.
Albert Einstein

RESUMO

As espécies *Allium* são fontes ricas de fitonutrientes, sendo usadas desde a antiguidade como remédios, úteis para uma variedade de doenças tais como: coronárias, hipercolesterolemia, diabetes do tipo 2, hipertensão, catarata, distúrbios gastrointestinais, dor de cabeça, picadas de insetos, vermes e tumores. Muitos destes efeitos biológicos são relacionados aos tiosulfinais, compostos de enxofre lábeis, típicos das espécies de *Allium*, que são também responsáveis pelo seu aroma e gosto picante característicos. Os compostos sulfurados voláteis de alho (*Allium sativum* L.) e cebola (*Allium cepa* L.) têm sido muito estudados nos últimos anos. Diversas técnicas foram utilizadas para a análise dessas substâncias, tais como GC-MS, GC-FID, HPLC-UV e outras. Na literatura, não há registro de análises em cromatografia gasosa para cultivares de alho e cebola brasileira. Além disso, nenhum método utilizando um sistema de detecção específico para sulfurados foi relatado. Devido a tais constatações desenvolvemos um método utilizando GC-PFPD (específico para detecção de sulfurados) para análise de compostos sulfurados da espécie *Allium*. Foram avaliados vários procedimentos de extração, incluindo por maceração, hidrodestilação, *headspace* (HS) e HS-SPME, sendo que a extração por HS-SPME mostrou-se mais eficiente, considerando o número de compostos extraídos. Para as análises qualitativas foram utilizados índices de retenção de Kovats para GC-PFPS e GC-MS e espectros de massas obtidos no GC-MS. Estas técnicas mostraram-se ferramentas importante na detecção e identificação de compostos sulfurados e não sulfurados de espécies de *Allium*. Utilizando GC-PFPD foi possível desenvolver um método seletivo e significativamente mais sensível em relação à GC-FID E GC-MS, capaz de analisar grande número de componentes sulfurados voláteis de alho e cebola. Portanto o novo método proposto, utilizando CG-PFPD para a determinação de substâncias sulfuradas, demonstrou que suas principais vantagens são a alta sensibilidade, excelente capacidade de resolução, precisão e confiabilidade.

Palavras-chave: Alho, cebola, compostos sulfurados voláteis, *headspace*, microextração em fase sólida, GC-FID, GC-PFPD, GC-MS.

ABSTRACT

Allium species are rich sources of phytonutrients and are used as medicine since ancient times, useful for a variety of diseases such as coronary problems, hypercholesterolemia, type 2 diabetes, hypertension, cataracts, gastrointestinal disturbances, headache, insect bites, worms and tumors. Many of these biological effects are related to thiosulfinates, labile organic sulfur compounds typical of *Allium* species, which are responsible for their characteristic flavor and pungency. The volatile sulfur compounds of garlic (*Allium sativum* L.) and onion (*Allium cepa* L.) have been studied in recent years. Several techniques were used for the analysis of these compounds, such as GC-MS, GC-FID, HPLC-UV and others. Up to know, there is no report about the analyses of organic sulfur profile in different cultivars of garlic and onion grown in Brazil. Furthermore, no method using a detection system specific for sulfur compounds has been reported yet. Because of these findings, this work proposes a selective method using GC-PFPD, for analysis of organic sulfur compounds in *Allium* species. We evaluated several extraction procedures, including maceration, hydrodistillation, headspace (HS) and HE-SPME, and the HE-SPME extraction was more efficient, considering the number of compounds extracted. For the qualitative analysis were used Kovatz retention indices to PFPD and GC-MS and the mass spectra obtained in GC-MS. These techniques were shown to be important tools in the detection and identification of sulfur and non-sulfur compounds from *Allium* species. Using GC-PFPD was possible to develop a selective method and significantly more sensitive in relation to the GC-FID and GC-MS, which make possible to analyze large number of volatile sulfur components of garlic and onion. So the new proposed method using GC-PFPD for the determination of sulfur has its main advantages in the high sensitivity, excellent resolution capacity, precision and reliability.

Keywords: Garlic, onion, volatile sulfur compounds, headspace, solid phase microextraction, GC-FID, GC-PFPD, GC-MS.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Espécies <i>Allium</i> cultivadas para uso culinário.....	19
Figura 2 - Compostos sulfurados encontrados na espécie <i>Allium</i>	23
Figura 3 - Formação dos produtos de degradação da alicina.....	24
Figura 4 - Detector de ionização de chama.....	28
Figura 5 - Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas.....	29
Figura 6 - Acoplamento CG-EM.....	32
Figura 7 - Acoplamento da coluna cromatográfica (via CG) na fonte de IE.....	32
Figura 8 - Esquema de um detector fotométrico de chama pulsante.....	37
Figura 9 - Estágios de pulsação da chama em um detector fotométrico de chama pulsante.....	38
Figura 10 - Curva do tempo de emissão das espécies OH*, CH* e S ₂ *, nos estados excitados.....	40
Figura 11 - Dispositivo de 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 µm de espessura.....	41
Figura 12 - Equilíbrio de partição entre a fibra e o meio que a envolve.....	42
Figura 13 - A extração por ser feita mergulhando-se a fibra ao líquido da amostra (A), ou exposta coletando os vapores da amostra(B).....	42
Figura 14 - (A) Vista interna do amostrador de SPME com a fibra exposta, (B) Vista com a fibra exposta e o êmbolo travado pelo pino no centro da fenda em “Z”.....	43
Figura 15 - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração (adsorção) e de dessorção do material extraído para a análise por GC.....	44
Figura 16 - Corte lateral de <i>liners</i> específicos para modo de injeção (a) <i>split</i> e (b) <i>splitless</i>	56
Figura 17 Cromatogramas dos voláteis de alho e cebola extraídos após 80 minutos da trituração, obtidos pelos testes de trituração com e sem água, utilizando 50 g de amostra: (a) branco, (b) cebola com água, (c) cebola sem água, (d) alho com água, (e) alho sem água. Análises feitas somente por GC-PFPD devido sua alta detectabilidade.....	65

Figura 18 - Cromatogramas dos voláteis de alho e cebola obtidos nos testes de trituração com faca e sem água utilizando 50 g de amostra: (a) branco, cebola após 15 min. (b) e 80 min. (c); alho após 15 min. (d) e 80 minutos após a fragmentação da amostra (e). Análises feitas somente por GC-PFPD.....66

Figura 19 - Comparação da capacidade extratora (em número de picos) das fibras de SPME após 40 minutos de adsorção e 3 minutos de dessorção, utilizando de 5 g de amostra após trituração com faca. (a) PDMS 7 µm, (b) PDMS 100 µm, (c) PA e (d) CAR/PDMS. Análises feitas somente em GC-PFPD.....67

Figura 20 - Cromatogramas mostra comparação dos métodos de extração por *headspace*, extraídos após 80 minutos da trituração de 15 g de amostra utilizando somente faca (a) cultivar de cebola e (c) cultivar de alho, extração por *HS-SPME* extraídos após 40 minutos (adsorção) e 3 minutos de dessorção, utilizando 15 g de amostra após trituração com faca (b) cultivar de cebola e (d) cultivar de alho. Análises por GC-PFPD.....68

Figura 21 - Cromatogramas utilizando *liner splitless* para a análise de alho nos sistemas cromatográficos (a) CG-MS, (b) ampliação de GC-MS, (c) GC-PFPD e (d) ampliação de GC-PFPD. As condições verificadas foram- modo de injeção- Grob com splitless 1,0 minuto e split 1/30, massa de amostra- 5 g.....70

Figura 22- Cromatogramas ampliados utilizando *liner* para *split* na análise de (a) alho e (b) cebola por CG-MS.....71

Figura 23 - Cromatogramas ampliados utilizando *liner* específico para split utilizando-se o modo de injeção *splitless/split* (modo de Grob) para a análise de cultivar de alho no sistema cromatográfico CG-PFPD variando o Range (a) 9 e (b) 10.....72

Figura 24 - Comparação entre os cromatogramas dos três sistemas cromatográficos para a análise de cultivar de cebola- (a) GC-MS, (b) GC-FID e (c) GC-PFPD e para a análise de cultivar de alho- (d) GC-MS, (e) GC-FID e (f) GC-PFPD.....73

Figura 25 - Cromatogramas do cultivar de alho chinês injetados em (a) GC-MS e (b) GC-FPD.....79

Figura 26 - Cromatogramas do cultivar de alho nacional injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.....80

Figura 27 - Cromatogramas do cultivar de cebola superex injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.....81

Figura 28 - Cromatogramas do cultivar de cebola baia Paraná orgânica injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.....82

Figura 29 - Cromatogramas do cultivar de cebola de optima injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.....83

Figura 30- Cromatograma de padrões de hidrocarbonetos (C ₈ a C ₃₂) analisados por (a) CG-MS, (b) GC-PFPD, injetados no modo de carbono para o cálculo do índice de Kovats.....	89
Figura 31 - Cromatogramas de padrões comerciais analisado em GC-MS.....	91
Figura 32 - Cromatogramas (a e b) de padrões comerciais analisado em GC-PFPD.....	92
Figura 33 - (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 µL do padrão sulfeto de alila, injetado em GC-MS.....	96
Figura 34 - (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 µL do padrão disulfeto de metila, injetado em GC-MS.....	96
Figura 35- (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 µL do padrão disulfeto de dialila, injetado em GC-MS.....	96
Figura 36 - (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção por SPME do padrão disulfeto de metila, injetado em GC-MS.....	97
Figura 37 - (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção por SPME do padrão sulfeto de alila, injetado em GC-MS.....	97
Figura 38 - (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção por SPME do padrão disulfeto de dialila, injetado em GC-MS.....	97
Figura 39 - (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 µL do padrão sulfeto de alil metila, injetado em GC-PFPD.....	98
Figura 40 - (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 µL do padrão sulfeto propila, injetado em GC-PFPD.....	98
Figura 41 - (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção por SPME do padrão sulfeto de ali metila, injetado em GC-PFPD.....	98
Figura 42 - Cromatogramas das cápsulas de óleo de alho injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.....	100

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Fibras de SPME disponíveis comercialmente.....	44
Tabela. 2: Índice de Kovats de alguns compostos sulfurados.....	47
Tabela. 3: Métodos desenvolvidos para a análise de substâncias voláteis do alho e cebola.....	48
Tabela 4: tipos de extrações verificadas com seus respectivos tratamento.....	51
Tabela 5: Dados da avaliação da repetibilidade (precisão intra-dia) para análise de compostos sulfurados voláteis de alho, extraídos por <i>HS</i> -SPME. e analisados por GC-MS e GC-PFPD. Média de três repetições.....	76
Tabela 6: Dados da avaliação da repetibilidade (precisão intra-dia) para análise de compostos sulfurados voláteis de cebola, extraídos por <i>HS</i> -SPME. e analisados por GC-MS e GC-PFPD. Média de três repetições.....	77
Tabela 7: Estudo da repetibilidade do tempo de retenção para amostras de cultivares de cebola analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.....	84
Tabela 8: Estudo da repetibilidade do tempo de retenção para amostras de cultivares de alho analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.....	85
Tabela 9: Estudo da repetibilidade da área para amostras de cultivares de cebola analisado pelos sistemas cromatográficos GC- MS e GC-PFPD.....	86
Tabela 10: Estudo da repetibilidade da área para amostras de cultivares de alho analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.....	87
Tabela 11: Tempo de retenção de hidrocarbonetos analisados pelos sistemas GC-MS e GC-PFPD.....	89
Tabela 12: curva de calibração dos padrões injetados no GC-MS.....	94
Tabela 13: curva de calibração dos padrões injetados no GC-PFPD.....	95
Tabela 14: Identificação de compostos sulfurados e não sulfurados em amostra de óleo essencial comercial analisado pelo sistema cromatográfico GC-MS e GC-PFPD.....	101
Tabela 15: Estudo da repetibilidade da área e do tempo de retenção para amostras de Cápsula de óleo de alho analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HPLC	do inglês <i>High-performance liquid chromatography</i> em português cromatografia líquida de alta eficiência
UV	ultravioleta
GC	do inglês Gas Chromatograph. Em português, Cromatografia Gasosa
FID	do inglês Flame Ionization Detection em português detecção por ionização em chama
MS	do inglês mass spectrometry em português espectrometria de massas
PFPD	do inglês Pulsed Flame Photometric Detector em português detector fotométrico de chama pulsante
mbar	Milibar
°C	grau Celsius
m/z	relação massa carga
g	grama
mL	mililitro
min.	minuto
eV	elétron volt
nm	nanômetros
mm	milímetros
µm	micrômetro
µL	microlitro
MM	massa molecular
SPME	do inglês <i>solid phase microextraction</i> em português microextração em fase sólida
PDMS	polidimetilsiloxano
PDMS–DVB	Polidimetilsiloxano divinilbenzeno
CAR–PDMS	Carboxen/Polidimetilsiloxano
CW–DVB	Carbowax divinilbenzeno

DVB-CAR-PDMS	Divinilbenzeno Carboxen Polidimetilsiloxano
PA	poliacrilato
Cwx	Carbowax
L_f	espessura do recobrimento
RMN de ¹H	do inglês Nuclear <i>magnetic resonance</i> em português ressonância magnética nuclear
SC-CO₂	do inglês <i>Supercritical</i> carbon dioxide extração supercrítica com dióxido de carbono
PFD	do inglês Flame Photometric Detector em português detector fotométrico de chama
AV	arraste a vapor,
M	maceração
HS	<i>headspace</i>
HS - SPME	<i>headspace</i> -SPME.
ppm	Partes por milhão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.2 <i>Allium sativum</i> – alho.....	20
1.3 <i>Allium cepa</i> – cebola.....	21
1.4 Importância da análise de substâncias sulfuradas.....	22
1.4.1 Alho (<i>Allium sativum</i>).....	22
1.4.2 Cebola (<i>allium cepa</i>).....	25
1.5 Análise e identificação de substâncias sulfuradas.....	26
1.5.1 Detector de ionização em chama (FID).....	27
1.5.2 Espectrometria de massas (MS).....	28
1.5.3 Cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas (GC-MS).....	30
1.5.4 Espectrometria de massas de substâncias sulfuradas.....	32
1.5.5 Detector Fotométrico de Chama Pulsante (PFPD).....	35
1.5.6 Extração por SPME (microextração em fase sólida).....	40
2. REVISÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS SULFURADOS DE ALLIUM.....	45
3. OBJETIVO.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Estratégia experimental.....	49
4.2 Amostra.....	50
4.3 Solvente e padrões.....	51
4.4 Preparação das amostras e métodos de extração.....	51
4.4.1 Tratamento da amostra de alho e cebola.....	51
4.4.2 Quantidade de amostra.....	52
4.4.3 Preparo de amostra de alho e cebola para análise de sulfurados.....	52
4.4.4 Extração por destilação por arraste a vapor.....	52
4.4.5 Maceração.....	53
4.4.6 Extração por headspace (HS).....	53
4.4.7 Extração por headspace - SPME (HS-SPME).....	54
4.5 Desenvolvimento do método cromatográfico.....	55
4.5.1 Avaliação do liner (liner específico para split e splitless).....	56
4.5.2 Modo de injeção: split, splitless/split (modo de Grob).....	56
4.5.3 Temperatura inicial da coluna.....	56
4.5.4 Análise por GC-FID.....	57
4.5.5 Análise por GC-MS.....	57
4.5.6 Análises por GC-PFPD.....	57
4.5.7 Sensibilidade (Range) do PFPD.....	58
4.6 Estudo da repetibilidade dos tempos de retenção e área do analito.....	58
4.7 Análises qualitativas.....	58
4.7.1 Fluxograma para o método de extração por HS-SPME dos cultivares de alho.....	60
4.7.2 Fluxograma para o método de extração por HS-SPME dos cultivares de cebola.....	61

4.8	Análise preliminar quantitativa.....	62
4.9	Aplicação do método analítico em amostra comercial.....	63
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
5.1	Estudo das técnicas de extração para obtenção dos voláteis sulfurados de alho e cebola.....	63
5.1.1	<i>Extração por arraste a vapor</i>	63
5.1.2	<i>Extração por maceração</i>	64
5.1.3	<i>Extração por Headspace</i>	64
5.1.4	<i>Extração por headspace SPME (HS-SPME)</i>	66
5.2	Estabelecimento das condições cromatográficas.....	68
5.2.1	<i>Liners</i>	69
5.3	Método cromatográfico final.....	74
5.3.1	<i>Análises por GC-PFPD</i>	74
5.3.2	<i>Análises por GC-MS</i>	74
5.3.3	<i>Amostra</i>	74
5.4	Estudo da precisão do método proposto.....	75
5.4.1	<i>Repetibilidade (precisão intra-dia)</i>	75
5.4.2	<i>Repetibilidade (precisão inter-dia)</i>	77
5.5	Análise qualitativa.....	88
5.5.1	<i>Determinação dos Índices de Kovats</i>	88
5.6	Estudos preliminares para análise quantitativa de sulfetos voláteis de <i>Allium spp</i>	90
5.6.1	<i>Limites de detecção e quantificação, faixa de linearidade e precisão intra-dias</i>	90
5.7	Aplicação do método qualitativo em amostra comercial de óleo de alho.....	99
6.	CONCLUSÃO.....	102
7.	PERSPECTIVA DE ESTUDO PARA ANÁLISES DE COMPOSTOS SULFURADOS.....	103

1. INTRODUÇÃO

Allium é o maior e o mais importante gênero da família Alliaceae e compreende 750 espécies, distribuídas principalmente nas regiões temperadas e tropicais do mundo. O posicionamento taxonômico do gênero *Allium* tem sido motivo de controvérsia, sendo algumas vezes incluído na família Liliaceae e outras vezes em Amaryllidaceae (classe Monocotyledones, ordem Asparagales), conforme a ênfase em determinadas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Mais recentemente, a combinação de dados morfológicos e moleculares tem reforçado a idéia de que as cerca de 750 espécies do gênero *Allium* pertencem, de fato, a uma família monofilética “Alliaceae” que é distinta, mas estreitamente relacionada com a família Amaryllidaceae. (BOITEUX; MELO 2003)

Além do alho e da cebola, diversas outras espécies desse gênero são cultivadas extensamente para uso culinário (**Figura 1**), tal como o alho-poró (*A. porrum* L.), cebolinha (*A. fistulosum* L.), shallot (*A. ascalonicum* L.), alho de urso (*A. ursinum* L.), alho porro bravo (*A. ampeloprasum*), cebolinha francesa (*A. schoenoprasum* L.), cebolinha chinesa (*A. tuberosum* L.) e outras. (BOITEUX; MELO 2003)

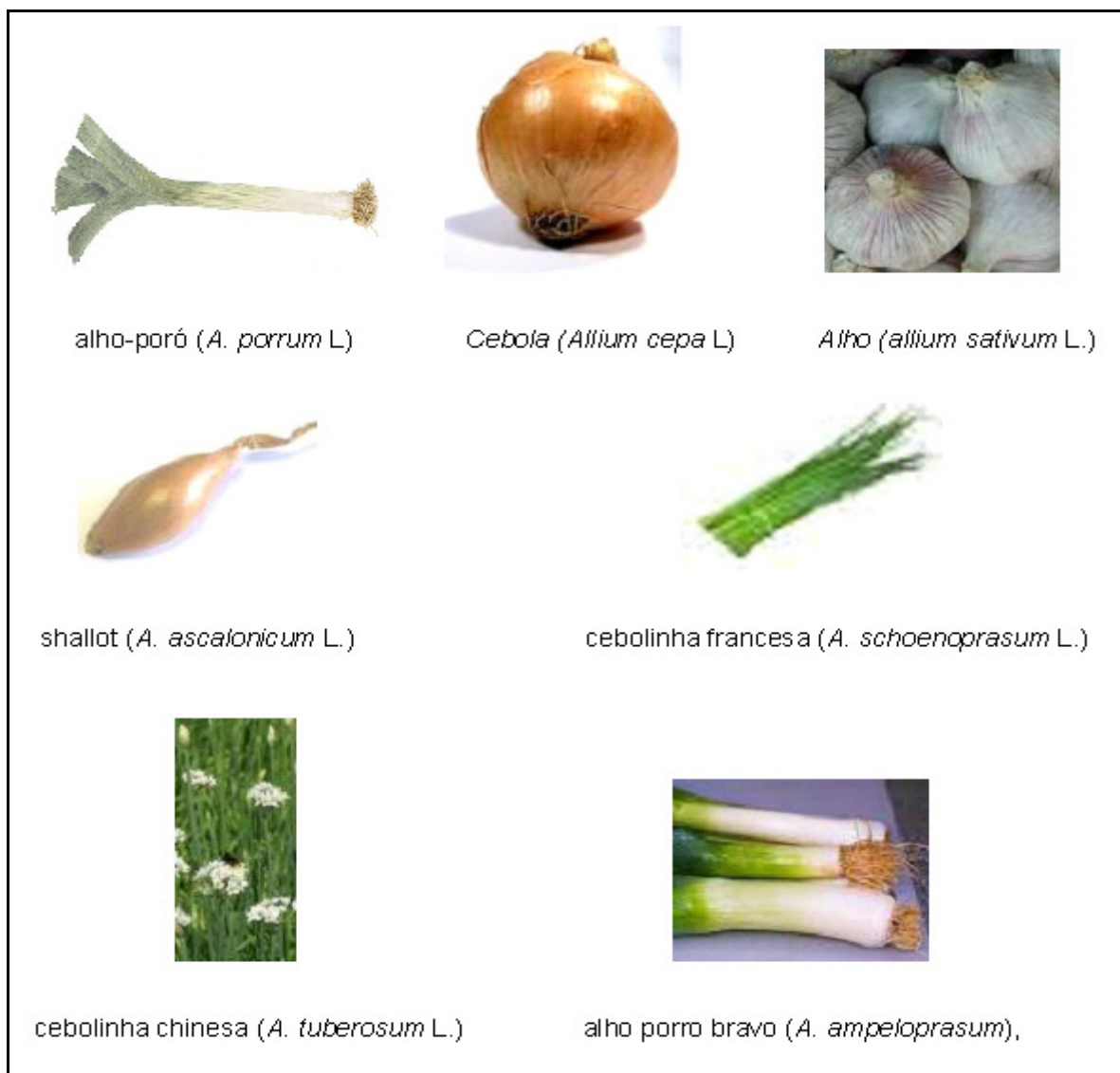


Figura 1: Espécies *Allium* cultivadas para uso culinário.

Além do uso culinário, diversas espécies de *Allium* são também indicadas para prevenir várias doenças. A primeira citação destas plantas é encontrada no Codex Ebers (1550 bc) (BLOCK, 1985), que relata diversas fórmulas terapêuticas em que eles estão incluídos. Este interesse crescente segue uma tendência geral orientada à presença de metabólitos secundários nos alimentos. Estes compostos, nomeados recentemente como "nutracêuticos" ou "fitoquímicos", são classificados como micronutrientes não essenciais e podem contribuir com a homeostase

humana, desempenhando um papel importante na manutenção da saúde (HENRY, 1999 e ZEISEL, 1999).

Algumas revisões foram publicadas sobre composição química de alho e cebola, na maior parte tratando de componentes organossulfurados ou de organoselênios encontrados nestas plantas (ROSE et al., 2005 e BLOCK, 1992).

1.2 *Allium sativum* – alho

Segundo Puiatti e Ferreira (2005), o alho é a hortaliça mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela cultura da cebola. No Brasil, a cultura ocupa o quarto lugar em importância econômica dentre as hortaliças, superado apenas pelas culturas da batata, tomate e cebola (FILGUEIRA, 2003). Segundo dados de Mota (apud Agrianual, 2004), o Brasil importou em 2001, cerca de 78 mil toneladas de alho, o que confere ao país o título de segundo maior importador mundial, somente superado pela Indonésia que importou no mesmo ano cerca de 206 mil toneladas de alho. Segundo Resende (2004), o consumo mensal do Brasil chegou a 10 mil toneladas, além de mais 30 mil toneladas anuais para alho-semente, o que gera um consumo médio anual de cerca de 150 mil toneladas para o mercado interno brasileiro. O Brasil, tradicional importador de alho, vem reduzindo sua dependência externa graças ao desenvolvimento de novas tecnologias e expansão do cultivo de alhos nobres (DALLAMARIA, 2002). Segundo o IBGE, em 2004, o país produziu 85.597 toneladas de alho, numa área de 10.517 hectares, alcançando uma produtividade média de 8.138(kg/ha). Essa produção rendeu ao Brasil R\$ 265.752.000 (IBGE).

O mercado brasileiro utiliza, comercialmente, dois grandes grupos de alho: um denominado de alhos nobres e um segundo grupo conhecido como seminobres.

Os alhos pertencentes ao grupo nobre possuem cabeça redonda, com bulbos uniformes e grandes, apresentando poucos bulbilhos. Os bulbos têm túnica branca e película de cor rósea ou roxa, necessitando serem vernalizados para bulbificação e apresentando sensibilidade ao pseudoperfilhamento. Já o grupo seminobre caracteriza-se por possuírem alhos de cabeça irregular, com bulbos desuniformes e de túnica branca com película branca a levemente arroxeadada, não necessitando de vernalização para a formação do bulbo. A separação entre e dentro dos grupos ocorre, na maioria das vezes, com base em características morfológicas da planta, e isso requer o plantio e certo período de tempo para que os fenótipos sejam manifestados (MOTA et al., 2004).

1.3 *Allium cepa* – cebola

A cebola é considerada a terceira cultura olerícola de importância econômica no Brasil (cerca de 1.000 ton), ficando atrás, apenas, da batata e do tomate. A quantidade e o valor da produção, quando comparados com os de outros produtos agrícolas, parecem ser insignificantes, mas a cebola constitui atividade socioeconômica de grande relevância para os estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, nos quais se concentram, aproximadamente, 80% da produção nacional (BOEING, 2002)

No Brasil, devido à diversidade climática das diversas regiões do País, a cultura da cebola é desenvolvida ao longo de todos os meses do ano, com maior ou menor intensidade dependendo do estado produtor. A particularidade brasileira de possuir várias safras no decorrer do ano permite que o mercado nacional seja abastecido periodicamente com quantidade de cebola em níveis equivalentes às necessidades de consumo (BOEING, 2002).

1.4 Importância da análise de substâncias sulfuradas

1.4.1 Alho (*Allium sativum*)

O alho é muito utilizado na culinária, e também como fitoterápico, utilizado como diurético, laxante, doenças gastrintestinais, doenças das vias respiratórias, doenças de circulação (hipertensão, arteriosclerose de vasos coronários, debilidade dos músculos cardíacos). Foram feitas pesquisas em laboratórios com animais, que mostraram que o alho ajuda a diminuir o câncer de mama, pele e pulmão, além de ajudar a prevenir o câncer do cólon e do esôfago (ALMEIDA et al. 2008).

Estudos realizados por uma equipe da Universidade da Carolina do Norte mostraram que as pessoas que regularmente comem alho cru ou cozido diminuem pela metade o risco de sofrerem de câncer de estômago, quando comparados aos que não comem alho. Essas pessoas também têm reduzido em dois terços os riscos de sofrerem de câncer do reto. (ALMEIDA et al. 2008).

Dentre inúmeras análises químicas, os cientistas chegaram à conclusão de que a grande riqueza do alho se encontra nos seus componentes, sendo que mais de trinta já foram isolados e caracterizados (**Figura 2**), especialmente os derivados de enxofre, dos quais os mais importantes são alicina, alitiamina, aliina, dissulfeto de dietila, e polisulfureto de alila. Entre eles, o mais importante é, sem dúvida, a alicina (tiosulfinato de dialila), responsável pela maioria das propriedades farmacológicas da planta. Na verdade, a alicina, um líquido de coloração amarelada, só aparece de fato quando o alho é mastigado ou cortado, rompendo-se as células do bulbo (SCHNEIDER, 1984). Quando rompida a parede celular do vegetal, uma enzima chamada aliniase entra em contato com a aliina resultando na formação de alicina (tiosulfinato de dialila), precursor dos compostos odoríferos do alho (ELLMORE; FELDBERG, 1994).

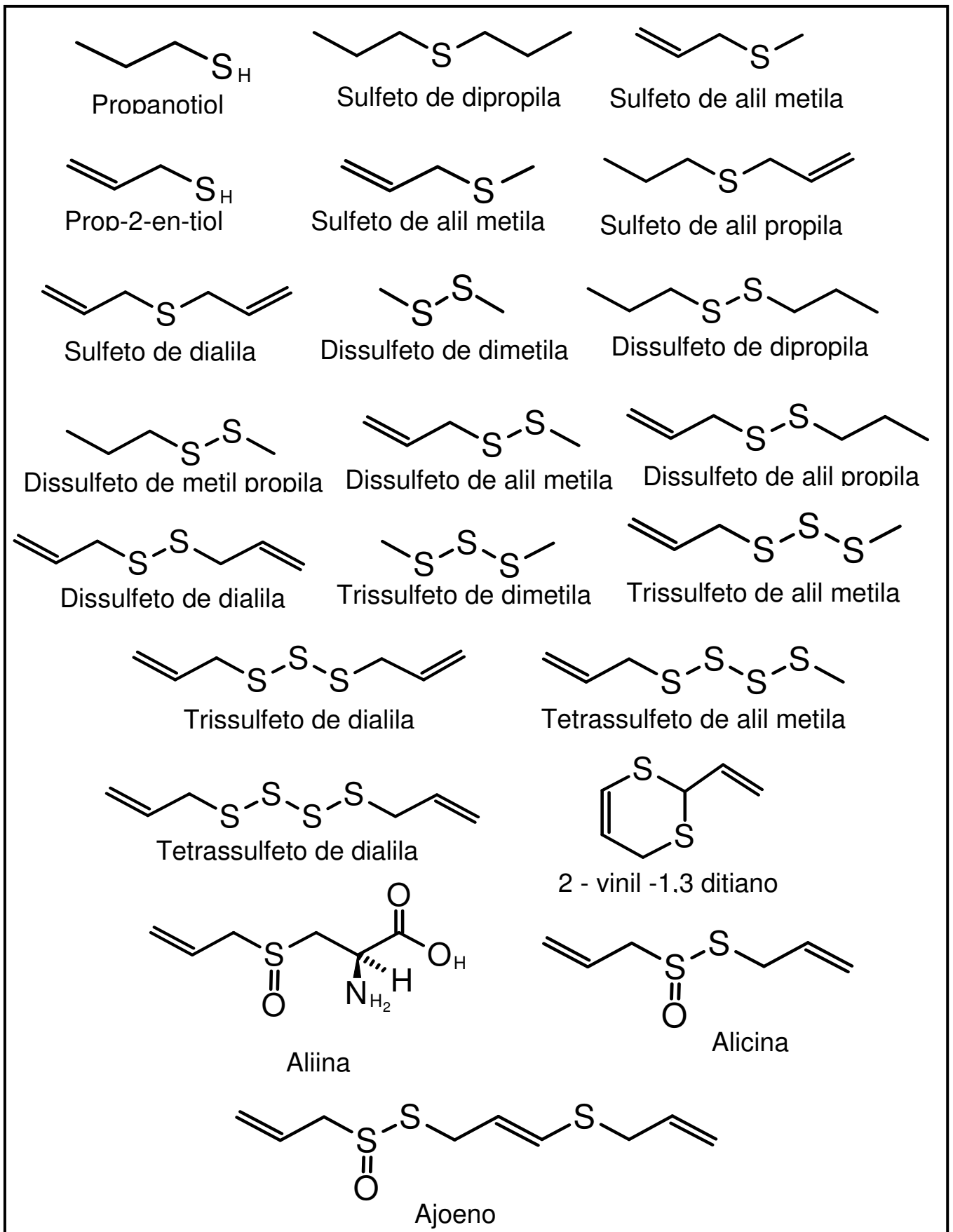


Figura 2: Compostos sulfurados encontrados na espécie *Allium*.

Embora se pensasse inicialmente que a alicina fosse a substância antifúngica ativa *in vivo*, pesquisas demonstraram que a meia vida da alicina não era suficientemente longa para que a ação dessa substância fosse comprovada. Constatou-se então que são os produtos de degradação da alicina (**Figura 3**) que possuem efeito antifúngico *in vivo* (FREEMAN; KODERA, 1995).

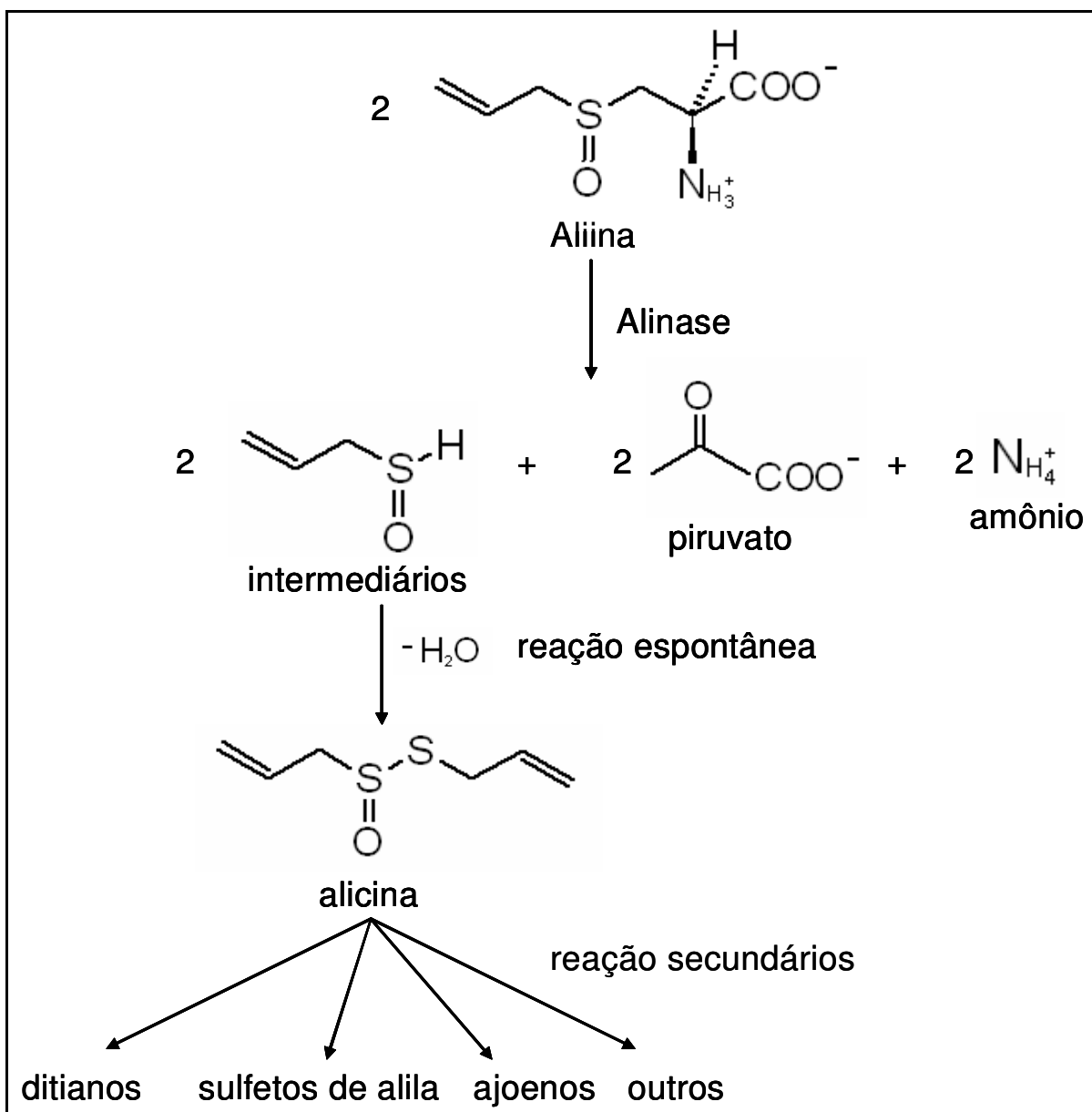


Figura 3: Formação dos produtos de degradação da alicina.

Até o momento não há, na literatura, relato comparativo da composição química de cultivares de alho, no que se refere às substâncias sulfuradas. No entanto, já foi demonstrado que a composição de substâncias polares (saponinas, sapogeninas e flavonóides) em diferentes cultivares de alho e cebola é variável. (LANZOTTI, 2006)

1.4.2 Cebola (*allium cepa*)

Este vegetal é muito utilizado na culinária, havendo relatos da cebola atuando como agente anti-hipertensivo (GRISOLIA; TAKAHASHI, 1991) antitrombótico (BORDIA et al., 1996; CHEN et al., 2000), bactericida (ZOHRI; ABDEL-GAWAD; SABER, 1995), antidiabético (SHEELA; KUMUD; AUGUSTI, 1995; KUMARI; MATHEW; AUGUSTI, 1995; BABU; SRINIVASAN, 1997; ZIYYAT et al., 1997; KELKAR; KAKLIJ; BAPAT, 2001), antioxidante (HELEN et al., 1999; HELEN et al., 2000), agente preventivo ao câncer (FUKUSHIMA et al., 1997; ITO; NAKAMURA; NAKAMURA, 1997; TEYSSIER, 2001) e também à osteoporose (MUHLBAUER; LOZANO; RELINI, 2002). Seus princípios bioativos ainda estão em estudo, mas sabe-se que alguns produtos finais de diversas substâncias bioquímicas, como tiosulfinais, tiosulfonatos, mono, di e tri-sulfetos; possuem diversas atividades benéficas (anticancerígena, antitrombótica, antiasmática e antibiótica) (GRIFFITHS et al., 2002). Por outro lado, dados etnofarmacológicos e etnobotânicos sugerem que o extrato aquoso do bulbo da cebola aumenta o fluxo urinário (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1983; VIEIRA, 1992).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, o risco de homens que comem mais alho e cebola em desenvolver câncer de próstata é 50% menor que os que não fazem o uso destes vegetais na dieta. Foi comprovada que a

atividade dos leucócitos de pessoas alimentadas com alho é 139 % superior em comparação a de pessoas sem alho na dieta. Esta proteção parece ser resultado de vários mecanismos, incluindo: bloqueio da formação de nitrosaminas, hepatoproteção seletiva contra substâncias carcinogênicas, supressão da bioativação de vários carcinogênicos, aumento seletivo do reparo do DNA, redução da proliferação celular e indução de apoptose. Possivelmente vários destes eventos ocorrem simultaneamente e a ação dos componentes sulfurados parece ser influenciada por diversos componentes da dieta (ALMEIDA et al., 2008).

1.5 Análise e identificação de substâncias sulfuradas

A alta complexidade das matrizes biológicas, na grande maioria das vezes, é o limitante na resolução, na detecção e na identificação de analitos sulfurados (DAGAN, 2000). Métodos para determinação destes metabólitos, constituintes importantes de aromas e atividades biológicas, têm sido desenvolvidos. Esses métodos variam de simples testes a complexos métodos físico-químicos e podem ser divididos em diretos e indiretos. Dentro dos métodos indiretos destacam-se a identificação de vários metabolitos secundários por meio da conversão enzimática de sulfóxidos de S-alquencilisteínas em tiosulfatos, sulfóxido de tiopropanal, sulfetos e polissulfetos (FENWICK; HANLEY, 1985). Nos métodos diretos o uso de CLAE com orto-ftaldeído (OPA) como agente derivante é comum (GUSTINE, 1985).

Embora, geralmente, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permita uma reprodutibilidade e precisão adequadas na determinação de sulfurados, existem fatores limitantes, como por exemplo, a baixa resolução cromatográfica e limite de detecção muito alto. Em complemento, a variação no tempo de retenção e as coeluições podem levar a falsa identificação de picos, podendo encobrir a menor

absorção dessas substâncias no ultravioleta (UV). A partir deste ponto de vista, a técnica mais promissora é a Cromatografia Gasosa (CG) com melhor resolução e sensibilidade (KUBEC et al, 1999), além de ser a mais indicada para análise de substâncias voláteis.

Neste trabalho foram utilizados três sistemas de cromatografia gasosa distintos:

1 – GC-FID: cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. Sistema de operação fácil e detecção universal para substâncias orgânicas.

2 – GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Alia a alta capacidade de resolução do GC à sensibilidade, universalidade e informação qualitativa do MS, requisitos úteis na identificação de componentes de uma mistura.

3 – GC-PFPD: A sensibilidade e seletividade do detector fotométrico de chama pulsante a compostos sulfurados facilitam a análise dessas substâncias em misturas complexas com substâncias não sulfuradas.

A seguir são discutidos os princípios operacionais dos detectores nos três sistemas cromatográficos.

1.5.1 *Detector de ionização em chama (FID)*

O detector de ionização em chama tem seu funcionamento baseado no princípio de que a condutividade elétrica de um gás é diretamente proporcional à quantidade de partículas carregadas nele presentes. O gás de arraste, proveniente da coluna, passa pela chama e alguns compostos eluídos serão nela queimados juntamente com o gás hidrogênio (usado como combustível na chama). O comburente mais utilizado é o ar, também podendo ser utilizado o oxigênio.

Quando apenas o gás de arraste passa puro pela chama de hidrogênio, fluirá uma corrente muito pequena - da ordem de 10^{-14} A. Por outro lado, quando houver compostos orgânicos na amostra vaporizada, a chama queimará estes compostos formando CO_2 , água e partículas portadoras de carga. A corrente resultante desse fluxo de partículas carregadas servirá como base para a quantificação das amostras eluídas da coluna. Um dispositivo para facilitar a ignição externa é colocado o mais próximo possível da chama (**Figura 4**) (LANÇAS, 1993).

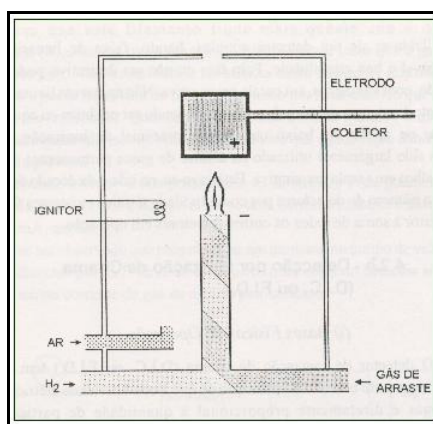


Figura 4: Detector de ionização de chama.

1.5.2 *Espectrometria de massas (MS)*

A espectrometria de massas é, sem dúvida, a técnica analítica instrumental mais diversa que existe na atualidade. Entre suas qualidades pode-se destacar:

- capacidade de identificação. Podem-se identificar qualitativamente diferentes tipos de substâncias, utilizando o tipo de ionização adequado;
- possibilidade de realizar análises quantitativas;
- capacidade de análise de misturas complexas;
- alta sensibilidade e especificidade.

Os componentes de um espectrômetro de massas são, basicamente, os representados na **figura 5** (ESTEBAN, 1996).

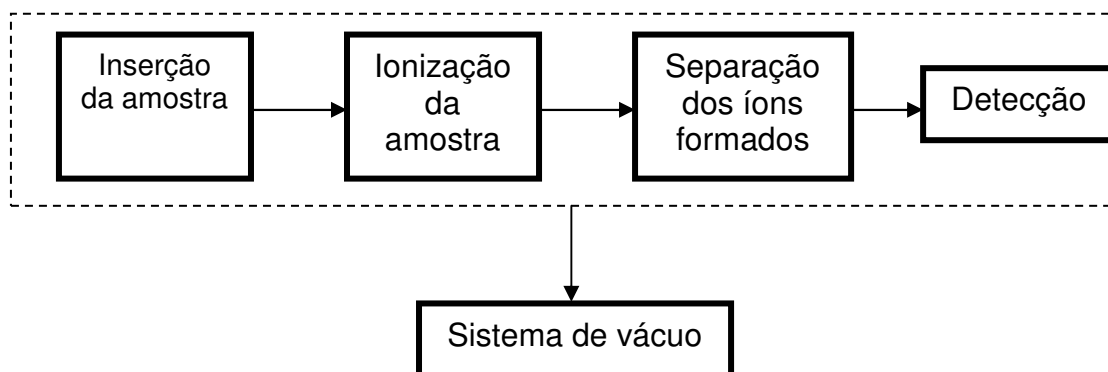


Figura 5: Esquema geral dos componentes de um espectrômetro de massas

Inserção da amostra: a introdução da amostra no espectrômetro de massas se realiza de diferentes maneiras, dependendo da natureza dessa amostra. Esse dispositivo de entrada da amostra deve estar desenhado para situar a amostra no interior do equipamento, onde a pressão é, normalmente, inferior a 10^{-6} mbar e vaporizá-la, no caso dessa amostra não ser gasosa. Em algumas técnicas, como por exemplo, nas ionizações à pressão atmosférica, há duas zonas com vácuos diferentes e, nesse caso, a pressão no ponto de introdução da amostra pode ser alta (ESTEBAN, 1996).

Ionização da amostra: uma vez que a amostra foi introduzida no interior do espectrômetro de massas, se procede a sua ionização mediante diferentes métodos (*electrospray*, ionização por elétrons denominada antigamente por impacto eletrônico, ionização química à pressão atmosférica etc.), segundo o tipo de amostra que está sendo analisada. Essa zona do espectrômetro é denominada de fonte de ionização (ESTEBAN, 1996).

Separação dos íons formados: a amostra ionizada é submetida a campos elétricos e/ou magnéticos que resultam em separação conforme a relação

massa/carga (comumente referida como m/z) do íon. Diferentes princípios de operação resultam em separação por velocidade adquirida pelo íon a partir de um estímulo inicial; por trajetória do íon em um campo magnético ou por condução do íon em um campo elétrico variável capaz de transportar apenas uma faixa muito estreita de m/z , dentre vários outros. Os íons seguem uma trajetória que é desviada mediante a aplicação de campos elétricos ou magnéticos situados na zona denominada analisador (ESTEBAN, 1996).

1.5.3 Cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas (GC-MS)

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação bastante eficiente, conseguindo separar misturas com centenas de componentes. No entanto, uma vez separados, detectados e quantificados todos os componentes individuais, o único dado disponível para a identificação de tais substâncias é o tempo de retenção dos correspondentes picos cromatográficos. Muitas vezes esse dado não é suficiente para uma identificação inequívoca (ARDREY, 2003).

A espectrometria de massas pode identificar, de modo quase inequívoco, qualquer substância individual, mas, a identificação de componentes individuais de uma mistura, devido à complexidade do espectro obtido (superposição dos espectros individuais), pode ficar comprometida (ARDREY, 2003).

O acoplamento dessas duas técnicas é bastante compatível, uma vez que ambas trabalham com a amostra em fase gasosa e requerem pequenas quantidades de amostras na análise. O único obstáculo reside no fato de que o efluente que sai da coluna cromatográfica (o gás de arraste, normalmente com um fluxo entre 1-3

mL/min) está à pressão atmosférica e deve ser conduzido até o interior do espectrômetro de massas, que trabalha em alto vácuo. Esse fluxo é tolerado pelo espectrômetro de massas, cujo sistema de bombeamento consegue manter um vácuo adequado, eliminando o excesso desse gás (ARDREY, 2003).

As substâncias passíveis de análise por cromatografia gasosa precisam preencher, basicamente, dois requisitos: serem voláteis na temperatura utilizada para realizar a separação cromatográfica e serem termicamente estáveis (ARDREY, 2003).

Esses dois requisitos também são necessários para produzir um espectro de massas de um analito utilizando ionização por elétrons ou ionização química como modos de ionização (ARDREY, 2003).

Em resumo, todos os compostos que podem ser analisados via cromatografia gasosa podem ser ionizados e analisados diretamente através dos modos de ionização disponíveis para esse tipo de acoplamento (impacto eletrônico e ionização química), sem a necessidade de uma interface que faça o acoplamento das duas técnicas (cromatografia gasosa e espectrometria de massas) (ALÉCIO, 2005).

As **Figuras 6 e 7** mostram o acoplamento utilizado (acoplamento direto), onde a coluna atinge o interior da fonte de íons através de uma interface aquecida (para evitar condensações durante esse percurso) (ALÉCIO, 2005).

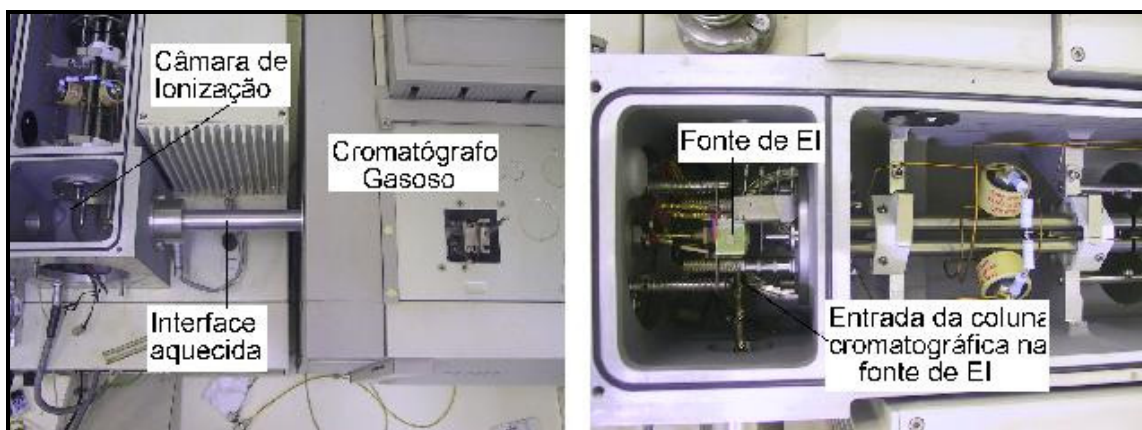


Figura 6: Acoplamento CG-EM.

Figura 7: Acoplamento da coluna cromatográfica (via CG) na fonte de IE.

1.5.4 *Espectrometria de massas de substâncias sulfuradas*

A contribuição do isótopo ^{34}S para o pico M+2 é de 4,4 %, o que facilita a identificação dos compostos sulfurados. O número de átomos de enxofre pode ser determinado pela intensidade da contribuição do isótopo ^{34}S para o pico M+2 (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Os espectros de massas de tióis assemelham-se muito a espectros de álcoois. No entanto, os espectros dos sulfetos, quando comparados aos dos éteres, demonstram diferenças significativas surgidas da baixa energia de ionização dos compostos de enxofre, as quais se situam a aproximadamente 1 eV abaixo dos valores correspondentes aos compostos de oxigênio (BENEVIDES, 2001; VAN DE GRAAF; MACLAFFERTY, 1977)..

Tal fato torna possível a formação de íons de baixa energia molecular, aumentando substancialmente a formação do íon molecular $[\text{M}]^+$ (BENEVIDES, 2001; VAN DE GRAAF; MACLAFFERTY, 1977).

A quebra da ligação σ C-S pode ocorrer com retenção de carga no fragmento contendo enxofre e produzindo um íon estável através da isomerização da estrutura

RCH=SH⁺. Íons tais como HS⁺, H₂S⁺, e CHS⁺ são suficientemente estáveis para se obter séries de íons usados para a caracterização de compostos sulfurados, tendo em vista que poucos outros tipos de compostos têm picos *m/z* 33, 34 e 35. (BENEVIDES, 2001; VAN DE GRAAF; MACLAFFERTY, 1977).

Tióis – exceto no caso das mercaptanas terciárias superiores, o pico do íon molecular das mercaptanas alifáticas é usualmente intenso o bastante para que se possa medir *M*+2 com precisão. Em geral as seqüências de fragmentação assemelham-se às dos alcoóis. A quebra da ligação C-C (ligação α , β) vizinha ao grupo SH do íon característico CH₂=SH⁺ \leftrightarrow ⁺CH₂-SH (*m/z* 47). O enxofre estabiliza menos o fragmento que o nitrogênio, porém mais do que o oxigênio. A quebra da ligação β , γ produz um pico em *m/z* 61 de intensidade aproximadamente igual à metade do pico em *m/z* 47. A quebra da ligação γ , δ forma um pico de baixa intensidade em *m/z* 75, e a quebra na ligação δ , ϵ dá um pico em *m/z* 89 mais intenso do que o pico em *m/z* 75 (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Mercaptanas primárias eliminam uma molécula neutra (H₂S) para dar um pico *M*-34 intenso que, por sua vez, elimina etileno para dar origem às séries homólogas *M* - H₂S - (CH₂=CH₂)_{*n*} (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Mercaptanas secundárias e terciárias sofrem fragmentação no carbono α com perda do grupo maior para dar picos importantes em *M* - CH₃, *M* - C₂H₅, *M* - C₃H₇. Entretanto, pode aparecer também um pico de rearranjo *m/z* 47 em mercaptanas secundárias e terciárias. Um pico em *M* - 33 (perda de HS) está usualmente presente em mercaptanas secundárias (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

A seqüência de fragmentação da cadeia de hidrocarbonetos, em mercaptanas de cadeia longa, aparece sobreposta à seqüência de fragmentação da mercaptana.

Assim como nos álcoois, os picos de alquenila (isto é, 41, 55, 69,...) são mais intensos do que os picos de alquila (m/z 43, 57, 71,...) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Mercaptanas aromáticas passam por fragmentações similares às esperadas para fenóis, as principais exceções são as formações de picos $[M - S]^+$, $[M - SH]^+$ e $[M - C_2H_2]^+$ (MACLAFFERTY; TURECEK, 1993).

Sulfetos alifáticos – o pico do íon molecular dos sulfetos alifáticos é, em geral, suficientemente intenso para que o pico $M+2$ possa ser medido com precisão. As seqüências de fragmentação assemelham-se geralmente às dos éteres. A quebra de uma ou outra das ligações C–C α , β ocorre com favorecimento da eliminação do maior grupo. Os íons primários formados decompõem-se a seguir com transferência de hidrogênio e eliminação de um alqueno. As fragmentações típicas de éteres alifáticos ocorrem também no caso dos sulfetos e o resultado final é o íon $RCH=SH^+$ (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

No caso dos sulfetos não ramificados nos carbonos δ , este íon é $CH_2=SH^+$ (m/z 47), e sua intensidade pode levar à confusão com íon idêntico derivado de uma mercaptana. A ausência dos picos $M - H_2S$ ou $M - SH$ no espectro dos sulfetos, entretanto, é suficiente para a distinção (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Um pico de intensidade média a forte em m/z 61 costuma estar presente no espectro de todos os sulfetos, exceto os sulfetos terciários. Quando existe um substituinte metila na posição α , o íon em m/z 61 que provém da quebra mencionada acima corresponde ao fragmento $CH_3CH=SH^+$ (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Os sulfetos de metila primários sofrem fragmentação nas ligações α , β originando o íon $CH_3 - S=CH_2$ em m/z 61 (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Os sulfetos dão um íon característico por quebra da ligação C-S com retenção de carga no enxofre. O íon resultante RS^+ aparece como um pico em m/z $32 + CH_3$, $32 + C_2H_5$, $32 + C_3H_7$ (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Sulfetos de fenila sofrem reações típicas de seus éteres equivalentes, porém demonstram rearranjos adicionais mais complicados para elucidação estrutural (MACLAFFERTY; TURECEK, 1993).

Dissulfetos - O pico do íon molecular dos dissulfetos contendo até 10 carbonos é relativamente intenso (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Um dos picos mais intensos resulta da quebra da ligação C-S com retenção da carga no fragmento alquila. Outro pico intenso resulta da mesma quebra, com migração, porém, de um átomo de hidrogênio para formar o fragmento RSSH, que retém a carga. Outros picos resultam, aparentemente, da quebra da ligação S-S sem rearranjo ou com rearranjo de um dos átomos de hidrogênio de modo a dar RS^+ , RS^{+1} e RS^{+2} , respectivamente (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

1.5.5 *Detector Fotométrico de Chama Pulsante (PFPD)*

Detectores a base de chama para cromatógrafos gasosos são extensivamente utilizados e constituem, atualmente, os principais detectores moleculares seletivos. Os mais notáveis são o detector de ionização em chama (FID), que é o mais comumente utilizado e seletivo para moléculas orgânicas; o detector fotométrico de chama (PFD), que é usado principalmente para detecção seletiva de moléculas contendo enxofre e fósforo; o detector de ionização termoiônica (TID), muitas vezes chamado de detector de nitrogênio e fósforo (NPD); o detector de emissão infravermelha (FIRE), que é baseado na emissão IV em chama quente e o detector de absorção atômica (AAD), para análise de metais em

nível de traço. Todos eles são fundamentados na existência contínua de uma chama e, conseqüentemente, da combustão dos gases, usualmente hidrogênio e oxigênio (com ou sem ar).

A substância eluída, quando introduzida na chama, tem sua presença indicada pela formação de transportadores de carga (íons positivos, íons negativos ou elétrons) ou espécies excitadas que emitem radiações eletromagnéticas (ultravioleta visível ou infravermelha). Obviamente, com o tempo, foi necessário o aperfeiçoamento desses detectores, em termos de sensibilidade, seletividade, consumo de gás, simplicidade e, conseqüentemente, preço (ATAR; CHESKIS; AMIRAV, 1991).

Por isso, recentemente desenvolveu-se uma nova concepção para os detectores de chama contínua convencional. Em determinações de sulfurados com o PFD ocorre a formação de dióxido de enxofre no detector, o qual pode impregná-lo prejudicando sua eficiência. No PFPD a chama não é contínua como no PFD, pois a chama só acende (pulsa) quando a câmara de combustão está saturada com a amostra eluída da coluna, e assim a formação de SO_2 é minimizada (McMAHON apud ZOCOLO, 2006). Basicamente, os gases combustíveis (H_2 e ar) são misturados em uma pequena câmara de chama e fluem para um fio ignitor de Ni/Cr continuamente aquecido. Assim, a chama acende, é propagada pelo detector e apaga sozinha depois da mistura gasosa combustível ter sido queimada. O detector então é preenchido novamente com a mistura combustível e o processo se repete. O fluxo de gás contínuo remove os produtos de combustão e cria uma ignição adicional, após poucos milissegundos, de uma maneira periódica. Em comparação com o detector fotométrico de chama contínua, o detector de chama pulsante é caracterizado pelo fluxo reduzido de gases, necessário para permitir apenas a

propagação da chama, pelo pequeno acúmulo de gás na câmara e pela fonte de ignição de chama periódica (CHESKIS; ATAR; AMIRAV, 1993). O esquema de um detector fotométrico de chama pulsante está apresentado na **figura 8**.

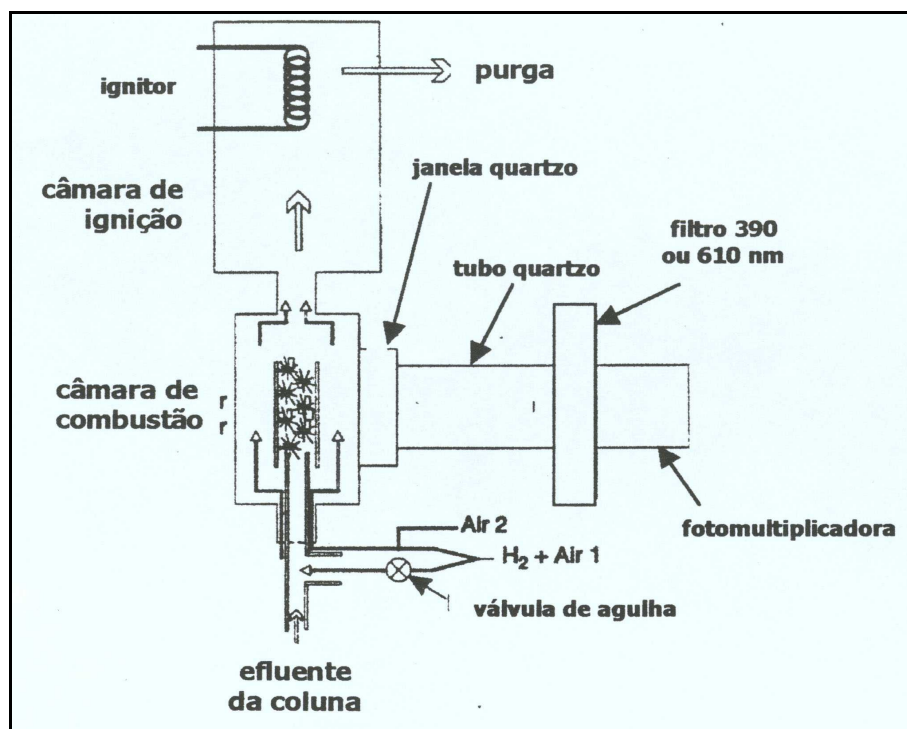


Figura 8: Esquema de um detector fotométrico de chama pulsante (VARIAN ASSOCIATES, 1997).

A pulsação da chama envolve quatro estágios (VARIAN ASSOCIATES, 1997), que são apresentados na **figura 9**.

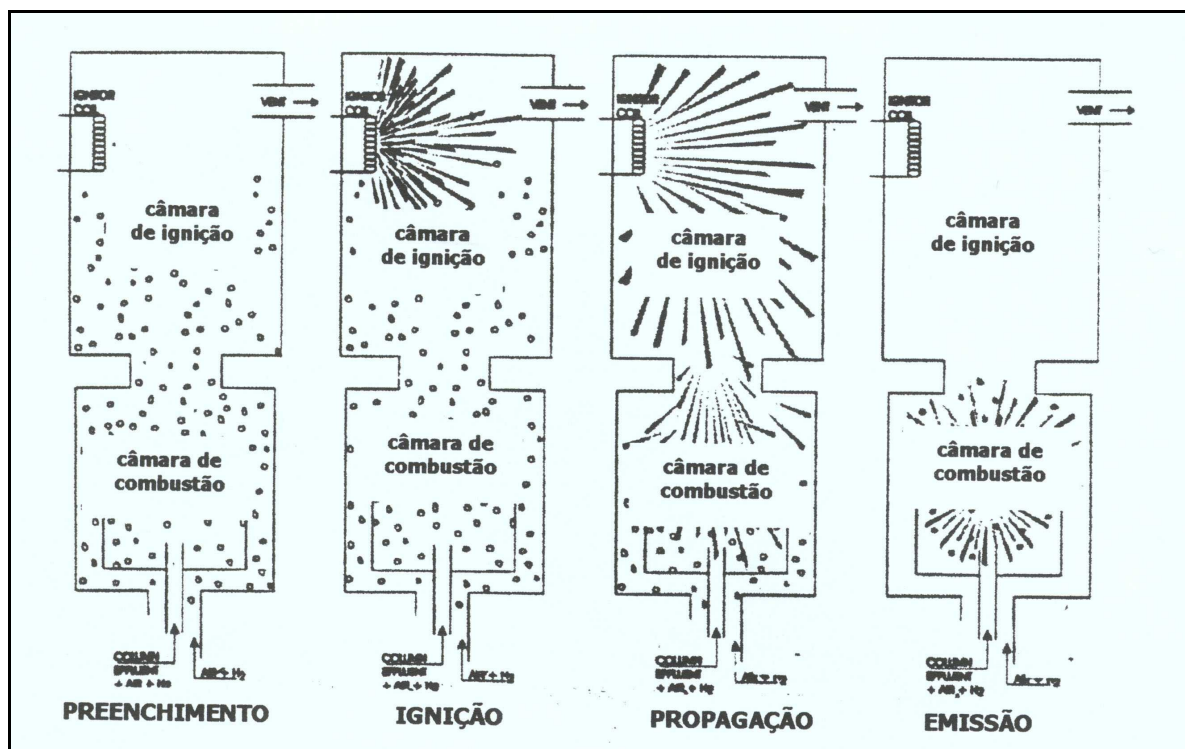


Figura 9: Estágios de pulsção da chama em um detector fotométrico de chama pulsante (VARIAN ASSOCIATES, 1997).

Preenchimento: H₂ e ar se misturam e entram na câmara de combustão por dois pontos. Parte do fluxo de gás combustível se mistura com o efluente da coluna e se move em direção ascendente passando pelo interior do tubo combustor de quartzo. Uma segunda parte do fluxo passa pelo exterior do tubo de quartzo e entra na câmara de ignição (VARIAN ASSOCIATES, 1997).

Ignição: A câmara de ignição contém uma bobina ignitora continuamente aquecida. Quando a mistura de gás combustível atinge a bobina aquecida, a mistura se incendeia e acende a chama (VARIAN ASSOCIATES, 1997).

Propagação: a chama é propagada descendente pela câmara de combustão. No fundo da câmara, a chama se extingue. Durante essa fase de propagação, as moléculas dos produtos de combustão da chama são “quebradas” e transformadas em moléculas simples ou átomos (VARIAN ASSOCIATES, 1997).

Emissão: Durante e após a propagação da chama, os átomos da amostra de interesse sofrem outra reação para formar espécies eletronicamente excitadas, a partir das quais a luz é emitida. A emissão da chama se completa dentro de menos de 0,3 milissegundos após a propagação, enquanto as espécies de interesse emitem mais tarde. Essa diferença nos tempos de emissão é que produz detectividade e seletividade realçada (VARIAN ASSOCIATES, 1997).

O PFPD é indicado para análises de sulfurados por realizar o “*auto-cleanup*” da amostra, pelo princípio da propagação da chama pulsada e por ter melhor seletividade e alta sensibilidade para compostos de enxofre (VARIAN ASSOCIATES, 1997).

Como o PFD convencional, o PFPD utiliza uma chama ar/hidrogênio. Chamas ricas em hidrogênio favorecem uma variedade de reações químicas em fase gasosa, algumas das quais produzem produtos moleculares que emitem luz (isto é, reações quimioluminescentes), incluindo CH^* , CH_2^* e OH^* . A luz emitida por esses produtos é chamada de emissão de fundo, e apresenta máximo próximo de 436 nm. Com o PFPD é possível separar a emissão de fundo da emissão dos produtos moleculares excitados dos compostos de interesse analítico, aumentando a detectividade e seletividade. Além disso, um aumento adicional nas emissões relativas dos elementos de interesse é atingido através da escolha apropriada da composição da mistura de gases combustíveis, como por exemplo, a espécie S_2 é favorecida por chamas ricas em hidrogênio. Outros parâmetros que devem ser controlados para obter-se uma boa detecção são o “*gate delay*” e o “*gate width*”, que são usados para selecionar o período de tempo da emissão que deve ser integrada, eliminando interferências e selecionando a detecção. As diferenças nos tempos de emissão estão representadas na **figura 10**. Para a análise de sulfurados, o “*gate delay*”

sugerido para evitar emissão de fundo é cerca de 4 milissegundos e o “*gate width*” situa-se em 10 milissegundos. Recomenda-se a utilização de um filtro de enxofre em 395 nm (VARIAN ASSOCIATES, 1997).

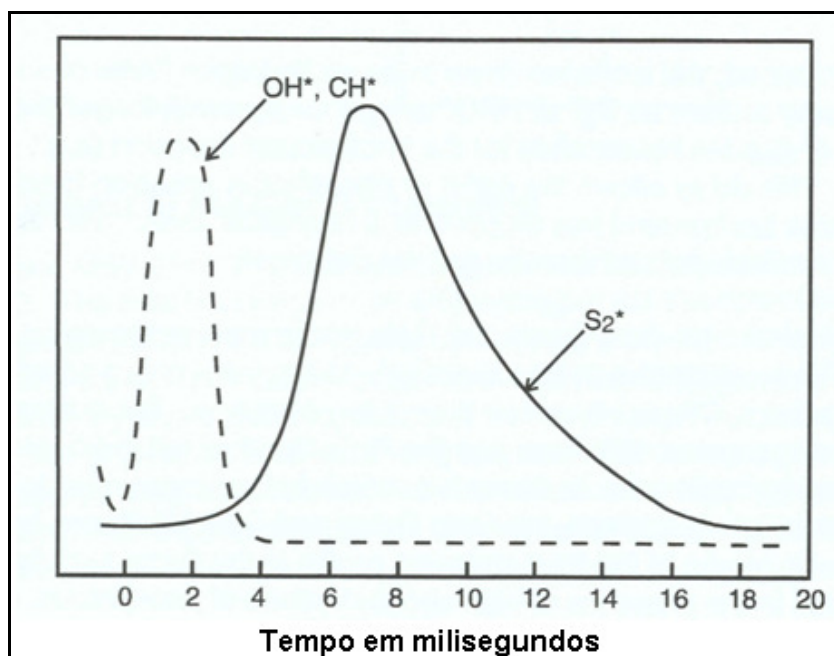


Figura 10: Curva do tempo de emissão das espécies OH^* , CH^* e S_2^* , nos estados excitados (VARIAN ASSOCIATES, 1997).

1.5.6 *Extração por SPME (microextração em fase sólida)*

A SPME tem aplicações em áreas como análise ambiental e de solos, água, alimentos, produtos naturais e farmacêuticos, análise clínica e forense (ARTHUR; PAWLISZYN, apud VALENTE; AUGUSTO, 2000). Sendo uma técnica relativamente nova (da década de 90) continua em consolidação (SARAULLO, apud VALENTE; AUGUSTO, 2000 e SCHÄFER, apud VALENTE; AUGUSTO, 2000), tanto sob o aspecto de fundamentação teórica, quanto sob os de aplicações.

SPME é uma microtécnica, em que os processos de extração e pré-concentração de analitos ocorrem numa escala dimensional que não é das mais usuais. O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida (FS) de 100 μm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberto

com um filme fino de um polímero (ex: polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA ou Carbowax = Cwx) ou de um adsorvente sólido (ex: carvão ativo microparticulado = Carboxen) (SUPELCO, apud VALENTE; AUGUSTO, 2000). O detalhe da **Figura 11** representa uma fibra comercial em que o recobrimento, ou filme extrator, tem espessura de 100 μm .

As espessuras dos recobrimentos, L_f , de fibras comerciais variam de 7 μm a 100 μm e seus volumes de 0,03 μL a 0,7 μL (SHIREY; MANI E PAWLISZYN, apud VALENTE; AUGUSTO, 2000).

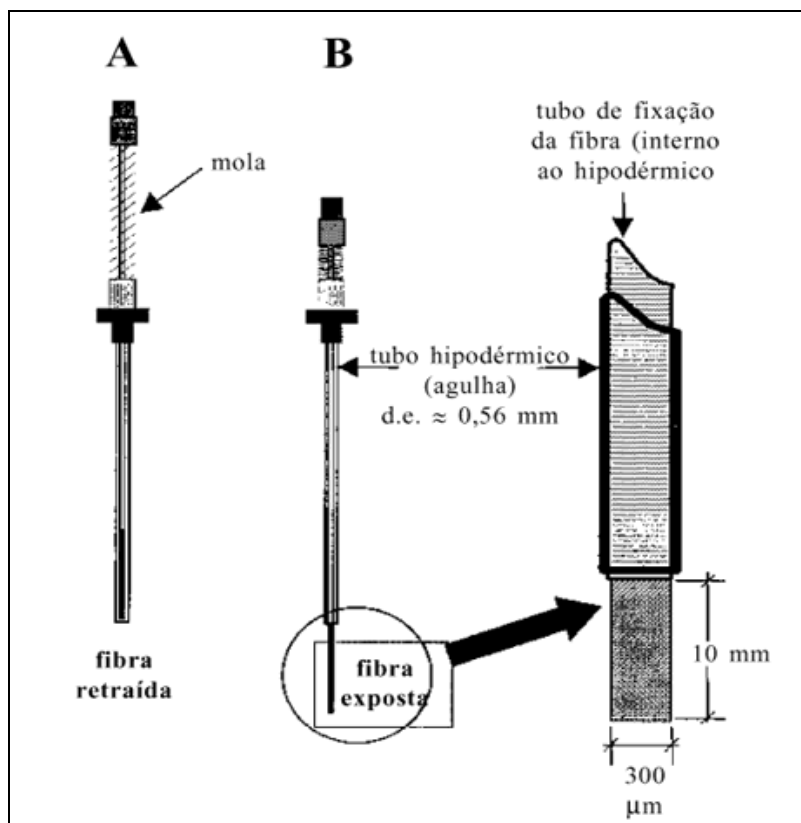


Figura 11. Dispositivo de fibra de SPME: (A) Posição com a fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico de diâmetro externo 0,56 mm), (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da seção com recobrimento de 100 μm de espessura.

Numa extração por SPME as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de

massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve (**Figura 12**). Portanto, a teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas. (PAWLISZYN, apud VALENTE; AUGUSTO, 2000).

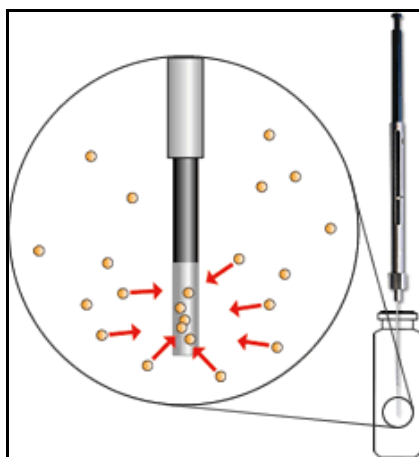


Figura 12. Equilíbrio de partição entre a fibra e o meio que a envolve.

A extração ocorre mergulhando-se a seção recoberta na amostra (expor a fibra ao líquido da amostra), ou no seu "headspace" (espaço vazio) (**Figura 13**).

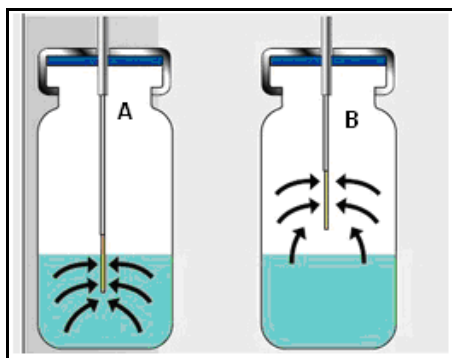


Figura 13. A extração por ser feita mergulhando-se a fibra ao líquido da amostra (A), ou exposta coletando os vapores da amostra(B).

Com o dispositivo da fibra (**Figura 11**) e o amostrador (uma espécie de seringa, **Figura 14**) o manuseio das fibras para extração é bastante facilitado. A

fibra, que não pode ser manipulada diretamente (frágil), é usada com o amostrador, como mostrado na **Figura 14**, a fibra é presa a um êmbolo. Na extremidade oposta ao êmbolo, o tubo hipodérmico fica exposto, no corpo do amostrador existe uma fenda em forma de "Z", na qual corre um pino que, preso ao êmbolo, guia o seu deslocamento (**Figura 14B**). No movimento de exposição da fibra, quando o pino atinge o corte transversal da fenda (**Figura 14B**), um pequeno giro do êmbolo trava a fibra na posição "exposta".

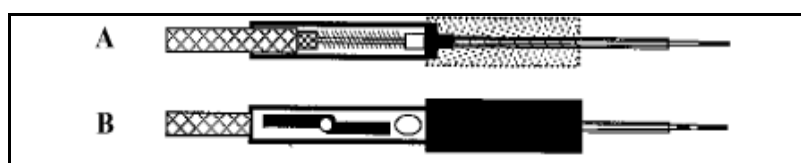


Figura 14. (A) Vista interna do amostrador de SPME com a fibra exposta, (B) Vista com a fibra exposta e o êmbolo travado pelo pino no centro da fenda em "Z".

A sequência de procedimento para realizar a extração e a dessorção no injetor do cromatógrafo é mostrada na **Figura 15**.

Com a fibra retraída na agulha, o septo do frasco de amostra é perfurado e a fibra é exposta à amostra. Terminado o tempo de extração a fibra é novamente retraída, a agulha é retirada do septo e levada para inserção no CG. Com a fibra retraída o septo do injetor é perfurado, a fibra é exposta para dessorção térmica e, terminada a dessorção, é retraída e a agulha retirada. Após o procedimento é altamente recomendável vedar a agulha com um pedaço de septo, para evitar contaminações da fibra, o que também auxilia amostrar em locais distantes e transportar o conjunto para o laboratório (SHIREY; MANI, apud VALENTE; AUGUSTO, 2000).

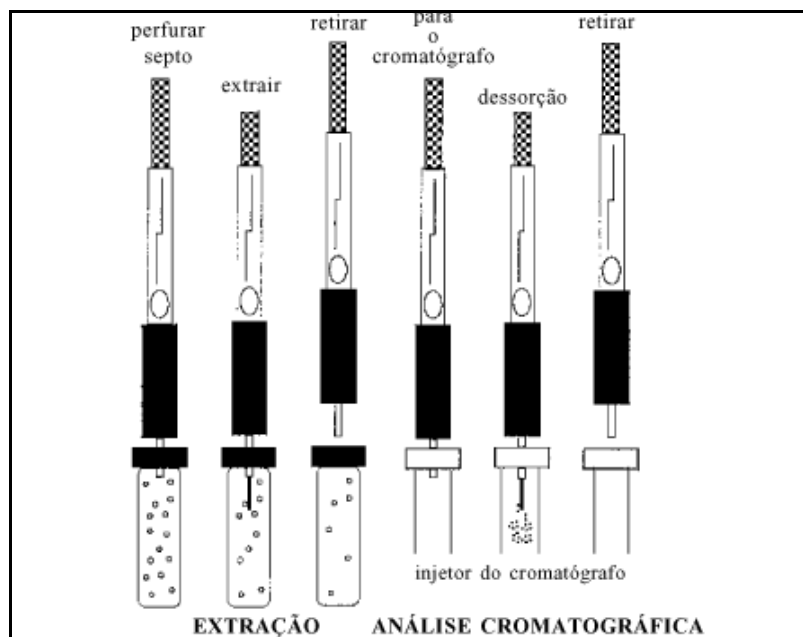


Figura 15. Uso do amostrador de SPME para o processo de extração (adsorção) e de dessorção do material extraído para a análise por GC.

As fibras disponíveis comercialmente para CG estão relacionadas na **(Tabela 1)**. As sugestões de aplicações desta tabela são necessariamente genéricas, pois as fibras relacionadas foram desenvolvidas para uso geral. Fibras para problemas específicos ainda não são comercializadas (PAWLISZYN, apud VALENTE; AUGUSTO, 2000)

Tabela 1. Fibras de SPME disponíveis comercialmente (SHIREY; MANI, E SUPELCO, apud VALENTE; AUGUSTO, 2000)

Tipo ¹	Composição Química	$L_f/\mu\text{m}$	$\Delta T\text{ }^\circ\text{C}^2$	Aplicação sugerida
Não Polares	Polidimetilasiloxino (PDMS)	100; 30; 7	200-270 200-320	Basicamente para compostos apolares. É possível usar com polares
Polares	Poliacrilato (PA)	85	220-310	Medianamente a altamente polares, como fenois, pesticidas organofosforados, cetonas, alcoois. Voláteis de média a alta polaridade
	Carbowax/divinilbenzeno (CW-DVB)	65	200-270	
Bi-polares	PDMS-DVB	65	200-270	Voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade.
	Caboxen/PDMS	75	-	Voláteis.

Legenda: ¹ Não estão relacionadas fibras para cromatografia líquida; ². $\Delta T\text{ }^\circ\text{C}$ = faixa de temperatura indicada para dessorção, L_f : espessura do recobrimento.

2. REVISÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS SULFURADOS DE *ALLIUM*

Os compostos sulfurados voláteis do alho e cebola têm sido muito estudados nos últimos anos, sendo que diversas técnicas têm sido utilizadas, tais como GC-MS, GC-FID, HPLC-UV e outras apresentadas resumidamente na **tabela 3**. Na **tabela 2** estão apresentados alguns compostos sulfurados identificados e seus respectivos índices de Kovats.

O primeiro método foi desenvolvido em 1973 por Freeman e McBreen, que baseava-se na determinação espectrofotométrica rápida dos tiosulfinatos na cebola fresca, seca a frio (liofilizada), e seca em estufa, após extração com hexano. Os resultados indicaram correlação com a concentração do piruvato, que está associado ao limiar olfatório do suco de cebola. (FREEMAN; MCBREEN, 1973)

Após 20 anos muitos cientistas começaram trabalhar neste assunto. Lawson et al., 1991 executaram análise quantitativa de todos os alquil e alquenil tiosulfinatos detectáveis em homogenatos de alho, incluindo configurações isômeras, usando um método em CLAE-UV com fase estacionária C18. Os tiosulfinatos puros sintetizados ou isolados foram identificados por RMN de ^1H , e seus coeficientes da extinção determinados. Alguns isômeros configuracionais requereram separação por CLAE – sílica. A variação nos teores de tiosulfinatos, considerando origem (países diferentes), bulbos, dentes e os tempos de armazenamento, foram investigados. Os resultados indicaram variações significativas na composição e teor de sulfurados nas várias amostras de alhos e principalmente de produtos obtidos a partir de alho em pó e óleo de alho (LAWSON; WANG; HUGHES, 1991¹ e LAWSON; WOOD; HUGHES, 1991²).

Em 1992, Sinha et al., publicaram um método baseado na extração supercrítica com dióxido de carbono (SC-CO₂) das cebolas e análise quantitativa por CG-EM. Esta análise evidenciou a presença de 28 compostos de enxofre, incluindo alicina. Comparação do extrato SC-CO₂ com o óleo obtido por destilação por arraste a vapor evidenciou diferenças marcantes na composição de sulfurados entre estas duas técnicas. (SINHA et al., 1992)

Em 1998, Mochizuki e Yamoto utilizaram as técnicas GC-MS e GC-PFD para analisar a composição de compostos sulfurados de várias espécies de *Allium*. A preparação das amostras foi realizada como segue: amostras frescas foram trituradas e submetidas à hidrodestilação, por um período de 45 minutos. O hidrolato foi extraído com éter etílico e submetido às análises cromatográficas. Foram identificados 25 compostos sulfurados, com distribuição característica em cada espécie de *Allium* estudada (MOCHIZUKI; YAMOTO, 1998).

Em 2001, Mondy et al., identificaram compostos sulfurados voláteis, utilizando extrações dos voláteis por *headspace*-SPME, e extração do óleo essencial por solventes orgânicos e injetados em GC-MS, seus resultados foram comparados com os de HPLC-UV. A injeção no GC-MS de alho fresco conduziu a resultados muito diferentes. Conclui-se que o processo cromatográfico pode detectar alicina por GC-MS, mas a maior parte dela é degradada durante a cromatografia. As análises em HPLC-UV permitem a quantificação simultânea de alicina e a diferenciação dos grupos da espécie de *Allium* (MONDY et al, 2001).

Em 2004, Calvo-Gómez et al., publicaram um método baseado na extração do óleo essencial do alho por hidrodestilação. Os compostos voláteis do óleo essencial foram extraídos utilizando *headspace*-SPME, foram injetados e identificados por CG-MS. Neste estudo comparou-se a performance de 8 fibras de

SPME de diferentes polaridades (Carboxen/Polidimetilsiloxano 75 µm (CAR-PDMS), Polidimetilsiloxano 100, 30 e 7 µm (PDMS), Poliacrilato 85 µm (Pa), Polidimetilsiloxano divinilbenzeno 65 µm (PDMS-DVB), Carbowax divinilbenzeno 65 µm (CW-DVB) e Divinilbenzeno Carboxen Polidimetilsiloxano 50/30 µm (DVB-CAR-PDMS)) e foram identificados 47 compostos sulfurados e não sulfurados considerando as análises com as diferentes fibras de SPME (CALVO-GÓMEZ et al, 2004).

Tabela. 2: Índice de Kovats de alguns compostos sulfurados.

COMPOSTO	MM	COLUNA	INDICE DE KOVATS	Referência
sulfeto de dimetila	62	HP-5	505	LEFFINGWELL; ALFORD, 2005.
metanotiol	48	HP-5	500	CARRAPISO et al., 2002.
2-metil tirano	74	DB-5	650	MACKU; SHIBAMOTO, 1991.
metiltiolacetato	90	DB-5	701	BEAULIEU; GRIMM, 2001.
dissulfeto de dimetila	94	SE-54	734	REMBOLD et al., 1989.
etiltiolacetato	104	SE-54	767	WEENEN; KOOLHAAS; APRIYANTONO, 1989
2-metiltiofeno	98	DB-5	780	MACKU; SHIBAMOTO, 1991.
Sulfeto de alila	114	HP-5	861	KUBEC et al., 1997.
alil mercaptano	74	DB-5	871	KIM et al., 1995.
sulfeto de dipropila	118	HP-5	894	KUBEC et al., 1999.
2,4 dimetiltiofeno	112	HP-5	878	KUBEC et al. 1997.
disulfeto de dietila	122	SE-54	927	MACKU; SHIBAMOTO, 1991.
sulfeto de alil metila	88	DB-5	922	KIM et al., 1995.
Trissulfeto de dimetila	126	DB-5	950	QIAN; REINECCIUS, 2003.
2-propiltiofeno	126	DB-5	966	MACKU; SHIBAMOTO, 1991.
1,2 ditiano	106	HP-5	978	KUBEC et al. 1997.
Tiofeno	84	BPX-5	667	MACHIELS et al., 2003.
2 metil- 1,3-ditiano	134	HP-5	1033	KUBEC et al., 1997.
3,3,5,5-tetrametil-1,2,4-tritiolano	180	HP-5	1233	KUBEC et al., 1997.
Trissulfeto de dialila	178	HP-5	1297	KUBEC et al., 1997.
Disulfeto de carbono	76	DB-5	568	BEAULIEU; GRIMM, 2001.

Tabela. 3: Métodos desenvolvidos para a análise de substâncias voláteis do alho e cebola

Matriz	Métodos	Referências
Cebola	E/RSD	FREEMAN; McBREEN, 1973.
	E/HPLC CHIRAL	BAUER et al., 1991.
	SC-CO2/GC-MS	SINHA et al., 1992.
	SD/GC-MS]	SINHA et al., 1992.
	E/CRYOGENIC GC-MS	Block et al., 1992 ¹ . Block et al., 1993.
	E/HPLC/1H-NMR	Block et al., 1992 ² . Block et al., 1993.
	SFE-MS	CALVEY et al., 1994.
	SFE/GC-MS	CALVEY et al., 1994 ² .
	SFE/LC-MS	CALVEY et al., 1997.
	E/GC	SCHMIDT et al., 1996.
	E/GC	HONG et al., 2000.
	E/GC-MS	MONDY et al., 2001.
	E/HPLC-UV (DAD)	MONDY et al., 2001.
	SPME/GC-MS	MONDY et al., 2002.
	SPME/LC-MS	MONDY et al., 2002.
	E/PTV-GC-AED	JUNYAPOON et al., 1999.
	PTV-GC-ITD/MS	JUNYAPOON et al., 1999.
Alho	SD/HPLC REVERSED/1H NMR	LAWSON et al., 1991 ¹ .
	SD/HPLC REVERSED/1H NMR	LAWSON et al., 1991 ² .
	E/HPLC/1H NMR	BLOCK et al., 1992 ² . BLOCK et al., 1993.
	SFE-MS	CALVEY et al., 1994 ¹ .
	SFE/GC-MS	CALVEY et al., 1994 ² .
	SFE/LC/MS	CALVEY et al., 1997.
	E/RSD (NTB)	MIRON et al., 1998.
	E/RSD (4-MP)	MIRON et al., 2002.
	SYNTHESIS/SPE/UV	CRUZ-VILLALON, 2001.
	E/TLC	KEUSGEN, 1997.
	GLDE/GC	LEE et al., 1996.
	SD/GC	LEE et al., 1996.
	E/HPLC	NIKOLIC et al., 2001.
	E/PTV-GC-AED	JUNYAPOON et al., 1999.
	PTV-GC-ITD/MS	JUNYAPOON et al., 1999.
	E/HPLC REVERSED/UV	BOCCHINI et al. 2001.
	LC-APCI-MS	CALVEY et al., 1997.
	TLC-HPLC- UV-light - H NMR	NAZNIN et al., 2008.
	GC-MS/HPLC-UV/HPLC-MS	MONDY et al., 2001.
	GC-MS/LC	CALVEY et al., 1994 ¹ .
	GC/MS-GC/FPD	MOCHIZUKI; YAMOTO, 1998.
	PTV-GC-AED/ GC-ICP-MS	JUNYAPOON et al., 1999.
	HRGC-MS	GRANVOGL et al., 2004.
GC-MS	HORI, 2007.	
GC-MS, GC-FID, HPLC, FT-Raman, UV.	KIMBARIS et al., 2006.	
SPME-GC-MS	CALVO-GÓMEZ et al., 2004.	

Legenda: Cryogenic GC-MS - criogenia para Cromatógrafo Gasoso acoplado com espectrômetro de massa, E- extração, GC-AED - Cromatógrafo Gasoso acoplado a um detector por emissão atômica, GC-ITD/MS - Cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas “detector - íon trap”, GLDE – extração por dospersão gás-liquido, LC - cromatografia líquida HPLC CHIRAL - cromatografia líquida de alta eficiência com coluna quirál, HPLC REVERSED - cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de fase reversa, LC-MS -

Cromatógrafo Líquido acoplado a Espectrômetro de Massa, PTV – injetor de vaporização com temperatura programada, RSD – determinação espectrofotométrica rápida, RSD (4-MP) - determinação espectrofotométrica rápida (4 mercaptopridina), RSD (4-MP) - determinação espectrofotométrica rápida (2 nitro – 5 benzoato), SD – destilação arraste a vapor, SC-CO₂ - Extração Supercrítica com Dióxido de Carbono, SFE - Extração *com* Fluido Supercrítico, SFE – extração em fase sólida, SPME – microextração em fase sólida, SYNTHESIS – síntese da alicina, UV (DAD) – ultravioleta – detector de arranjo de diodos.

3. OBJETIVO

Considerando a importância de compostos sulfurados voláteis quimioprotetores produzidos principalmente depois da fragmentação dos tecidos vegetais de espécies *Allium* ssp, a inexistência de método robusto para a análise dessas substâncias e, conseqüentemente, a ausência de relatos de compostos orgânicos sulfurados em diferentes cultivares de espécies de *Allium* in natura e em produtos deles derivados, propõe-se como objetivo geral dessa dissertação:

Desenvolver e validar um método cromatográfico para análise de compostos sulfurados voláteis presentes em plantas frescas de *Allium* ssp.

- Identificação do maior número de compostos sulfurados através de índice de retenção (Kovats) e espectrometria de massa (GC-MS);
 - Aplicação do método em amostra de óleo essencial (comercial);
- Comparação do perfil de voláteis sulfurados de alho e cebola.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégia experimental

Após a realização da revisão bibliográfica dos métodos descritos na literatura para as análises de sulfurados em cultivares de alho e cebola, propôs-se uma estratégia experimental constituída das seguintes etapas:

1. - Avaliação dos procedimentos de tratamento da amostra de alho e cebola
2. - Avaliação de alguns métodos de extração;

3. - Estabelecimento de condições cromatográfica;
4. - Comparação da performance (sensibilidade e seletividade) dos detectores FID, PFPD e MS;
5. - Avaliação da eficiência do método, considerando os parâmetros:
 - 1- coeficiente de variação (precisão)
 - 2- limite de detecção
 - 3- reprodutibilidade

4.2 Amostra

O cultivar de alho analisado para o desenvolvimento do método foi alho nacional, adquirido no mercado comercial de Araraquara - SP em junho/julho de 2008 e os cultivares utilizados para validação foram alho chinês e alho nacional, fornecidos no mês de janeiro de 2009 (final da safra) pela Temperalho (Indústria, Comercio, Importação e Exportação - Ltda) de Jacanga – SP.

Os cultivares de cebola utilizados para no desenvolvimento do método foram Luana, carta-branca, Dow-victor, hibrido-colina, hibrido-gobi, optima-f1, super-rex e hibrido natah rahi fornecidos pela Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé Ltda - São José do Rio Pardo – SP. Para a otimização do método utilizou-se cultivares de cebola adquiridos no mercado comercial de Araraquara no periodo de junho-agosto de 2008 (durante a safra) e para a validação do método foram utilizadas cultivares de cebola: Superex, Optima e Baia Paraná orgânica, também fornecidos pela Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé Ltda - São José do Rio Pardo – SP no mês de janeiro de 2009 (final da safra)

4.3 Solvente e padrões

Foram utilizados solventes (eter etílico, acetato de etila e hexano) de grau analítico (Synth, Diadema, Brasil) e água ultra pura (18M Ω) obtida no sistema Milli-Q (MILLIPORE, BEDFORD, ESTADO UNIDOS).

Os padrões dos compostos sulfurados disulfeto de dimetila, 99,4% de pureza (lote: 13515-229), sulfeto de alila, 99,9% de pureza (lote: 01606-667), disulfeto de dialila 71% pureza (lote: 01605-4DD) e disulfeto de dipropila 99,3% de pureza (lote:16280-629) foram adquiridos da empresa Chromadex (Irvine, CA, USA).

4.4 Preparação das amostras e métodos de extração

4.4.1 Tratamento da amostra de alho e cebola

Foram testados seis procedimentos para o tratamento (trituração) das amostras de alho e cebola (**Tabela 4**).

Tabela 4: tipos de extrações verificadas com seus respectivos tratamento.

Código	Amostra	Trituração	Extração	Tratamento
1	cebola	Manual com faca	AV M	Uma parte da amostra foi bem picada e a outra descartada.
2	alho/cebola	Manual com faca	HS	Uma parte da amostra foi bem picada e a outra conservada em geladeira a 5°C.
3	alho/cebola	Triturador automático Com adição de água	HS HS-SPME	Pedaços de amostra foram cortados com uma faca e colocados em um béquer de 100 mL com 50 mL de água e triturados.
4	alho/cebola	Triturador automático (sem adição de água)	HS HS-SPME	Pedaços de amostra foram cortados com uma faca e colocados em um béquer de 100 mL e triturados.
5	alho/cebola	Manual com faca Sem nitrogênio líquido	HS HS-SPME	Quantidades suficientes foram picada e distribuídas em 3 frascos para extração em triplicata, sendo que uma alíquota da amostra foi extraída e as demais foram conservadas em geladeira a uma temperatura de 5°C para extrações posteriores.
6	alho/cebola	Manual com faca Com nitrogênio líquido	HS HS-SPME	Quantidades suficientes foram picada e transferidas para um almofariz e moídos com nitrogênio líquido. O pó fino obtido foi distribuído em 3 frascos para extração, sendo que uma alíquota da amostra foi extraída e as demais foram conservadas em geladeira a uma temperatura de -80°C para extrações posteriores.

Legenda: AV - destilação por arraste a vapor, M - maceração, HS - *headspace*, HS – SPME- *headspace* -SPME.

Foram avaliados quatro métodos para a extração dos compostos sulfurados voláteis de alho e cebola:

Extração por arraste a vapor - AV

Maceração - M

Extração por *headspace* - HS

Extração por *headspace*-SPME - HS - SPME

4.4.2 Quantidade de amostra

Para os procedimentos de extração avaliou-se a quantidade de amostra picada de alho e cebola colocada nos frascos de extração. As quantidades avaliadas foram: 50,0, 20,0, 15,0, 5,0 e 2,5 g.

4.4.3 Preparo de amostra de alho e cebola para análise de sulfurados

Os cultivares de alho e cebola antes da trituração foram mantidos por uma hora em geladeira a temperatura de cerca de 5 °C, após uma hora foram triturados, uma alíquota foi para extração e a outra mantida nas condições adequada de cada método, como mostra os fluxogramas das paginas 62 e 63.

4.4.4 Extração por destilação por arraste a vapor

Cerca de 50 g de amostra foram picados (trituração 1) e transferidos para o compartimento de amostra. Vapor de água, gerado em um balão à parte, foi forçado a passar pela amostra, durante 5 minutos, arrastando os componentes voláteis (TELASCREA et al. 2007 e MARCHETTI et al. 2006.). Para a extração do óleo

essencial do hidrolato obtido foram testados os seguintes solventes: hexano, éter etílico, hexano/acetato de etila 8:2 v/v e acetato de etila. Após a extração, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e submetida à análise cromatográfica.

4.4.5 Maceração

Foram testados três procedimentos para a extração por maceração:

1- Cerca de 50 g de amostra foi triturado (trituração 2), transferido para um almofariz e macerado juntamente com 20 mL de hexano. Em seguida o extrato foi filtrado, seco com sulfato de sódio anidro e analisado por cromatografia gasosa.

2- Cerca de 50 g de amostra foi picado (trituração 2), transferido para um almofariz e triturado com nitrogênio líquido. O pó fino obtido foi macerado em 20 mL hexano. O extrato obtido foi filtrado e seco com sulfato de sódio anidro e analisado por cromatografia gasosa.

3- Em um béquer de 250 mL adicionou-se 50 mL de hexano a cerca de 50 g de pedaços de cebola. Após 24 horas, a temperatura ambiente, o extrato obtido foi filtrado, seco com sulfato de sódio anidro e analisado por cromatografia gasosa.

4.4.6 Extração por headspace (HS)

Foram testados quatro procedimentos para a extração por *headspace*:

1- Aproximadamente 50 g de amostra foram picadas (trituração 2), e colocados em frascos de 40 mL, hermeticamente fechados com tampas de silicone. Alíquotas de 300 µL da fase vapor foram coletadas através de uma microseringa de 500 µL nos tempos 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 minutos e analisadas por cromatografia gasosa. Este procedimento foi feito só com cultivares de cebola.

2- Aproximadamente 50 g de amostra foram picadas (trituração 3), em seguida a mistura foi colocada em frasco de 40 mL, hermeticamente fechado com tampa de silicone. Alíquotas de 300 µL da fase vapor foram coletadas através de uma microseringa de 500 µL nos tempos 15 e 80 minutos e analisadas por cromatografia gasosa.

3- Aproximadamente 50 g de amostra foram picadas (trituração 4), em seguida a mistura foi colocada em frasco de 40 mL, hermeticamente fechado com tampa de silicone. Alíquotas de 300 µL da fase vapor foram coletadas através de uma microseringa de 500 µL nos tempos 15 e 80 minutos e analisadas por cromatografia gasosa.

4- Aproximadamente 50 g de amostra foram picadas (trituração 2) e imediatamente colocado em frasco de 40 mL, hermeticamente fechados com tampas de silicone. Alíquotas de 300 µL da fase vapor foram coletadas através de uma microseringa de 500 µL nos tempos 15 e 80 minutos e analisadas por cromatografia gasosa.

4.4.7 Extração por headspace - SPME (HS-SPME)

Para a extração dos analitos por SPME foram avaliadas quatro fibras de microextração em fase sólida e três procedimentos de extração.

Fibras testadas:

- CAR/PDMS (Carboxen/Polidimetilsiloxano) 75 µm
- PDMS (Polidimetilsiloxano) de 100 µm e 7 µm
- PA (Poliacrilato) 85µm

Procedimentos de extração por HS-SPME avaliados

1- Triturou-se 2,5; 5; 15 e 20 g de cultivar de alho nacional com uma faca e imediatamente colocado em frascos de 40 mL, hermeticamente fechados com tampa de silicone. A fibra de SPME foi introduzida no frasco de cada amostra e mantida por períodos de 10, 30, 50, 80 minutos de exposição (adsorção dos analitos). Em seguida a fibra foi retirada do frasco e imediatamente introduzida no injetor do cromatógrafo a gás (GC-FID, GC-PFPD ou GC-MS) por um período de dessorção térmica de 3, 4 ou 5 minutos, após o qual a fibra foi retirada do injetor. O mesmo procedimento foi feito com cultivar de cebola.

2- Triturou-se 50g (trituração 5) de amostra, que foram imediatamente colocados em frascos de 40 mL, hermeticamente fechados com tampa de silicone. A fibra de SPME foi introduzida no frasco de cada amostra e após um período 40 minutos de exposição (adsorção dos analitos) a fibra foi imediatamente introduzida no injetor do cromatógrafo a gás por um período de dessorção térmica de 3 minutos, após o qual a fibra foi retirada do injetor.

3- Triturou-se 50g (trituração 6) de amostra, que foram imediatamente colocados em frascos de 40 mL, hermeticamente fechados com tampa de silicone. A fibra de SPME foi introduzida no frasco de cada amostra e após um período 40 minutos de exposição (adsorção dos analitos) a fibra foi imediatamente introduzida no injetor do cromatógrafo a gás por um período de dessorção térmica de 3 minutos, após o qual a fibra foi retirada do injetor.

4.5 Desenvolvimento do método cromatográfico

As análises cromatográficas foram desenvolvidas nos seguintes equipamentos: cromatografo a gás Varian CP - 3800, equipado com injetor automático Varian 8200 e detector de ionização em chama (GC-FID); cromatografo

a gás Varian CP- 3800, equipado com injetor automático e detector fotométrico de chama pulsante (GC-PFPD); cromatografo a gás Shimadzu QP - 2010, equipado com injetor automático e acoplado ao espectrômetro de (GC-MS).

4.5.1 Avaliação do liner (liner específico para *split* e *splitless*)

Avaliou-se a influência de *liners* específicos para os modos de injeção *split* e *splitless* (Figura 16), nos sistemas GC-MS e GC-FID, através da análise de uma amostra de alho e outra de cebola nas duas configurações.

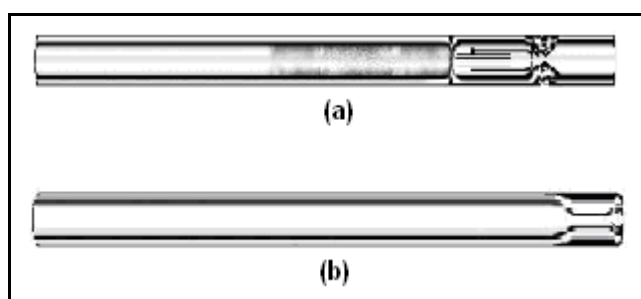


Figura 16. Corte lateral de *liners* específicos para modo de injeção (a) *split* e (b) *splitless*.

4.5.2 Modo de injeção: *split*, *splitless/split* (modo de Grob)

Avaliou-se a performance dos modos de injeção com divisão de fluxo (*split*) e injeção no modo de Grob (*splitless/split*) nas análises dos cultivares de alho e cebola, nos três sistemas cromatográficos.

Modo *split*: avaliou-se as razões de *split* 1/10, 1/20, 1/30 e 1/40.

Modo de Grob: avaliou-se os tempos de *splitless* 0,3; 0,5; 1 e 2 minutos, combinados com as razões de *split* 1/10, 1/20, 1/30 e 1/40.

4.5.3 Temperatura inicial da coluna

Avaliaram-se diferentes temperaturas iniciais de análise (35, 40 e 50 °C).

Todas as amostras (alho e cebola) foram analisadas nos três sistemas cromatográficos (GC-FID, GC-PFPD e GC-MS), utilizando coluna Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,1 μm ., com a seguinte programação de temperatura:

35 °C (3 min) $\xrightarrow{3\text{ °C/min}}$ 100 °C (1 min) $\xrightarrow{10\text{ °C/min}}$ 200 °C (5 min)

As demais condições cromatográficas foram estabelecidas como segue.

4.5.4 Análise por GC-FID

Temperatura do injetor em 200 °C. Detetor: temperatura em 220 °C e sensibilidade ajustada em 12. Vazão do gás de arraste (N_2): 1,0 mL/min, gás de *make up* : 29 mL/min, ar sintético: 10 mL/min e hidrogênio: 1 mL/min. Volume de injeção: 1 μL de óleo essencial e 300 μL para vapores do *headspace*.

4.5.5 Análise por GC-MS

As condições cromatográficas otimizadas no GC-FID foram utilizadas para a análise em GC-MS ressaltando-se que o modo de ionização foi positivo operando a 70 eV e a faixa da massas de aquisição foi *m/z* 50-500 Daltons, sendo os demais parâmetros cromatográficos iguais aos usados no GC-FID.

4.5.6 Análises por GC-PFPD

As condições desenvolvidas no GC-FID também foram utilizadas para o GC-PFPD, exceto àquelas que são específicas deste aparelho, quais sejam: gás de arraste H_2 com vazão de 1,0 mL/min; filtro para enxofre (395 nm); vazão de ar 1 (ar sintético) em 17 mL/min, ar 2 (ar sintético) em 10 mL/min, hidrogênio em 11 mL/min;

gate delay de 4 mseg., *gate width* de 10 mseg., *trigger level* a 200mV. Sensibilidade ajustada em 9.

4.5.7 Sensibilidade (Range) do PFPD

Avaliou-se a melhor sensibilidade do detector PFPD, considerando o intervalo entre 8 a 10.

4.6 Estudo da repetibilidade dos tempos de retenção e área do analito

Para esse estudo injetou-se nos sistemas GC-PFPD e GC-MS no modo TIC os vapores extraídos por HS-SPME. Repetiram-se cinco vezes as análises nos dois sistemas cromatográficos para os cultivares de alho e cebola. Calculou-se o valor médio e desvio padrão para os tempos de retenção e para as áreas de cada pico obtidos nos dois sistemas cromatográficos estudados e, por meio dos valores obtidos, calculou-se o coeficiente de variação percentual (%CV).

4.7 Análises qualitativas

A identificação dos compostos voláteis sulfurados obtidos por HS-SPME de amostras de alho e cebola foi realizada da seguinte maneira:

a. Comparação dos cromatogramas obtidos por GC-PFPD e GC-MS para indicação dos compostos sulfurados;

b. Cálculo dos índices de Kovats por GC-PFPD. Foram utilizadas as mesmas condições na análise de compostos sulfurados, excetuando-se os valores de *gate delay* e *gate width*, ajustados para 0,5 e 4 mseg, respectivamente, de modo a permitir a detecção de espécies excitadas de carbono (CH^{*}). Tal inovação no método foi desenvolvida por Zocolo, 2006 em sua dissertação de mestrado, sendo este trabalho

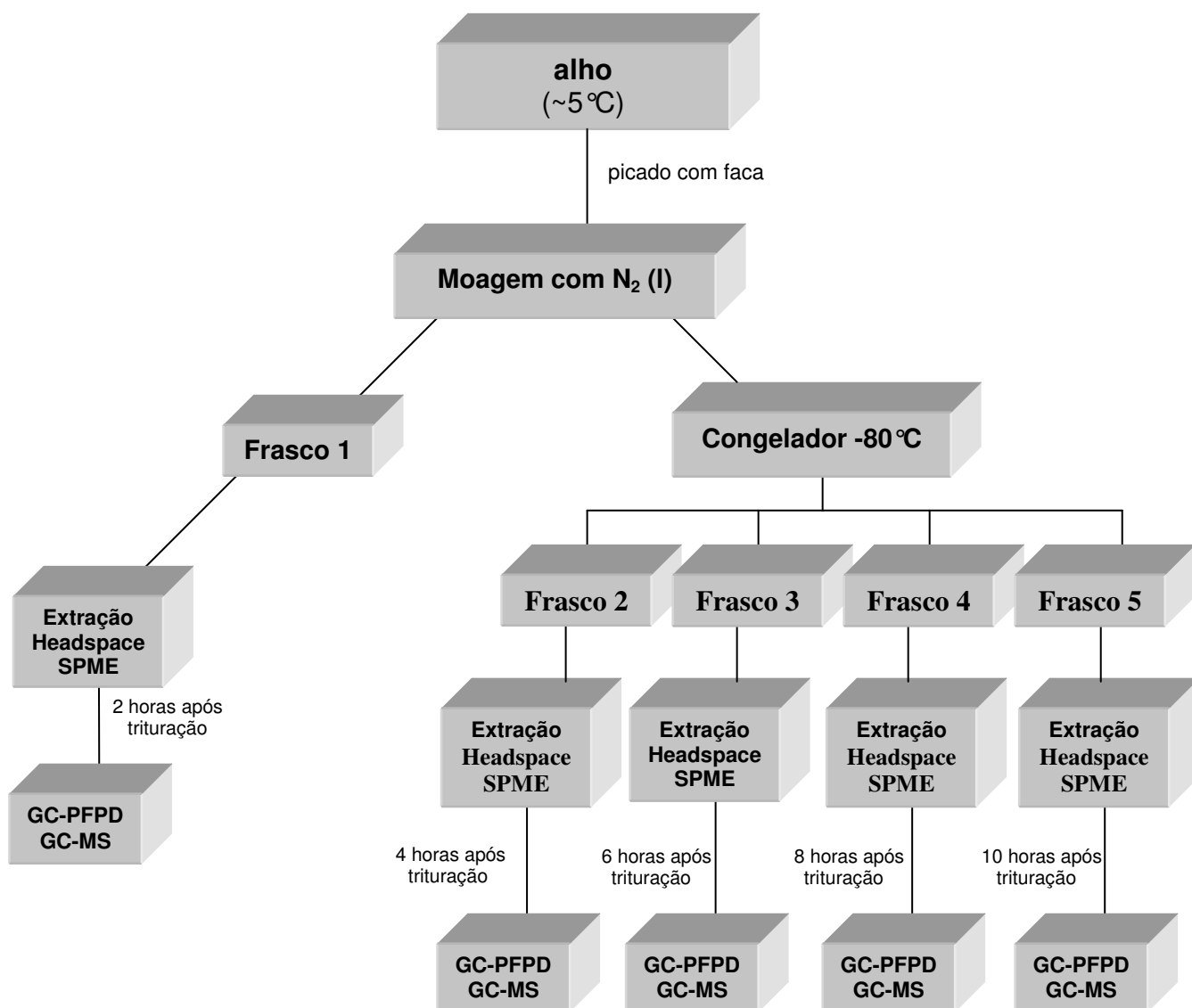
o primeiro relato de análise de hidrocarbonetos em GC-PFPD que possibilita a identificação de substâncias desconhecidas por meio do cálculo do índice de Kovats;

c. Cálculo dos índices de Kovats por GC-MS;

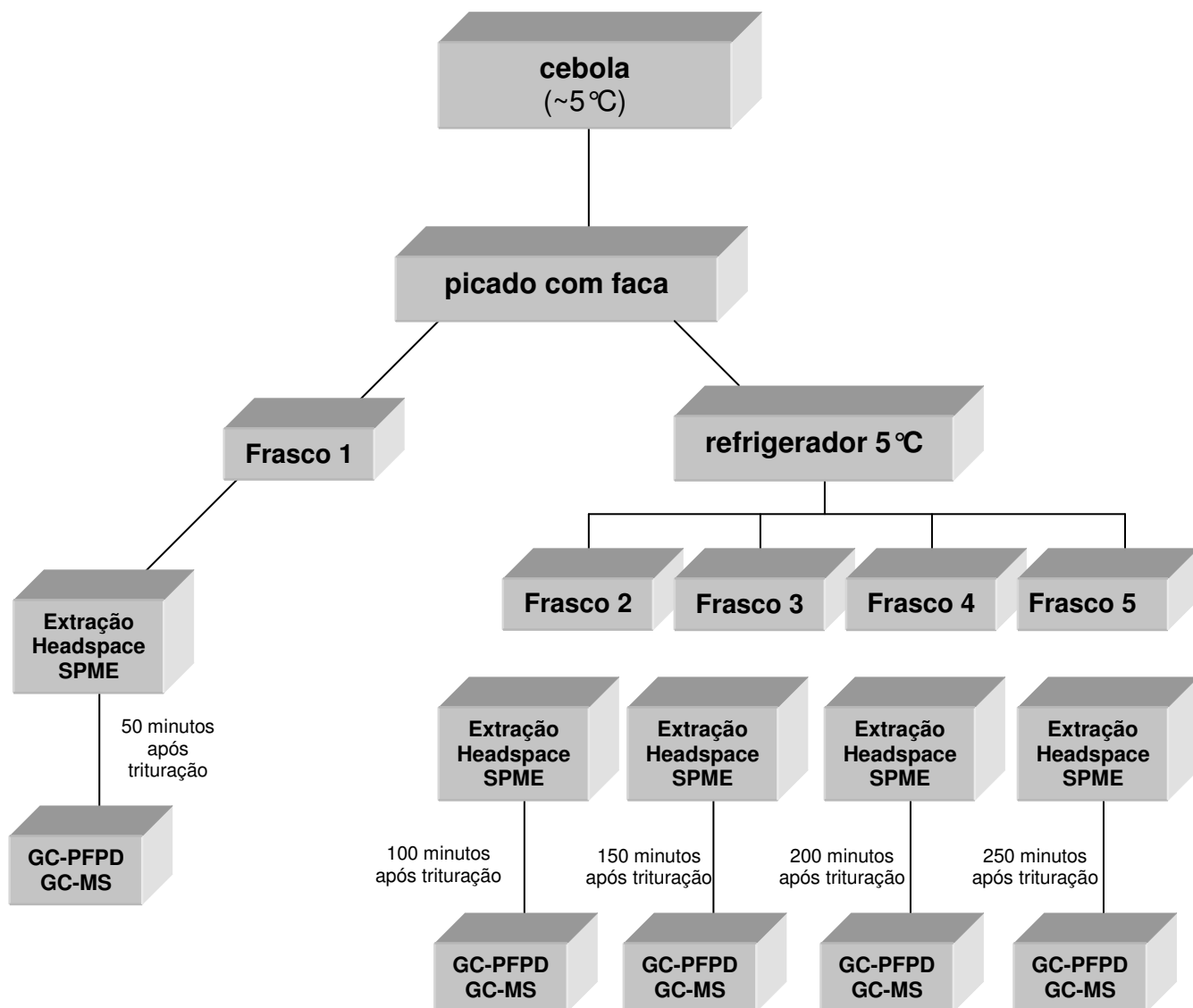
d. Comparação dos espectros de massas obtidos para cada pico na análise por GC-MS com aqueles das bibliotecas NIST e WILEY, através do software GCMS solutions Ver. 2.5.

Para a determinação dos índices de Kovats foi utilizada mistura de alcanos lineares C_8 a C_{32} (Sigma-aldrich, Steinheim - Germany) corrida em análise separada das amostras de alho e cebola.

4.7.1 Fluxograma para o método de extração por HS-SPME dos cultivares de alho



4.7.2 Fluxograma para o método de extração por HS-SPME dos cultivares de cebola



4.8 Análise preliminar quantitativa

As análises quantitativas foram realizadas através do método de padrão externo, nos sistemas GC-MS e GC-PFPD. Foram utilizados padrões de sulfeto de alila, dissulfeto de dimetila, dissulfeto de dialila, dissulfeto de dipropila. As soluções de trabalho foram preparadas nas seguintes concentrações para análises por GC-MS:

sulfeto de alila → 5, 10, 15, 24 e 40 ppm

dissulfeto de dialila → 5, 10, 15, 24 e 40 ppm

dissulfeto de dimetila → 1, 2, 4, 6 e 8 ppm

dissulfeto de dipropila → 5, 10, 12 e 20 ppm

Para análises por GC-PFPD as concentrações foram:

sulfeto de alil metila: 0,1; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 ppm

sulfeto de propila: 1,0 ; 4,0; 6,0; 0,8 e 1,0 ppm

Estas soluções foram utilizadas para obtenção das respectivas curvas analíticas, faixas de linearidade e limites de detecção e quantificação para cada um dos padrões, em cada detector utilizado. Para verificar a viabilidade da extração por *HS-SPME* foram feitas injeções diretas das soluções de trabalho. Para a extração por *HS-SPME* colocou-se 1,0 mL das soluções de trabalho em um frasco de 2 mL. A fibra de *SPME* foi introduzida no frasco e após 40 minutos de exposição para adsorção dos analitos a mesma foi retirada do frasco e imediatamente introduzida no injetor do cromatógrafo a gás, permanecendo por um período de 3 minutos para dessorção térmica dos compostos. Para a injeção direta foi injetado 1.0 µL das soluções de trabalho e comparados com a injeção por *HS-SPME*.

4.9 Aplicação do método analítico em amostra comercial

Uma amostra de fitoterápico (óleo essencial de alho) foi adquirida no comércio local e analisada pelo método analítico desenvolvido para análise de compostos sulfurados do alho e da cebola.

A caixa do medicamento continha 3 blisters (cartelas) contendo 15 cápsulas com cerca de 200 µL de óleo cada, segundo o fabricante duas cápsulas equivalem a 7,34g de alho cru. O conteúdo da cápsula foi retirado com uma seringa de vidro tipo gastight, transferido para um frasco de 40 mL e submetido ao mesmo procedimento da extração estabelecido neste estudo. As amostras foram analisadas nos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD. Esse procedimento foi feito em quintuplicata em 3 dias diferentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Estudo das técnicas de extração para obtenção dos voláteis sulfurados de alho e cebola

5.1.1 *Extração por arraste a vapor*

Os primeiros contatos com a amostra (cebola) foram para desenvolver um método de trituração e extração. Utilizou-se um método de extração adaptado por Telascra et al. (2007); Marchetti et al. (2006), onde o vapor da água passa através de um compartimento de amostra por 5 minutos, arrastando seus voláteis para câmara refrigerada. Esse método não foi eficiente, não havendo detecção de nenhum composto. Provavelmente o problema está relacionado ao tempo de extração, uma vez que há relato na literatura (MOCHIZUKI; YAMOTO, 1998) que descreve a identificação de 25 compostos sulfurados extraídos através de hidrodestilação, sendo mantidos em refluxo por um período de 45 minutos.

5.1.2 Extração por maceração

Os processos de extração dos compostos sulfurados de cebola por maceração 1, 2 e 3, descritos no item 4.3.3, utilizando-se solvente orgânico (hexano), também não levaram a resultados satisfatórios, ou seja, não foi detectado nenhum composto sulfurado nos extratos obtidos.

5.1.3 Extração por Headspace

Os experimentos realizados com *headspace* visaram à obtenção de substâncias voláteis geradas após a trituração do material vegetal. Tais substâncias seriam geradas principalmente após a descompartimentalização celular decorrendo da trituração das amostras vegetais.

Amostras de alho e cebola fragmentadas com e sem água, com o auxílio do triturador automático (MIXER ULTRA MIXER) forneceram uma pasta homogênea, que foi colocada em frascos que a seguir foram lacrados. Amostras da atmosfera interna dos frascos (*headspace*) foram analisadas por cromatografia gasosa. Esses dois métodos de extração também não foram eficientes, ou seja, não se detectou nenhum composto volátil. A trituração das amostras de alho e cebola utilizando somente faca produziu o melhor resultado dentre os métodos de trituração avaliados (trituração com e sem água). A amostra foi rapidamente triturada e imediatamente estocada nos frascos lacrados. Os cromatogramas obtidos para as amostras de voláteis da atmosfera desses frascos dos métodos verificados são apresentados na **Figura 17**.

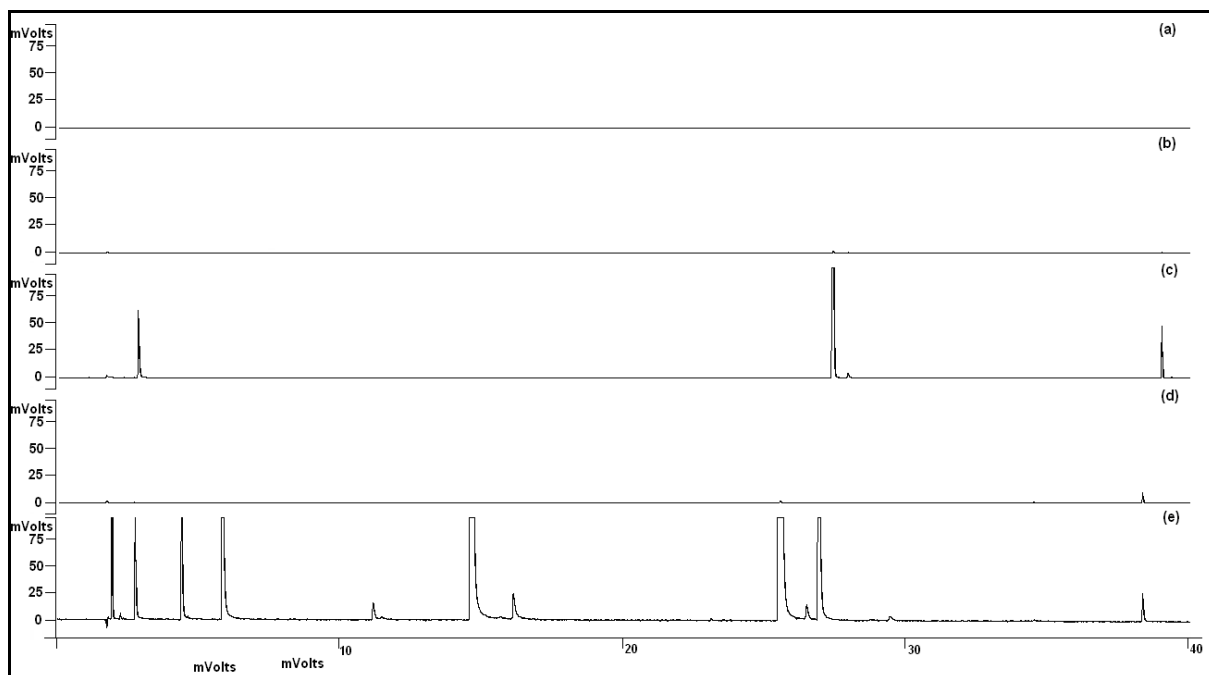


Figura 17: Cromatogramas dos voláteis de alho e cebola extraídos após 80 minutos da trituração, obtidos pelos testes de trituração com e sem água, utilizando 50 g de amostra: (a) branco, (b) cebola com água, (c) cebola sem água, (d) alho com água, (e) alho sem água. Análises feitas somente por GC-PFPD devido sua alta detectabilidade.

Como os compostos sulfurados são produzidos após a descompartmentalização celular, considerou-se importante avaliar o tempo de amostragem. MONDY et al. (2001) demonstraram que o tempo de amostragem dos voláteis deve ser realizado 10 minutos após a fragmentação dos tecidos vegetais se a extração for feita por SPME e 80 minutos após a fragmentação se a extração for feita por solvente. Esse tempo é necessário para permitir a formação dos compostos sulfurados.

A **Figura 18** mostra os cromatogramas obtidos para a amostra de voláteis de alho e cebola nos tempos de 15 e 80 minutos após a fragmentação da amostra sem água. Observa-se que um maior número de substância é obtido após 80 minutos da fragmentação, em concordância com a literatura.

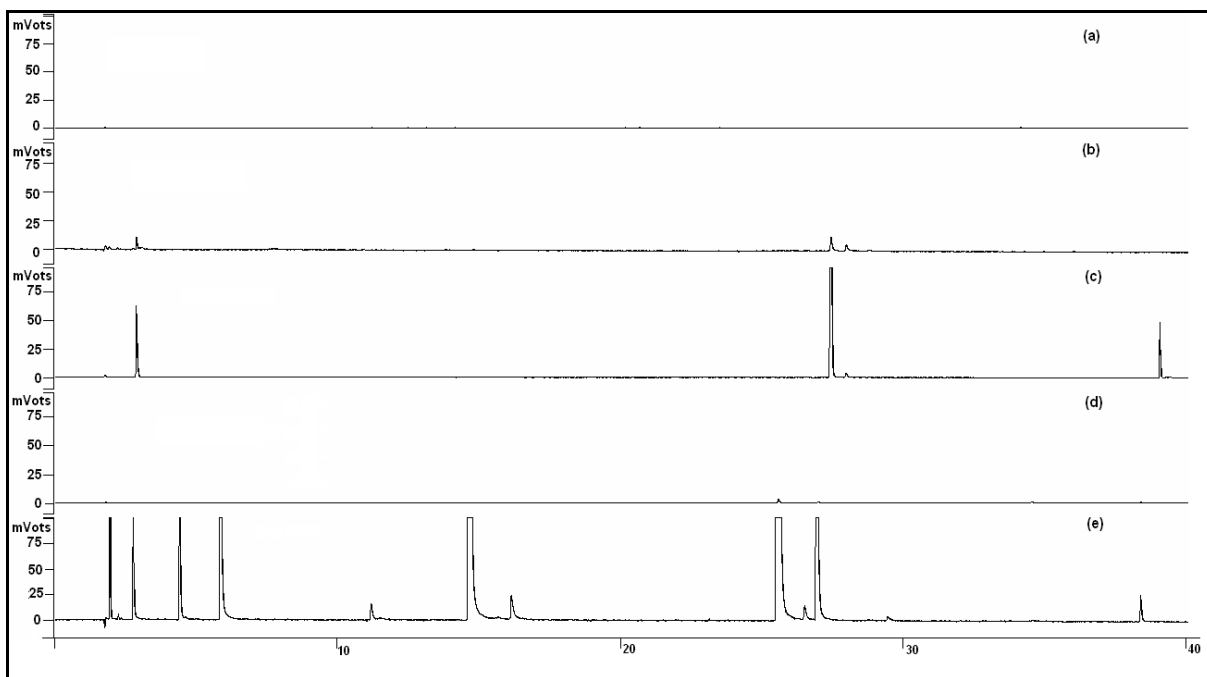


Figura 18: Cromatogramas dos voláteis de alho e cebola obtidos nos testes de trituração com faca e sem água utilizando 50 g de amostra: (a) branco, cebola após 15 min. (b) e 80 min. (c); alho após 15 min. (d) e 80 minutos após a fragmentação da amostra (e). Análises feitas somente por GC-PFPD.

5.1.4 Extração por headspace SPME (HS-SPME)

Avaliou-se 4 fibras de micro extração em fase sólida (SPME) de diferentes polaridades: CAR/PDMS (Carboxen/Polidimetilsiloxano) 75 μm , PDMS (Polidimetilsiloxano) de 100 μm e 7 μm , PA (Poliacrilato) 85 μm . Os parâmetros considerados foram o número de picos cromatográficos e os tempos de adsorção e desorção. Após triturar-se 5 g de amostras (alho) utilizando-se somente faca, as fibras de SPME foram expostas (adsorção) por 10, 30, 50, 80 minutos, sendo que os melhores resultados obtidos foram para 30 e 50 minutos. Escolheu-se assim o tempo de 40 minutos para a extração (adsorção) dos voláteis das amostras. Para a desorção foram avaliados os tempos de 3, 4 e 5 minutos, para os quais não foram observadas diferenças importantes. Desta forma, os tempos de adsorção e desorção dos analitos voláteis nas fibras de SPME ficaram estabelecidos como 40 e 3 minutos, respectivamente.

Quanto à capacidade de extração das fibras, a que apresentou melhor resultado foi a CAR/PDMS (Carboxen/Polidimetilsiloxano) 75 μm , uma fibra bi-polar, como mostra a **Figura 19**. Esta fibra foi a que mostrou capacidade em extrair maior número de compostos voláteis.

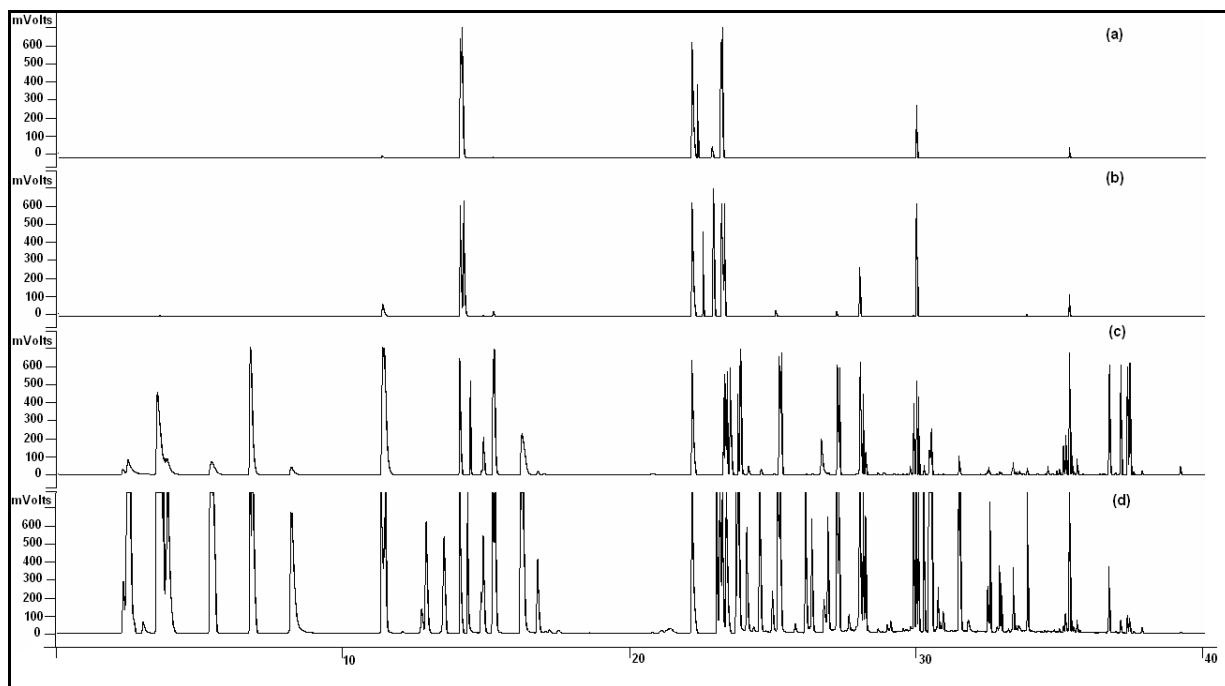


Figura 19: Comparação da capacidade extratora (em número de picos) das fibras de SPME após 40 minutos de adsorção e 3 minutos de dessorção, utilizando de 5 g de amostra após trituração com faca. (a) PDMS 7 μm , (b) PDMS 100 μm , (c) PA e (d) CAR/PDMS. Análises feitas somente em GC-PFPD.

Considerando os dois métodos de extrações *headspace* e *headspace* SPME, o melhor método de extração foi com *headspace*-SPME, através do qual foi possível obter maior número de componentes voláteis, como é apresentado na **Figura 20**. Isso é devido à fibra extratora adsorver os voláteis até sua saturação completa, ou seja, até a fibra extratora entrar em equilíbrio com o meio externo onde se encontra os vapores da amostra. De fato a extração por *headspace* foi descartada e somente a extração por SPME foi desenvolvida na continuidade deste trabalho.

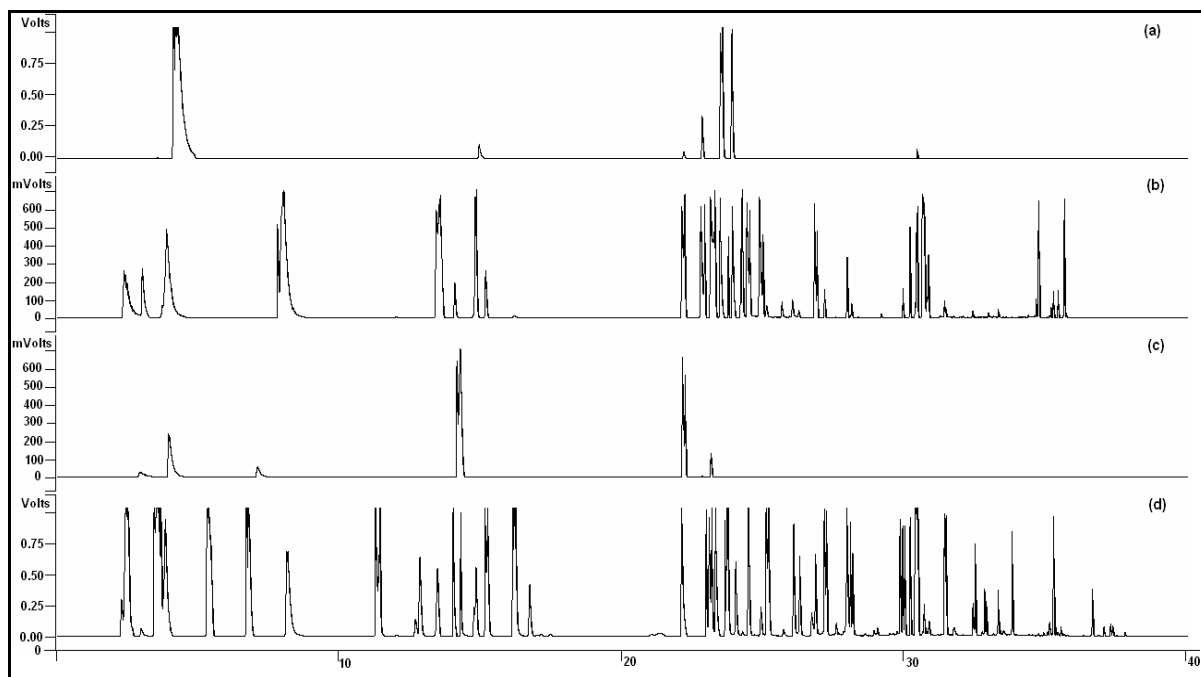


Figura 20: Cromatogramas mostra comparação dos métodos de extração por *headspace*, extraídos após 80 minutos da trituração de 15 g de amostra utilizando somente faca (a) cultivar de cebola e (c) cultivar de alho, extração por *HS-SPME* extraídos após 40 minutos (adsorção) e 3 minutos de dessorção, utilizando 15 g de amostra após trituração com faca (b) cultivar de cebola e (d) cultivar de alho. Análises por GC-PFPD.

5.2 Estabelecimento das condições cromatográficas

As condições cromatográficas desenvolvidas no decorrer do projeto são apresentadas a seguir:

Foi utilizada uma coluna Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,1 μm ., ficando assim estabelecida a programação de temperatura da coluna: temperatura inicial da rampa de aquecimento 35°C por 3 minutos, seguido por taxa de aquecimento 3°C / min até 100°C, depois taxa de aquecimento de 10°C / min até 200° C. Estas condições foram mantidas em todas as análises feitas por GC-FID, GC-MS e GC-PFPD.

Outros parâmetros cromatográficos estudados:

5.2.1 *Liners*

Estudou-se a adequação dos *liners* quanto à melhor detecção (MS e PFPD) e resolução cromatográfica. *Liners* específicos para o modo de injeção *split* e *splitless* foram testados. Em ambos os casos utilizaram-se modo de injeção de Grob, variando-se o tempo de *splitless* e a razão de *split*. Nesta etapa avaliou-se também, concomitantemente, a quantidade de amostra (alho ou cebola) colocada nos frascos de extração.

Verifica-se na **Figura 21** que quando utiliza-se o *liner* específico para *splitless* para análise de amostras obtidas por HS-SPME ocorre saturação dos detectores MS e PFPD mesmo quando a quantidade de alho extraída foi de 5 g, embora nesta condição é possível a observação de vários picos minoritários.

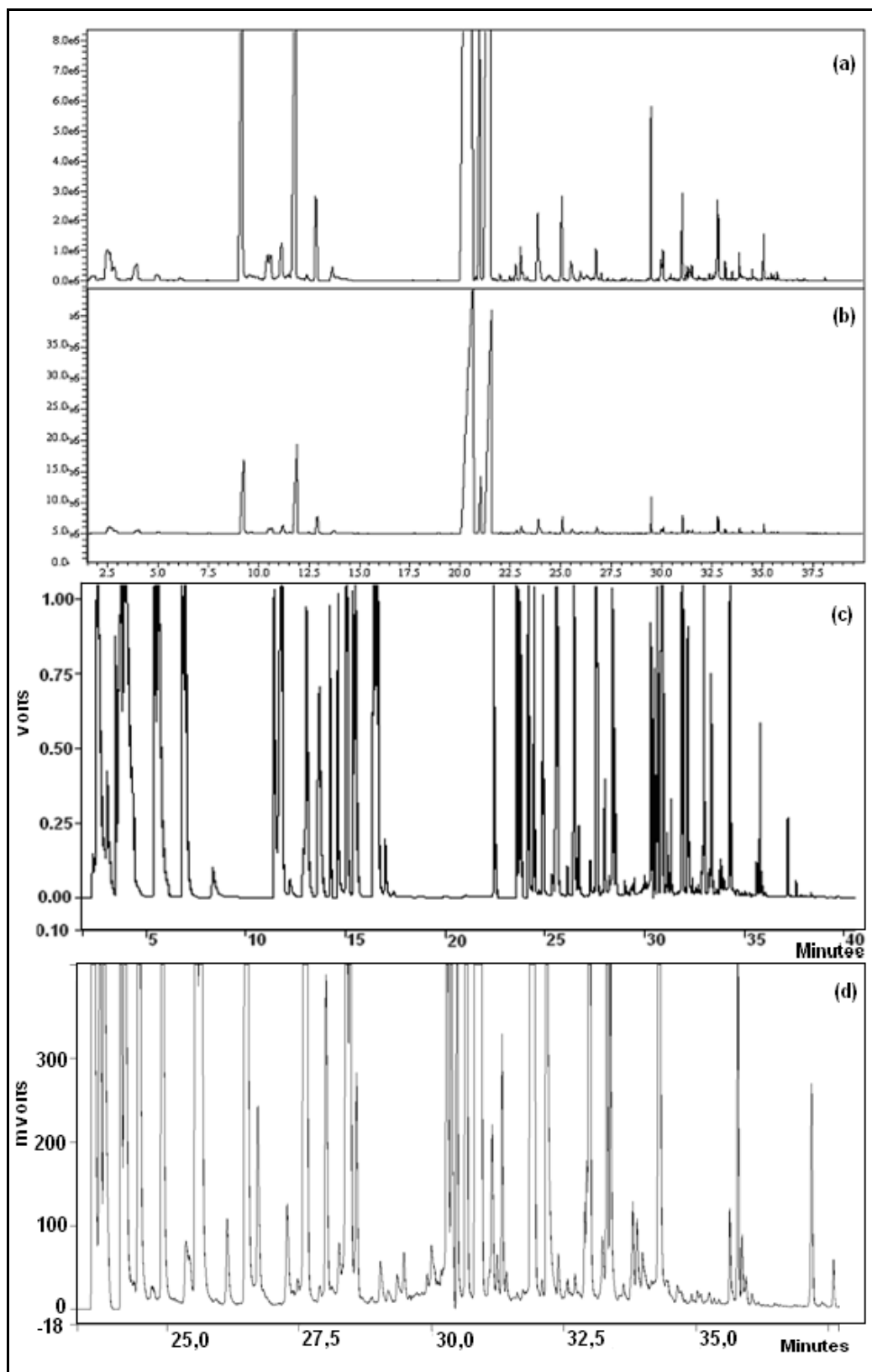


Figura 21: Cromatogramas utilizando *liner splitless* para a análise de alho nos sistemas cromatográficos (a) CG-MS, (b) ampliação de GC-MS, (c) GC-PFPD e (d) ampliação de GC-PFPD. As condições verificadas foram: modo de injeção: Grob com splitless 1,0 minuto e split 1/30, massa de amostra: 5 g.

Com o *liner* específico para *split* para inserção das amostras obtidas por HS-SPME, observou-se boa detecção para os compostos mais voláteis e os compostos mais abundantes não saturaram os detectores utilizados (**Figura 22**). Assim, os melhores resultados obtidos com o *liner* para *split* foram:

Alho: 5 g de amostra

Cebola: 15 g de amostra

Modo de injeção para GC-MS: split 1/30

Modo de injeção para GC-PFPD: Grob com splitless 1,0 minuto e split 1/30

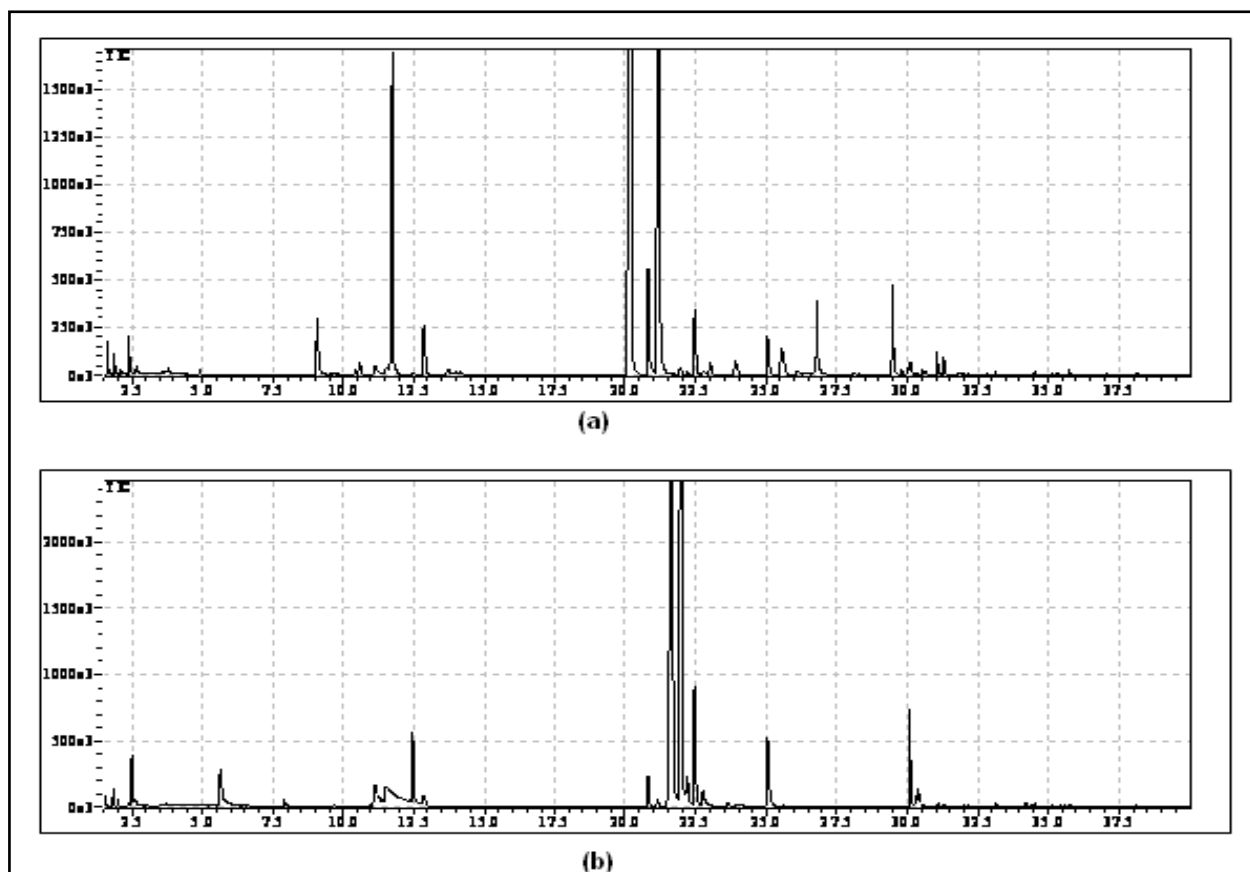


Figura 22: Cromatogramas ampliados utilizando *liner* para *split* na análise de (a) alho e (b) cebola por CG-MS.

Utilizou-se o sistema GC-PFPD todas as condições citadas acima no modo de injeção *split*, *splitless/split* (modo de Grob), os cromatogramas não obtiveram boa

resolução, isso devido à alta sensibilidade desse detector para compostos sulfurados que saturaram o detector. Devido à saturação do detector PFPD, ajustou-se a sensibilidade (Range) do detector, que varia de 8 a 10. Verificou-se que a melhor condição foi *splitless* por 1 minuto e restante *split* 1/30 modo Grob, utilizou-se sensibilidade do detector como “range 9”. Após alterar-se a sensibilidade de 10 para 8 os compostos mais voláteis não foram detectados, sendo isso, alterou-se para 9 a sensibilidade, assim os compostos mais voláteis foram detectados e os compostos mais abundantes não saturaram o detector (**Figura 23**).

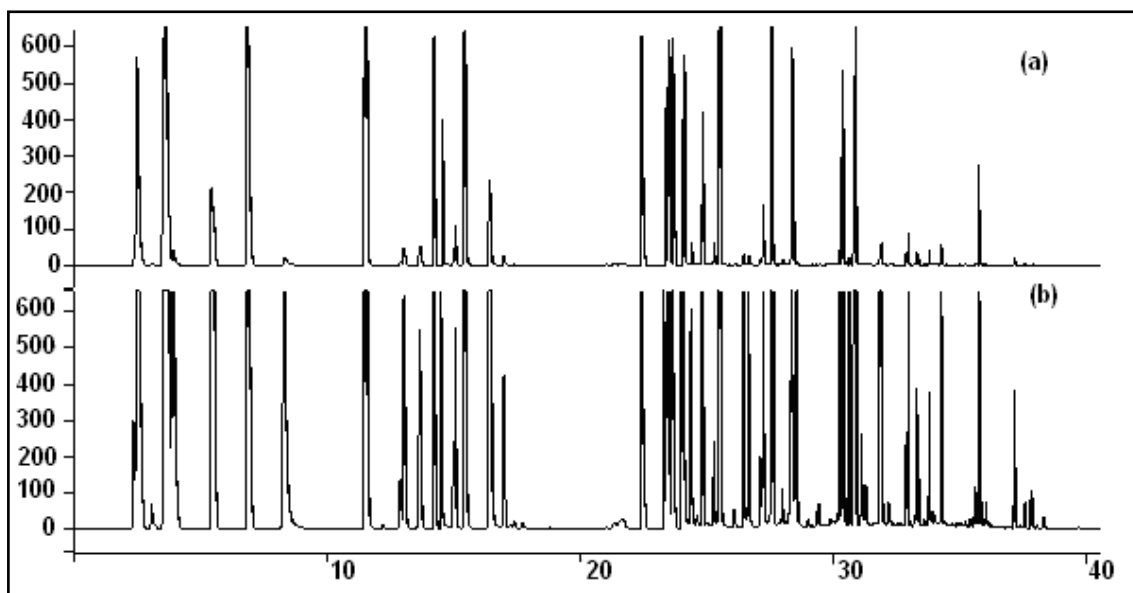


Figura 23: Cromatogramas ampliados utilizando *liner* específico para *split* utilizando-se o modo de injeção *splitless/split* (modo de Grob) para a análise de cultivar de alho no sistema cromatográfico CG-PFPD variando o Range (a) 9 e (b) 10.

Finalmente, após comparação dos cromatogramas obtidos nos três sistemas cromatográficos (GC-FID, GC-MS e GC-PFPD) (**Figura 24**), concluiu-se que o GC-FID possui baixa sensibilidade para compostos sulfurados, o que já era esperado devido ao caráter eletronegativo do enxofre, por esse motivo tal detector foi excluído deste projeto.

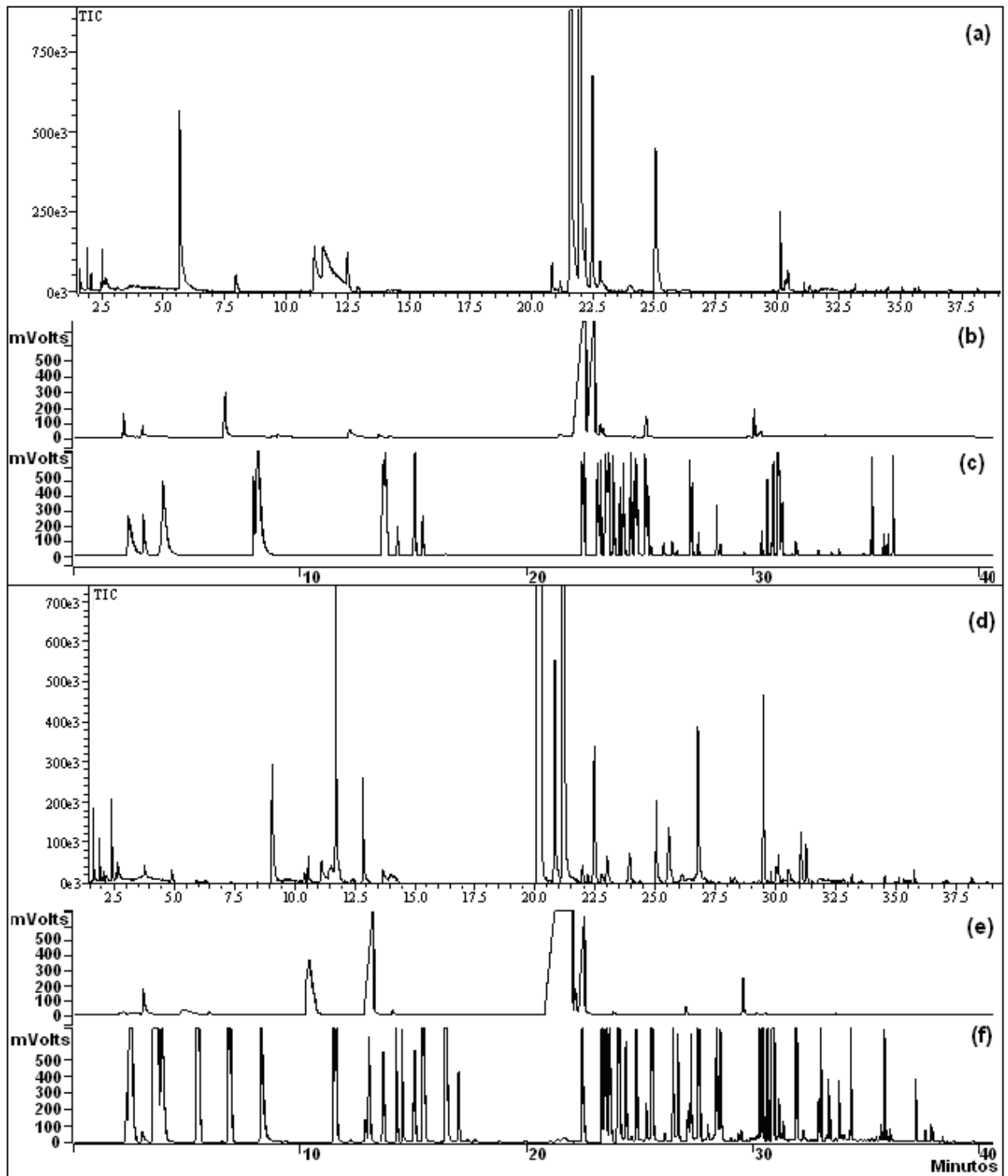


Figura 24: Comparação entre os cromatogramas dos três sistemas cromatográficos para a análise de cultivar de cebola: (a) GC-MS, (b) GC-FID e (c) GC-PFPD e para a análise de cultivar de alho: (d) GC-MS, (e) GC-FID e (f) GC-PFPD.

5.3 Método cromatográfico final

Após todas as avaliações descritas anteriormente, o método cromatográfico utilizado nas análises subseqüentes é descrito abaixo em detalhe.

Coluna Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,1 μm ., com a seguinte programação de temperatura:

35 °C (3 min) $\xrightarrow{3\text{ °C/min}}$ 100 °C (1 min) $\xrightarrow{10\text{ °C/min}}$ 200 °C (5 min)

5.3.1 Análises por GC-PFPD

Temperatura do injetor em 200 °C. Detetor: temperatura em 220 °C e gás de arraste H_2 com vazão de 1,0 mL/min; filtro para enxofre (395 nm); vazão de ar 1 (ar sintético) em 17 mL/min, ar 2 (ar sintético) em 10 mL/min, hidrogênio em 11 mL/min; *gate delay* de 4 msec., *gate width* de 10 msec., *trigger level* a 200mV. Sensibilidade ajustada em 9.

Modo de injeção para GC-PFPD: Grob com splitless 1,0 minuto e split 1/30

5.3.2 Análises por GC-MS

As condições cromatográficas otimizadas no GC-PFPD foram utilizadas para a análise em GC-MS ressaltando-se que o modo de ionização foi positivo operando a 70 eV e a faixa da massas de aquisição foi m/z 50-500 Daltons, sendo os demais parâmetros iguais aos usados no GC-FID.

Modo de injeção para GC-MS: split 1/30

5.3.3 Amostra

A quantidade de amostra analisada em casa sistema cromatográfico foi:

Alho: 5 g de amostra - cultivar alho nacional (adquirido no mercado comercial de Araraquara), alho chinês e alho nacional.

Os cultivares de alho foram mantidos por uma hora em um refrigerador a temperatura de cerca de 5 °C antes da trituração manual, após uma hora foram picados com faca e triturados com nitrogênio líquido, em seguida submetidos a extração por *HS-SPME* como descrito no **fluxograma da página 60**.

Cebola: 15 g de amostra - cultivar cebola nacional (adquirido no mercado comercial de Araraquara), superex, optima e Baia Paraná orgânica.

Os cultivares de cebola foram mantidos por uma hora em um refrigerador a temperatura de cerca de 5 °C antes de serem picados, após uma hora foram picados com faca a temperatura ambiente e submetidos a extração por *HS-SPME* como descrito no **fluxograma da página 61**.

5.4 Estudo da precisão do método proposto

5.4.1 Repetibilidade (precisão intra-dia)

Avaliou-se a repetibilidade para as áreas e os tempos de retenção dos analitos, para amostras preparadas por *HS-SPME* (em triplicata) e analisadas em dois sistemas cromatográficos (GC-MS e GC-PFPD). Verificou-se que o valor do coeficiente de variação percentual (CV) para tempo de retenção foi de até 6% para os compostos mais voláteis. Segundo a legislação brasileira (ANVISA) não é aceitável valores superiores de 5%. O CV para as áreas dos picos foi, para muitos casos, acima de 100%, inviabilizando análises quantitativas nestas condições experimentais. Isso se deve provavelmente à falta de homogeneidade da amostra, temperatura do ambiente de trabalho e/ou a instabilidade desses compostos voláteis.

Devido a esses problemas com a variação do tempo de retenção e principalmente da área desses compostos sulfurados, alterou-se o tratamento das amostras sendo descrito o novo método nos fluxogramas das **paginas 60 e 61**.

O novo método de extração descrita pelos fluxogramas (**paginas 60 e 61**) foi aplicado e os extratos analisados nos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD, avaliando-se os valores médios das áreas e dos tempos de retenção para cada pico e respectivos desvios padrão e coeficientes de variação percentual, nos dois sistemas cromatográficos (**Tabela 5 e 6**)

Tabela 5: Dados da avaliação da repetibilidade (precisão intra-dia) para análise de compostos sulfurados voláteis de alho, extraídos por *HS-SPME*. e analisados por GC-MS e GC-PFPD. Média de três repetições.

PICOS	GC-MS						GC-PFPD					
	t _R (min.)	SD	C.V (%)	Média área	SD	C.V (%)	t _R (min.)	SD	C.V %	Média Área	SD	C.V %
1	1,699	0,009	0,54	1.511.341	318.356	21,06	2,250	0,005	0,22	283.999	26.292	9,3
2	1,939	0,008	0,42	638.275	128.004	20,05	2,892	0,004	0,12	447.718	254.198	56,8
3	2,175	0,008	0,36	1.465.592	191.160	13,04	13,951	0,004	0,03	1.335.493	690.345	51,7
4	2,495	0,009	0,36	522.845	96.630	18,48	15,065	0,005	0,03	200.440	152.799	76,2
5	2,736	0,037	1,34	233.437	33.396	14,31	22,077	0	0	966.302	123.167	12,7
6	3,894	0,007	0,18	187.452	116.627	62,22	22,182	0,015	0,07	727.331	256.309	35,2
7	6,079	0,006	0,09	1.144.359	135.698	11,86	22,786	0,005	0,02	218.624	110.744	50,7
9	7,635	0,006	0,08	434.451	203.515	46,84	23,089	0	0	1.214.188	34.264	2,8
10	8,063	0,031	0,38	199.342	33.985	17,05	23,193	0,011	0,05	1.020.556	115.679	11,3
11	8,653	0,005	0,06	111.009	31.616	28,48	24,360	0,001	0,01	250.464	23.050	9,2
12	9,325	0,006	0,06	2.072.404	1.009.983	48,73	25,012	0,008	0,03	36.164	20.719	57,3
13	10,824	0,009	0,08	342.111	184.754	54	26,165	0,012	0,05	662.455	217.156	32,8
14	11,479	0,004	0,03	305.927	232.416	75,97	27,313	0,016	0,06	341.275	266.733	78,2
15	11,999	0,006	0,05	1.071.455	341.280	31,85	27,788	0,006	0,02	26.420	11.423	43,2
16	12,952	0,006	0,04	65.441	22.430	34,27	28,023	0,022	0,08	11.628	3.298	28,4
17	13,126	0,007	0,05	109.574	55.319	50,49	28,140	0,006	0,02	739.505	487.930	66
18	13,895	0,005	0,03	1.013.762	150.633	14,86	28,336	0,011	0,04	4.503	1.539	34,2
19	14,285	0,006	0,04	548.147	99.240	18,1	30,172	0,008	0,03	777.156	198.168	25,5
20	15,165	0,006	0,04	97.210	33.981	34,96	30,432	0,006	0,02	13.826	6.493	47
21	15,753	0,005	0,03	165.867	50.899	30,69	30,666	0,054	0,18	70.990	25.418	35,8
22	16,443	0,024	0,15	58.470	18.620	31,85	30,709	0,009	0,03	73.464	40.050	54,5

Legenda: C.V - coeficiente de variação, SD - desvio padrão, t_R - tempo de retenção.

Tabela 6: Dados da avaliação da repetibilidade (precisão intra-dia) para análise de compostos sulfurados voláteis de cebola, extraídos por HS-SPME. e analisados por GC-MS e GC-PFPD. Média de três repetições.

PICOS	GC-MS						GC-PFPD					
	t _R (min.)	SD	C.V (%)	Média área	SD	C.V (%)	Média t _R (min.)	SD	C.V %	Média área	SD	C.V %
1	1,713	0,014	0,84	179.631	69.229	38,54	3,564	0,006	0,18	1.461.867	48.593	3,32
2	1,970	0,016	0,84	737.992	127.042	17,21	14,722	0,004	0,02	338.960	80.126	23,64
3	2,164	0,017	0,78	660.937	305.395	46,21	23,477	0,001	0,01	1.442.342	17.572	1,22
4	2,643	0,003	0,11	705.394	346.656	49,14	23,685	0,002	0,01	917.954	288.644	31,44
5	2,713	0,019	0,7	32.372	12.909	39,88	23,888	0	0	1.261.863	151.912	12,04
6	2,765	0,017	0,63	72.097	25.667	35,6	23,977	0,013	0,05	1.736.655	85.934	4,95
7	5,850	0,013	0,22	2.042.062	1.332.924	65,27	24,423	0,012	0,05	106.651	74.617	69,96
8	8,133	0,010	0,12	273.494	139.299	50,93	30,701	0,002	0,01	836.699	217.797	26,03

Legenda: C.V - coeficiente de variação, SD - desvio padrão, t_R - tempo de retenção

Para as análises realizadas nesse novo método de extração observa-se que o coeficiente de variação percentual (CV) foi inferior a 0,85 % para o tempo de retenção dos picos cromatográficos dos cultivares de alho e cebola, com exceção apenas do pico 5 da amostra de alho, que apresentou CV = 1,34%. No entanto, os coeficientes de variação para as áreas dos picos cromatográficos de alho e cebola chegaram a valores de até 78%.

5.4.2 Repetibilidade (precisão inter-dia)

Nesta avaliação foi utilizado dois cultivares de alho e três cultivares de cebola disponíveis no varejo no mês de janeiro, devido final da safra. Para minimizar as possíveis fontes de erro e obter uma confiança em nosso método devido à alta volatilidade desses analitos em estudo, as análises foram repetidas em quintuplicatas, sendo analisadas em 3 dias diferentes pelo mesmo operador e nos dois sistemas cromatográficos (GC-MS e GC-PFPD) (**figuras 25-29**). Os cultivares analisados de alho e cebola foram: alho chinês e alho nacional, e os cultivares de cebola foram: Superex, Optima e Baia Paraná orgânica.

As **Tabelas 7 e 8** mostram os valores médios obtidos para os tempos de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação percentual para análises das amostras de alho e cebola analisadas nos sistemas cromatográficos GC-PFPD e GC-MS. Observa-se que o método desenvolvido foi reprodutivo, obtendo-se um CV $\leq 2,16\%$ para análises de compostos voláteis de alho e cebola. As **Tabelas 9 e 10** mostram os valores médios de área dos picos, desvio padrão e coeficiente de variação percentual para as mesmas análises. Obteve-se novamente diferenças muito grandes entre as várias análises.

Estes resultados demonstram que o método proposto tem excelente desempenho para análises qualitativas, mas que ainda precisa de aprimoramento para análises quantitativas.

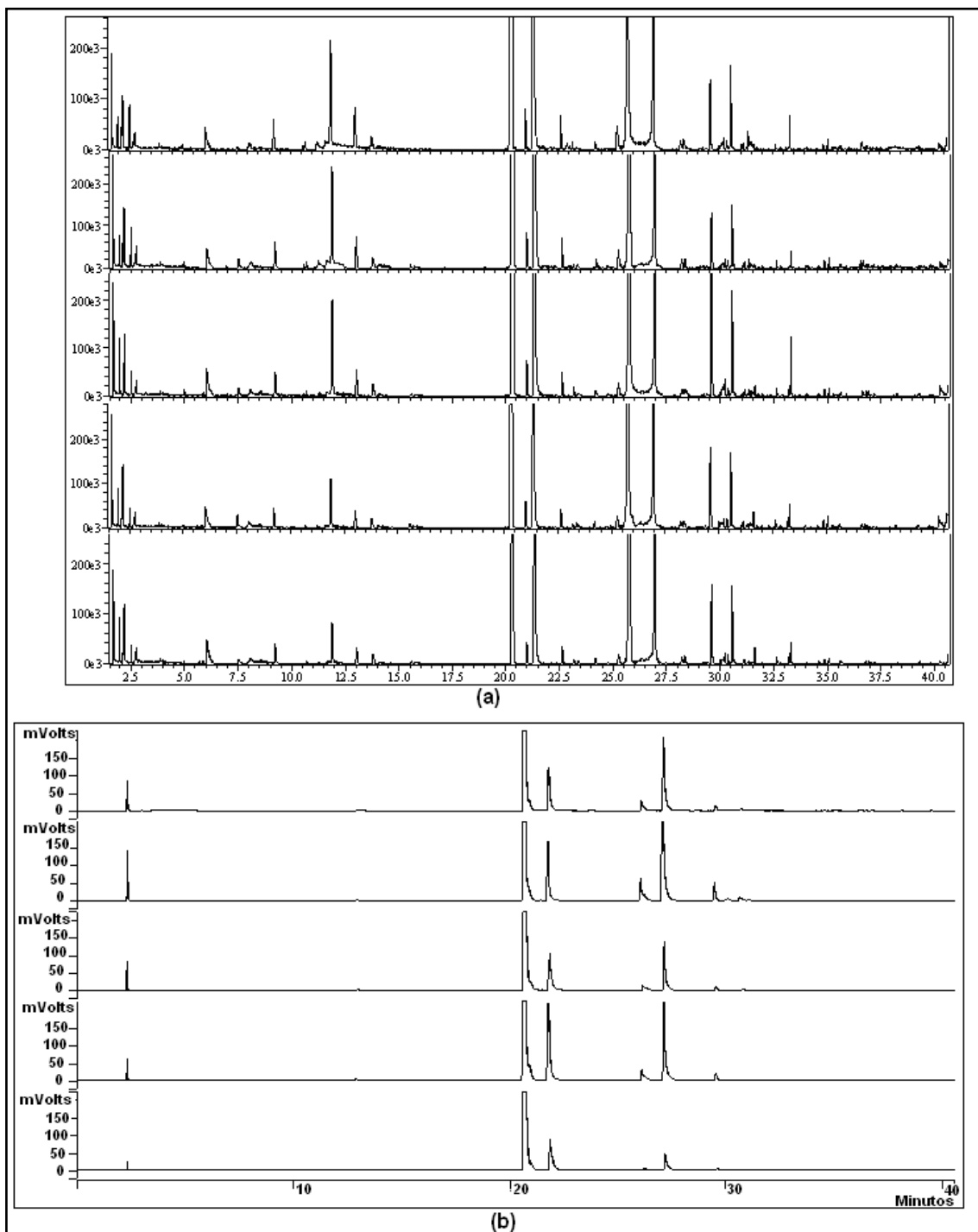


Figura 25: Cromatogramas do cultivar de alho chinês, injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.

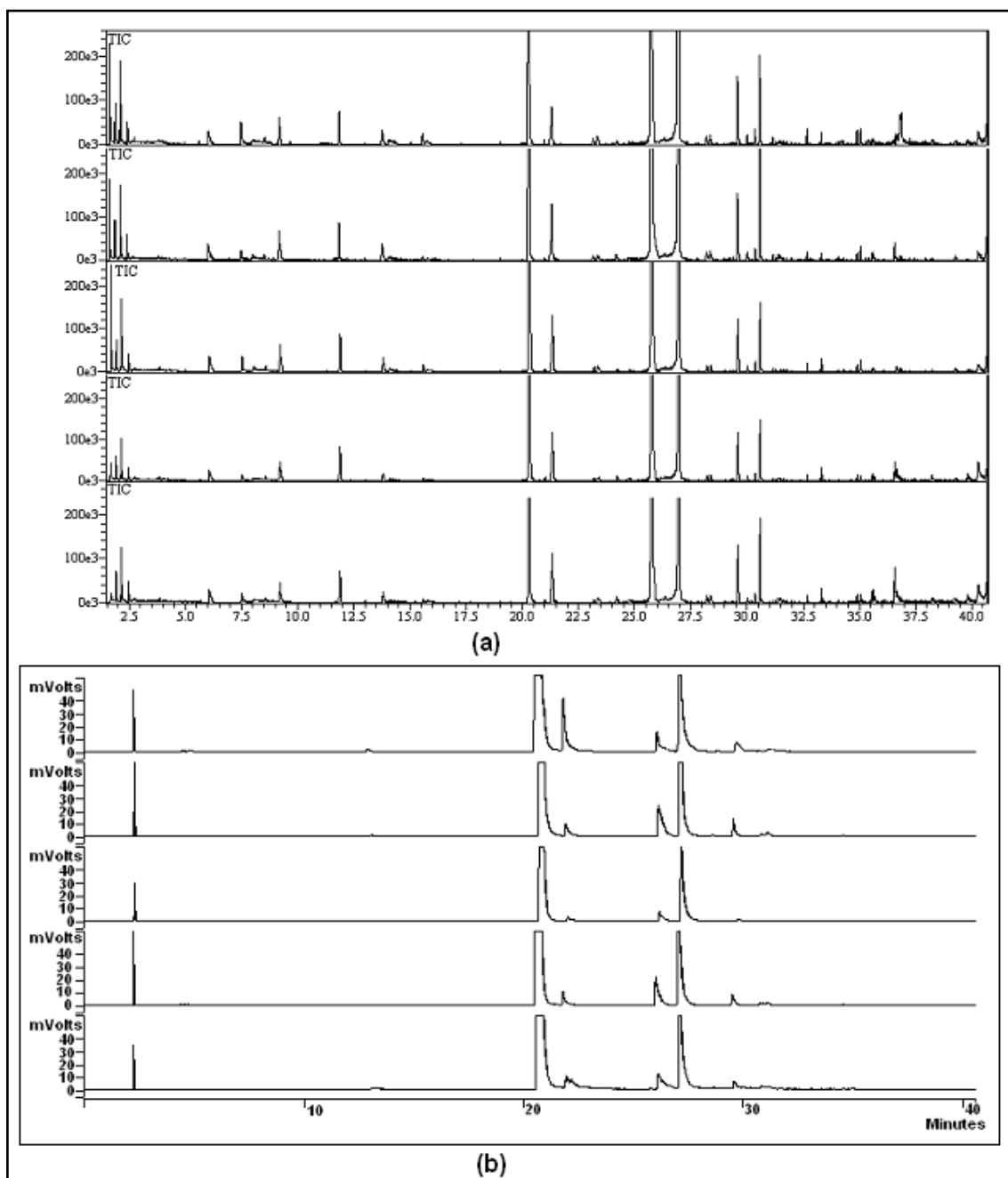


Figura 26: Cromatogramas do cultivar de alho nacional, injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.

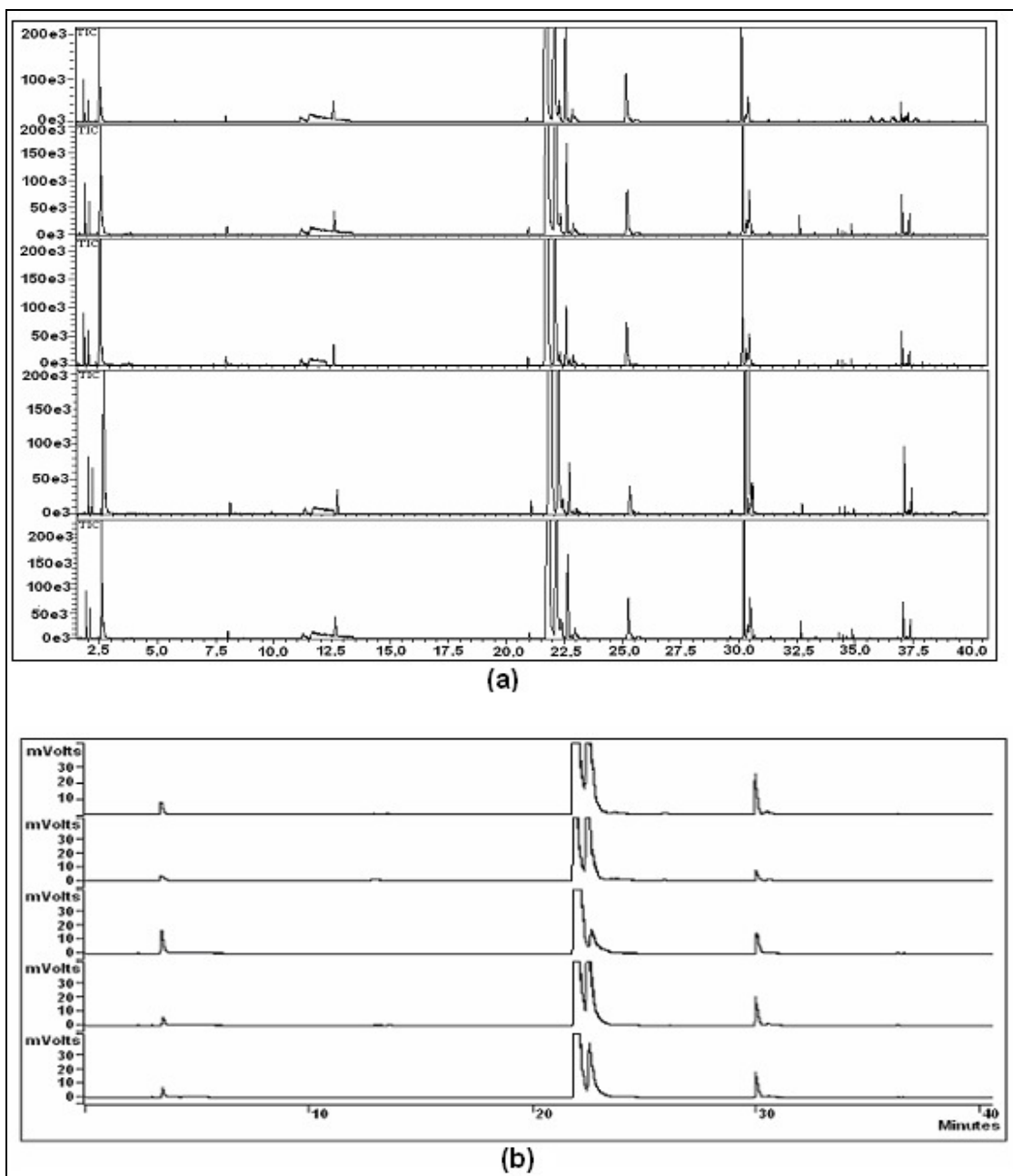


Figura 27: Cromatogramas do cultivar de cebola superex, injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.

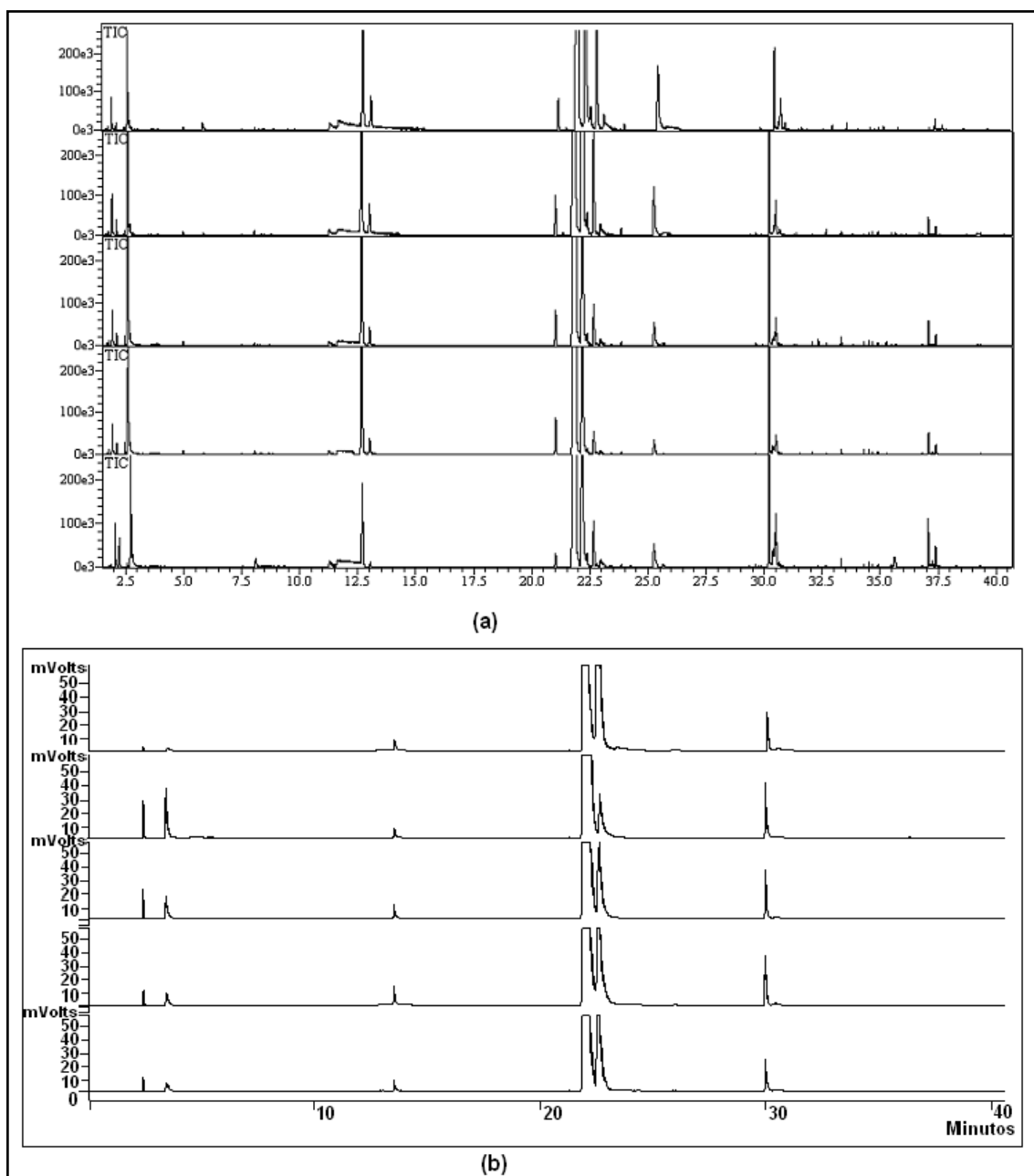


Figura 28: Cromatogramas do cultivar de cebola baia Paraná orgânica, injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.

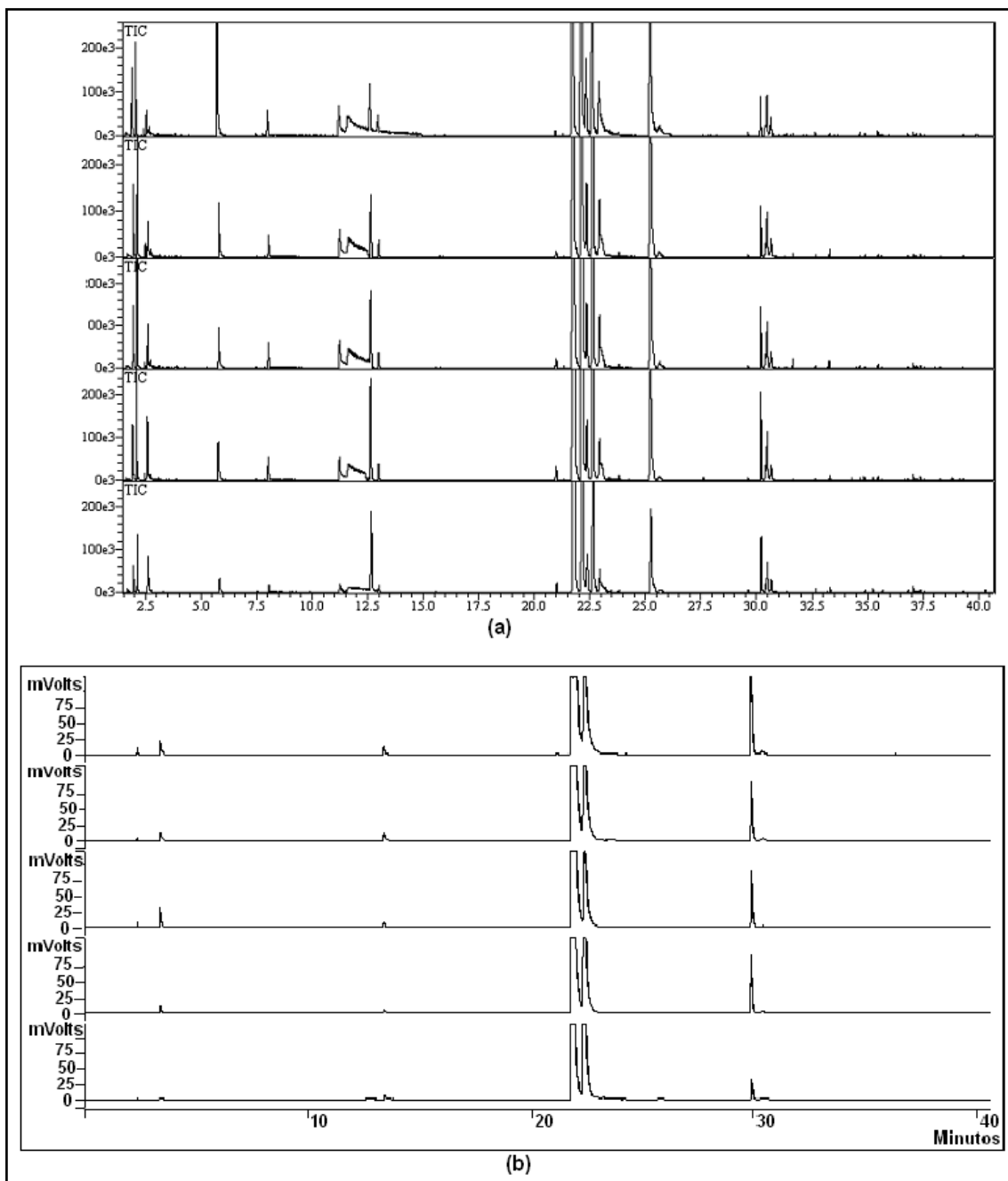


Figura 29: Cromatogramas do cultivar de cebola de optima, injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.

Tabela 7: Estudo da repetibilidade do tempo de retenção para amostras de cultivares de cebola analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.

P i c o s	GC-MS									GC-PFPD								
	Cultivares de cebola									Cultivares de cebola								
	superex			Baia Paraná orgânica			optima			superex			Baia Paraná orgânica			optima		
	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)
1	1,679	0,006	0,38	-	-	-	1,701	0,028	1,64	-	-	-	2,383	0,008	0,33	2,347	0,019	0,82
2	1,931	0,015	0,78	1,940	0,033	1,68	1,937	0,016	0,81	3,409	0,045	1,32	3,439	0,066	1,91	3,385	0,073	2,16
3	2,116	0,015	0,72	2,128	0,033	1,55	2,128	0,026	1,20	-	-	-	13,499	0,009	0,06	13,397	0,020	0,15
4	2,603	0,015	0,59	2,614	0,033	1,26	2,612	0,015	0,59	-	-	-	-	-	-	21,201	0,027	0,13
5	2,705	0,012	0,44	2,723	0,037	1,36	2,713	0,014	0,50	-	-	-	21,868	0,007	0,03	21,789	0,042	0,19
6	5,773	0,009	0,15	5,772	0,012	0,20	5,771	0,012	0,20	21,901	0,042	0,19	21,989	0,046	0,21	21,912	0,036	0,17
7	11,253	0,011	0,10	-	-	-	11,248	0,013	0,12	22,424	0,103	0,46	22,523	0,075	0,33	22,395	0,086	0,39
8	12,652	0,009	0,07	12,668	0,013	0,10	12,653	0,014	0,11	30,030	0,072	0,24	30,014	0,059	0,20	29,973	0,077	0,26
9	-	-	-	13,014	0,010	0,07	12,994	0,009	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	21,012	0,007	0,03	21,013	0,001	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	21,844	0,029	0,13	21,850	0,036	0,17	21,804	0,035	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	22,172	0,008	0,04	22,180	0,009	0,04	22,168	0,014	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	22,375	0,007	0,03	-	-	-	22,368	0,014	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	22,647	0,007	0,03	22,653	0,004	0,02	22,645	0,009	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	22,943	0,009	0,04	22,947	0,005	0,02	22,939	0,010	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	25,248	0,009	0,04	25,252	0,007	0,03	25,246	0,010	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	30,208	0,003	0,01	30,213	0,005	0,02	30,205	0,006	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	30,494	0,006	0,02	30,498	0,005	0,02	30,490	0,006	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legendas: C.V % - coeficiente de variação percentual, SD - desvio padrão, t_R - tempo de retenção em minutos

Tabela 8: Estudo da repetibilidade do tempo de retenção para amostras de cultivares de alho analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.

Picos	GC-MS						GC-PFPD					
	Cultivares de alho						Cultivares de alho					
	chinês			nacional			chinês			nacional		
	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)	Média t _R (min.)	SD t _R (min.)	C.V % t _R (min.)
1	1,687	0,013	0,75	1,686	0,011	0,64	2,271	0,008	0,34	2,266	0,019	0,83
2	1,928	0,014	0,75	1,917	0,010	0,52	12,940	0,052	0,40	-	-	-
3	2,125	0,012	0,58	2,156	0,009	0,44	20,651	0,020	0,10	20,648	0,058	0,28
4	2,159	0,012	0,56	-	-	-	21,820	0,052	0,24	21,933	0,134	0,61
5	2,470	0,012	0,48	2,469	0,010	0,41	26,130	0,076	0,29	26,151	0,119	0,45
6	2,670	0,013	0,49	-	-	-	27,134	0,068	0,25	27,129	0,086	0,32
7	2,719	0,012	0,45	-	-	-	29,586	0,116	0,39	29,613	0,098	0,33
8	6,053	0,013	0,21	6,060	0,008	0,14	-	-	-	-	-	-
9	9,211	0,007	0,07	9,219	0,008	0,08	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	9,274	0,009	0,09	-	-	-	-	-	-
11	11,882	0,006	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	11,892	0,007	0,06	-	-	-	-	-	-
13	13,009	0,007	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	13,801	0,009	0,06	-	-	-	-	-	-
15	20,329	0,011	0,06	20,334	0,009	0,04	-	-	-	-	-	-
16	20,997	0,006	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	21,362	0,007	0,03	21,343	0,006	0,03	-	-	-	-	-	-
18	22,639	0,006	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	25,249	0,006	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	25,744	0,007	0,03	25,761	0,006	0,02	-	-	-	-	-	-
21	26,962	0,008	0,03	26,984	0,009	0,03	-	-	-	-	-	-
22	29,591	0,003	0,01	29,599	0,004	0,01	-	-	-	-	-	-
23	30,361	0,006	0,02	30,368	0,004	0,01	-	-	-	-	-	-
24	30,575	0,003	0,01	30,583	0,003	0,01	-	-	-	-	-	-

Legendas: C.V % - coeficiente de variação percentual, SD - desvio padrão, t_R - tempo de retenção em minutos

Tabela 9: Estudo da repetibilidade da área para amostras de cultivares de cebola analisado pelos sistemas cromatográficos GC- MS e GC-PFPD.

P i c o s	GC-MS									GC-PFPD								
	Cultivares de cebola									Cultivares de cebola								
	superex			Baia Paraná orgânica			optima			Superex			Baia Paraná orgânica			optima		
	Média área	SD área	C.V % área	Média área	SD área	C.V % área	Média área	SD área	C.V % área	Média área	SD área	C.V % área	Média área	SD área	C.V % área	Média área	SD área	C.V % área
1	28.336	875	3,09	-	-	-	6710,375	2.474	36,87	-	-	-	42.930	19.242,71	44,82	22.859	13.700	59,93
2	99.198	43.177	43,53	107.176	44.474	41,50	169108,3333	88.434	52,29	139.307	44,927	64,72	77.997	55.996,02	71,79	68.914	38.219	55,46
3	90.968	41.496	45,62	94.328	48.041	50,93	229105,6429	119.319	52,08	-	-	-	53.483	13.686,47	25,59	2.046.141	1.185.930	57,96
4	812.529	450.075	55,39	667.509	363.970	54,53	156560,4	94.287	60,22	-	-	-	-	-	-	33.333	16.165	48,50
5	20.926	8.754	41,83	16.750	7.585	45,28	10299,625	6.013	58,38	-	-	-	1.969.413	1.062.715,08	53,96	1.644.981	98.898	6,01
6	351.890	163.875	46,57	373.780	135.731	36,31	609867,8571	397.850	65,24	6.391.195	42,105	21,01	4.546.912	1.746.574,49	38,41	4.195.215	1.643.887	39,18
7	46.036	22.765	49,45	-	-	-	129627,4286	70.715	54,55	1.311.283	103,477	74,40	1.062.751	654.420,54	61,58	1.794.116	957.332	53,36
8	93.500	43.855	46,90	1.269.208	618.948	48,77	393427,0769	242.452	61,63	164.963	72,007	63,83	164.164	106.635,85	64,96	198.500	150.225	75,68
9	-	-	-	169.875	66.414	39,10	93474,2	27.652	29,58	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	187.135	90.710	48,47	62261,33333	23.519	37,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	24.672.817	11.528.914	46,73	25.223.260	11.059.749	43,85	13982231,27	7.646.654	54,69	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	8.101.547	2.342.206	28,91	9.173.121	3.550.519	38,71	9763179,867	1.959.493	20,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	160.789	82.884	51,55	-	-	-	319006,3333	138.159	43,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1.437.465	806.162	56,08	2.094.816	1.062.913	50,74	2362475,467	1.047.762	44,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	124.472	73.948	59,41	164.361	82.017	49,90	250280,3333	112.651	45,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	878.209	513.482	58,47	1.295.155	669.691	51,71	1480372,6	672.077	45,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	477.805	270.629	56,64	933.684	577.629	61,87	214755,7692	118.284	55,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	100.130	53.611	53,54	153.637	82.375	53,62	131845,6667	49.093	37,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legendas: C.V % - coeficiente de variação percentual, SD - desvio padrão, t_R - tempo de retenção em minutos.

Tabela 10: Estudo da repetibilidade da área para amostras de cultivares de alho analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.

Picos	GC-MS						GC-PFPD					
	Cultivares de alho						Cultivares de alho					
	chinês			nacional			chinês			nacional		
	Média área	SD área	C.V % área	Média área	SD área	C.V % área	Média área	SD área	C.V % área	Média área	SD área	C.V % área
1	257.920	74.911	29,04	197.595	95.566	48,36	113.287	68.698	60,64	92.006	59.201	64,34
2	130.507	59.566	45,64	105.988	26.637	25,13	30.392	8.136	26,77	-	-	-
3	95.914	45.268	47,20	215.444	66.854	31,03	5.465.131	1.008.200	18,45	4.493.619	1.504.848	33,49
4	165.064	56.302	34,11	-	-	-	1.032.371	472.845	45,80	142.748	73.434	51,44
5	76.820	31.759	41,34	66.217	23.224	35,07	186.841	109.283	58,49	156.420	84.412	53,96
6	22.995	8.552	37,19	-	-	-	1.051.401	707.530	67,29	990.946	512.529	51,72
7	41.391	11.199	27,06	-	-	-	89.475	58.428	65,30	51.864	17.547	33,83
8	114.396	25.941	22,68	104.056	21.611	20,77	-	-	-	-	-	-
9	84.063	36.437	43,35	121.759	32.635	26,80	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	58.250	31.945	54,84	-	-	-	-	-	-
11	409.563	157.076	38,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	208.107	45.288	21,76	-	-	-	-	-	-
13	145.484	53.949	37,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	80.705	24.542	30,41	-	-	-	-	-	-
15	6.254.475	1.727.913	27,63	5.350.988	897.762	16,78	-	-	-	-	-	-
16	179.813	64.938	36,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	5.314.355	1.343.943	25,29	324.550	109.248	33,66	-	-	-	-	-	-
18	145.463	41.012	28,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	83.106	31.084	37,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	2.569.356	541.066	21,06	3.688.570	1.002.339	27,17	-	-	-	-	-	-
21	6.933.395	1.372.668	19,80	10.249.866	2.932.733	28,61	-	-	-	-	-	-
22	309.430	178.906	57,82	201.775	82.126	40,70	-	-	-	-	-	-
23	29.447	13.421	45,58	43.671	23.858	54,63	-	-	-	-	-	-
24	285.699	94.080	32,93	348.797	151.849	43,54	-	-	-	-	-	-

Legendas: C.V % - coeficiente de variação percentual, SD - desvio padrão, t_R - tempo de retenção em minutos.

5.5 Análise qualitativa

5.5.1 *Determinação dos Índices de Kovats*

Nas análises qualitativas a utilização de índices de retenção tem por finalidade minimizar as diferenças na comparação de dados de retenção de análises realizadas em diferentes equipamentos. Neste trabalho foram comparados resultados obtidos por GC-MS e GC-PFPD com dados de índice de retenção obtidos da literatura, utilizando-se o índice de retenção de Kovats, modificado para eluição com gradiente de temperatura Van Den Dool and Kratz.

Sabe-se que o detector de massas do tipo quadrupolo (MS) responde de maneira bastante satisfatória aos hidrocarbonetos, principalmente os alifáticos, o que permite então a obtenção do índice de retenção de Kovats. Quando se faz uso do PFPD, no entanto, a análise dos hidrocarbonetos homólogos utilizados para o cálculo desse índice fica comprometida. A forma encontrada para possibilitar essa análise foi mudar os parâmetros de funcionamento do detector (PFPD) no que diz respeito ao tempo de integração do sinal de emissão do elemento, que no caso do enxofre varia de 4 a 14 msec (valor otimizado), enquanto para a detecção de hidrocarbonetos esse valor passa a ser de 0,5 a 3 msec, (ZOCOLO, 2006). A **Figura 30** e **Tabela 11** demonstram os cromatogramas e seus respectivos tempos de retenção dos hidrocarbonetos homólogos analisados por GC-MS e por GC-PFPD para o modo carbono.

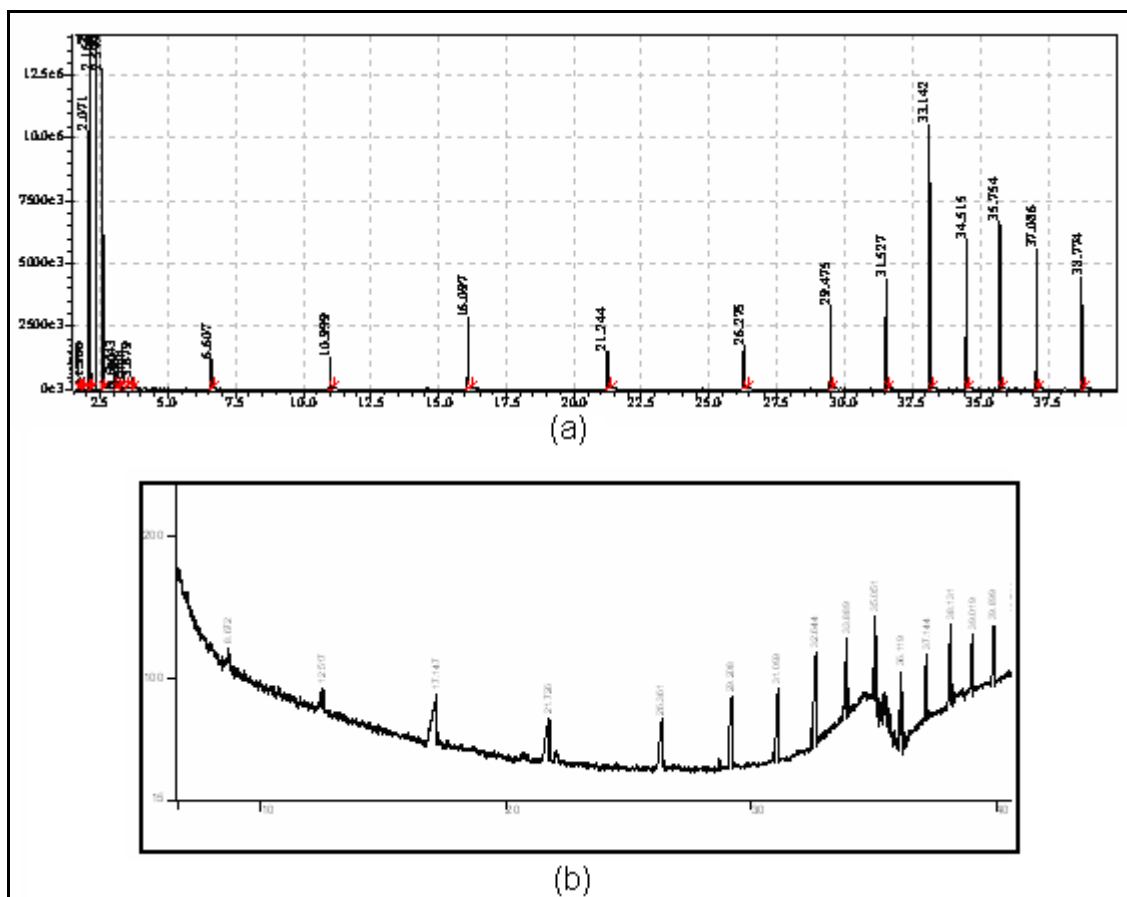


Figura 30: Cromatograma de padrões de hidrocarbonetos (C_8 a C_{32}) analisados por (a) GC-MS, (b) GC-PFPD, injetados no modo de carbono para o cálculo do índice de Kovats.

Tabela 11: Tempo de retenção de hidrocarbonetos analisados pelos sistemas GC-MS e GC-PFPD

Padrão C_8 a C_{19}	GC-PFPD	GC-MS
	t_R (min.)	t_R (min.)
C_8	8,672	6.607
C_9	12,517	10.999
C_{10}	17,147	16.097
C_{11}	21,726	21.244
C_{12}	26,361	26.275
C_{13}	29,208	29.475
C_{14}	31,099	31.527
C_{15}	32,644	33.142
C_{16}	33,889	34.515
C_{17}	35,051	35.754
C_{18}	36,119	37.086
C_{19}	37,144	38.774

Além dos índices de retenção também foram utilizados, quando possível, os espectros de massas obtidos para cada pico nas análises por GC-MS. Os espectros de massas obtidos de cada pico cromatográfico foram comparados com aqueles constantes das bibliotecas NIST e WILEY (**Anexo 3-19**).

Após análise dos dados de retenção e de espectrometria de massas foi possível propor a identificação de 10 substâncias sulfuradas nas amostras de cebola e 14 nas amostras de alho (**anexo 1 e 2**). Comparando-se os cultivares de alho analisados verificou-se que, para o cultivar de alho chinês, foi possível detectar 21 compostos voláteis e para o alho nacional detectou-se 16 compostos voláteis. Para os cultivares de cebola foram detectados 16 compostos voláteis, para o cultivar superex, 15 compostos voláteis para o cultivar baia Paraná orgânica e 18 compostos voláteis para o cultivar optima para análises feitas em GC-MS.

Observa-se que o GC-PFPD detectou maior número de compostos sulfurados em relação ao GC-MS, devido ao PFPD ter maior sensibilidade a compostos de enxofre, sensibilidade essa que aumenta quanto maior for a relação heteroátomo/carbono.

5.6 Estudos preliminares para análise quantitativa de sulfetos voláteis de *Allium* spp.

5.6.1 Limites de detecção e quantificação, faixa de linearidade e precisão intra-dias.

Estes parâmetros foram avaliados, considerando os tempos de retenção e as áreas dos picos cromatográficos de alguns padrões de sulfetos, obtidas por injeção direta de 1,0 µL da solução desses padrões e pelo método HS-SPME (**Tabelas 12 e 13**) e (**Figuras 31, 32**). Os coeficientes de variação percentual obtidos para estes

compostos muito voláteis podem ser considerados aceitáveis ($CV < 50\%$). Nas análises realizadas por GC-MS obteve-se maior precisão através da injeção direta das soluções de padrões, enquanto por GC-PFPD os coeficientes de variação foram em torno de 50% para os dois tipos de análises realizadas. No entanto, as diferenças nas áreas dos padrões obtidas por injeção direta da solução ou por *HS-SPME* ainda mostram-se erráticas e precisam ser mais bem avaliadas.

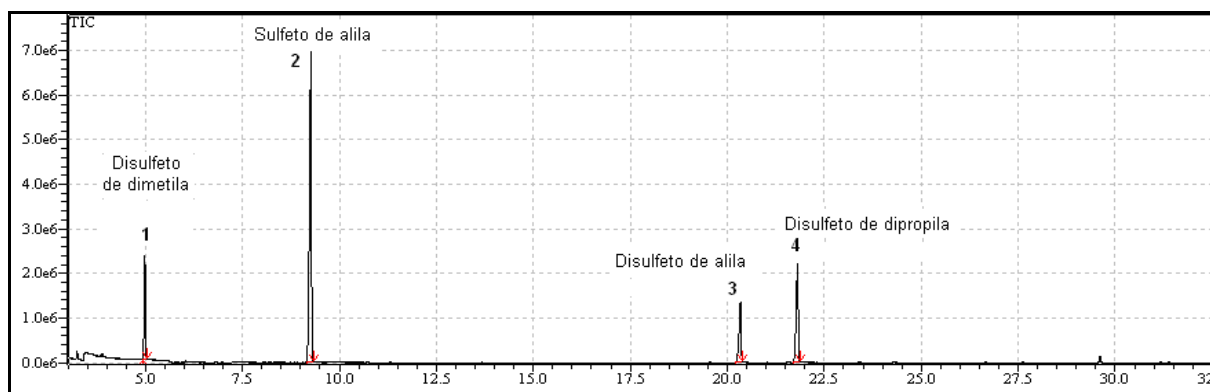


Figura 31: Cromatogramas de padrões comerciais analisado em GC-MS.

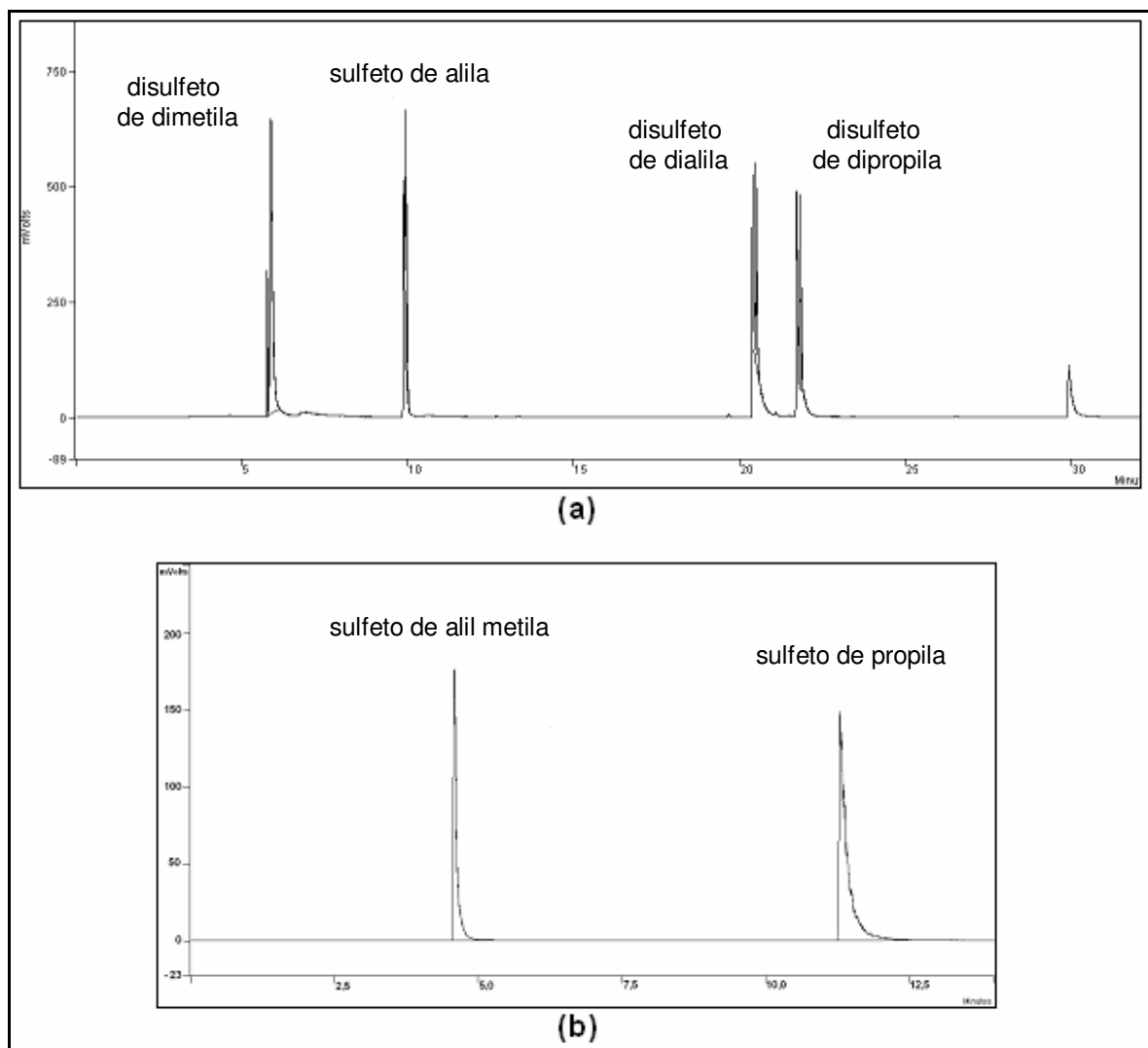


Figura 32: Cromatogramas (a e b) de padrões comerciais analisado em GC-PFPD.

Foram construídas curvas de acordo com VALENTE, AUGUSTO e RIEDO, (2009). O método proposto por VALENTE possui um diferencial que consiste na eliminação de valores discrepantes, o que é feito quando se adota a mediana ao invés da média como ferramenta estatística.

Para os gráficos de linearidade teremos a seguinte notação:

Mediana = mediana dos valores obtidos para cada concentração

$A/C = \text{Área/Concentração}$

IC_i = Intervalo de confiança inferior

IC_s = intervalo de confiança superior

Os gráficos indicativos da região de resposta linear dos detectores foram obtidos para cada um dos padrões disponíveis de sulfetos. Os pontos que ultrapassaram os limites aceitos de linearidade (75 e 125% de confiança) foram descartados, enquanto que os pontos que permaneceram dentro desta faixa foram utilizados para a elaboração das curvas analíticas.

Para a os gráficos de intervalo de linearidade construídos pelo sistema cromatográfico GC-MS apresentados nas **Figuras 33-38**, observa-se que várias concentrações dos padrões ficaram fora dos limites estabelecidos ($0,75 < K < 1,25$), para as curvas construídas nos dois modos de injeção (injeção direta e por SPME).

Para o sistema GC-PFPD o comportamento dos padrões foi linear apesar do fato de que os valores r^2 não serem estatisticamente favoráveis em alguns casos, nos quais se situaram abaixo de 0,95 (**Figuras 39-41**). Esse comportamento provavelmente foi causado pela grande volatilidade das substâncias analisadas o que dificultou à tomada de volumes e/ou a retenção dessas substâncias na seringa. Por isso, o r^2 de algumas curvas analíticas ficou abaixo dos valores especificados pelos órgãos de metrologia química tais como a ANVISA. Outro fato que não deve ser esquecido é que, quando da análise de material vegetal fresco, a maioria dessas substâncias sulfuradas é produzida depois da descompartimentalização do tecido vegetal, que implica em uma variabilidade implícita importante.

Essa avaliação preliminar para análises quantitativas desses compostos sulfurados voláteis serviu de indicativo da necessidade de um estudo mais detalhado dos procedimentos de amostragem para análises quantitativas. No entanto, as análises qualitativas mostraram-se robustas e confiáveis, podendo ser aplicadas na avaliação de compostos sulfurados formados após a fragmentação de bulbos de alho e cebola frescos.

Tabela 12: curva de calibração dos padrões injetados no GC-MS.

Pontos/ padrões	GC-MS						GC-MS					
	Injeção de 1 µL da solução padrão						Injeção por SPME					
	Média t _R (min.)	SD	C.V (%)	Média Área	SD	C.V (%)	Média t _R (min.)	SD	C.V (%)	Área	SD	C.V (%)
Disulfeto de metila (1ppm)	4,883	0,002	0,05	1.899.096	34.046	1,79	4,970	0,012	0,25	2.992.155	414.205	13,84
Disulfeto de metila (2ppm)	4,891	0,001	0,02	4.353.814	128.324	2,95	4,962	0,017	0,35	5.577.478	510.417	9,15
Disulfeto de metila (4ppm)	4,892	0,002	0,03	7.481.246	344.137	4,60	4,984	0,005	0,09	9.147.725	889.789	9,73
Disulfeto de metila (6ppm)	4,896	0,002	0,04	11.401.655	711.476	6,24	4,988	0,012	0,24	20.202.425	1.510.165	7,48
Disulfeto de metila (8ppm)	4,883	0,002	0,05	17.738.249	730.518	4,12	-	-	-	-	-	-
Sulfeto de alila (5ppm)	9,189	0,004	0,04	12.489.118	443.779	3,55	9,226	0,005	0,05	12.527.129	2.636.071	21,04
Sulfeto de alila (10ppm)	9,218	0,001	0,01	22.994.267	559.808	2,43	9,249	0,008	0,09	22.205.445	6.171.067	27,79
Sulfeto de alila (15ppm)	9,234	0,003	0,03	34.738.968	1.146.601	3,30	9,259	0,015	0,16	27.809.898	4.606.444	16,56
Sulfeto de alila (24ppm)	9,240	0,003	0,03	52.219.789	2.458.010	4,71	9,295	0,005	0,06	43.629.553	4.990.361	11,44
Sulfeto de alila (40ppm)	9,159	0,002	0,02	54.792.042	2.445.140	4,46	9,308	0,011	0,11	70.501.596	9.661.986	13,70
Disulfeto de dialila (5ppm)	20,302	0,007	0,03	5.202.605	103.207	1,98	20,318	0,017	0,08	5.300.181	2.081.239	39,27
Disulfeto de dialila (10ppm)	20,338	0,002	0,01	10.532.497	437.399	4,15	20,324	0,005	0,02	5.214.503	724.439	13,89
Disulfeto de dialila (15ppm)	20,360	0,003	0,02	16.862.116	782.779	4,64	20,342	0,011	0,05	6.059.322	1.352.381	22,32
Disulfeto de dialila (24ppm)	20,370	0,003	0,02	23.929.499	2.253.615	9,42	20,371	0,007	0,04	8.878.375	1.352.048	15,23
Disulfeto de dialila (40ppm)	20,266	0,003	0,01	25.610.330	1.089.902	4,26	20,399	0,021	0,10	29.199.103	8.335.187	28,55
Disulfeto de dipropila (5ppm)	21,792	0,007	0,03	7.899.098	341.865	4,33	21,812	0,022	0,10	14.534.123	5.989.817	41,21
Disulfeto de dipropila (10ppm)	21,818	0,001	0,01	15.312.063	281.480	1,84	21,806	0,007	0,03	11.261.038	1.778.828	15,80
Disulfeto de dipropila (12ppm)	21,847	0,003	0,02	19.244.400	374.888	1,95	21,809	0,011	0,05	8.944.560	2.137.550	23,90
Disulfeto de dipropila (20ppm)	21,752	0,003	0,01	29.430.098	1.136.884	3,86	21,862	0,021	0,10	31.233.775	8.934.463	28,61

Legendas: C.V % - coeficiente de variação percentual, SD - desvio padrão, t_R - tempo de retenção em minutos.

Tabela 13: curva de calibração dos padrões injetados no GC-PFPD.

Pontos/ padrões	GC-PFPD						GC-PFPD					
	Injeção de 1 µL da solução padrão						Injeção por SPME					
	Média t _R (min.)	SD	C.V (%)	Média Área	SD	C.V (%)	Média t _R (min.)	SD	C.V (%)	Área	SD	C.V (%)
Sulfeto de alil metila (0,1ppm)	4,500	0,004	0,08	20.653.703	1.990.778	9,64	4,548	0,046	1,01	11.239	5.311	47,26
Sulfeto de alil metila (0,4ppm)	4,585	0,004	0,08	6.604.267	3.653.619	55,32	4,530	0,004	0,09	47.814	13.910	29,09
Sulfeto de alil metila (0,6ppm)	4,584	0,002	0,04	17.404.417	1.079.693	6,20	4,540	0,027	0,60	68.062	17.510	25,73
Sulfeto de alil metila (0,8ppm)	4,560	0,038	0,84	33.748.951	1.349.490	4,00	4,551	0,027	0,59	104.159	14.586	14,00
Sulfeto de alil metila (1ppm)	4,524	0,009	0,20	81.341.940	2.605.585	3,20	4,575	0,037	0,82	159.895	67.904	42,47
Sulfeto de propila (1ppm)	11,686	0,073	0,62	18.658.057	2.605.583	13,96	-	-	-	-	-	-
Sulfeto de propila (4ppm)	11,318	0,029	0,25	66.251.053	1.349.489	2,04	-	-	-	-	-	-
Sulfeto de propila (6ppm)	11,265	0,012	0,11	82.595.581	1.079.696	1,31	-	-	-	-	-	-
Sulfeto de propila (8ppm)	11,238	0,008	0,07	74.114.366	39.586.257	53,41	-	-	-	-	-	-
Sulfeto de propila (10ppm)	11,175	0,011	0,10	79.322.733	1.994.809	2,51	-	-	-	-	-	-

Legendas: C.V % - coeficiente de variação percentual, SD - desvio padrão, t_R - tempo de retenção em minutos.

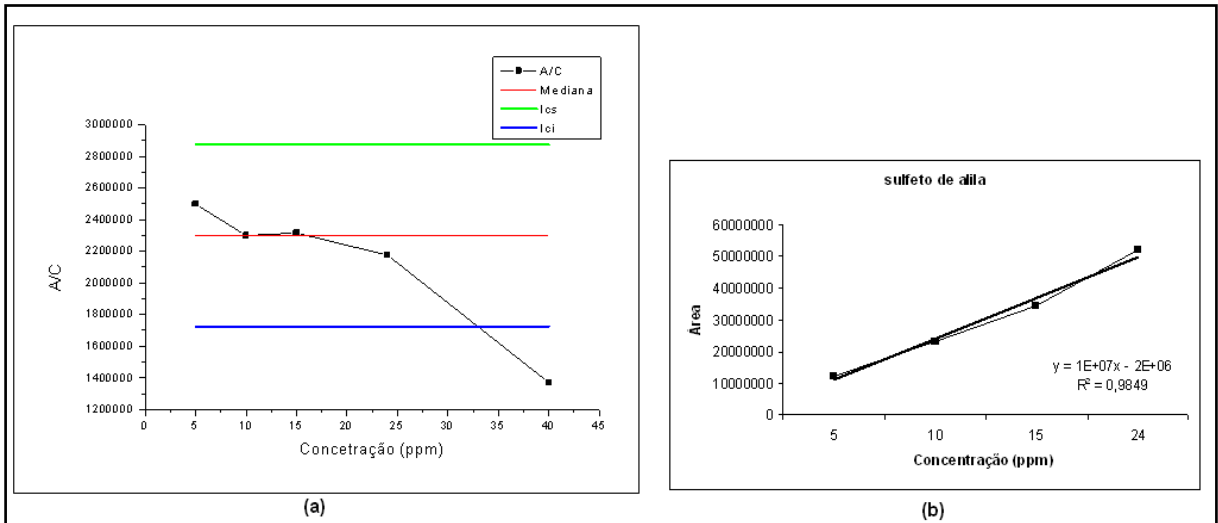


Figura 33: (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 μ L do padrão sulfeto de alila, injetado em GC-MS.

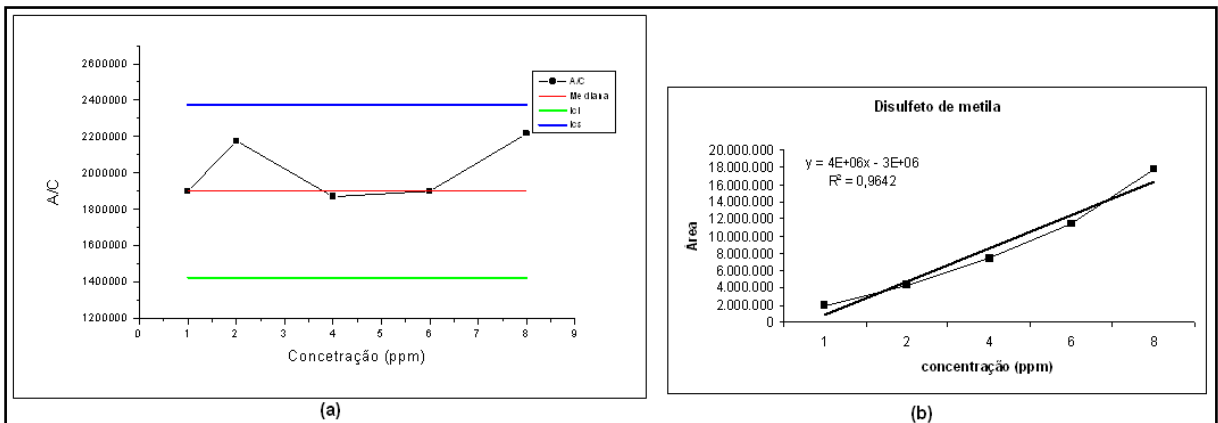


Figura 34: (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 μ L do padrão disulfeto de metila, injetado em GC-MS.

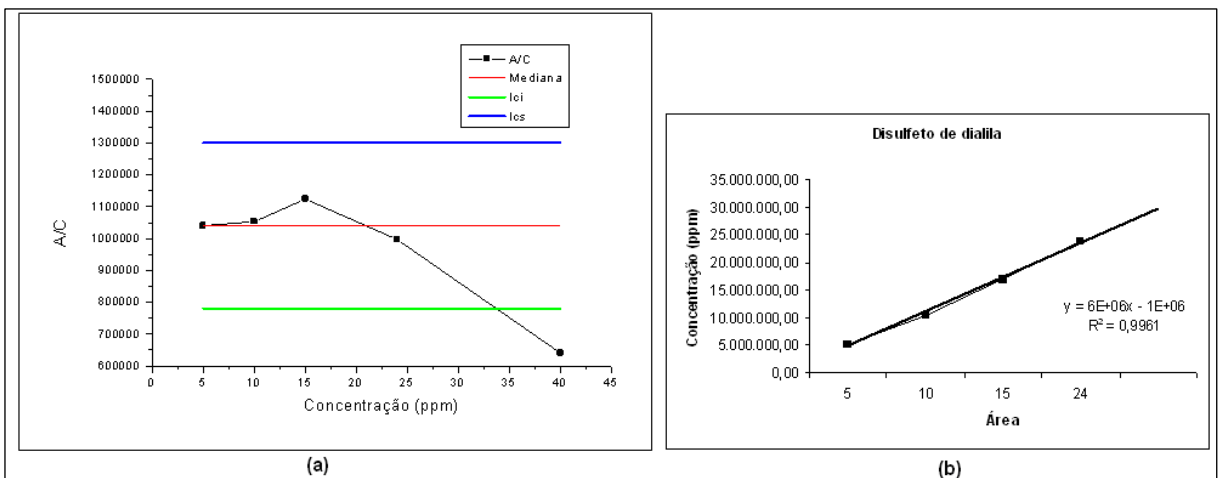


Figura 35: (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 μ L do padrão disulfeto de dialila, injetado em GC-MS.

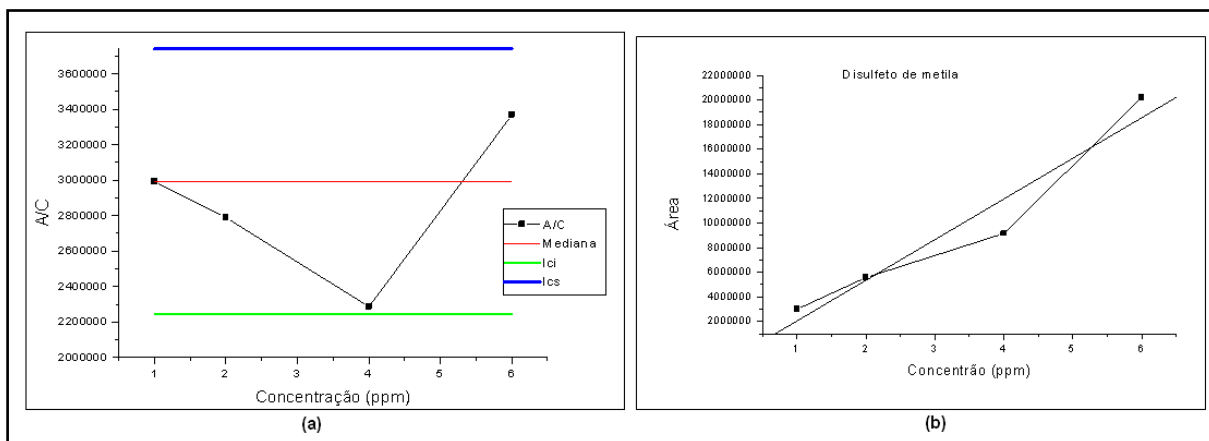


Figura 36: (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção por SPME do padrão disulfeto de metila, injetado em GC-MS.

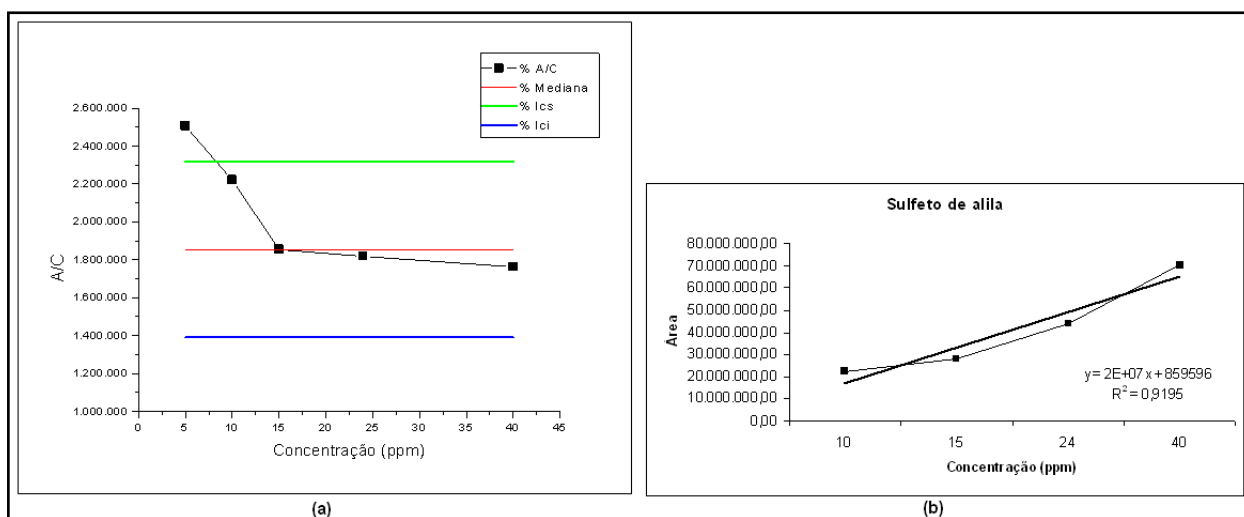


Figura 37: (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção por SPME do padrão sulfeto de alila, injetado em GC-MS.

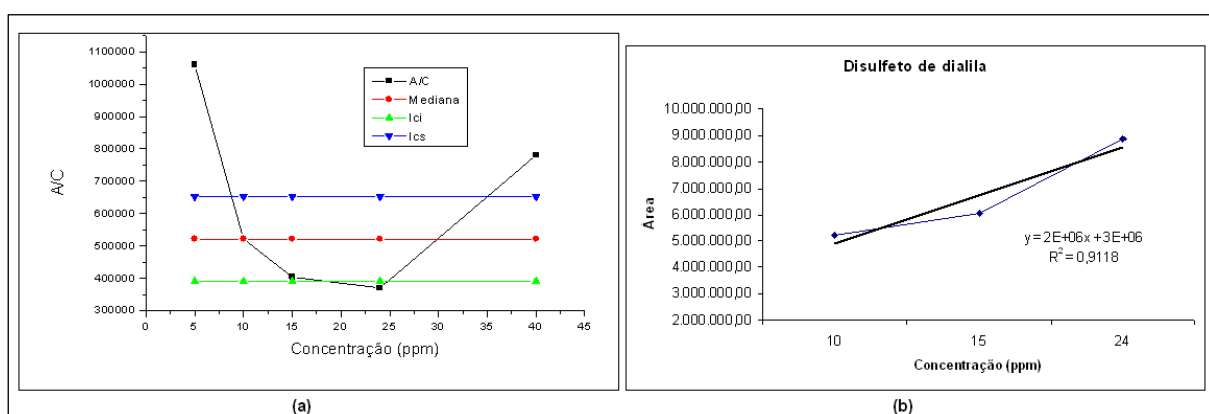


Figura 38: (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção por SPME do padrão disulfeto de dialila, injetado em GC-MS.

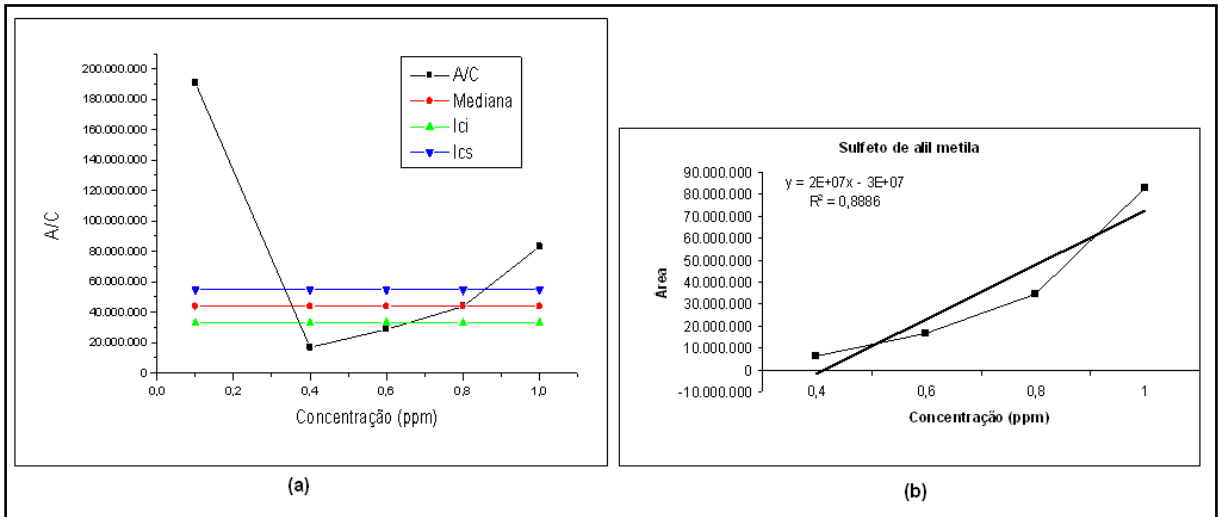


Figura 39: (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 µL do padrão sulfeto de alil metila, injetado em GC-PFPD.

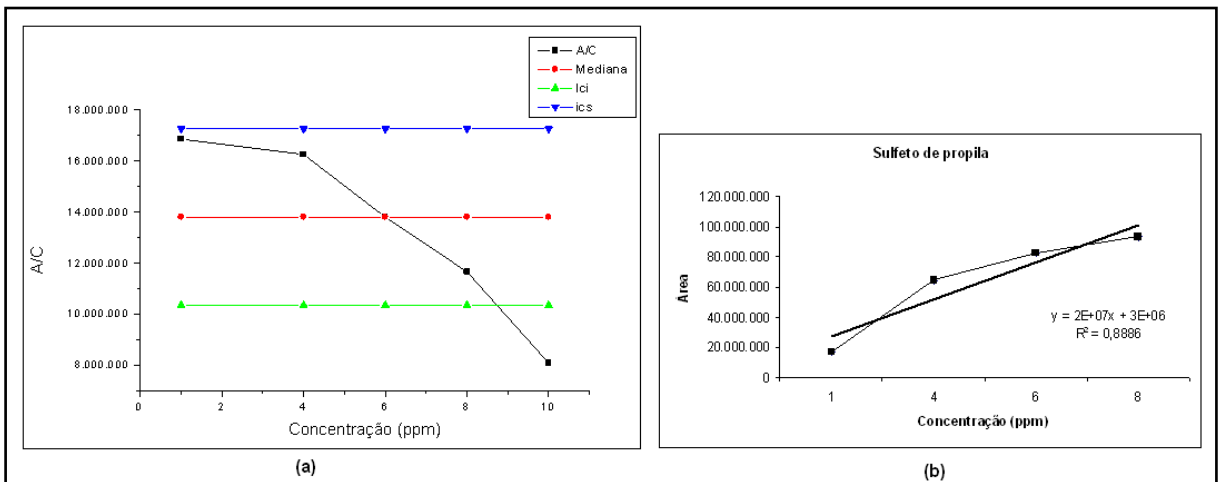


Figura 40: (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção direta de 1,0 µL do padrão sulfeto propila, injetado em GC-PFPD.

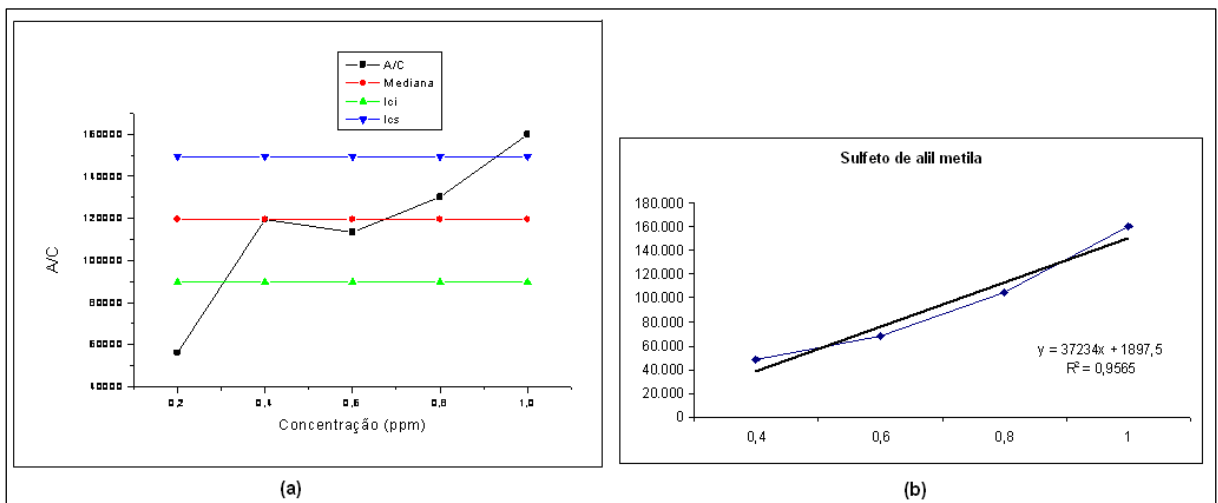


Figura 41: (a) intervalo de linearidade, (b) curva analítica da injeção por SPME do padrão sulfeto de ali metila, injetado em GC-PFPD.

5.7 Aplicação do método qualitativo em amostra comercial de óleo de alho

Para uma avaliação da aplicabilidade do método proposto neste trabalho, o mesmo foi utilizado na análise de uma amostra de óleo essencial comercial muito consumida no mercado brasileiro. Consta no rótulo do produto que o óleo de alho é composto por óleo volátil, cuja composição contém 2,6 mg de óleo essencial de alho, que incluem compostos como o dialilssulfeto, dialildissulfeto e dialiltrissulfeto, e 247,4 mg de óleo de soja como excipiente.

Nas análises realizadas por GC-MS e GC-PFPD foi possível identificar 7 compostos sulfurados e 1 não sulfurado no óleo de alho (**Figura 42 e Tabelas 14 e 15**).

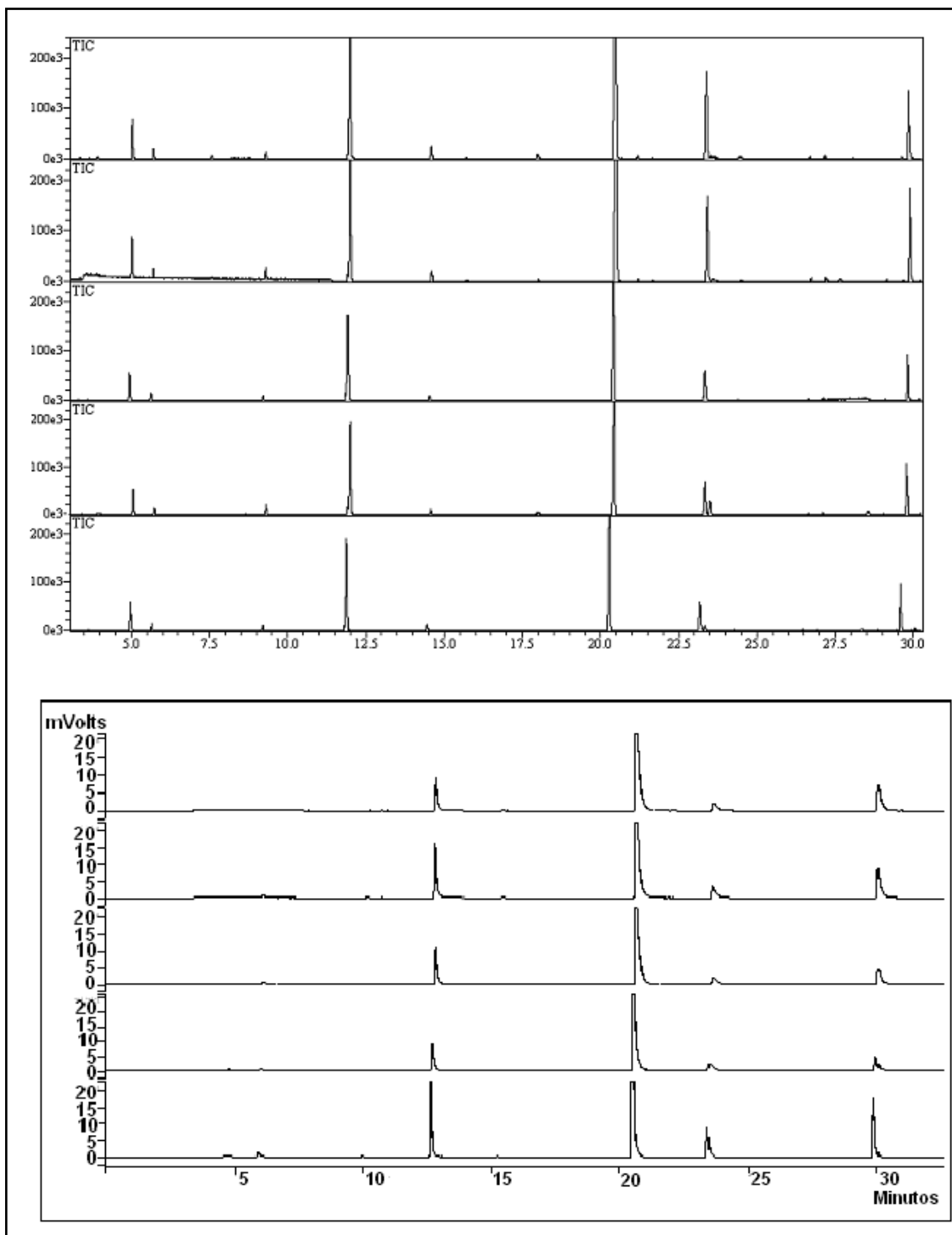


Figura 42: Cromatogramas das cápsulas de óleo de alho injetados em (a) GC-MS e (b) GC-PFPD.

Após analisar, em quintuplicata, as cápsulas de óleo de alho nos dois sistemas cromatográficos, verificou-se que o método qualitativo foi reprodutivo e eficiente, possibilitando a identificação de compostos sulfurados e não sulfurados.

Foi possível a identificação de metil-benzeno (tolueno), que possivelmente deve ser utilizando na extração do óleo essencial. O metil-benzeno (tolueno) é um solvente tóxico que pode afetar o sistema nervoso, sendo ele facilmente absorvido pelos pulmões (40 a 60% do inalado) e em níveis baixos ou moderados podem produzir cansaço, confusão mental, debilidade, perda da memória, náusea, perda do apetite e perda da visão e audição.

Tabela 14: Identificação de compostos sulfurados e não sulfurados em amostra de óleo essencial comercial analisado pelo sistema cromatográfico GC-MS e GC-PFPD.

GC-PFPD		CG-MS			Identificação	NIST/ WILEY	MM
cápsula de óleo de alho		cápsula de óleo de alho					
t_R (min)	$IK_{cal.}$	t_R (min)	$IK_{cal.}$	$IK_{Lit.}$			
-	-	4.989	-	747	Dissulfeto de dimetila ¹	98	94
6.111	-	5.665	-	746	Metil-benzeno	94	92
-	-	9.215	859	861	Sulfeto de alila ¹	89	114
12.833	907	11.884	917	913	dissulfeto de alil metila	80	120
-	-	14.455	968	972	Trissulfeto de dimetila	90	126
20.629	1.076	20.296	1.082	1079	Dissulfeto de dialila ¹	79	146
23.739	1.143	23.179	1.138	1142	trissulfeto de alil metila	79	152
-	-	29.591	1.306	1297	trissulfeto de dialila	91	178
30.184	1.352	-	-	1353/ 1345	trissulfeto de (E/Z) prop-1-enila propila ²	-	180

Legendas: ¹ indentificado por padrão, ² tentativa de identificação, $IK_{cal.}$ - Índice de Kovats calculado, $IK_{Lit.}$ - Índice de Kovats literatura, t_R - tempo de retenção em minutos.

Tabela 15: Estudo da repetibilidade da área e do tempo de retenção para amostras de cápsula de óleo de alho analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.

Picos	GC-MS						GC-PFPD					
	cápsula de óleo de alho						cápsula de óleo de alho					
	Média t_R (min.)	SD t_R (min.)	C.V % t_R (min.)	Média área	SD área	C.V % área	Média t_R (min.)	SD t_R (min.)	C.V % t_R (min.)	Média área	SD área	C.V % área
1	4,977	0,01	0,19	144.520	28.207	19,52	-	-	-	-	-	-
2	5,656	0,01	0,17	32.183	7.441	23,12	6,091	0,10	1,60	4.975	1.609	32,35
3	9,204	0,01	0,08	34.254	14.211	41,49	-	-	-	-	-	-
4	11,883	0,01	0,07	698.808	198.917	28,47	12,784	0,08	0,65	74.785	33.842	45,25
5	14,462	0,01	0,09	38.921	20.299	52,15	-	-	-	-	-	-
6	20,292	0,01	0,05	1.998.032	949.370	47,52	20,586	0,07	0,33	627.926	242.632	38,64
7	23,180	0,01	0,04	344.282	190.968	55,47	23,613	0,12	0,50	37.780	15.497	41,02
8	29,590	0,01	0,02	282.727	112.628	39,84	30,079	0,11	0,38	52.714	21.208	40,23
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legendas: C.V % - coeficiente de variação percentual, SD - desvio padrão, t_R - tempo de retenção em minutos.

6. CONCLUSÃO

Com relação à metodologia desenvolvida neste trabalho destacam-se os processos de tratamento e de extração da amostra, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. O protocolo desenvolvido propõe o tratamento da amostra em condições de controle de temperatura (sendo mantidas as amostras a 5° C antes da trituração e a temperatura ambiente para trituração da cebola e a -80 °C para alho) e do tempo de manuseio, utilizando trituração com uma faca (método rápido e fácil) e submetido imediatamente a extração com a fibra de SPME (um meio de extração eficiente e econômico) sendo controlada a temperatura do ambiente e analisada em cromatografia gasosa, sem a necessidade de uso de solventes orgânicos ou de reagentes, tornando o método viável, eficiente, rápido e de baixo custo. Na literatura a maioria das metodologias desenvolvidas é da extração do óleo essencial sendo feitas por hidrodestilação, extração por fluido supercrítico e outros, com utilização de reagente e solvente orgânico, tornando o método complicado e de alto custo.

A técnica de extração por SPME é uma ferramenta muito útil para as análises de compostos voláteis, pois não usa solvente, é rápida, simples, de baixo custo e versátil e pode ser usada para a extração de compostos orgânicos. Essa técnica de extração é relativamente nova (década de 90) e continua em consolidação, tanto sob o aspecto de fundamentação teórica, quanto de aplicações, e vem sendo muito utilizada por inúmeros autores para análise de substâncias voláteis em alimentos ou, de uma maneira geral para amostras sólidas, líquidas e gasosas.

As técnicas de cromatográfica gasosa GC-MS e GC-PFPD foram uma ferramenta importante para a detecção e identificação de compostos sulfurados e não sulfurados da espécie *allium*.

Utilizando o GC-MS foi possível a identificação de 14 compostos sulfurados voláteis e 2 compostos não sulfurados voláteis de cultivares de alho e a identificação de 10 compostos sulfurados voláteis e 1 composto não sulfurado volátil de cultivares de cebola. Identificou também 7 compostos sulfurados voláteis de uma cápsula de óleo de alho comercial, foi possível a identificação de metil-benzeno (tolueno) um solvente tóxico, que em hipótese alguma poderia ser encontrado em uma amostra comercial.

Utilizando GC-PFPD foi possível desenvolver um método seletivo e significativamente mais sensível em relação à GC-FID E GC-MS, capaz de analisar grande número de componentes sulfurados voláteis de alho e cebola. Portanto, o novo método proposto, utilizando CG-PFPD, para a determinação de substâncias sulfuradas, demonstrou que suas principais vantagens são a alta sensibilidade, excelente capacidade de resolução, precisão e confiabilidade.

7. PERSPECTIVA DE ESTUDO PARA ANÁLISES DE COMPOSTOS

SULFURADOS

O objetivo principal deste projeto foi desenvolver um método qualitativo para identificar compostos sulfurados e não sulfurados de cultivares de alho e cebola da espécie *Allium ssp.* Além das análises qualitativas foram inclusos nesse estudo avaliações preliminares de alguns parâmetros para análise quantitativa. Verificou-se também a aplicação e a viabilidade do método desenvolvido em amostra comercial. De fato, foram surgindo dúvidas e novas perspectivas de estudos para análises qualitativas e quantitativas de compostos sulfurados da espécie *Allium ssp.*, os quais serão descrito abaixo:

Desenvolver análises qualitativas para caracterização química de cultivares de alho e cebola e conseqüente controle de qualidade, avaliação da melhor região de plantio e época para colher esses cultivares considerando seus compostos sulfurados voláteis, ou seja, contendo maior quantidade desses analitos benéficos para a saúde.

Será que esses cultivares, no comércio, são corretamente estocados? Será que as empresas de produtos derivados de alho estão de acordo com o que eles especificam em seus produtos, tais como as características nutricionais. De acordo com nossa análise qualitativa, em um produto derivado de óleo essencial de alho de uma marca reconhecida e de grande comércio no Brasil encontrou-se metil-benzeno (tolueno) - será que há no momento um controle de qualidade exigido pelos órgãos governamentais para esse tipo de contaminação desse tipo de amostra?

Desenvolver-se um método quantitativo também para controle de qualidade dessas substâncias da espécie *allium* ssp e para produtos industriais derivados de alho, que são importantes porque muitas das substâncias sulfuradas produzidas pelas espécies de *Allium* são reconhecidamente benéficas à saúde.

Observa-se que para esses tipos de análises de cultivares de alho e cebola ainda existe uma extensa área de estudo a ser desenvolvida.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE n°. 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos e revoga a Resolução RE n° 475 de 19 de março de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 02 set. 2008.

ALECIO, A. C. **Utilização de cromatografia líquida e gasosa acoplada a espectrometria de massas no estudo do perfil químico de espécies de Piperaceae, Rubiaceae, Lauraceae e Celastraceae**. 2005. 145 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

ALMEIDA, M.; BONAVENTURA, C.; LIMA, A. D.; AZAR, L. **Alho: tecnologia em gastronomia-noções de nutrição**. Disponível em: <<http://www.unirio.br/gastronomiavancada/alho/seminariodealho.htm>>. Acesso em: 13 maio 2008.

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. Cebola. In: _____ . **Plantas que curam**. Rio de Janeiro: Ed. Três, 1983. v. 10, p. 135-136.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. London: John Wiley & Sons, 2003.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

ATAR, E.; CHESKIS, S.; AMIRAV, A. Pulsed flame - a novel concept for molecular detection. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2061-2064, 1991.

BABU, P. S.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary capsaicin and onion on the metabolic abnormalities associated with streptozotocin induced diabetes mellitus. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 175, n. 1-2, p. 49-57, 1997.

BAUER, R.; BREU, W.; WAGNER, H.; WEIGAND, W. Enantiomeric separation of racemic thiosulphinate esters by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 541, p. 464-468, 1991.

BEAULIEU, J. C.; GRIMM, C. C. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1345-1352, 2001.

BENEVIDES, P. J. C. **Estudo fitoquímico guiado por bioensaios em algumas espécies da Mata Atlântica e Floresta Amazônica**. 2001. 209 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BLOCK, E. The chemistry of garlic and onions. **Scientific American**, v. 252, p. 114-119, 1985.

BLOCK, E. The organosulfur chemistry of the Genus *Allium* - Implications for the Organic Chemistry of Sulfur. **Angewandte Chemie International ed in English**, v. 31, p. 1135-1178, 1992.

BLOCK, E.; PUTMAN, D.; ZHAO, S. H. *Allium* chemistry: GC-MS analysis of thiosulfinates and related compounds from onion, leek, scallion, shallot, chive, and Chinese chive. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2431-2438, 1992.

BLOCK, E.; NAGANATHAN, S.; PUTMAN, D.; ZHAO, S. H. *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2418-2430, 1992.

BLOCK, E.; NAGANATHAN, S.; PUTMAN, D.; ZHAO, S. H. Organosulfur chemistry of garlic and onion: recent results. **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, p. 625-632, 1993.

BOCCHINI, P.; ANDALO, C.; POZZI, R.; GALLETTI, G. C.; ANTONELLI, A. Determination of diallyl thiosulfinate (allicin) in garlic (*Allium sativum* L.) by high-performance liquid chromatography with a post-column photochemical reactor. **Analytica Chimica Acta**, v. 441, p. 37-43, 2001.

BOEING, G. **Fatores que afetam a qualidade da cebola na agricultura familiar catarinense**. Florianópolis: Instituto Cepa, 2002.

BOITEUX, L. S.; MELO, P. C. T. **Taxonomia e origem**. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/taxonomia_e_origem.htm>. Acesso em: 25 mar. 2007.

BORDIA, T.; MOHAMMED, N.; THOMSON, M.; ALI, M. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 54, n. 3, p. 183-186, 1996.

CALVEY, E. M.; ROACH, J. A.; BLOCK, E. Supercritical fluid chromatography of garlic (*Allium sativum*) extracts with mass spectrometric identification of allicin. **Journal of Chromatography A**, v. 32, p. 93-96, 1994.

CALVEY, E. M.; MATUSIK, J. E.; WHITE, K. D.; DEORAZIO, R.; SHA, D.; BLOCK, E. *Allium* chemistry: supercritical fluid extraction and LC-APCI-MS of thiosulfinates and related compounds from homogenates of garlic, onion, and ramp. Identification in garlic and ramp and synthesis of 1-propanesulfinothioic Acid S-Allyl Ester. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4406-4413, 1997.

CALVEY, E. M.; MATUSIK, J. E.; WHITE, K. D.; BETZ, J. M.; BLOCK, E.; LITTLEJOHN, M. H.; NAGANATHAN, S.; PUTMAN, D. Off-Line supercritical fluid extraction of thiosulfinates from garlic and onion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42 n. 6, p. 1335-1341, 1994.

CALVO-GÓMEZ, O.; MORALES-LÓPEZ, J.; LÓPEZ, M. G. Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1036, p. 91-93, 2004.

CARRAPISO, A. I.; JURADO, A.; TIMON, M. L.; GARCIA, C. Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6453-6458, 2002.

CHEN, J. H.; CHEN, H.; TSAI, S. J.; JEN, C. J. Chronic consumption of raw but not boiled Welsh onion juice inhibits rat platelet function. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 1, p. 34-37, 2000.

CHESKIS, S.; ATAR, E.; AMIRAV, A. Pulsed-flame photometer: a novel gas chromatography detector. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 539-555, 1993.

CRUZ-VILLALON, G. Synthesis of allicin and purification by solid-phase extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 290, p. 376-378, 2001.

DAGAN, S. Comparison of gas chromatography-pulsed flame photometric detection-mass spectrometry, automated mass spectral deconvolution and identification system and gas chromatography-tandem mass spectrometry as tools for trace level detection and identification. **Journal of Chromatography A**, v. 868, n. 2, p. 229-247, 2000.

DALLAMARIA, G. C. M. A cultura do alho no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, jul. 2002. Suplemento 2. 1 CD-ROM.

DILL, J. D.; FISHER, C. L.; McLAFFERTY, F. W. Structures of relative energies of gaseous CH_3C^+ ions. **Journal of America Chemistry Society**, v. 101, p. 6526-6531, 1978.

ELLMORE, G.; FELDBERG, R. Alliin lyase localization in bundle sheaths of garlic clove (*Allium sativum*). **American Journal of Botany**, v. 81, p. 89-95, 1994.

ESTEBAN, L. **La espectrometria de massas en imágenes**. Madrid: ACK Editores, 1996.

FENWICK, G. G.; HANLEY, A. B. The Genus *Allium* - Part. 2. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 22, p. 199-377, 1985.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2000. p. 412.

FREEMAN, F.; KODERA, Y. Garlic chemistry: stability of S-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothionate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2332-2338, 1995.

FREEMAN, G. G.; McBRENN, F. A rapid spectrophotometric method of determination of thiosulfinate in onion (*Allium cepa*) and its significance in flavor studies. **Biochemical Society Transactions**, v. 1, p. 1150-1154, 1973.

FUKUSHIMA, S.; TAKADA, N.; HORI, T.; WANIBUCHI, H. Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion. **Journal Cell Biochemistry Supplement**, v. 27, p. 100-105, 1997.

GRANVOGL, M.; CHRISTLBAUER, M.; SCHIEBERLE, P. Quantitation of the intense aroma compound 3-mercapto-2-methylpentan-1-ol in raw and processed onions (*Allium cepa*) of different origins and in other *Allium* varieties using a stable isotope dilution assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2797-2802, 2004.

GRIFFITHS, G.; TRUEMAN, L.; CROWTHER, T.; THOMAS, B.; SMITH, B. Onions - a global benefit of health. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 603-615, 2002.

GRISOLIA, C. K.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of mutagenic effect of the antihypertensive drug methyldopa (Aldomet) on mammalian systems *in vivo* and *in vitro* and on *Allium cepa*. **Mutation Research**, v. 259, n. 2, p. 127-132, 1991.

GUSTINE, D. L. Determination of S-metil cysteine sulfoxide in Brassica extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 319, p. 450-453, 1985.

HELEN, A.; KRISHNAKUMAR, K.; VIJAYAMMAL, P. L.; AUGUSTI, K. T. Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa* Linn.) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. **Toxicology Letters**, v. 116, n. 1-2, p. 61-68, 2000.

HELEN, A.; RAJASREE, C. R.; KRISHNAKUMAR, K.; AUGUSTI, K. T.; VIJAYAMMAL, P. L. Antioxidant role of oils isolated from garlic (*Allium sativum* Linn.) and onion (*Allium cepa* Linn.) on nicotine-induced lipid peroxidation. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 41, n. 5, p. 316-319, 1999.

HENRY, C. M. Nutraceuticals: food or trend? **Chemical Engineering News**, v. 21, p. 42-47, 1999.

HONG, G.; PEISER, G.; CANTWELL, M. I. Use of controlled atmospheres and heat treatment to maintain quality of intact and minimally processed green onions. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, p. 53-61, 2000.

HORI, M. Onion aphid (*Neotoxoptera formosana*) attractants, in the *headspace* of *Allium fistulosum* and *A. tuberosum* leaves. **Journal of Applied Entomology**, v. 131, p. 8-12, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção**. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2004/pam2004.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

ITO, Y.; NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, Y. Suppression of aflatoxin B1-or methyl methanesulfonate-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells after treatment with S-methanethiosulfonate. **Mutation Research**, v. 393, n. 3, p. 307-316, 1997.

JUNYAPOON, S.; ROSS, A. B.; BARTLE, K. D.; FRERE, B.; LEWIS, A. C.; COOKE, M. Injection by programmed temperature vaporization injection (PTV) of gaseous samples for gas chromatography - atomic emission spectrometry (GC-AED). **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, p. 47-51, 1999.

KELKAR, S. M.; KAKLIJ, G. S.; BAPAT, V. A. Determination of antidiabetic activity in *Allium cepa* (onion) tissue cultures. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 38, n. 4, p. 277-279, 2001.

KEUSGEN, M. TLC analysis of *Allium sativum* constituents. **Planta Medica**, v. 63, p. 93-94, 1997.

KIM, S. M.; WU, C. M.; KOBAYASHI, A.; KUBOTA, K.; OKUMURA, J. Volatile compounds in stir-fried garlic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2951-2955, 1995.

KIMBARIS, A. C.; SIATIS, N. G.; PAPPAS, C. S.; TARANTILIS, P. A.; DAFERERA, D. J.; POLISSIOU, M. G. Quantitative analysis of garlic (*Allium sativum*) oil unsaturated acyclic components using FT-Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 94, p. 287-295, 2006.

KUBEC, R.; DRHOVÁ, V.; VELÍSEK, J. Volatile compounds thermally generated from S-propylcysteine and S-propylcysteine sulfoxide - aroma precursors of *Allium* vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1132-1138, 1999.

KUBEC, R.; SVOBODOVÁ, M.; VELISEK, J. Gas chromatographic determination of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides. **Journal of Chromatography A**, v. 862, n. 1, p. 85-94, 1999.

KUBEC, R.; VELISEK, J.; DOLEZAL, M.; KUBELKA, V. Sulfur-containing volatiles arising by thermal degradation of *alliin* and deoxyalliin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3580-3585, 1997.

KUMARI, K.; MATHEW, B. C.; AUGUSTI, K. T. Antidiabetic and hypolipidemic effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from *Allium cepa* Linn. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 329, n. 1, p. 49-54, 1995.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993.

LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 3-22, 2006.

LAWSON, L. D.; WANG, Z. J.; HUGHES, B. G. Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. **Planta Medica**, v. 57, p. 363-370, 1991.

LAWSON, L. D.; WOOD, S. G.; HUGHES, B. G. HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates. **Planta Medica**, v. 57, p. 263-270, 1991.

LEE, W. Y.; BAE, D. H.; CHOI, Y. H. Extraction of thiosulfinates from garlic using gas in liquid dispersion. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 1, p. 179-185, 1996.

LEFFINGWELL, J. C.; ALFORD, E. D. Volatile constituents of perique tobacco. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, p. 899-915, 2005.

MACHIELS, D.; VAN RUTH, S. M.; POSTHUMUS, M. A.; ISTASSE, L. Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. **Talanta**, v. 60, p. 755-764, 2003.

MackU, C.; SHIBAMOTO, T. Volatile sulfur-containing compounds generated from the thermal interaction of corn oil and cysteine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1987-1989, 1991.

MARCHETTI, C. N.; TELASCREA, M.; TININIS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Dinâmica circadiana e sazonal dos principais componentes do óleo essencial de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 23-26, 2006.

McLafferty, F. W.; Turecek, F. **Interpretation of mass spectra**. 4th ed. Sausalito: University Science Books, 1993.

MIRON, T.; RABINKOV, A.; MIRELMAN, D.; WEINER, L.; WILCHEK, M. A. Spectrophotometric assay for allicin and alliinase (*Alliin lyase*) activity: reaction of 2-Nitro-5-thiobenzoate with thiosulfonates. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 317-325, 1998.

MIRON, T.; SHIN, I.; FEIGENBLAT, G.; WEINER, L.; MIRELMAN, D.; WILCHEK, M.; RABINKOV, A. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfonates. **Analytical Biochemistry**, v. 307, p. 76-83, 2002.

MOCHIZUKI, E.; YAMAMOTO, T. Identification of *Allium* products using flame photometric detection gas chromatography and distribution patterns of volatile sulfur compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 5170-5176, 1998.

MONDY, N.; DUPLAT, D.; CHRISTIDES, J. P.; ARNAULT, I.; AUGER, J. Aroma analysis of fresh and preserved onions and leek by dual solid-phase microextraction-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p. 89-93, 2002.

MONDY, N.; NAUDIN, A.; CHRISTIDES, J. R.; MANDON, N.; AUGER, J. Comparison of GC-MS and HPLC for the analysis of *allium* volatiles. **Chromatographia Supplement**, v. 53, p. 356-360, 2001.

MOTA, J. H.; YURI, J. E.; RESENDE, G. M.; SOUZA, R. J. Similaridade genética de cultivares de alho pela comparação de caracteres morfológicos, físico-químicos produtivos e moleculares. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 2, abr./jun. 2006.

MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; YURI, J. E.; RESENDE, G. M.; PAIVA, L. V. Diversidade genética de cultivares de alho (*allium sativum* L.) por meio de marcador molecular RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 764-770, 2004.

MUHLBAUER, R. C.; LOZANO, A.; RELINI, A. Onion and a mixture of vegetables, salads, and herbs after bone resorption in the rat by a mechanism independent of their base excess. **Journal of Bone & Mineral Research**, v. 17, n. 7, p. 1230-1236, 2002.

NAZNIN, M. T.; AKAGAWA, M.; OKUKAWA, K.; MAEDA, T.; MORITA, N. Characterization of *E*- and *Z*-ajoene obtained from different varieties of garlics. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1113-1119, 2008.

NIKOLIC, V.; STANKOVIC, M.; NIKOLIC, L.; SKALA, D. HPLC analysis of thiosulphinates in aqueous extracts from garlic (*Allium sativum* L.). **Chemical Industry**, v. 55, p. 120-124, 2001.

PAWLISZYN, J. New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 113-122, 1995.

PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction**: theory and practice. New York: Wiley, 1997. p. 3.

PUIATTI, M.; FERREIRA, F. A. Cultura do alho. In: FONTES, P. C. R. (Ed.). **Olericultura**: teoria e prática. Viçosa: Ed. UFV, 2005. p. 299-322.

QIAN, M.; REINECCIUS, G. Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 252-259, 2003.

REMBOLD, H.; WALLNER, P.; NITZ, S.; KOLLMANNNSBERGER, H.; DRAWERT, F. Volatile components of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 659-662, 1989.

RESENDE, F. V. Mercado promissor. **Cultivar**, v. 28, n. 6, 2004.

ROSE, P.; WHITEMAN, M.; MOORE, P. K.; ZHU, Y. Z. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 351-368, 2005.

SARAULLO, A.; MARTOS, P. A.; PAWLISZYN, J. Water analysis by solid phase microextraction based on physical chemical properties of the coating. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 11, p. 1992-1998, 1997.

SCHÄFER, B.; HENNIG, P.; ENGEWALD, W. Methodological aspects of *headspace* SPME: application of the retention index system. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 20, p. 217-221, 1997.

SCHMIDT, N. E.; SANTIAGO, L. M.; EASON, H. D.; DAFFORD, K. A.; GROOMS, C. A.; LINK, T. E.; MANNING, D. T.; COOPER, S. D.; KEITH, R. C.; CHANCE III, W. O.; WALLA, M. D.; COTHAM, W. E. Rapid extraction method of quantitating the lachrymatory factor of onion using gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2690-2693, 1996.

SCHNEIDER, E. **A cura e a saúde pelos alimentos**. 2. ed. Santo André: Casa Publicadora Brasileira, 1984.

SHEELA, C. G.; KUMUD, K.; AUGUSTI, K. T. Antidiabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats (letter). **Planta Medica**, v. 61, n. 4, p. 356-357, 1995.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SINHA, N. K.; GUYER, D. E.; GAGE, D. A.; LIRA, C. L. Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 842-845, 1992.

TELASCREA, M.; ARAÚJO C, C.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; MORAES, P. L. R.; CAVALHEIRO, A. J. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): composition and intraspecific chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 222-232, 2007.

TEYSSIER, C.; AMIOT, M. J.; MONDY, N.; AUGER, J.; KAHANE, R.; SIESS, M. H. Effect of onion consumption by rats on hepatic drug-metabolizing enzymes. **Food Chemistry Toxicology**, v. 39, n. 10, p. 981-987, 2001.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 4, p. 523-530, 2000.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: < <http://www.chemkeys.com/artigo/12/0>>. Acesso em: 10 mar. 2009.

VAN DE GRAFF, B.; McLAFFERTY, F. W. Structure and formation of gaseous $C_2H_5S^+$ íons. **Journal of American Chemistry Society**, v. 99, p. 6806-6810, 1977.

VARIAN ASSOCIATES. **Pulsed Flame Photometric Detector (PFPD) for GC 3800:** operator's manual. Washington, D.C., 1997.

VIEIRA, L. S. Plantas medicinais de uso popular: cebola. In_____. **Fitoterápica da Amazônia:** manual de plantas medicinais. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. p. 101-103.

WEENEN, H.; KOOLHAAS, W. E.; APRIYANTONO, A. Sulfur-containing volatiles of Durian fruits (*Durio zibethinus* Murr.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3291-3293, 1996.

ZEISEL, S. H. Health: regulation of nutraceuticals. **Science**, v. 285, p. 1854- 1853, 1999.

ZIYYAT, A.; LEGSSYER, A.; MEKHFI, H.; DASSOULI, A.; SERHROUCHNI, M.; BENJELLOUN, W. Phytotherapy of hypertention and diabetes in oriental Morocco. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, n. 1, p. 45-54, 1997.

ZOCOLO, G. J. **Desenvolvimento de método cromatográfico para análise de polissulfetos naturais de *Petiveria alliacea***. 2006. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R. Volatile sulfides of the Amazonian garlic bush. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 1009-1010, 1984.

ZOHRI, A. N.; ABDEL-GAWAD, K.; SABER, S. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. **Microbiology Research**, v. 150, n. 2, p. 167-72, 1995.

Anexos

Lista de Anexos

- Anexo 1:** Identificação de compostos voláteis em cultivar de alho analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.....119
- Anexo 2:** Identificação de compostos voláteis em cultivares de cebola analisados pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD.....124
- Anexo 3:** Espectro de massas e proposta de fragmentação de Prop-1-eno tiol obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....128
- Anexo 4:** Espectro de massas e proposta de fragmentação de 2-metil pent-2-enal obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....128
- Anexo 5:** Espectro de massas de prop-2-enal obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....129
- Anexo 6:** Espectro de massas de prop -2-en-1-ol obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....129
- Anexo 7:** Espectro de massas e proposta de fragmentação de 2,3-dimetil-tiofeno obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....129
- Anexo 8:** Espectro de massas de 3-vinil (4H) 1,2- ditiino obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....130
- Anexo 9:** Espectro de massas de dissulfeto de metila - Cis- 1 - propenila obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....130
- Anexo 10:** Espectro de massas de dióxido de carbono obtido em amostra de alho e cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....130
- Anexo 11:** Espectro de massas de dióxido de enxofre obtido em amostra de alho e cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....131
- Anexo 12:** : Espectro de massas e proposta de fragmentação de dissulfeto de dipropila obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....131
- Anexo 13:** Espectro de massas e proposta de fragmentação de dissulfeto de metil propila obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....132
- Anexo 14:** Espectro de massas e proposta de fragmentação de dissulfeto de dialila obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.....132

Anexo 15: Espectro de massas e proposta de fragmentação de dissulfeto dimetila obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62 TM e WILEY.....	133
Anexo 16: Espectro de massas e proposta de fragmentação de metil tirano obtido em amostra de alho e cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62 TM e WILEY.....	133
Anexo 17: Espectro de massas e proposta de fragmentação de propanal obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62 TM e WILEY.....	134
Anexo 18: Espectro de massas e proposta de fragmentação de sulfeto de alila metila obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62 TM e WILEY.....	134
Anexo 19: Espectro de massas e proposta de fragmentação de trissulfeto de dipropila obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62 TM e WILEY.....	135

Anexo 1: Identificação de compostos voláteis em cultivar de alho analisado pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD

GC-PFPD						CG-MS									
alho spme car 1		Chinês		Nacional		alho spme car 1		Chinês		Nacional					
t _R (min)	IK _{cal.}	t _R (min)	IK _{cal.}	t _R (min)	IK _{cal.}	t _R (min)	IK _{cal.}	t _R (min)	IK _{cal.}	t _R (min)	IK _{cal.}	IK _{lit.}	Identificação	NIST/WILEY	MM
-	-	-	-	-	-	-	-	1,687	-	1,686	-	-	Dióxido de enxofre	99	64
-	-	-	-	-	-	-	-	1,928	-	1,917	-	-	prop-2-enal	98/ 91	56
-	-	-	-	-	-	-	-	2,125	-	-	-	-	Dissulfeto de carbono	95	76
-	-	-	-	-	-	-	-	2,159	-	2,156	-	-	prop -2-en-1-ol	98/ 95	58
-	-	2,271	-	2,266	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	2,425	-	2,470	-	2,469	-	-	Metil tirano	93/ 95/ 94	74
2,484	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,520	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	2,670	-	-	-	-	Metil tirano	90	74
-	-	-	-	-	-	-	-	2,719	-	-	-	-	Metil tirano	89	74
2,885	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,070	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,552	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,660	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	3,879	-	-	-	-	-	-	Dissulfeto de alila metila	92	88
3,914	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	5,001	-	-	-	-	-	-	Dissulfeto de dimetila	94	94
5,441	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,460	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	6,053	-	6,060	-	-	-	-	-
6,857	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,285	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8,321	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	9,316	862	9,211	859	9,219	859	861	Sulfeto de alila	93/88/ 92	114
11,458	872	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	871	Alil mercaptana	-	74.14
11,626	877	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	875	Sulfeto de alila propila	-	116.225
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	876	2- metil 4,5- dihidro tiazole	-	101.171
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	877	1,4- oxitiano	-	104.172
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	878	2,4-dimetil tiofeno	-	112.19
-	-	-	-	-	-	10,810	896	-	-	-	-	892	2,4-Ditia pentano	-	108.228
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	892	Isotiocianato de alila	-	99.155
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	894	Sulfeto de dipopila	-	118.241
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	898	2,3-dimetil tiofeno	-	112.194
-	-	-	-	-	-	11,357	907	-	-	-	-	898	2,3-dimetil tiofeno	96	112
12,867	908	12,940	909	-	-	-	-	-	-	-	-	898	2,3-dimetil tiofeno	-	112.194
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	903	3-mercapto petan-2-ona	-	118.198

-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	903	3-(metiotiol) propanal	-	104.172
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	910	3-(metiotiol) propanal	-	104.172
13,012	911	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	910	2-mercapto pentan-3-ona	-	118.198
-	-	-	-	-	-	-	-	11,882	917	-	-	922	Dissulfeto de alila metila	83	120
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,892	918	922	Dissulfeto de alila metila	83	120
-	-	-	-	-	-	12,007	920	-	-	-	-	922	Dissulfeto de alila metila	77	120
13,662	925	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	919	Dimetil sulfona	-	94.134
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	922	Dissulfeto de alila metila	-	120.238
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	923	Dissulfeto de carbono	-	104.172
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	925	Ester etil 2- mercapto acido propanóico	-	134.198
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	925	hexano-1-tiol	-	118.241
14,231	937	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	932	Dissulfeto de dietila	-	122.25
-	-	-	-	-	-	-	-	13,009	939	-	-	937	Dissulfeto de <i>cis</i> -1- propenila metila	85	120
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	944	4 metil - 4 - mercapto pentan-2-ona	-	132.225
14,453	942	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	945	1,2 ditiaciclopent-3-eno	-	104.196
-	-	-	-	-	-	13,116	942	-	-	-	-	946	dissulfeto de metila <i>trans</i> - propenila	88	120.238
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	946	Dissulfeto de metila propila	-	122.254
15,036	954	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	952	Dihidro-3-(2H)-tiofeno	-	102.156
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	956	4-metil 3-tiazona	-	101.171
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,801	955	-	Isotiocianato de metoximetila	81	103
15,400	962	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	966	2 propil tiofeno	-	126.22
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	968	4-metil 4 sulfanl pentano-2-one	-	132.225
16,416	984	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	978	Trissulfeto de dimetila	-	126.267
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	978	1,2-ditiano	-	106.21
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	985	3-(metil tiol) propan-1-ol	-	106.188
-	-	-	-	20,648	1076	-	-	-	-	-	-	1079/ 1088	Dissulfeto de dialila	-	146.276
-	-	20,651	1077	-	-	-	-	20,329	1082	-	-	1079/ 1088	Dissulfeto de dialila	78	146
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,334	1082	1079/ 1088	Dissulfeto de dialila	79	146
21,005	1084	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1079/ 1088	Dissulfeto de dialila	-	146.276
21,005	1084	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1080	1 (metil tiol) pentan-3-ona	-	132.225
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1080	Mercaptano de benzila	-	124.204
-	-	-	-	-	-	20,607	1088	-	-	-	-	1079/ 1088	Disulfeto de dialila	79	146
21,308	1091	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1079/ 1088	Dissulfeto de dialila	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	20,997	1095	-	-	1079/ 1088	Dissulfeto de dialila	74	146
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1098	Ester etílico do ácido propanóico 3-(metil tiol)	-	148.224
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1099	1,4-ditiepano	-	134.265
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1099	Disulfeto de dipropenila	-	146.276
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1102	dissulfeto de <i>trans</i> - bis-(1 propenila)	-	146.276
-	-	-	-	-	-	21,160	1098	-	-	-	-	1079/ 1088	Dissulfeto de dialila	72	146
-	-	21,820	1102	-	-	-	-	21,362	1102	21,343	1102	1079/ 1088	Dissulfeto de dialila	75	146

-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1197	3-vinil 3,4-dihidro 1,2-ditiano	-	144.260
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1203	3-metil tiol hexan-1-ol	-	148.267
26,673	1211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1214	3-vinil 1,2-ditiaciclo hex-4-eno	-	144.260
26,951	1221	-	-	-	-	-	-	26,962	1221	-	-	1214	3-vinil 1,2-ditiaciclo hex-4-eno	91	144
26,995	1222	-	-	-	-	-	-	-	-	26,984	1222	1214	3-vinil 1,2-ditiaciclo hex-4-eno	89	144
-	-	-	-	-	-	27,028	1224	-	-	-	-	1214	3-vinil 1,2-ditiaciclo hex-4-eno	91	144
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1224	benzotiazole	-	135.187
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1224	Tetrassulfeto de dimetila	-	158.333
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1225	1,5 ditiaciclooctano	-	162.318
-	-	27,134	1227	27,129	1227	-	-	-	-	-	-	1224	benzotiazole	-	135.187
27,224	1230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1224	Tetrassulfeto de dimetila	-	158.333
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1225	1,5 ditiaciclooctano	-	162.318
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1233	3,3,5,5-tetrametil 1,2,4- tritiolano	-	180.357
27,549	1242	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27,599	1243	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27,997	1257	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28,265	1267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1268	Cis 3,5 dietil 1,2,4 tritiolano	-	160.278
28,354	1270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1271	1,3,5 tritiano	-	138.278
28,432	1273	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28,546	1277	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	29,591	1306	-	-	1300	Trissulfeto de alila	90	178
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,599	1306	1300	Trissulfeto de alila	90	178
-	-	-	-	-	-	29,668	1309	-	-	-	-	1300	Trissulfeto de alila	84	178
29,440	1312	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1307	Trisulfeto de alil propila	-	180.357
-	-	-	-	-	-	29,766	1314	-	-	-	-	1319	4-mercaptofenol	-	126.177
-	-	29,586	1320	-	-	-	-	-	-	-	-	1319	4-mercaptofenol	-	126.177
-	-	-	-	29,613	1321	-	-	-	-	-	-	1324	Tiosulfinato de dialila	-	146.276
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1328	Trissulfeto de dipropila	-	182.373
-	-	-	-	-	-	-	-	30,361	1343	-	-	1345/ 1353	trissulfeto de (E/Z) prop-1-enila propila	-	180.357
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,368	1344	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	30,575	1354	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,583	1354	-	-	-	-
30,246	1355	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1345/ 1353	trissulfeto de (E/Z) prop-1-enila propila	-	180.357
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1359	sulfeto de bis (1 metil 2 oxopropila)	-	174.262
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1359	5-metil 1,2,3,4 tetratiano	-	170.344
30,344	1360	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1359	sulfeto de bis-(1 metil 2 oxopropila)	-	174.262
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1359	5-metil 1,2,3,4 tetratiano	-	170.344
30,419	1364	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1361	1,3,5 tritiano	-	152.304
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1367	5-metil 4,7- ditiadeca-1,9-dieno	-	188.355
30,612	1374	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1367	5-metil 4,7- ditiadeca-1,9-dieno	-	188.355
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1373	Cis- 3,5- dietil 1,2,4 tritiolano	-	180.357

30,806	1385	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,874	1388	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	31,380	1393	-	-	-	-	1395	2,3,5 tritiahexano 5 oxido	-	156.293
-	-	-	-	-	-	31,436	1396	-	-	-	-	1395	2,3,5 tritiahexano 5 oxido	-	156.293
31,115	1401	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1395	2,3,5 tritiahexano 5 oxido	-	156.293
31,245	1409	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,281	1412	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,576	1431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1430	Etil metil(metil tiol) piridina	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1430/1434/1416	Dimetil 1,2,5 tritiepáno	-	-
31,710	1440	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,848	1448	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,893	1451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32,194	1471	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32,284	1477	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1483	Pentassulfeto de dimetila	-	190.399
32,945	1524	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33,278	1551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1548	3-(etil tiol) 1,2,4 tritiano	-	198.397
33,344	1556	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33,592	1576	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1581	7-metil- 4,5,8 tritia undeca-1,10-dieno	-	220.421
33,760	1590	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1591	6-metil 4,5,8-tritia undeca-1,10-dieno	-	220.421
33,841	1596	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1591	6-metil 4,5,8-tritia undeca-1,10-dieno	-	220.421
33,946	1605	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33,989	1608	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34,091	1617	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34,199	1627	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34,265	1632	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1635	6-metil 1,2,3,4,5- pentatiepano	-	202.410
35,598	1649	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1647	Dimetil 1,2,3,6, tetratiacicloctano	-	212.423
35,739	1764	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35,824	1772	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35,897	1822	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1815	8-metil 4,5,6,9-tetratia doceca-1,11-dieno	-	252.487
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1819	7-metil 4,5,6,9 tetratiadodeca- 1,11-dieno	-	252.487
37,126	1898	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37,535	1940	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37,772	1836	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37,849	1971	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37,985	1985	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 2: Identificação de compostos voláteis em cultivares de cebola analisados pelos sistemas cromatográficos GC-MS e GC-PFPD

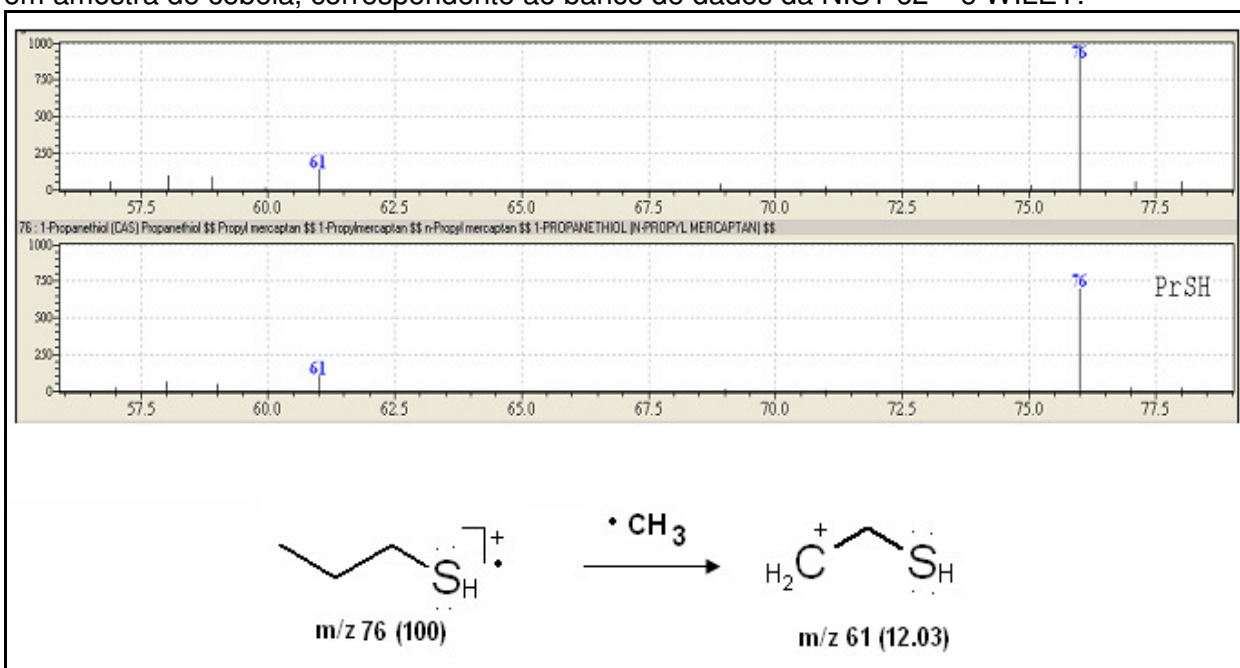
GC-PFPD								CG-MS											
cebola spme car 1		superex		Baia Paraná orgânica		optima		cebola spme car 1		superex		Baia Paraná orgânica		optima					
t _R (min)	IK _{cal}	t _R (min)	IK _{cal}	t _R (min)	IK _{cal}	t _R (min)	IK _{cal}	t _R (min)	IK _{cal}	t _R (min)	IK _{cal}	t _R (min)	IK _{cal}	t _R (min)	IK _{cal}	IK _{lit}	Identificação	NIST/WILEY	MM
-	-	-	-	-	-	-	-	1,624	-	1,679	-	-	-	1,701	-	-	Dióxido de enxofre	99/99/98	64
-	-	-	-	-	-	-	-	1,880	-	1,931	-	1,940	-	1,937	-	-	propanal	99/98/99/96	58
-	-	-	-	-	-	-	-	2,070	-	2,116	-	2,128	-	2,128	-	-	Dissulfeto de carbono	100/100/99/99	76
-	-	-	-	-	-	2,347	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,428	-	-	-	2,383	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	2,542	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,603	-	2,614	-	2,612	-	-	Prop-1-eno tiol	97/98/97	76
2,986	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,705	-	2,723	-	2,713	-	-	Metil tirano	92/87/92	74
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	3,409	-	-	-	3,385	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,671	-	-	-	3,439	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,738	-	-	-	-	-	-	-	5,787	-	5,773	-	5,772	-	5,771	-	-	1-óxido de tietano	78/77/77	90
7,889	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	8,095	834	-	-	-	-	-	-	834	2-metil pent-2-enal	91	98
11,995	886	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	861	Sulfeto de alila	-	114
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	863	metilol propan-2-ona	-	104
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	866	2 metil -Tetrahydro tiofeno	-	102
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	871	Alil mercaptana	-	74
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,253	905	-	-	11,248	905	898	2,3- dimetil tiofeno	95/ 87	112
-	-	-	-	-	-	-	-	11,354	907	-	-	-	-	-	-	898	2,3- dimetil tiofeno	89	112
-	-	-	-	-	-	13,397	919	-	-	-	-	-	-	-	-	919	Dimetilsulfona	-	94
13,466	920	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	923	Dissulfeto de carbono	-	104
-	-	-	-	13,499	921	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	924	Dissulfeto de alil metila	-	120
13,624	924	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	925	Ester etil 2- mercapto acido propiônico	-	134
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	925	hexano-1-tiol	-	118
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,652	932	-	-	12,653	932	946	Dissulfeto de metil propila	92/94	122
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,668	933	-	-	946	Dissulfeto de metil propila	94	122
14,160	935	-	-	-	-	-	-	12,773	935	-	-	-	-	-	-	946	Dissulfeto de metil propila	91	122
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,994	939	-	dissulfeto de metila -Cis- 1-propenila	87	120
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,014	940	-	-	-	dissulfeto de metila -Cis- 1-propenila	93	120
-	-	-	-	-	-	-	-	13,114	941	-	-	-	-	-	-	-	dissulfeto de metila -Cis- 1-propenila	89	120
14,842	950	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	945	1,2 ditiaciclo pent -3- eno	-	104
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	946	dissulfeto de metila trans prop-1-enil	-	120
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	946	Dissulfeto de metila propila	-	122
14,959	953	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	952	Dihydro-3-(2H)-thiophenone	-	102
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	956	Dihidro-3-(H) tiofeno	-	101

15,241	959	-	-	-	-	-	-	-	-	952	Dihidro-3-(H) tiofeno	-	102				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	956	4-metil-3-tiazolino	-	101				
15,276	960	-	-	-	-	-	-	-	-	966	Dihidro 3 (2H) tiofenona	-	126				
-	-	-	-	21,201	1089	-	-	-	-	1079/ 1088	Dissulfeto de dialila	-	146				
-	-	-	-	-	-	-	-	21,012	1095	1098	Ester etílico do ácido propiônico	-	148				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,013	3-(metil tiol)	-	134				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1099	1,4-ditiepano	-	146				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1099	Dissulfeto de dipropenila	-	146				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1102	disulfeto de trans-bis-(1 propenila)	-	146				
-	-	-	-	21,789	1101	-	-	-	-	1098	Ester etílico do ácido propiônico	-	148				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1099	3-(metil tiol)	-	134				
-	-	21,90	110	21,868	1103	-	-	-	-	1099	1,4-ditiepano	-	146				
-	-	1	4	-	-	21,912	1104	-	-	1099	Dissulfeto de dipropenila	-	146				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1102	dissulfeto de trans-bis-(1 propenila)	-	146				
-	-	-	-	21,989	1106	-	-	-	-	1109	Dissulfeto de dipropila	-	150				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1109	Dissulfeto de dipropila	88	150				
-	-	-	-	-	-	-	-	21,844	111	1109	Dissulfeto de dipropila	93/92	150				
-	-	-	-	-	-	-	-	2	1112	1109	Dissulfeto de dipropila	-	150				
22,345	1113	-	-	-	-	22,395	1114	21,929	1114	1109	Dissulfeto de dipropila	80	150				
-	-	22,42	111	-	-	-	-	-	-	1109	Dissulfeto de dipropila	-	148				
-	-	4	5	-	-	-	-	-	-	1116	dissulfeto de prop-1-enila propila	-	129				
-	-	-	-	22,523	1117	-	-	-	-	1116	1(4,5 dihidro 2 tiazolil) etanona	-	148				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1117	2-(etil mercapto) tetrahidrotiofeno	-	148				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1118	5-metil 2-tiofenocarboxaldeido	-	126				
-	-	-	-	-	-	-	-	22,172	111	1116	disulfeto de prop-1-enila propila	-	148				
-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	22,180	dissulfeto de prop-1-enila propila	-	148				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1119	2-(etil mercapto) tetrahidrotiofeno	-	148				
-	-	-	-	-	-	22,323	1121	-	-	1117	2-(etil mercapto) tetrahidrotiofeno	-	148				
-	-	-	-	-	-	-	-	22,375	1122	1118	5-metil 2-tiofenocarboxaldeido	-	126				
23,026	1128	-	-	-	-	-	-	22,647	1128	22,653	1128	22,645	1128	1130	2,5-dimetil 1,4-ditiano	-	148
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1131	3-mercapto hexanol	-	134
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1132	Trissulfeto de dietila	-	154
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1133	3-(metil tio) acetato de propan-1-ol	-	148
-	-	-	-	-	-	22,813	1131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	146
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,939	1134	-	-	-	-	-	146
-	-	-	-	-	-	-	-	22,943	113	-	-	-	-	-	-	-	146
-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	146
23,441	1137	-	-	-	-	23,085	1137	-	-	-	-	-	-	1132	Trissulfeto de dietila	-	154
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1133	3-(metil tio) acetato de propan-1-ol	-	148
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1142	Trissulfeto de alila metila	-	152
23,659	1142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1142	Trissulfeto de alila metila	-	152
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1144	3,5 dimetil 1,2,4 tritiolano	-	152
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1144	disulfeto de metila metil(metil	-	140

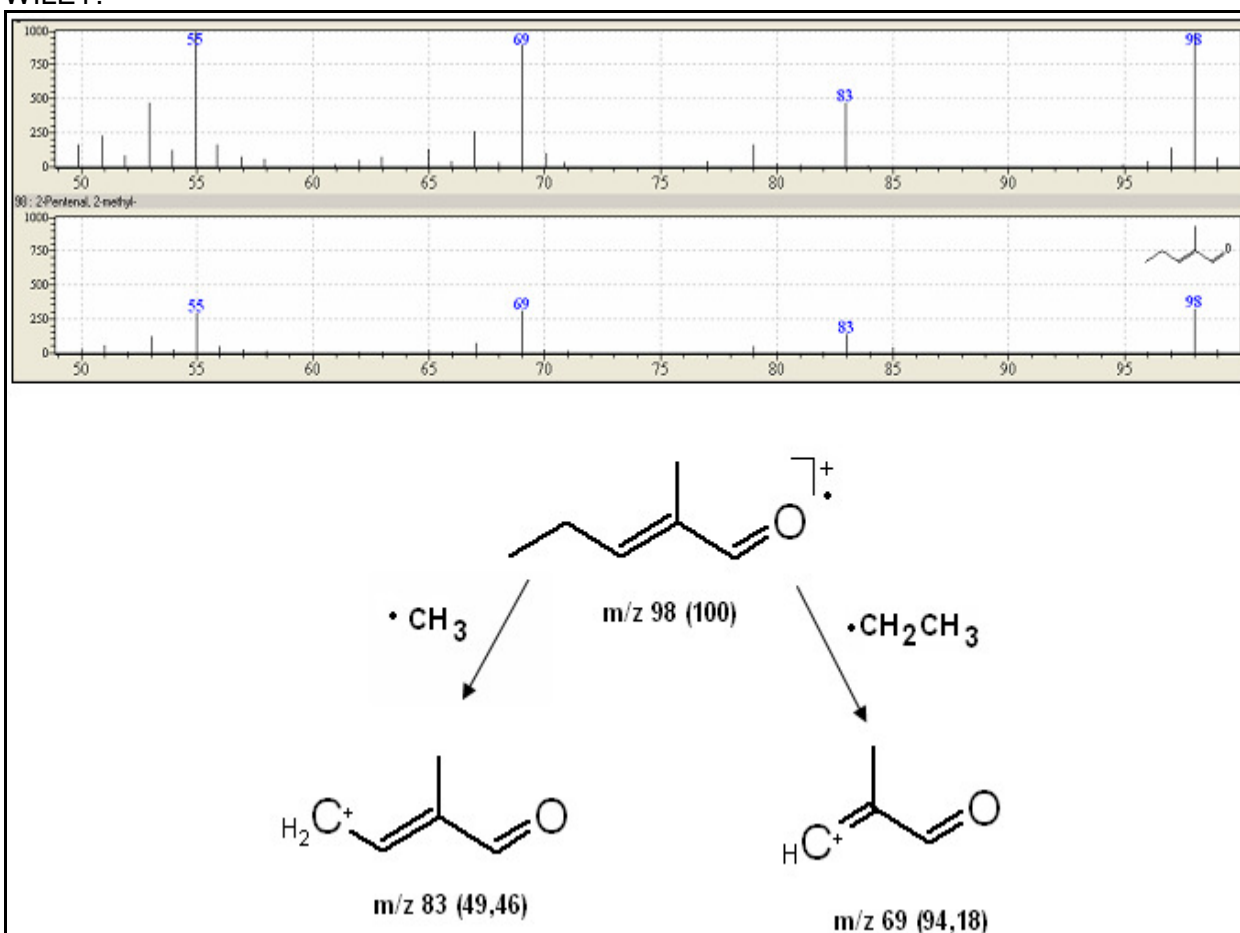
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1145	tiol)	-	140		
24,005	1149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1145	2- acetil 5 metiltiofeno	-	140		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1150	trissulfeto metila n-propila	-	154		
24,128	1152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1150	Metil 1,2,3 tritiacicloptano	-	138		
24,390	1157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1161	3-metil 1,4-ditiacicloptano	-	148		
24,459	1159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1161	3-metil 1,4-ditiacicloptano	-	148		
24,634	1163	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1161	3-metil 1,4-ditiacicloptano	-	148		
24,722	1165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1167	Sulfeto de benzil metila	-	138		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1168	Tritiaciclohexano	-	118		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1169	2-metil 3-(metil ditio) furano	-	160		
25,068	1172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1168	Tritiaciclohexano	-	118		
25,144	1174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1169	2-metil 3-(metil ditio) furano	-	160		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1172	3,5 dimetil 1,2,4 tritiolano	-	152		
25,330	1178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1172	3,5 dimetil 1,2,4 tritiolano	-	152		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1183	2-vinil 1,3-ditiano	-	146		
-	-	-	-	-	-	25,411	1183	25,248	1180	25,252	1180	25,246	1180	1183	2-vinil 1,3-ditiano	-	146
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1188	Benzotiofeno	-	134
25,905	1190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1188	Benzotiofeno	-	134
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1195	2-etil 1,3-ditiaciclohex-4-eno	-	146
26,290	1198	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1195	2-etil 1,3-ditiaciclohex-4-eno	-	146
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1197	3-vinil 3,4-dihidro 1,2-ditiano	-	144
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1203	3-metil tiol hexan-1-ol	-	148
26,534	1206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1203	3-metil tiol hexan-1-ol	-	148
27,089	1226	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1224	Benzotiazole	-	135
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1224	Tetrassulfeto de dimetila	-	158
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1225	1,5 ditiaciclooctano	-	162
27,228	1230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1225	1,5 ditiaciclooctano	-	162
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1233	3,3,5,5-tetrametil 1,2,4-tritiolano	-	180
27,486	1240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28,464	1274	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1268	Cis 3,5 dietil 1,2,4 tritiolano	-	160
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1271	1,3,5 tritiano	-	138
28,771	1285	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1286	3-sulfanil heptan-1- ol	-	148
-	-	-	-	-	-	-	-	30,208	1336	30,213	1336	30,205	1336	1335	Trissulfeto de dipropila	82/89/90	182
-	-	-	-	-	29,973	1340	30,292	1340	-	-	-	-	-	1335	Trissulfeto de dipropila	79	182
-	-	-	-	30,014	1343	-	-	-	-	-	-	-	-	1335	Trissulfeto de dipropila	-	182
-	-	30,030	1343	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1345	trissulfeto de (E/Z) prop-1-enila propila	-	180
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1353	trissulfeto de (E/Z) prop-1-enila propila	-	180
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,490	1349	1353	trissulfeto de (E/Z) prop-1-enila propila	-	180		
-	-	-	-	-	-	-	-	30,494	1350	30,498	1350	-	-	1353	trissulfeto de (E/Z) prop-1-enila propila	-	180
-	-	-	-	-	-	30,569	1353	-	-	-	-	-	-	1353	trissulfeto de (E/Z) prop-1-enila propila	-	180
30,319	1359	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1359	sulfeto de bis (1 metil 2 oxopropila)	-	174
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1359	5-metil 1,2,3,4 tetratiano	-	170
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1361	1,2,5-tritioptano	-	152
30,567	1372	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1367	5 metil 4,7 ditia deca-1,9- dieno	-	188
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1373	Cis 3,5 dietil 1,2,4 tritiolano	-	180
30,802	1384	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30,843	1386	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

31,035	1397	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1395	2,3,5- tritiahexano 5 oxido	-	156
31,101	1400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1395	2,3,5- tritiahexano 5 oxido	-	156
31,178	1405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,236	1409	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,818	1447	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31,890	1451	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32,022	1460	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32,311	1478	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1483	Pentassulfeto de dimetila	-	190
32,465	1488	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1483	Pentassulfeto de dimetila	-	190
32,835	1515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1508	Tetrassulfeto de metila pentila	-	214
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1514	dissulfeto de 3,4-dimetil metila 2- tienila	-	158
33,281	1551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1548	3 (etil tiol) 1,2,4 tritiano	-	198
33,393	1560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33,584	1576	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1581	7- metil 4,5,8- tritia undeca-1,10-dieno	-	220
33,754	1589	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1591	6-metil 4,5,8- tritia undeca-1,10-dieno	-	220
34,489	1652	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1647	Dimetil 1,2,3,6, tetratiacilooctano	-	212
34,682	1668	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34,833	1681	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1683	dissulfeto de Bis (2 furfuri)	-	226
35,113	1706	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35,203	1714	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35,393	1732	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35,645	1756	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35,731	1764	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35,888	1778	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36,117	1800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36,205	1808	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37,452	1931	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

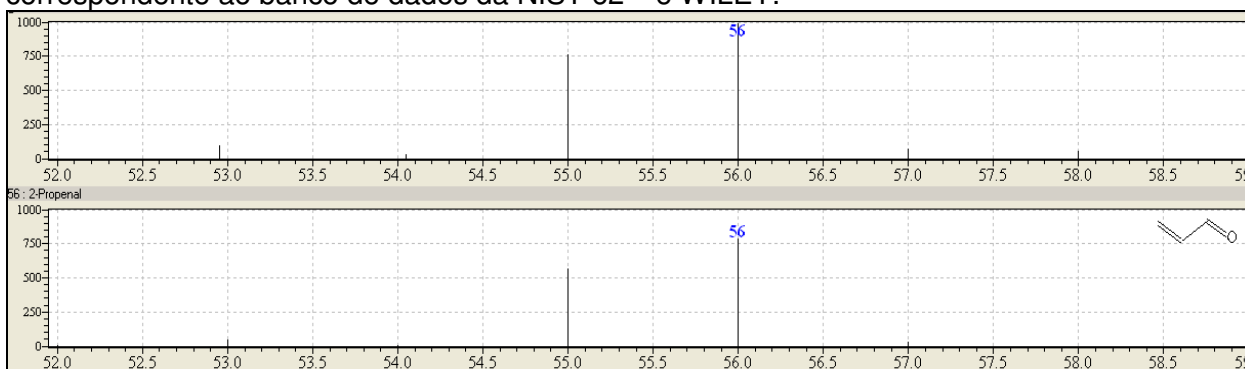
Anexo 3: Espectro de massas e proposta de fragmentação de Prop-1-eno tiol obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



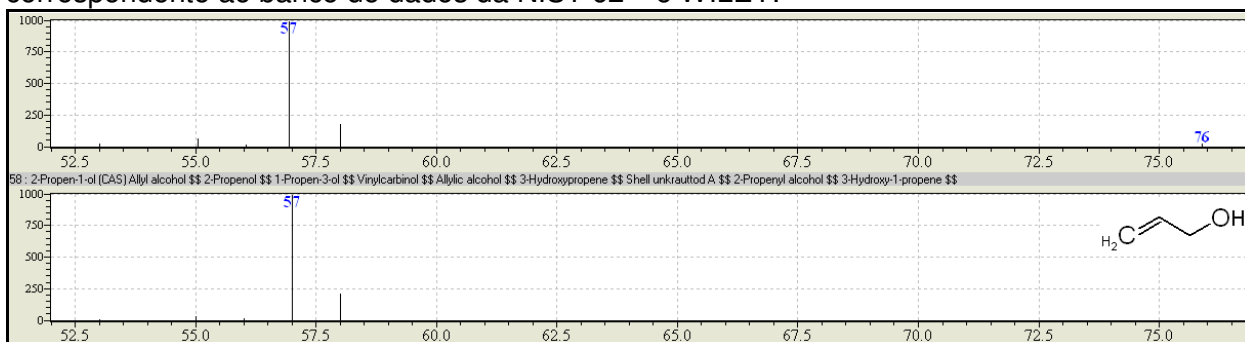
Anexo 4: Espectro de massas e proposta de fragmentação de 2-metil pent-2-enal obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



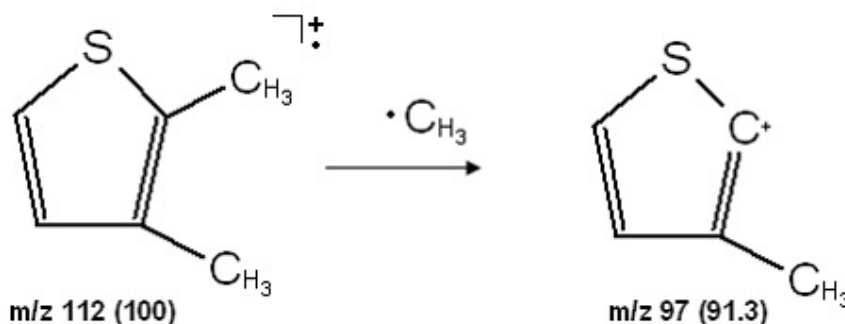
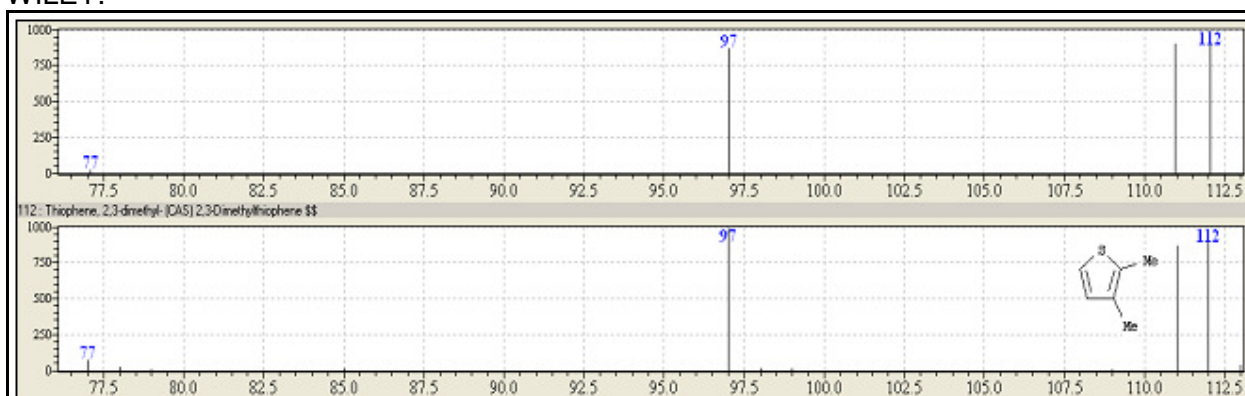
Anexo 5: Espectro de massas de prop-2-enal obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



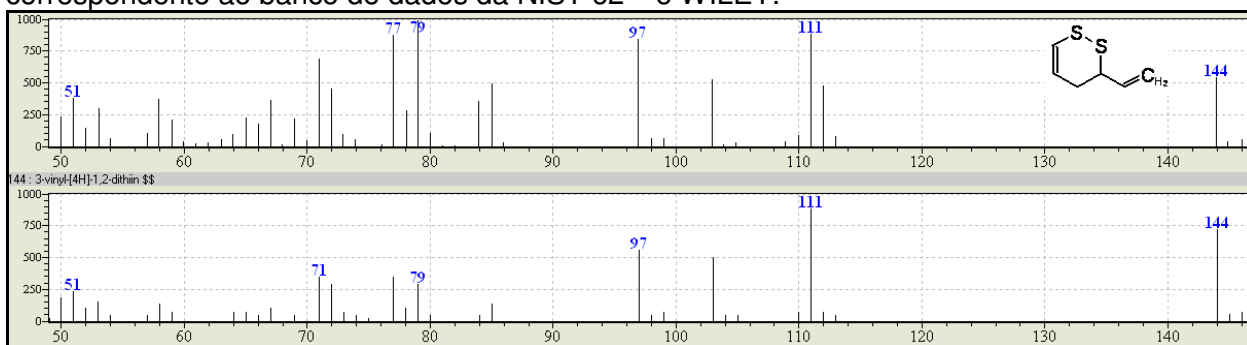
Anexo 6: Espectro de massas de prop -2-en-1-ol obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



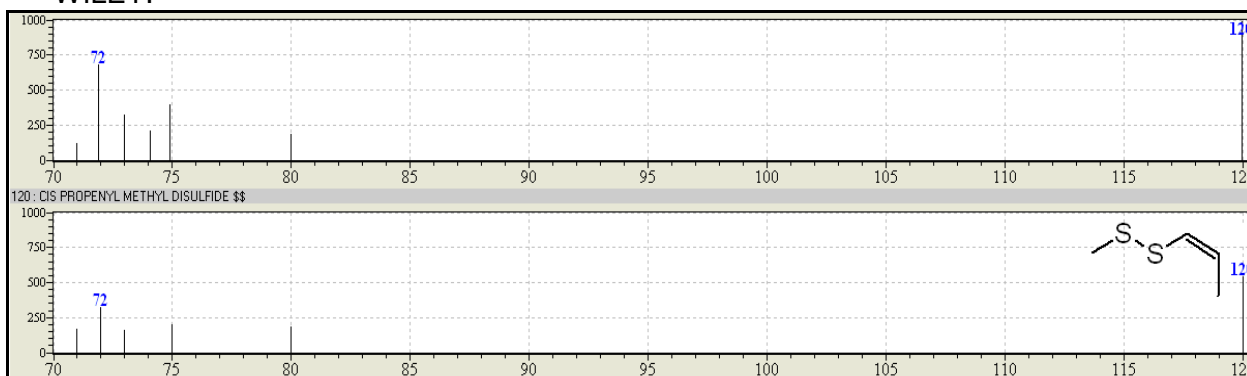
Anexo 7: Espectro de massas e proposta de fragmentação de 2,3-dimetil-tiofeno obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



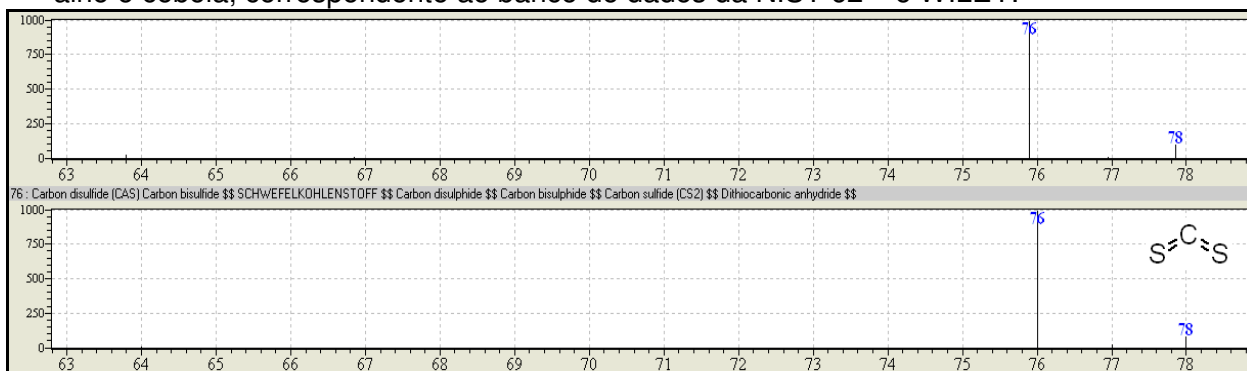
Anexo 8: Espectro de massas de 3-vinil (4H) 1,2- ditiino obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



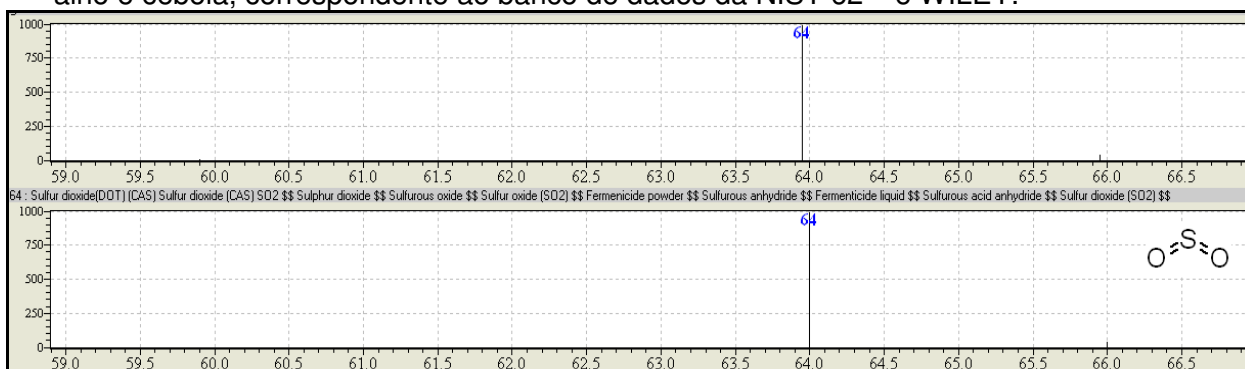
Anexo 9: Espectro de massas de dissulfeto de metila - Cis- 1 - propenila obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



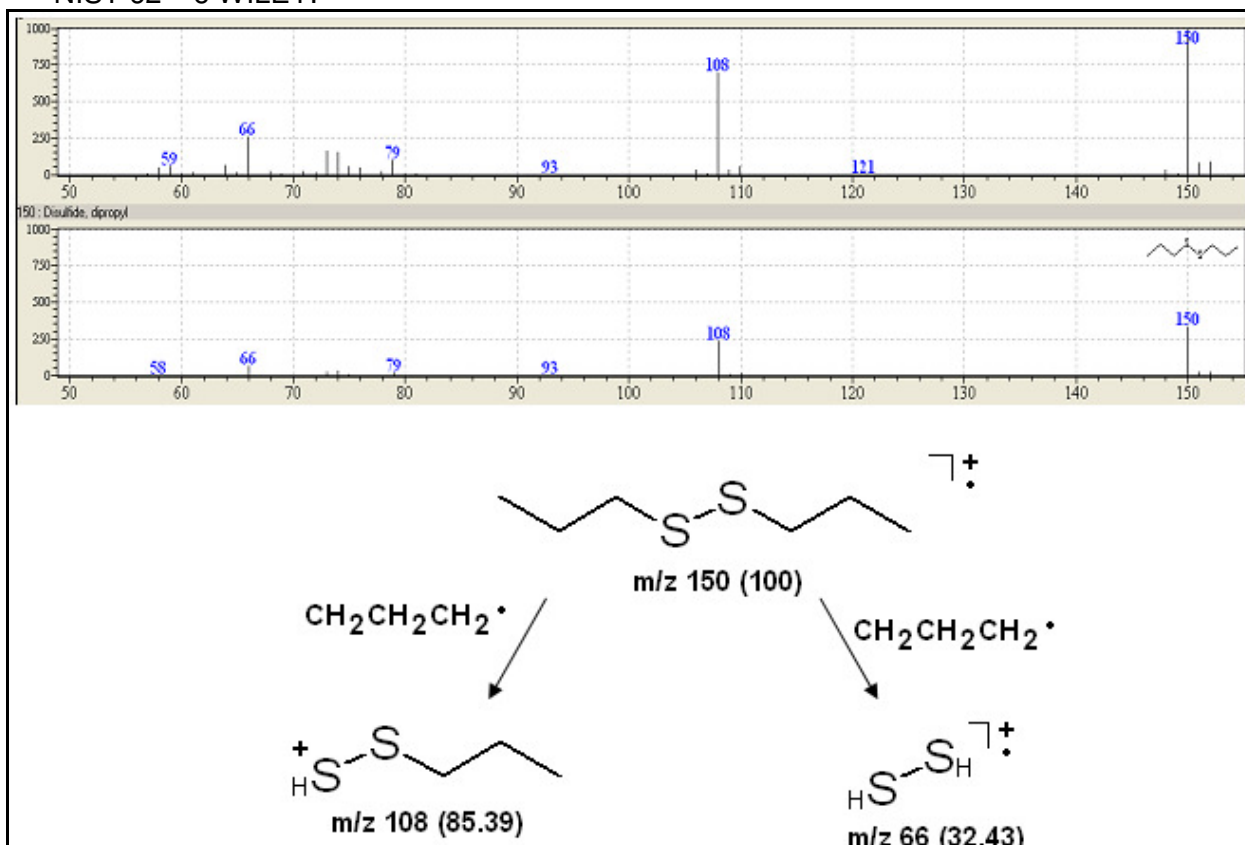
Anexo 10: Espectro de massas de dióxido de carbono obtido em amostra de alho e cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



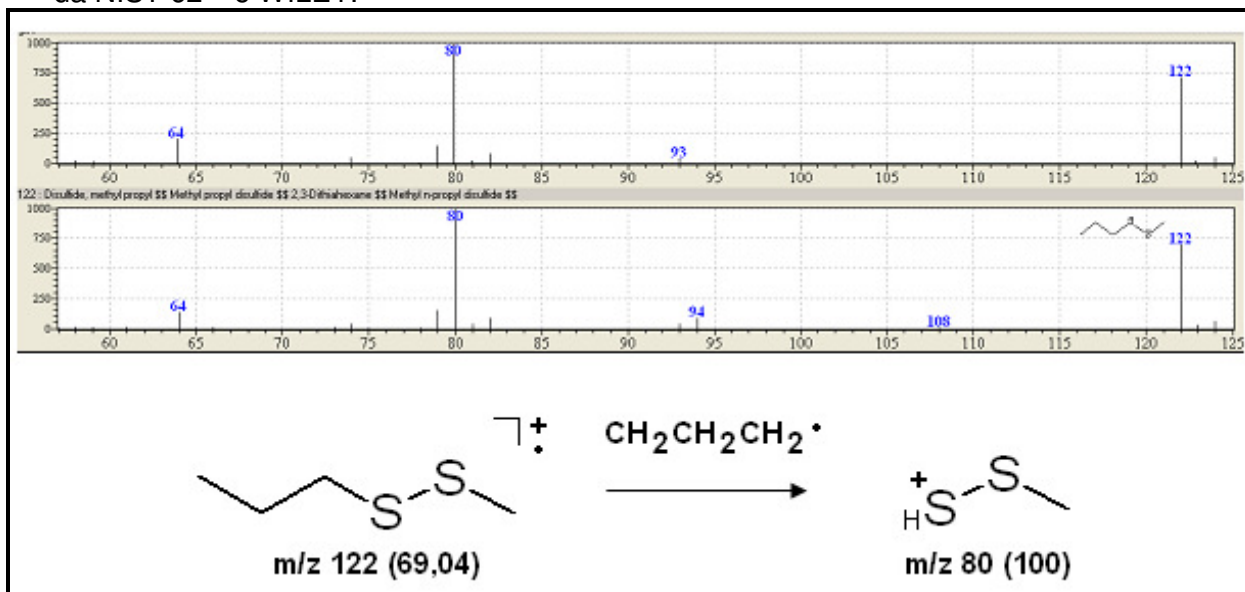
Anexo 11: Espectro de massas de dióxido de enxofre obtido em amostra de alho e cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



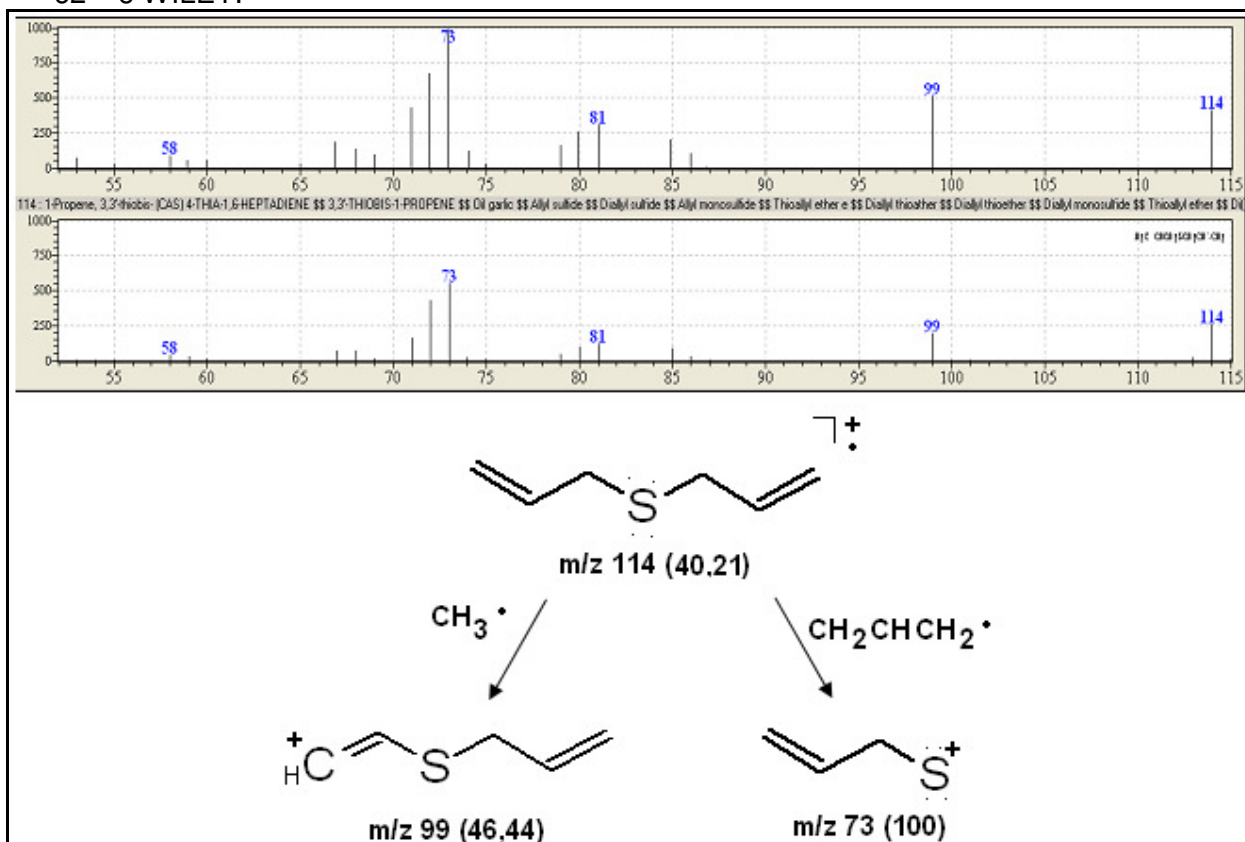
Anexo 12: Espectro de massas e proposta de fragmentação de dissulfeto de dipropila obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



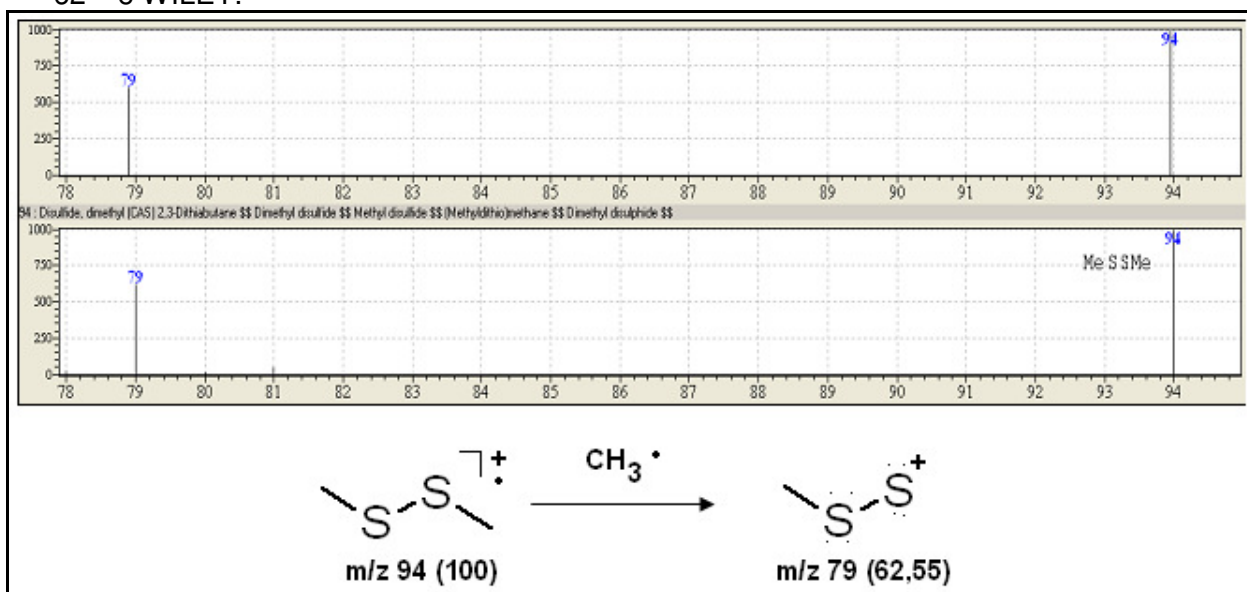
Anexo 13: Espectro de massas e proposta de fragmentação de dissulfeto de metil propila obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



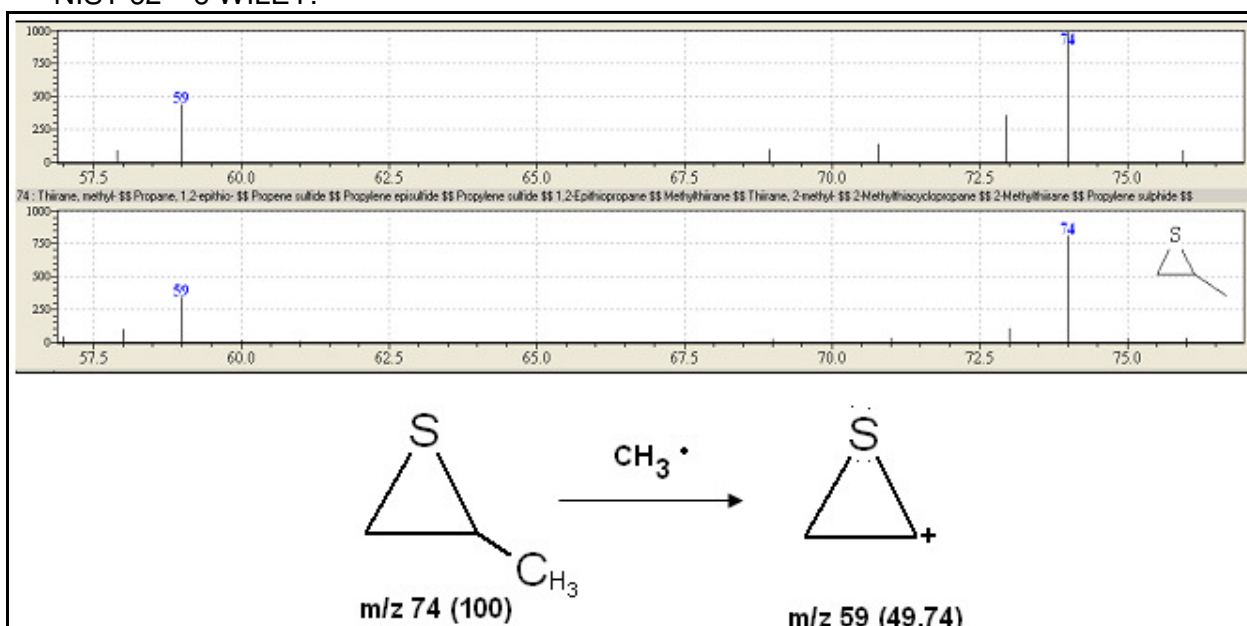
Anexo 14: Espectro de massas e proposta de fragmentação de dissulfeto de dialila obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



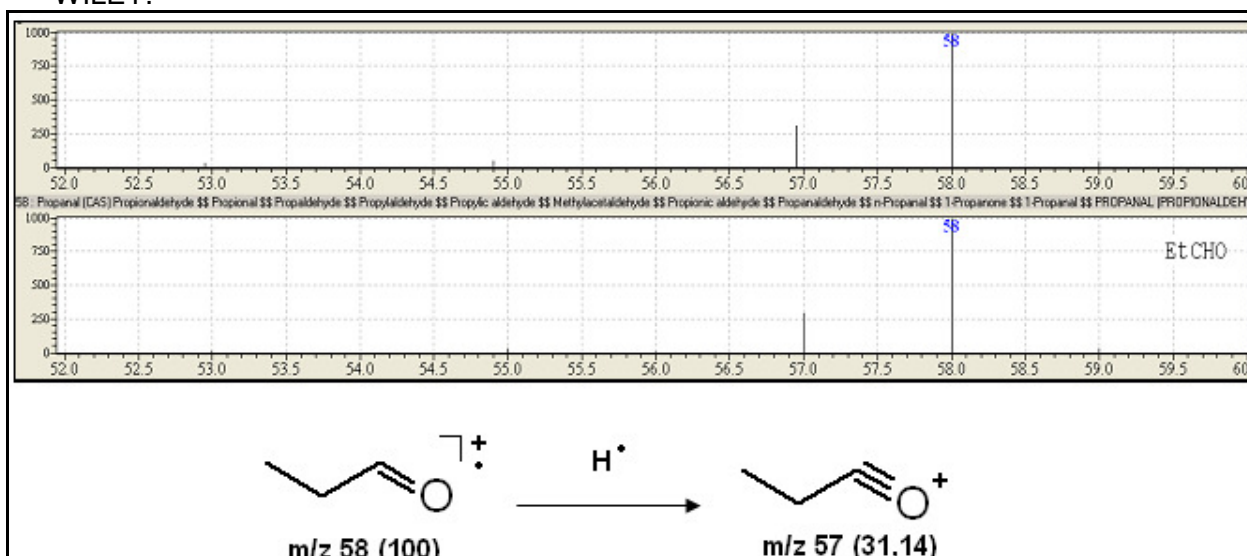
Anexo 15: Espectro de massas e proposta de fragmentação de dissulfeto dimetila obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



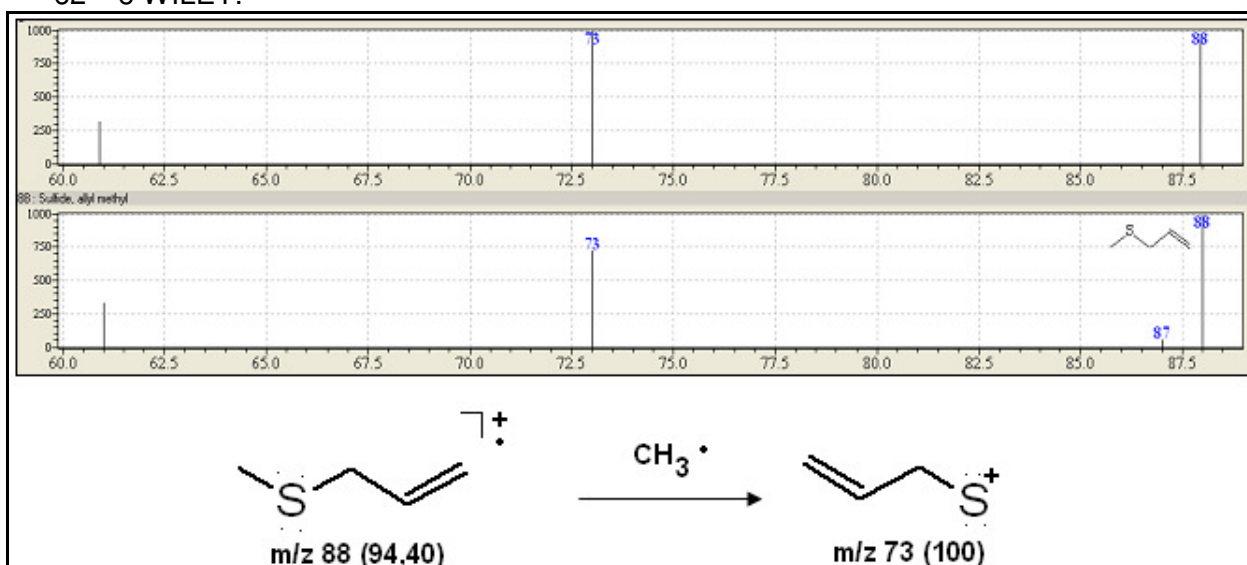
Anexo 16: Espectro de massas e proposta de fragmentação de metil tirano obtido em amostra de alho e cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



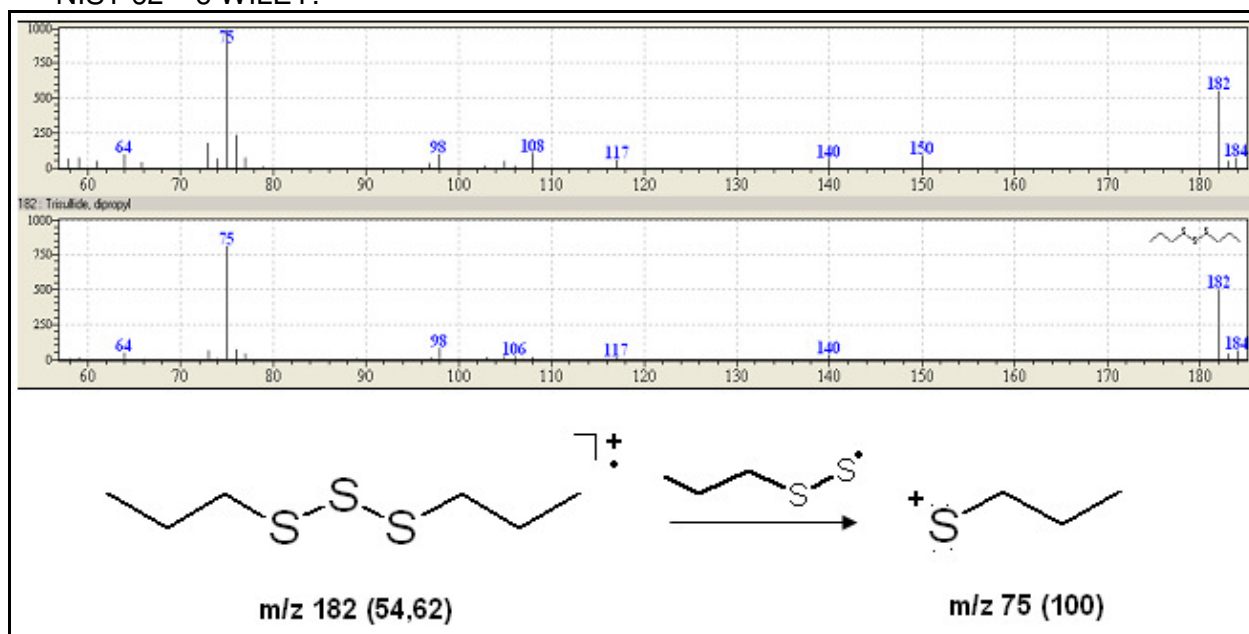
Anexo 17: Espectro de massas e proposta de fragmentação de propanal obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



Anexo 18: Espectro de massas e proposta de fragmentação de sulfeto de alila metila obtido em amostra de alho, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



Anexo 19: Espectro de massas e proposta de fragmentação de trissulfeto de dipropila obtido em amostra de cebola, correspondente ao banco de dados da NIST 62TM e WILEY.



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](#)