

# 5º Encontro Nacional de Cromatografia

Universidade de Aveiro  
2007



universidade de aveiro  
theoria poiesis praxis



Grupo de Cromatografia

## P.8 Análise de Timol em cera de abelha por micro-extracção em fase sólida (SPME)

Vitor Ramalheira, Jorge Sá Morais, Miguel Vitas-Bogas

CIMO, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

tel. +351-273 303 318

fax +351-273 325 405

vramais@ccp.pt

A aplicação contínua de acaricidas lipofílicos sintéticos no tratamento das abelhas conduziu a uma acumulação que depende da frequência, lipofilicidade e quantidade do princípio activo utilizada. Este efeito é mais acentuado na cera de abelha que no mel, no entanto, e porque a persistência destes resíduos é elevada, provoca o aparecimento de resistências e a perda do seu efeito acaricida<sup>1</sup>. Esta razão levou à pesquisa de outros compostos alternativos não tóxicos e não persistentes, com efeito sobre o ácaro das abelhas, *Varnon Jacobsoni*. Entre estes encontra-se o timol, um composto fenólico, volátil, presente no tomilho. Dos diversos componentes dos óleos essenciais este é sem dúvida o que demonstrou maior efeito acaricida, utilizando-se no tratamento das abelhas directamente ou como componente de diversas formulações. Em Portugal, foi introduzido muito recentemente sob a forma comercial de APIGUARD: um gel, à base de timol, que controla tecnicamente a libertação do princípio activo.

O controlo dos resíduos de timol na cera de abelha e no mel é assim um desafio actual quer do ponto de vista sanitário quer de qualidade alimentar.

A micro-extracção em fase sólida (SPME) é uma técnica de preparação de amostras que se baseia na sorção de analitos no revestimento de uma fibra de sílica fundida e posterior desorção térmica no injector de um cromatógrafo em fase gasosa (GC). Para além de combinar num único processo etapas de extracção, purificação e concentração dos analitos, a técnica de SPME apresenta uma série de vantagens relativamente às técnicas de extracção convencionais, como a extracção líquido-líquido e extracção em fase sólida, nomeadamente a sua relativa simplicidade e rapidez, reduzido custo e não utilização de solventes para a extracção de analitos, para além de permitir a extracção por imersão directa na amostra gasosa ou líquida e extracção por amostragem do espaço-de-cabeça da amostra líquida ou sólida<sup>2</sup>. Ao contrário das técnicas tradicionais, que permitem uma extracção quantitativa dos analitos, a técnica de SPME baseia-se num equilíbrio de partição do analito. Esta particularidade torna a técnica de SPME bastante sensível a parâmetros experimentais que possam afectar os coeficientes de partição dos analitos e, conseqüentemente, a sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados<sup>3</sup>.

O objectivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia para a análise de timol em ceras contaminadas, utilizando como padrão interno a benzofenona. Em primeiro

lugar, procedeu-se à optimização da técnica através da determinação da quantidade de cera, temperatura de análise e período de contacto da fibra com o espaço-de-cabeça da amostra mais adequados para o caso em estudo. Num segunda fase, procedeu-se à análise de diversas lâminas de cera contaminadas propositadamente com timol e sujeitas a diferentes condições de armazenamento: em frio, ao ar e em estufa. Finalmente, procedeu-se à construção da curva de calibração e quantificação do timol presente nas diversas amostras de cera analisadas. Considerando-se os resultados, para os níveis de contaminação avaliados, as condições analíticas mais adequadas ocorrem com a utilização de 1 g de cera, mantendo-se a fibra em contacto com o espaço-de-cabeça durante 40 minutos a uma temperatura de 60° C. Nestas condições experimentais foi possível obter uma boa correlação linear ( $r^2=0,990$ ) no intervalo de concentrações [3,5-14mg/g]. A quantidade de timol encontrada nas amostras é significativamente inferior à colocada durante o processo de fabrico das lâminas, pelo que o processo de conservação não é o mais adequado, sendo evidente uma menor quantidade de timol quando a lamina de cera é colocada na estufa.

Agradecimentos: Programa Agro Medida 8.1 DEED - Projecto 746

1. Bogdanov, S., J. Contaminants of bee products. *Apikhting*, 2006, 37, 1-18.
2. Altar, C.L.; Kilam, L.M.; Buchholz, K.D.; Pawliszyn, J. Automation and optimization of solid-phase micro-extraction. *Anal. Chem.* 1992, 64, 1960-1966.
3. Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgado, I.; Coimbra, M.A. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5142-5151.

# **ANÁLISE DE TIMOL EM CERA DE ABELHA POR MICRO-EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)**

Vitor Ramalheira, Jorge Sá Morais, Miguel Vilas-Boas

CIMO, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

\*Tel +351-273 303 318 Fax +351-273 325 405 e-mail: [vmartins@ipb.pt](mailto:vmartins@ipb.pt)

A aplicação contínua de acaricidas lipofílicos sintéticos no tratamento das abelhas conduz a uma acumulação que depende da frequência, lipofilicidade e quantidade de princípio activo utilizada. Este efeito é mais acentuado na cera de abelha que no mel, no entanto, e porque a persistência destes resíduos é elevada, provoca o aparecimento de resistências e a perda do seu efeito acaricida.<sup>[1]</sup> Esta razão levou à pesquisa de outros compostos alternativos não tóxicos e não persistentes, com efeito sobre o ácaro das abelhas, *Varroa Jacobsoni*. Entre estes compostos encontra-se o timol, um composto fenólico, volátil, presente no tomilho. Dos diversos componentes dos óleos essenciais este é sem dúvida o que demonstrou maior efeito acaricida, utilizando-se no tratamento das abelhas directamente ou como componente de diversas formulações.<sup>[2]</sup> Em Portugal, foi introduzido muito recentemente sob a forma comercial de APIGUARD: um gel, à base de timol, que controla termicamente a libertação do princípio activo.

O controlo dos resíduos de timol na cera de abelha e no mel é assim um desafio actual quer do ponto de vista sanitário quer de qualidade alimentar.

A micro-extracção em fase sólida (SPME) é uma técnica de preparação de amostras que se baseia na sorção de analitos no revestimento de uma fibra de sílica fundida e posterior desorção térmica no injectador de um cromatógrafo em fase gasosa (GC). Para além de combinar num único processo etapas de extracção, purificação e concentração dos analitos, a técnica de SPME apresenta uma série de vantagens relativamente às técnicas de extracção convencionais, como a extracção líquido-líquido e extracção em fase sólida, nomeadamente a sua relativa simplicidade e rapidez, reduzido custo e não utilização de solventes para a extracção de analitos, para além de permitir a extracção por imersão directa na amostra gasosa ou líquida e extracção por

amostragem do espaço-de-cabeça da amostra líquida ou sólida.<sup>[3]</sup> Ao contrário das técnicas tradicionais, que permitem uma extracção quantitativa dos analitos, a técnica de SPME baseia-se num equilíbrio de partição do analito. Esta particularidade torna a técnica de SPME bastante sensível a parâmetros experimentais que possam afectar os coeficientes de partição dos analitos e, conseqüentemente, a sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados.<sup>[4]</sup>

O objectivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia para a análise de timol em ceras contaminadas, utilizando como padrão interno a benzofenona. Em primeiro lugar, procedeu-se à optimização da técnica através da determinação da quantidade de cera, temperatura de análise e período de contacto da fibra com o espaço-de-cabeça da amostra mais adequados para o caso em estudo. Numa segunda fase, procedeu-se à análise de diversas lâminas de cera contaminadas propositadamente com timol e sujeitas a diferentes condições de armazenamento: em frio, ao ar e em estufa. Finalmente, procedeu-se à construção da curva de calibração e quantificação do timol presente nas diversas amostras de cera analisadas.

Considerando-se os resultados, para os níveis de contaminação avaliados, as condições analíticas mais adequadas ocorrem com a utilização de 1 g de cera, mantendo-se a fibra em contacto com o espaço-de-cabeça durante 40 minutos a uma temperatura de 60 °C. Nestas condições experimentais foi possível obter uma boa correlação linear ( $r^2=0,990$ ) no intervalo de concentrações [3,5-14 mg/g]. A quantidade de timol encontrada nas amostras é significativamente inferior à colocada durante o processo de fabrico das lâminas, pelo que o processo de conservação não é o mais adequado, sendo evidente uma menor quantidade de timol quando a lâmina de cera é colocada na estufa.

[1] Bogdanov, S., J. Contaminants of bee products. *Apidologie*. **2006**, 37, 1-18.

[2] Imdorf, A.; Charrière, J.D.; Maquelin, C.; Kilchenmann, V.; Bachofen, B. Alternative varroa control. *Amer. Bee J.* **1996**, 136, 189-193.

[3] Arthur, C.L.; Killam, L.M.; Buchholz, K.D.; Pawliszyn, J. Automation and optimisation of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 1960-1966.

[4] Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M.A. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 5142-5151.