



Dissertação de Mestrado



“Avaliação das frações voláteis de espécies de *Aniba* por Microextração em Fase Sólida acoplada a Cromatografia Gasosa (SPME-CG) e Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (CG × CG)”

Rita de Cássia Zacardi de Souza\*

Orientador: Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata\*

Co-orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto\*\*

\*Laboratório de P & D de Produtos Naturais, IQ-UNICAMP

\*\*Laboratório de Cromatografia Gasosa, IQ-UNICAMP

Campinas, fevereiro de 2010

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

So89a	<p>Souza, Rita de Cassia Zacardi de. Avaliação das frações voláteis de espécies de <i>Aniba</i> por microextração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME-GC) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente / Rita de Cassia Zacardi de Souza. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata. Coorientador: Prof. Dr. Fabio Augusto.</p> <p style="text-align: center;">Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. SPME. 2. <i>Aniba</i>. 3. Cromatografia gasosa. 4. Óleos essenciais. I. Barata, Lauro Euclides Soares. II. Augusto, Fabio. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.</p>
-------	---

**Título em inglês:** Evaluation on the volatile fraction of *Aniba* species using solid phase microextraction coupled to gas chromatography (SPME-GC) and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC)

**Palavras-chaves em inglês:** SPME, *Aniba* species, Gas chromatography, Essential oils

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata (orientador), Prof. Dr. Palimécio Gimenes Guerrero Junior (UFTPR), Prof. Dr. Paulo José Samenho Moran (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 21/02/2011



## Agradecimentos

Aos meus pais e as minhas irmãs Raquel e Renata pelo apoio, incentivo e compreensão.

Ao Instituto de Química da Unicamp e seus ex-Diretores Ronaldo A. Pilli e Heloíse Pastore por me apoiarem, como funcionária, a realizar o mestrado e o estágio na Itália.

Ao Prof. Dr. Palimécio G. Guerrero Jr. e Prof. Dr. José S. Moran, (membros) Prof. Dr. Marcos N. Eberlin, Profa. Dra. Vera Redher e Profa. Dra. Luzia Koike (suplentes) por aceitarem o trabalho de banca.

Ao Prof. Dr. Fabio Augusto pela co-orientação e sugestões.

Ao Prof. Luigi Mondello pela oportunidade de estagiar em seu laboratório na Universidade de Messina – Itália.

À Profa. Dra. Raquel M. Braga, pelo apoio e compreensão.

Ao Luis A. F. de Godoy, pelo tratamento estatístico dos dados.

Aos meus amigos Adrian, Danilo e José e às minhas grandes amigas Valéria e Carol pelo apoio e incentivo.

A minha grande amiga Adriana e seus filhos Rubens e Lígia pelo acolhimento, apoio e incentivo imprescindíveis para a finalização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Lauro E. S. Barata, que mais do que um orientador foi, é hoje e sempre será um grande amigo! Muito obrigada pelo incentivo, apoio e confiança!

Muito obrigada!



## Curriculum Vitae

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

**Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - 2010**  
Mestrado em Química

**Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - 2005**  
Bacharelado em Química Tecnológica

**Escola Estadual Conselheiro Antônio Prado – ETECAP - 1995**  
Técnico em Química

### EXPERIENCIA PROFISSIONAL

**2008 – atual, Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química**  
Laboratório Espectrometria de Massas - Química

**2008 – janeiro a agosto - The Mediterranean Separation Science Foundation Research (MSSF) and Training Center Università di Messina, Sicilia - Itália**  
Estágio sob supervisão do Prof. Dr. Luigi Mondello.

**1998 - 2007 – Lab. de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais.**  
Depto. Química Orgânica, IQ – UNICAMP - Técnica de Apoio à Pesquisa junto ao Prof. Barata.

**1997 - Procter & Gamble do Brasil**  
Hair Care - Técnica em Química.

**1996 - Rhodia S/A**  
Centro de Pesquisa de Paulínia  
Programa de Estágio Técnico.

### PUBLICAÇÕES E TRABALHOS EM CONGRESSO:

Souza, R.C.Z.; Eiras, M.M.; Cabral, E.C.; Barata, L.E.S; Eberlin, M.N.; Catharino, R.R., The Famous Amazonian Rosewood Essential Oil: Characterization and Adulteration Monitoring by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting, aceito em novembro **2010**.

Tranchida, P.Q.; Souza, R.C.Z.; Barata, L.E.S.; Mondello, M.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L., Analysis of Macacaporanga (*Aniba parviflora*) Leaf Essential Oil by Using Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography Combined with Rapid-Scanning Quadrupole Mass Spectrometry, *Chromatography Today* 1, 4, 5-9, **2008**

Lupe F.A.; Souza, R.C.Z.; Barata, L.E.S., Seeking a sustainable Alternative to Brazilian Rosewood, *Perfumer & Flavorist*, v. 33, p.40-43, **2008**.

Godoy, L.; Souza, R.C.Z.; Barata, L.E.S.; Augusto, F.; Poppi, R. J., Identificação de Espécies Vegetais do Gênero *Aniba* por Análise de Componentes Principais (PCA) Aplicada a Dados Cromatográficos.” 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Salvador, **2009**.

Braga, A.M.P.; Santos, P.H.S.; Souza, R.C.Z.; Silva, M. A., Chemical Composition Change in Pineapple during Ripening: the Optimum Stage for Drying, CIGR Section V International Symposium, 2009, Rosario. Proceedings of the CIGR Section V International Symposium, **2009**.

May, A.; Bovi, O.A.; Maia, N.B.; Barata, L.E.S.; Souza, R.C.Z.; Mattoso, E.; Moraes, A.R.A.; Pinheiro, M.Q., Basil Plants Growth and Essential Oil Yield in a Production System with Successive Cuts *Bragantia*, Campinas, v.67, n.2, p.261-266, **2008**.

Souza, R.C.Z.; Augusto, F.; Barata, L.E.S.; Mondello, L.; Tranchida, P.Q.S.; Mondello, M., Análise do Óleo Essencial de *Aniba parviflora* (Macacaporanga) por Cromatografia Gasosa Monodimensional e Bidimensional Acopladas a Espectrometria de Massas. COLACRO XII - Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, Florianópolis, **2008**.

Silva, J.C.T.; Meirelles, A.M.O.; Souza, P.A.; Santos, B.C.B.; Souza, R.C.Z.; Marques, M.; Franchi, G.C.; Nowill, A.E.; Barata, L.E.S., In vitro cytotoxic activity of extract, essential oil and isolated neolignans from *Virola surinamensis* leaves. COLACRO XII - Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, Florianópolis, **2008**.

Souza, R.C.Z.; Schiozer, A.L.; Barata, L.E.S.; Augusto, F., A HS-SPME-GC-MS Study on the Composition of the Volatile Organic Fraction of Leaves from *Aniba* sp.- 10th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech), Brugges, Bélgica, **2008**.

Santos, B.C.B.; Silva, J.C.T.; Rauh, L.K.; Souza, R.C.Z.; Cabrini, D.A.; Barata, L.E.S., Seasonal evaluation of essential oil chemical composition of *Virola surinamensis* leaves in the topical anti-inflammatory activity. XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil (SPMB) - **2008**.

Souza, R.C.Z.; Cabral, E.C.; Barata, L.E.S.; Eberlin, M.N.; Catharino, R.R., Characterization And Adulteration Of Rosewood Oil By Synthetic Linalool Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. I Brazilian Conference on Natural Products, São Pedro, SP, Brasil **2007**.

Souza, R.C.Z.; May, P.; Barata, L.E.S.; Bovi O.A.; Maia, N.B.; Mattoso, E.; Moraes A.R.A.; Pinheiro M.Q., Produção de Biomassa de Óleo Essencial de Alecrim em Função do Intervalo entre Cortes e da Altura de Corte. IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, Fortaleza, **2007**.

## Resumo

“Avaliação das frações voláteis de espécies de *Aniba* por Microextração em Fase Sólida acoplada a Cromatografia Gasosa (SPME-CG) e Cromatografia Gasosa Bidimensional

Abrangente  
(CG × CG) ”

O presente trabalho é apresentado em dois capítulos: o primeiro compreende o desenvolvimento de uma metodologia de diferenciação entre duas espécies de *Aniba* frequentemente confundidas, *Aniba parviflora* e *Aniba rosaeodora* e o segundo compreende o estudo da composição química dos óleos essenciais de *Aniba parviflora* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (CG × CG-EM).

Para a diferenciação das espécies foi utilizada a avaliação das suas frações voláteis (*headspace*) através da SPME-CG (Microextração em Fase Sólida acoplada a Cromatografia Gasosa). Foram analisadas um total de 100 amostras de folhas das duas espécies e a diferenciação foi feita através do tratamento quimiométrico dos dados obtidos.

Foram analisados ainda óleos essenciais das folhas e da madeira de *A. parviflora* obtidos por arraste a vapor. O estudo destes forneceu além da composição química, a análise quantitativa dos seus componentes.

Por fim foi realizada a comparação da técnica de CG-EM com a inovadora técnica de CGxCG-EM que possibilitou um aumento de 50% na identificação dos componentes e aproximadamente de 80% na separação e detecção.

Os resultados obtidos permitem dizer que é possível diferenciar duas espécies botanicamente vizinhas através de técnicas analíticas de maneira objetiva com respaldo estatístico.





## Abstract

“Evaluation on the volatile fraction of *Aniba* species using Solid Phase Microextraction coupled to Gas Chromatography (SPME-GC) and Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography (GC × GC)”

This work consists of two main parts: The first part involves the development of a differentiation methodology between two *Aniba* species that are often confused with one another, they are *Aniba parviflora* and *Aniba rosaeodora*. The second part involves the chemical composition study of *Aniba parviflora* essential oils through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC- MS).

In the first part, the species differentiation was performed using SPME-GC and chemometric tools for the assessment of their volatile fraction (headspace). A total of 100 different leaf samples coming from distinct individuals of these two species were examined and the differentiation was made based on the SPME-GC chromatograms data that were treated using chemometric tools.

In the second part the essential oils of *A. parviflora* coming both from leaves and wood were also analyzed and its study resulted in the oils chemical composition and in the quantitative analyses of its components. This work provided also a comparison between two techniques, GC-MS and the innovative GCxGC-MS. The later technique allowed an increase of at least 80 % of total components separation and detection and an increase of more than 50 % of the total identified components.



1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 O mercado de óleos essenciais .....	2
1.2 A produção do óleo essencial da madeira do pau-rosa .....	4
1.3 Uma alternativa sustentável: Produção do óleo essencial das folhas de pau-rosa .....	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS .....	9
2.1 O gênero <i>Aniba</i> sp .....	10
2.2 <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke – O pau-rosa.....	10
2.3 <i>Aniba parviflora</i> (syn <i>Aniba fragans</i> ): .....	12
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	14
3.1 Cromatografia Gasosa .....	15
3.1.1. Detectores em CG .....	15
3.1.2. Índice de Retenção linear (IRL) .....	16
3.2 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente .....	18
3.3 Microextração em Fase Sólida - SPME ( <i>Solid Phase Microextraction</i> ).....	20
3.4 Análise de Componentes Principais – PCA .....	21
4. JUSTIFICATIVA DO PROJETO .....	23
5. OBJETIVOS GERAIS.....	25
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
6.1 Desenvolvimento de uma metodologia de diferenciação entre as duas espécies de <i>Aniba</i> (CAPÍTULO I). .....	25
6.2 Análise dos óleos essenciais de <i>A. parviflora</i> (CAPÍTULO II). .....	25
7. CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS DUAS ESPÉCIES DE <i>Aniba</i> . .....	26
7.1 EXPERIMENTAL .....	27
7.1.1 Material vegetal.....	27
7.1.1.1 Folhas de <i>Aniba rosaeodora</i> e <i>Aniba parviflora</i> .....	27
7.1.2 Otimização do método de extração por HS-SPME .....	28

7.1.3	Análise do <i>headspace</i> por microextração em fase sólida acoplada a Cromatografia Gasosa (HS-SPME-CG) .....	29
7.1.4	Tratamento estatístico através da Análise de Componentes Principais (PCA) .....	30
7.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
7.2.1	Otimização do método de extração por SPME das folhas de <i>Aniba</i> .....	30
7.2.2	Tratamento estatístico através da Análise de Componentes Principais (PCA) .....	36
7.3	CONCLUSÕES DO CAPITULO I - DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS DUAS ESPÉCIES DE <i>Aniba</i> . . .....	38
8.	CAPÍTULO II – ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>A. parviflora</i> .....	39
8.1	EXPERIMENTAL .....	40
8.1.1	Óleos essenciais (OEs) de <i>A. parviflora</i> .....	40
8.1.2	Análise dos óleos essenciais por CG-EM (Análise qualitativa).....	40
8.1.3	Análise dos óleos essenciais em CG-FID (Análise semi-quantitativa)..	41
8.1.4	Fator de resposta (FR):.....	41
8.1.5	Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (CG×CG): .....	44
8.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
8.2.1	Análise dos óleos essenciais em CG-MS (Análise qualitativa) .....	45
8.2.2	Análise de óleo essencial em CG-FID (Análise quantitativa aproximada através do FR).....	52
8.2.3	Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (CG×CG): .....	58
8.3	CONCLUSÕES DO CAPITULO II - ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Aniba parviflora</i> .....	61
9.	CONCLUSÕES FINAIS.....	61

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Valores de importação e exportação brasileiras para óleos essenciais'. .....	3
<b>Tabela 2.</b> Informações sobre as amostras de <i>Aniba</i> analisadas .....	30
<b>Tabela 3.</b> Sequência de testes utilizada na otimização do método de extração por SPME de <i>Aniba</i> sp. ....	31
<b>Tabela 4.</b> Amostras de pau-rosa ( <i>A. rosaeodora</i> - <b>AR</b> ) analisadas.....	33
<b>Tabela 5.</b> Amostras de macacaporanga ( <i>A. parviflora</i> - <b>AP</b> ) analisadas.....	34
<b>Tabela 6.</b> Fator de resposta para as diferentes classes de compostos. ....	42
<b>Tabela 7:</b> Composição química do OE folhas ( <b>OE235</b> ) e da madeira ( <b>OE241</b> ) de <i>Aniba parviflora</i> obtida através da análise em CG-EM. ....	48
<b>Tabela 8:</b> Análise quantitativa para OEs de folhas ( <b>OE235</b> ) e da madeira ( <b>OE241</b> ) de <i>Aniba parviflora</i> obtida através da análise em CG-DIC. ....	54
<b>Tabela 9:</b> Comparação dos valores de % área relativa e % em g/100g para o <b>OE</b> das folhas de macacaporanga ( <b>OE235</b> ) obtida através da análise cromatográfica.....	56
<b>Tabela 10:</b> Comparação dos valores de % área relativa e % em g/100g para o <b>OE</b> da madeira de macacaporanga ( <b>OE241</b> ) obtida através da análise cromatográfica. ....	56
<b>Tabela 11:</b> Diferenças entre os valores de % área relativa e % em g/100g para <b>OE235</b> (OE folhas de macacaporanga).....	57
<b>Tabela 12:</b> Comparação da composição química do OE das folhas de <i>Aniba parviflora</i> ( <b>OE235</b> ) através de CG-EM e CGxCG-EM . ....	60



## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Mapa do estado do Pará com a localização de Santarém.....	1
<b>Figura 2:</b> Foto da <i>Aniba rosaeodora</i> .....	10
<b>Figura 3:</b> Foto da <i>Aniba parviflora</i> .....	12
<b>Figura 4:</b> Esquema do cálculo do IRL.....	18
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática cromatografia bidimensional planar. ....	19
<b>Figura 6:</b> Representação do uso do amostrador de SPME. ....	21
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática da decomposição por PCA. ....	22
<b>Figura 8:</b> Gráfico de recuperação dos compostos alvo para diferentes tempos de extração.....	31
<b>Figura 9:</b> Gráfico de recuperação dos alvos para diferentes temperaturas de extração. ....	32
<b>Figura 10.</b> Cromatograma representativo de HS-SPME-CG para folhas de <i>Aniba parviflora</i> - condições cromatográficas: coluna SLB-5MS, 50°C, 50-250°C (3°C.min <sup>-1</sup> ), fluxo constante de He a 1ml.min <sup>-1</sup> . ....	35
<b>Figura 11.</b> Cromatograma representativo de HS-SPME-CG para folhas de <i>Aniba rosaeodora</i> , condições cromatográficas: col. SLB-5MS, 50°C, 50-250°C (3°C.min <sup>-1</sup> ), fluxo constante de He a 1ml.min <sup>-1</sup> . ....	35
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas sobrepostos para <i>A. rosaeodora</i> e <i>A. parviflora</i> .....	36
<b>Figura 13.</b> Gráfico de escores do PCA. ....	37
<b>Figura 14.</b> Cromatograma de íons totais de CG-EM para OE de <b>folhas</b> de <i>Aniba parviflora</i> , coluna SLB-5MS, condições: 5 °C (1 min), 50-250°C (3°C.min <sup>-1</sup> ), 250-270°C (10°C min), 270°C (5 min), fluxo constante de He a 1ml.min <sup>-1</sup> . ....	46
<b>Figura 15.</b> Cromatograma de íons totais de CG-EM para OE de <b>madeira</b> de <i>Aniba parviflora</i> , coluna SLB-5MS, condições: 5 °C (1 min), 50-250°C (3°C.min <sup>-1</sup> ), 250-270°C (10°C min), 270°C (5 min), fluxo constante de He a 1ml.min <sup>-1</sup> . ....	46
<b>Figura 16:</b> Expansão dos cromatogramas de íons totais (TIC) sobrepostos para amostra <b>OE235</b> e <b>OE241</b> na região do pico em 40.212 min. ....	52
<b>Figura 17.</b> Cromatograma de íons totais de CG-EM para OE235 de folhas de <i>Aniba parviflora</i> . Condições: coluna HP-5MS, 50°C (1 min), 50-250°C (3 °C.min <sup>-1</sup> ), 250-270°C (10°C min), 270°C (5 min), fluxo constante de He a 1ml.min <sup>-1</sup> . ....	58



<b>Figura 18:</b> Diagrama de contorno obtido por CGxCG–EM para OE de folhas de <i>Aniba parviflora</i> .....	59
<b>Figura 19.</b> Cromatograma para amostra - AR S1 .....	64
<b>Figura 20.</b> Cromatograma para amostra - AR S2 .....	64
<b>Figura 21.</b> Cromatograma para amostra - AR S3 .....	64
<b>Figura 22.</b> Cromatograma para amostra - AR S4 .....	65
<b>Figura 23.</b> Cromatograma para amostra - AR S5 .....	65
<b>Figura 24.</b> Cromatograma para amostra - AR S6 .....	65
<b>Figura 25.</b> Cromatograma para amostra - AR S7 .....	66
<b>Figura 26.</b> Cromatograma para amostra - AR S8 .....	66
<b>Figura 27.</b> Cromatograma para amostra - AR S9 .....	66
<b>Figura 28.</b> Cromatograma para amostra - AR S10 .....	67
<b>Figura 29.</b> Cromatograma para amostra - AR S11 .....	67
<b>Figura 30.</b> Cromatograma para amostra - AR S12 .....	67
<b>Figura 31.</b> Cromatograma para amostra - AR S13 .....	68
<b>Figura 32.</b> Cromatograma para amostra - AR S14 .....	68
<b>Figura 33.</b> Cromatograma para amostra - AR S15 .....	68
<b>Figura 34.</b> Cromatograma para amostra - AR 1.....	69
<b>Figura 35.</b> Cromatograma para amostra - AR 2.....	69
<b>Figura 36.</b> Cromatograma para amostra - AR 3.....	69
<b>Figura 37.</b> Cromatograma para amostra - AR 4.....	70
<b>Figura 38.</b> Cromatograma para amostra - AR 5.....	70
<b>Figura 39.</b> Cromatograma para amostra - AR 6.....	70
<b>Figura 40.</b> Cromatograma para amostra - AR 7.....	71
<b>Figura 41.</b> Cromatograma para amostra - AR 8.....	71
<b>Figura 42.</b> Cromatograma para amostra - AR 9.....	71
<b>Figura 43.</b> Cromatograma para amostra - AR 10.....	72
<b>Figura 44.</b> Cromatograma para amostra - AR 11.....	72
<b>Figura 45.</b> Cromatograma para amostra - AR 12.....	72
<b>Figura 46.</b> Cromatograma para amostra - AR 13.....	73
<b>Figura 47.</b> Cromatograma para amostra - AR 14.....	73
<b>Figura 48.</b> Cromatograma para amostra - AR 15.....	73

<b>Figura 49.</b> Cromatograma para amostra - AR 16.....	74
<b>Figura 50.</b> Cromatograma para amostra - AR 17.....	74
<b>Figura 51.</b> Cromatograma para amostra - AR 18.....	74
<b>Figura 52.</b> Cromatograma para amostra - AR 19.....	75
<b>Figura 53.</b> Cromatograma para amostra - AR 20.....	75
<b>Figura 54.</b> Cromatograma para amostra - AR I1.....	75
<b>Figura 55.</b> Cromatograma para amostra - AR I2.....	76
<b>Figura 56.</b> Cromatograma para amostra - AR I3.....	76
<b>Figura 57.</b> Cromatograma para amostra - AR I4.....	76
<b>Figura 58.</b> Cromatograma para amostra - AR I5.....	77
<b>Figura 59.</b> Cromatograma para amostra - AR I6.....	77
<b>Figura 60.</b> Cromatograma para amostra - AR I7.....	77
<b>Figura 61.</b> Cromatograma para amostra - AR I8.....	78
<b>Figura 62.</b> Cromatograma para amostra -AR I9.....	78
<b>Figura 63.</b> Cromatograma para amostra - AR I10.....	78
<b>Figura 64.</b> Cromatograma para amostra - AR I11.....	79
<b>Figura 65.</b> Cromatograma para amostra - AR I12.....	79
<b>Figura 66.</b> Cromatograma para amostra - AR I13.....	79
<b>Figura 67.</b> Cromatograma para amostra - AR I14.....	80
<b>Figura 68.</b> Cromatograma para amostra - AR I15.....	80
<b>Figura 69.</b> Cromatograma para amostra - AR P1 .....	80
<b>Figura 70.</b> Cromatograma para amostra - AR P2 .....	81
<b>Figura 71.</b> Cromatograma para amostra - AR P3 .....	81
<b>Figura 72.</b> Cromatograma para amostra - AR P4 .....	81
<b>Figura 73.</b> Cromatograma para amostra - AR P5 .....	82
<b>Figura 74.</b> Cromatograma para amostra - AR P6 .....	82
<b>Figura 75.</b> Cromatograma para amostra - AR P7 .....	82
<b>Figura 76.</b> Cromatograma para amostra - AR P8 .....	83
<b>Figura 77.</b> Cromatograma para amostra - AR P9 .....	83
<b>Figura 78.</b> Cromatograma para amostra - AR P10 .....	83
<b>Figura 79.</b> Cromatograma para amostra - AR P11 .....	84
<b>Figura 80.</b> Cromatograma para amostra - AR P12 .....	84

<b>Figura 81.</b> Cromatograma para amostra - AR P13 .....	84
<b>Figura 82.</b> Cromatograma para amostra - AR P14 .....	85
<b>Figura 83.</b> Cromatograma para amostra - AR P15 .....	85
<b>Figura 84.</b> Cromatograma para amostra - AP A1 .....	85
<b>Figura 85.</b> Cromatograma para amostra - AP A2 .....	86
<b>Figura 86.</b> Cromatograma para amostra - AP A3 .....	86
<b>Figura 87.</b> Cromatograma para amostra - AP A4 .....	86
<b>Figura 88.</b> Cromatograma para amostra - AP A5 .....	87
<b>Figura 89.</b> Cromatograma para amostra - AP S1 .....	87
<b>Figura 90.</b> Cromatograma para amostra - AP S2 .....	87
<b>Figura 91.</b> Cromatograma para amostra - AP S3 .....	88
<b>Figura 92.</b> Cromatograma para amostra - AP S4 .....	88
<b>Figura 93.</b> Cromatograma para amostra - AP S5 .....	88
<b>Figura 94.</b> Cromatograma para amostra - AP S6 .....	89
<b>Figura 95.</b> Cromatograma para amostra - AP S7 .....	89
<b>Figura 96.</b> Cromatograma para amostra - AP S8 .....	89
<b>Figura 97.</b> Cromatograma para amostra - AP S9 .....	90
<b>Figura 98.</b> Cromatograma para amostra – AP S10.....	90
<b>Figura 99.</b> Cromatograma para amostra - AP MC1 .....	90
<b>Figura 100.</b> Cromatograma para amostra - AP MC2 .....	91
<b>Figura 101.</b> Cromatograma para amostra - AP MC3 .....	91
<b>Figura 102.</b> Cromatograma para amostra - AP MC4 .....	91
<b>Figura 103.</b> Cromatograma para amostra - AP MC5 .....	92
<b>Figura 104.</b> Cromatograma para amostra - AP P1 .....	92
<b>Figura 105.</b> Cromatograma para amostra - AP P2 .....	92
<b>Figura 106.</b> Cromatograma para amostra - AP P3 .....	93
<b>Figura 107.</b> Cromatograma para amostra - AP P4 .....	93
<b>Figura 108.</b> Cromatograma para amostra - AP P5 .....	93
<b>Figura 109.</b> Cromatograma para amostra - AP P6 .....	94
<b>Figura 110.</b> Cromatograma para amostra - AP P7 .....	94
<b>Figura 111.</b> Cromatograma para amostra - AP P8 .....	94
<b>Figura 112.</b> Cromatograma para amostra - AP P9 .....	95

**Figura 113.** Cromatograma para amostra - AP P10 ..... 95

# 1. INTRODUÇÃO

Como parte de um projeto<sup>1</sup> que visa o cultivo de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) na Amazônia para a produção do óleo essencial de folhas, cerca de duas mil mudas desta planta foram instaladas em uma área de 5 hectares em Santarém, oeste do Estado do Pará.



**Figura 1:** Mapa do estado do Pará com a localização de Santarém<sup>2</sup>.

A aquisição de mudas botanicamente identificadas dessa espécie é fator limitante para o desenvolvimento de projetos de cultivo, já que na região do Oeste paraense, mesmo especialistas confundem mudas de *Aniba parviflora*, uma espécie vizinha com as de *A. rosaeodora* (pau-rosa). Esta questão gerou a necessidade de desenvolver uma metodologia que pudesse diferenciá-las. Adicionalmente, percebemos a oportunidade de estudar a *A. parviflora*, espécie endêmica do Oeste do Pará e conhecida na região como macacaporanga. Foram duas as razões dessa escolha, além do número reduzido de estudos publicados<sup>3,4,5</sup> para esta espécie, o óleo essencial das

---

<sup>1</sup> Cultivo e extração do óleo das folhas do Pau-rosa - Recursos do MDIC (Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio) e Banco da Amazônia - Coordenado por Lauro E.S. Barata – Convênio FUNCAMP 3668.

<sup>2</sup> [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Para\\_Municip\\_Santarem.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Para_Municip_Santarem.svg) acesso em novembro/2010.

<sup>3</sup> Rezende, C.M.A.M.; von Bülowa, M.V.; Gottlieb, O.R.; Pinho, S.L.V; Rocha, A.I., The 2-pyrones of *Aniba* species, 3167-3172, **1971**.

<sup>4</sup> Bittencourt, A.M.; Gottlieb, O.R.; Mors, W.B.; Magalhães, M.T; Mageswaran, S.; Ollis, W.D. Sutherland, I. O., The natural occurrence of 6-styryl-2-pyrones and their synthesis, *Tetrahedron*, 27, 5, 1043, **1971**.

folhas de macacaporanga quando analisado por perfumistas da Empresa de Perfumaria Givaudan foi considerado como matéria-prima potencial a ser introduzida no seu *cardex*<sup>6</sup>.

Esta dissertação de mestrado é dividida em dois Capítulos: o Capítulo I do desenvolvimento de uma metodologia não subjetiva de identificação e diferenciação das espécies *A. rosaeodora* e *A. parviflora*, e o Capítulo II que envolve a análise da composição química do óleo essencial de *A. parviflora* para o qual haviam sido encontrados apenas estudos preliminares.

## 1.1 O mercado de óleos essenciais

O mercado mundial de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos movimentou US\$ 333 bilhões em 2008 tendo um crescimento anual de 9%. O Brasil é o terceiro maior mercado mundial em Cosméticos com um crescimento anual médio de 27%, três vezes superior ao crescimento médio mundial<sup>7</sup>. Uma parte importante deste mercado (fragrâncias, perfumes e cremes, por exemplo) consome óleos essenciais, onde o Brasil ocupa a quarta posição mundial na produção, tendo exportado no período de janeiro de 2009 a junho de 2010, um volume correspondente a aproximadamente US\$115 milhões. No entanto, 96% deste volume corresponde ao óleo essencial de laranja, um sub-produto da indústria do suco, vendido recentemente por apenas US\$ 2/kg. Se considerarmos os outros óleos cítricos (limão e tangerina) este número cresce para 99,5%. Dos 0,5% restantes, apenas uma fração corresponde às matérias-primas aromáticas originadas da rica e inexplorada biodiversidade brasileira<sup>8</sup> como, por exemplo, o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) da Amazônia. Adicionalmente, registro recente<sup>9</sup> mostra que dos 1250 óleos essenciais estudados na Amazônia apenas cinco se

---

<sup>5</sup> Mattoso, E. Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 2005

<sup>6</sup> Cardex: Lista de ingredientes disponíveis. Informação da Diretoria da Givaudan, Brasil.

<sup>7</sup> Sumário Executivo Perfil Mercado SEBRAE Nacional Unidade de Acesso a Mercados - **11/2009**.

<sup>8</sup> <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/> Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) Aliceweb - acesso em julho de **2010**.

<sup>9</sup> Maia, J.G.S.; Andrade, E.H.A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. *Quím. Nova*, 32, 3, 595-622, **2009**.

tornaram efetivamente comerciais<sup>10</sup>, estando na pauta de exportação somente 3 deles, Copaíba, Cumaru e Pau-rosa.

**Tabela 1.** Valores de importação e exportação brasileiras para óleos essenciais<sup>8,11</sup>.

ÓLEOS ESSENCIAIS IMPORTAÇÃO X EXPORTAÇÃO	Kg Líquido	US\$		Kg Líquido	US\$	
		Importação	US\$/Kg		Exportação	US\$/Kg
"PETIT GRAIN" DE LARANJA	10.779	213.380,00	19,8	28.250	102.389,00	3,6
LARANJA	284.453	1.898.970,00	6,7	41.448.109	83.426.286,00	2,0
LIMAO	300.546	9.065.342,00	30,2	395.620	10.046.340,00	25,4
LIMA	115.834	2.492.172,00	21,5	147.518	2.416.240,00	16,4
CÍTRICOS	112.233	4.059.279,00	36,2	252.243	7.159.773,00	28,4
HORTELA-PIMENTA (MENTHA PIPERITA)	144.963	3.786.319,00	26,1	16.099	504.504,00	31,3
MENTA JAPONESA (MENTHA ARVENSIS)	940.605	11.391.334,00	12,1	6.527	168.091,00	25,8
MENTHA SPEARMINT*(MENTHA VIRIDIS L)	244.613	6.720.996,00	27,5	58	3.107,00	53,6
OUTRAS MENTAS	51.381	1.306.366,00	25,4	24.554	139.303,00	5,7
CITRONELA	45.472	506.508,00	11,1	6.564	125.571,00	19,1
CEDRO	77.296	1.296.645,00	16,8	30	1.304,00	43,5
PAU-SANTO (BULNESIA SARMIENTOL)	12.360	132.321,00	10,7	335	5.266,00	15,7
"LEMONGRASS"	3.420	93.853,00	27,4	-	-	-
<b>PAU-ROSA</b>	<b>654</b>	<b>47.356,00</b>	<b>72,4</b>	<b>21.022</b>	<b>2.271.829,00</b>	<b>108,1</b>
PALMA ROSA	366	11.862,00	32,4	-	-	-
CORIANDRO	2.728	203.511,00	74,6	-	-	-
CABREUVA	3.008	66.918,00	22,2	97	4.476,00	46,1
EUCALIPTO	377.505	3.314.338,00	8,8	389.028	4.604.611,00	11,8
ALFAZEMA OU DE LAVANDA	95.743	2.230.156,00	23,3	1.291	25.603,00	19,8
VETIVER	5.437	1.061.689,00	195,3	2.410	363.330,00	150,8
OUTROS OLEOS ESSENCIAIS	545.011	24.326.588,00	44,6	118.360	3.771.882,00	31,9
<b>TOTAL</b>	<b>3.374.407</b>	<b>74.225.903,00</b>		<b>42.858.115</b>	<b>115.139.905,00</b>	

De maneira geral, os produtos exportados pelo Brasil são caracterizados por grande volume e baixo preço de mercado. São produtos que podem ser considerados *commodities*<sup>12</sup> no setor e não apresentam diferenciais de qualidade em relação à concorrência. Enquanto o valor médio de óleos essenciais produzidos pelo Brasil é de US\$ 2,5/kg, a França exporta para o Brasil óleos ao preço médio de US\$ 35/kg<sup>5</sup>. O diferencial em valor é atribuído a especialização da indústria francesa, que produz óleos com características muito particulares e difíceis de serem produzidos em outra região. Isso se deve ao aproveitamento racional da biodiversidade local, com foco na riqueza aromática da região dos Alpes marítimos. O Brasil, ao contrário, inibe a atividade econômico-industrial ligada ao uso da biodiversidade pela burocratização excessiva dos

<sup>10</sup> Pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), Copaíba (*Copaiferae spp*), Pripioca (*Cyperus articulathus*), Cumaru (*Coumarona odorata*) e Breu (*Protium spp.*).

<sup>11</sup> Dados de Jan 2009 a jun 2010 fonte: Aliceweb - <http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br/>

<sup>12</sup> *Commodities* (mercadoria em inglês) pode ser definido como mercadorias, principalmente minérios e gêneros agrícolas, que são produzidos em larga escala e comercializados em nível mundial. As commodities são negociadas em bolsas mercadorias, portanto seus preços são definidos em nível global, pelo mercado internacional. Fonte: [http://www.suapesquisa.com/o\\_que\\_e/commodities.htm](http://www.suapesquisa.com/o_que_e/commodities.htm)

órgãos regulamentadores. Desta forma, perde a oportunidade de aproveitar-se do enorme fascínio que o Brasil e a Amazônia causam nos grandes mercados consumidores do planeta.

Produtos dirigidos à indústria de perfumaria e cosméticos seriam opção correta de uso sustentável da biodiversidade, uma vez que esta área consome baixos volumes de materiais a altos preços. Porém, apesar da riqueza da biodiversidade e do crescente número de publicações na área de plantas aromáticas, ainda é muito pequena a contribuição do Brasil na pesquisa, desenvolvimento e inovação de novas matérias primas e produtos com alto valor agregado para a indústria de perfumaria<sup>5</sup>.

A demanda por óleos essenciais é crescente na indústria, principalmente na de cosméticos e perfumaria. Apesar de o Brasil ter uma exportação significativa em óleos essenciais, aqueles originados da biodiversidade brasileira são raros e, algumas vezes, constituem atividade predatória, como no caso do pau-rosa, um dos principais produtos aromáticos de exportação da região amazônica e um dos focos deste trabalho.

## **1.2 A produção do óleo essencial da madeira do pau-rosa**

O óleo essencial do pau-rosa é produzido da madeira de árvores adultas, eventualmente centenárias, abatidas e reduzidas a cavacos para a extração do óleo. A espécie é endêmica da região Amazônica, mas já foi praticamente extinta nos Estados do Amapá e Pará e mesmo na Guiana Francesa, outrora grandes produtores.

As mais importantes casas de perfumaria internacionais são clientes desta fragrância fina e inigualável, porém a tendência é a total substituição desse óleo. Nos anos 70 produzia-se 500 toneladas de óleo de Pau-rosa<sup>13</sup>. E atualmente apenas 20 ton. Importantes empresas mundiais retiraram esta matéria-prima de seus portfólios uma vez que a sua produção não é sustentável e, portanto ecologicamente incorreta.

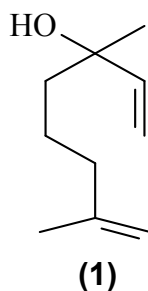
O óleo essencial de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) é exportado principalmente para os Estados Unidos, França, Japão, Reino Unido, e Alemanha<sup>8</sup>. Hoje, apenas o estado do Amazonas é produtor do óleo essencial de pau-rosa, e somente dois produtores continuam em atividade significativa, nas regiões de Maués e Novo Aripuanã. No

---

<sup>13</sup> Barata, L.E.S., May, P., Rosewood Exploitation in the Brazilian Amazon: Options for sustainable production, *Econ Bot* 58, 257-265, **2004**.



período de janeiro de 2009 até junho de 2010 (**Tabela 1**), a Amazônia exportou 21 toneladas de óleo essencial de pau-rosa ao preço médio de US\$ 108,0/kg, valor quatro vezes maior que o praticado em 1996 (US\$ 27,3/kg)<sup>8</sup>. A exportação desse produto tem decrescido consideravelmente nas últimas décadas devido à intensificação da fiscalização que procura regularizar a exploração do pau-rosa de acordo com normas internacionais de exploração madeireira em florestas tropicais, e também devido a atividade predatória que marca negativamente as empresas que consomem esta matéria-prima. Além disso, em meados dos anos 60, o linalol sintético (US\$ 6/kg) foi introduzido no mercado erodindo o uso do óleo de pau-rosa cujo principal constituinte é o linalol (**1**). Adicionalmente, o óleo essencial natural de Ho (*Cinnamomum camphora*) também concentrado em linalol, se estabeleceu no mercado a um preço igualmente baixo (US\$ 12/kg).



Apesar disso, o óleo essencial do pau-rosa representa uma importante economia para o Estado do Amazonas, contudo sua exploração que causa a perda de cerca de duas mil árvores anualmente contribui para a devastação da espécie na floresta nativa. Estima-se que pelo menos dois milhões de árvores de pau-rosa<sup>14</sup> já tenham sido abatidas sem que houvesse genuína preocupação com replantio, o que ocasionou uma redução drástica das populações do pau-rosa em matas naturais e conseqüentemente colocando a espécie em risco de extinção<sup>15</sup>. Uma política eficaz deveria prever a reposição desta e outras espécies por replantios consorciados, o que poderia ajudar na recomposição da floresta Amazônica<sup>16</sup>. Com a pressão do mercado consumidor e as

---

<sup>14</sup> Ohashi, S.T. et al., Brazilian rosewood oil: sustainable production and oil quality management. *Perfumer & Flavorist*, 22, 1-5, **1997**.

<sup>15</sup> Barata, L.E.S. Projeto P&D de Produtos das folhas de Pau-rosa - financiado pelo Banco da Amazônia, **2000**.

<sup>16</sup> L.Thomas, Corrida contra o relógio, Revista FAPESP, 171,38-39, **2010**.

políticas públicas exigindo produtos de origem certificada, inicia-se um ciclo de exploração sustentável dos recursos naturais da flora. Já em 1940 teve início uma tentativa de diminuir os impactos da retirada das árvores nativas, para isso o governo obrigava em norma o plantio de uma muda de pau-rosa para cada 20 quilos de óleo produzido. No entanto, por pressão dos próprios extratores, essa norma estadual foi suspensa pelo governo federal. Somente em 1992 o pau-rosa foi incluído na Lista de Espécies em Perigo de Extinção<sup>17</sup> que criou normas para a sua exploração, industrialização e comercialização (Portaria 01/98, 18.08.1998)<sup>18</sup>. Finalmente em março de 2010<sup>19</sup> o pau-rosa entrou para a lista internacional da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*), indicando que a produção deverá cair mais ainda devido a um controle que agora será internacional.

### **1.3 Uma alternativa sustentável: Produção do óleo essencial das folhas de pau-rosa**

Nos anos sessenta, cientistas brasileiros verificaram que folhas e galhos finos de pau-rosa produziam um óleo essencial rico em linalol<sup>14,20</sup>. No entanto, o desenvolvimento tecnológico para a produção do óleo das folhas só recentemente foi alcançado por Barata e colaboradores<sup>1</sup> que têm avaliado diferentes parâmetros indicativos do potencial industrial da extração e da qualidade sensorial do óleo das folhas como ingrediente para a indústria de perfumaria<sup>21,22</sup>. Vários estudos já demonstraram a viabilidade da produção do óleo das folhas de pau-rosa<sup>23,24,25,26,27</sup>.

---

<sup>17</sup> Portaria do Ibama-MMA 37/92, de 03.04.1992

<sup>18</sup> Ferraz, J.B.; Barata, L.E.S.; Sampaio, P. T.; Guimarães, G., Perfumes da floresta Amazônica: em busca de uma alternativa sustentável. *Ciência e Cultura*, 61, 3, 45-53, **2009**.

<sup>19</sup> *Jornal O Estado de São Paulo*, P. A23, 18.03.2010

<sup>20</sup> Gottlieb, O.R.; M. Fineberg; M.L. Guimarães; M.T. Magalhães; Maravalhas, N., Notes on Brazilian rosewood. *Perfumery and Essential Oil Record* 55, 253, **1964**.

<sup>21</sup> Os estudos de campo foram realizados por Eduardo Mattoso e os ensaios sensoriais realizados em cooperação com uma empresa internacional de fragrâncias para determinar a aceitação do óleo pela indústria de perfumaria.

<sup>22</sup> Zellner, B.D.; Lo Presti, M.; Barata, L.E.S.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L., Evaluation of leaf-derived extracts as an environmentally sustainable source of essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry and enantioselective gas chromatography-olfactometry *Analytical Chemistry* 78, 883-890, **2006**.

<sup>23</sup> Relatório Projeto P&D de Produtos das folhas de Pau-rosa - financiado pelo Banco da Amazônia **2000**.

Foi verificado que folhas e galhos verdes jovens produzem maior quantidade de óleo essencial (até 3,5%) do que a madeira (em média 1,1%) com boa qualidade e equivalente ao óleo da madeira, podendo conter, após destilação, até 95% de linalol<sup>28</sup>. A composição química do óleo das folhas é qualitativamente similar ao óleo de madeira atualmente comercializado, possui apenas diferenças quantitativas na composição o que em consequência produz um perfil olfativo diferenciado. Nosso grupo de pesquisa determinou o perfil químico e sensorial de óleos de pau-rosa através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia Gasosa Enantioseletiva acoplada à Olfatometria (Es-CG-O Enantioselective Gas Chromatography – Olfactometry)<sup>22</sup> Comparando-se a composição desses óleos observa-se que ambos possuem como componente majoritário o linalol (85% no óleo de madeira e 81% no óleo das folhas) e, em menores quantidades, os derivados *cis* e *trans* óxidos de linalol (**2,3**), bem como  $\alpha$ -terpineol (**4**) e  $\alpha$ -copaeno (**5**), porém as proporções dessas substâncias são diferentes em cada óleo o que se traduz em uma diferença olfativa entre os mesmos. A presença destas outras substâncias terpênicas minoritárias, conferem ao óleo de folhas um *bouquet* mais rico e sofisticado, podendo assim levá-lo a um novo produto para a pauta de exportação da Amazônia.

---

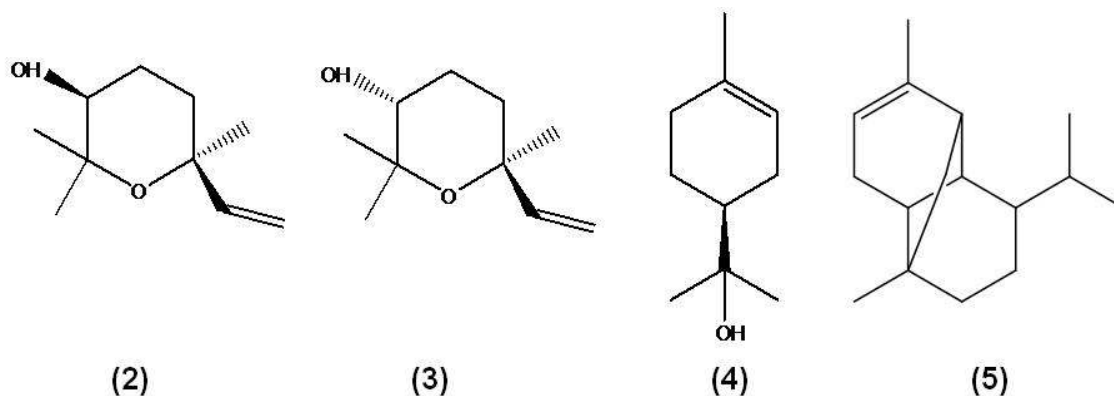
<sup>24</sup> Sampaio, P.T.B.; Santos, M.; Vieira, G.; Spironello, W.; Useche, F.L.; Bruno, F.M.S., Avaliação da rebrota da copa de árvores de pau-rosa (*Aniba rosaeodora Ducke*) em sistemas de podas sucessivas *Acta Amazonica*, 37, 55-60, **2007**.

<sup>25</sup> Takeda, S.P., Avaliação de biomassa e óleo de rebrotas de galhos e folhas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora Ducke*) em plantios comerciais submetidos à poda e adubação. Dissertação de Mestrado, INPA/UFAM, **2008**.

<sup>26</sup> Barata, L.E.S. e Quadros, R. "Amazon Scents: Replacing Rosewood in Perfumery Parte I", *Perfumer & Flavorist* 32,3, **2007**.

<sup>27</sup> Barata, L.E.S. e Quadros, R "Amazon Scents: Replacing Rosewood in Perfumery Parte II", *Perfumer & Flavorist* 32,4, **2007**.

<sup>28</sup> Leite, A.M.C.; Quisen, R.C.; Sampaio, P.T.B., Pau-rosa (*Aniba rosaeodora Ducke*). Lauraceae: informações sobre o sistema de plantio e o manejo sustentável da espécie. Manaus. Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos 13,30,**2001**.



A cromatografia quiral do óleo da madeira mostra isômeros numa proporção de 38 : 62 de (-) - linalol e (+) - linalol enquanto que essa proporção no óleo das folhas é de 30 : 70 respectivamente. A análise sensorial do óleo bruto das folhas tem sua fragrância descrita como adocicada, floral, fresca e cítrica enquanto a análise olfativa para o óleo da madeira é descrito como de notas amadeirada, doce, floral e cítrica. Esta diferença na descrição se explica tanto pela diferente proporção dos isômeros do linalol presente em cada óleo como pela presença de outras substâncias, mesmo em quantidades muito pequenas (menos de 1%) que fazem com que os óleos possuam fragrância diferenciada. Também os isômeros possuem características olfativas diferentes, o (-)-linalol é descrito como doce, floral e fresco, já o (+) - linalol como doce, cítrico e herbáceo<sup>29</sup>.

Os dados obtidos experimentalmente no projeto de cultivo de Pau-rosa patrocinado pelo Banco da Amazônia indicam que o pau-rosa pode ser cultivado e as folhas coletadas periodicamente de árvores jovens de 4 anos<sup>30</sup>.

O uso deste método evitaria a destruição das árvores e estudos mostraram que tanto as folhas quanto os galhos finos geram óleo essencial em rendimento compatível com o requerido pela indústria.

Para a ampla utilização comercial do óleo essencial das folhas de pau-rosa é necessária a abertura de nichos de mercado para que se possa substituir o atual óleo essencial de pau-rosa proveniente da madeira.

<sup>29</sup> Lupe, F.; Souza, R.C.Z.; Barata, L.E.S., Seeking a Sustainable Alternative to Brazilian Rosewood, *Perfumer & Flavorist*, 33, 40-43, **2008**.

<sup>30</sup> Fidelis, C.H.V.; Augusto, F.; Sampaio, P.T.; Krainovic P.; Barata, L.E.S., Chemical Characterization of Rosewood leaf (*Aniba rosaeodora* Ducke) Essential Oil by GC×GC-qMS, *JEOR* submetido (**2011**)

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS**

## 2.1 O gênero *Aniba* sp

Muitas espécies pertencentes à família Lauraceae estão entre as mais utilizadas pela indústria de matérias-primas aromáticas, entre essas, as espécies do gênero *Aniba* destacam-se pelo alto valor econômico devido à composição do óleo essencial, encontrado em grande quantidade principalmente no lenho e na casca. Ainda hoje no Brasil, muitas plantas dessa família, particularmente as do gênero *Aniba*, chamadas popularmente de louros, sofrem, com freqüência, equívocos na identificação botânica devido a semelhanças nas características morfológicas.

## 2.2 *Aniba rosaeodora* Ducke<sup>31</sup> – O pau-rosa



**Figura 2:** Foto da *Aniba rosaeodora*<sup>32</sup>

Inicialmente essa espécie foi registrada com o nome de *Licaria guianensis* Aubl., por ser conhecida pelo nome de “Licari”, pelos indígenas. Sua importância econômica teve início em 1875 quando Samarin, na França, obteve o óleo essencial por destilação. Em 1881, Morim, também na França, separou do óleo essencial um álcool que chamou de linalol. Sua primeira exportação para a Europa aparece registrada na Guiana Francesa em 1883. Anos mais tarde, Koeller sugeriu que a espécie fosse denominada *Ocotea caudata* Koeller. Mez. Contudo, Ducke em 1926 passou a chamá-la *A. rosaeodora* Ducke. Neste mesmo ano, Ducke verificou que havia diferenças entre as

---

<sup>31</sup> Kubitzki, K.; Renner, S., Lauraceae 1 (*Aniba* and *Aiouea*). In Flora Neotropica. Organization for Flora Neotropica, The New York Botanical Garden, New York, No. 31, 125 pp **1982**.

<sup>32</sup> Foto cedida por Eduardo Mattoso.

espécies da floresta Amazônica do Brasil e das Guianas, passando a chamá-la *A. rosaeodora var. amazonica* Ducke, uma espécie rica em óleo essencial. A última tentativa de mudança foi feita em 1938, quando Kostermans propôs a alteração para *A. duckei* Kosterm<sup>33</sup>. Ainda hoje existem discordâncias entre botânicos quanto à identificação correta dessa espécie. Varias referências citam o pau-rosa como o nome de duas espécies da família Lauraceae, *Aniba rosaeodora* Ducke e *Aniba duckei* Kosterm, das quais seria extraído o óleo essencial produto de exportação, outros autores citam estas espécies como sinônimas<sup>5</sup>.

*Maia et al*<sup>34</sup> sugerem que as espécies apesar de distintas são representativas do pau-rosa e poderiam, portanto, receber a mesma nomenclatura originalmente sugerida por Adolph Ducke ou seja *Aniba rosaeodora var. amazonica*.

Segundo a *Flora Neotropica*<sup>31</sup> a nomenclatura para a espécie é *Aniba rosaeodora* Ducke como usaremos neste trabalho.

Quanto a sua atividade biológica, poucos estudos em relação ao óleo foram encontrados. Artigo recente descreve o efeito sedativo do óleo de pau-rosa<sup>35</sup>, outros resultados mostram que *A. rosaeodora* é uma potencial fonte de substâncias citotóxicas. Extratos metanólicos de galhos e do tronco de *A. rosaeodora* apresentaram letalidade significativa em larvas de *Artemia franciscana*. Já o óleo essencial levou a 100% de mortalidade dessas larvas, além disso, apresentou atividade larvicida *in vitro* contra *Aedes aegypti*<sup>36</sup>. O linalol parece ser o composto responsável por essa bioatividade. Pesquisas científicas atribuem ao linalol, composto majoritário do óleo de pau-rosa, efeito calmante<sup>37</sup>, analgésico<sup>38</sup>, anticonvulsivo<sup>39</sup> e antiinflamatório<sup>40</sup>, além de facilitar a permeabilidade cutânea de compostos ativos<sup>41</sup>.

---

<sup>33</sup> Marques, C.A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl <http://www.ufrj.br/institutos/if/revista/pdf/v8p195.pdf>

<sup>34</sup> Maia, J.G.S.; Andrade, E.H.A.; Couto, H.A.R.; Marx, F.; Henke, C., Plant sources of Amazon rosewood oil. *Quim. Nova*, 30, 8, 1906-1910, **2007**.

<sup>35</sup> Araújo, D.A.; Gonçalves, J.C.; Montenegro, F.C.; Sousa, D.P.; Leite, J.R.; Mattei, R.; Benedito, M.A.; Cruz, J.S.; Maia, J.G.; Rosewood oil induces sedation and inhibits compound action potential in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 30,124,3,440-3, **2009**.

<sup>36</sup> Souza, K.S.; Chaar, J.S.; Oliveira, K.M.T.; Gomes, E.O.; Portela, C.N.; Pohlit, A.M., Quignard, E.L.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P.; Mouchrek Filho, V.E.; Silva, D.D.; Galhiane, M.S.; Chierice, G.O., Atividade biológica de extratos, hidrolatos e óleos voláteis de pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) e quantificação do linalol no hidrolato de folhas *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, 9, 2, 1-7, **2007**.

<sup>37</sup> Elisabetsky, E.; Marschner, J.; Souza, D.O.; Effects of Linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex, *Neurochem Res.*, 20, 4, 461-5, **1995**.

### 2.3 *Aniba parviflora* (syn *Aniba fragrans*)<sup>31</sup>:



Figura 3: Foto da *Aniba parviflora*<sup>42</sup>

*Aniba parviflora* (syn. *A. fragrans*), espécie frequentemente confundida com o pau-rosa pela grande semelhança das folhas e frutos, apesar de conter linalol, apresenta um óleo essencial de fragrância muito diferenciada<sup>43</sup> sendo conhecida no Estado do Pará como macacaporanga ou louro rosa, e louro amarelo no Amazonas<sup>5</sup>.

Espécie arbórea características de floresta pluvial, solos argilosos e não inundáveis, as árvores atingem até 30 m sendo todas as suas partes aromáticas; casca pardo-amarelada, folhas coriáceas, inflorescência lateral de até 2,5 cm de comprimento, multifloral, de flores pequenas, cúpula do fruto espessa, ferrugínea, fruto do tipo baga, de aproximadamente 25 x 20 mm, cor vinho-escuro quando<sup>5</sup>. O levantamento bibliográfico mostrou número escasso de referências e não foi encontrada nenhuma publicação em relação à análise do óleo essencial, exceto aquela de Mattoso<sup>5</sup>.

Estudos de composição do óleo essencial de *A. parviflora* serão de grande utilidade já que se trata de um produto que pode tornar-se comercial, por isso

---

<sup>38</sup> Peana, A.T.; Montis, M.G.; Sechi, S.; Sircana, G.; D'Aquila, P.S.; Pippia, P., Effects of (–)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2, *European Journal of Pharmacology*, 497, 279–284, **2004**.

<sup>39</sup> Silva, L.F.; Emanuelli, T.; Souza, D.O.; Elisabetsky, E., Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes”, *Neurochemical Research* 26, 3, 191–194, **2001**.

<sup>40</sup> Peana, A.T.; Marzocco, S.; Popolo, A.; Pinto, A., (–)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound, *Life Sciences*, 78, 719–723, **2006**.

<sup>41</sup> Vaddi, H.K.; Ho, P.C.; Chan, S.Y., Terpenes in propylene glycol as skin-penetration enhancers: permeation and partition of haloperidol, Fourier transform infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry. *J Pharm Sci*, 91, 7, 1639–51, **2002**.

<sup>42</sup> Foto cedida por João Ferraz.

<sup>43</sup> Notas de saída levemente especiadas e notas de fundo amadeiradas e balsâmicas



apresentaremos nesse trabalho um estudo aprofundado da composição do óleo de macacaporanga de folhas<sup>44</sup> e madeira utilizando CG-DIC, CG-EM e CGXCG.

---

<sup>44</sup> Tranchida, P.Q.; Souza, R.C.Z.; Barata, L.E.S.; Mondello, M.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L., Analysis of Macacaporanga (*Aniba parviflora*) Leaf Essential Oil by Using Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography Combined with Rapid-Scanning Quadrupole Mass Spectrometry, *Chromatography Today* 1, 4, 5-9, **2008**.

### 3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

## 3.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica única e versátil. Originalmente aplicada à análise de gases e vapores de componentes muito voláteis, atualmente tornou-se uma ferramenta analítica usada para a separação e análise direta de amostras gasosas, soluções líquidas e sólidos voláteis<sup>45</sup>.

Essa técnica analítica baseia-se na partição dos compostos voláteis em uma fase estacionária, geralmente um líquido suportado em uma micro coluna de sílica fundida, e uma fase móvel, que nesse caso deve ser um gás inerte (He ou H<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub>), conhecida também como gás de arraste.

O tempo em que o composto leva para percorrer a superfície da fase estacionária é chamado tempo de retenção, e é característico para o mesmo composto mantendo-se as exatas condições de análise. Assim, com alguma informação prévia sobre a amostra, pode-se utilizar esses tempos como um guia para estudos de composição, desde que se possua os padrões. Além disso, essa técnica permite também a quantificação dos componentes em uma mistura através da construção de curvas analíticas a partir de padrões.

### 3.1.1. Detectores em CG

Uma grande variedade de colunas, injetores e detectores podem ser usadas de acordo com o objetivo da análise, algumas configurações são melhores que outras dependendo da aplicação. Para análises quantitativas, por exemplo, os detectores do tipo FID (*Flame Ionization Detector*) ou DIC (Detector de Ionização de Chama) são os mais utilizados, pois possuem alguns dos requisitos para uma boa quantificação que são: alta sensibilidade, faixa linear dinâmica, baixo custo e robustez. Quanto ao fator de resposta do detector, que determina a real resposta (concentração/área) para uma determinada classe de substâncias, o ideal é que este seja, para as diferentes classes, o mais próximo de 1 e no DIC isso não ocorre.

---

<sup>45</sup> Grob, R.L.; Barry, E.F., *Modern Practice of Gas Chromatography* - 4<sup>o</sup> edição -John Wiley & Sons, Inc. 2004

O princípio de funcionamento da detecção por ionização em chama baseia-se na geração de um sinal elétrico a partir dos íons gerados na ionização propiciada pela alta temperatura da chama de hidrogênio. Os hidrocarbonetos respondem extremamente bem em detectores do tipo DIC e o sinal gerado é proporcional ao número de carbonos. Já a presença de heteroátomos ligados ao C como, por exemplo, nos grupos C=O e COOH, diminui a resposta do detector<sup>45</sup>.

A quantificação de componentes em uma mistura complexa pode ser feita através da construção de curvas analíticas para cada substância, que é a chamada 'quantificação verdadeira' ou *true quantitation*<sup>46</sup>, porém para amostras muito complexas como os óleos essenciais essa prática torna-se inviável. Uma estratégia é o uso do Fator de Resposta (FR) que será discutido a seguir.

Outra importante revolução na área analítica foi o acoplamento do CG com a Espectrometria de Massas (EM). Os detectores do tipo EM são ferramentas poderosas para a identificação dos componentes de uma amostra. Além de informações sobre a pureza dos sinais cromatográficos, detectores do tipo EM aumentam a detectabilidade de compostos minoritários, proporcionando melhores resultados das análises qualitativas.

A CG-EM ou GC-MS<sup>47</sup> é uma ferramenta que pode ser utilizada para separar, quantificar e identificar misturas voláteis complexas. O uso dessa técnica possibilita análises muito mais rápidas e com muito mais informação.

### 3.1.2. Índice de Retenção linear (IRL)

O comportamento de retenção de um composto em uma coluna cromatográfica específica é caracterizado por três parâmetros: tempo de retenção, fator de retenção e retenção relativa<sup>48</sup>. Como o tempo de retenção é dependente da velocidade linear aplicada, temperatura, comprimento da coluna e da fase estacionária, ocorrem

---

<sup>46</sup> Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Liberto E.; Cordero, C.; Bicchi, C., Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review *J. Flavour Frag.*, 25, 5, 282–290, **2010**.

<sup>47</sup> *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

<sup>48</sup> Zellner, B.D.; Bicchi C.; Dugo P.; Rubiolo P.; Dugo G. and Mondello L., Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review *J. Flavour Frag.*, 23, 5, 297–314, **2008**.

variações que desestimulam o uso do tempo de retenção como ferramenta de identificação.

Em 1958, Kovàts introduziu o conceito do Índice de Retenção, na época também chamado de Índice de Kovàts (**IK**), que é um número, obtido por interpolação, que relaciona o tempo de retenção de um componente em estudo com o tempo de retenção de dois padrões (geralmente hidrocarbonetos) eluídos antes e após o pico do composto de interesse (**Figura 4**) segundo a equação **1**. Porém o Índice de Retenção proposto por Kovàts referia-se somente a dados obtidos através de isotermas. Dool e Kratz, em 1963 adaptaram a equação de Índice de Retenção para análises em temperatura programada, também conhecido como Índice de Retenção Linear<sup>48</sup> (IRL) conforme descrito na equação **2**.

$$IK_{(x)} = 100 [z + (\log tr_{(x)} - \log tr_{(n)}) / (\log tr_{(N)} - \log tr_{(n)})] \quad (1)$$

$$IRL_{(x)} = 100 [z + (tr_{(x)} - tr_{(n)}) / (tr_{(N)} - tr_{(n)})] \quad (2)$$

Onde:

IK = Índice de Kovàts (ou Índice de Retenção) para um composto de interesse

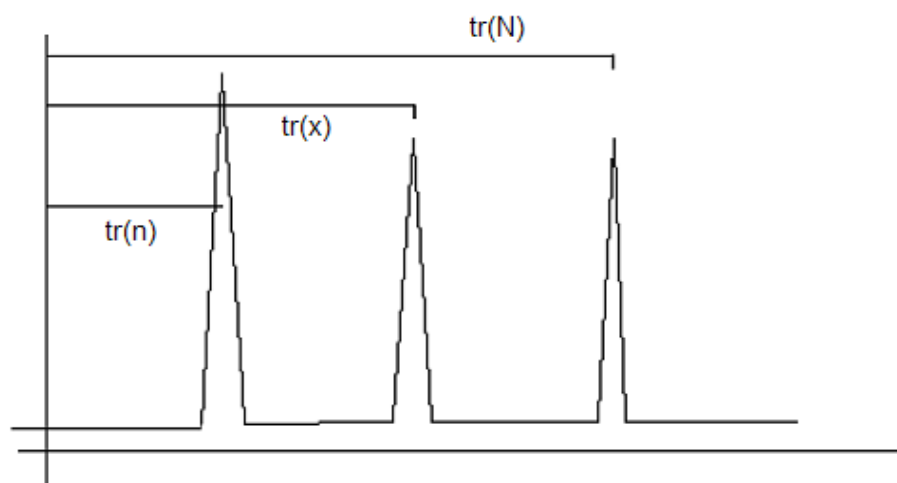
IRL = Índice de Retenção Linear

$tr_{(n)}$  = Tempo de retenção do alcano anterior ao pico de interesse

$tr_{(N)}$  = Tempo de retenção do alcano posterior ao pico de interesse

$tr_{(x)}$  = Tempo de retenção do pico de interesse

z = número de carbonos do alcano anterior



**Figura 4:** Esquema do cálculo do IRL.

O Índice de Retenção Linear é uma das ferramentas mais utilizadas na identificação de substâncias separadas por cromatografia gasosa. Mesmo quando se utiliza o acoplamento com a espectrometria de massas e a comparação dos espectros de fragmentação com base de dados o IRL funciona como um fator de desempate entre os espectros muito similares, o que aumenta a confiabilidade da identificação. Com relação às bases de dados em CG-EM vários softwares de bibliotecas de espectros estão disponíveis comercialmente, entretanto somente uma pequena parte inclui o IRL nas ferramentas de busca<sup>48</sup>.

### 3.2 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente

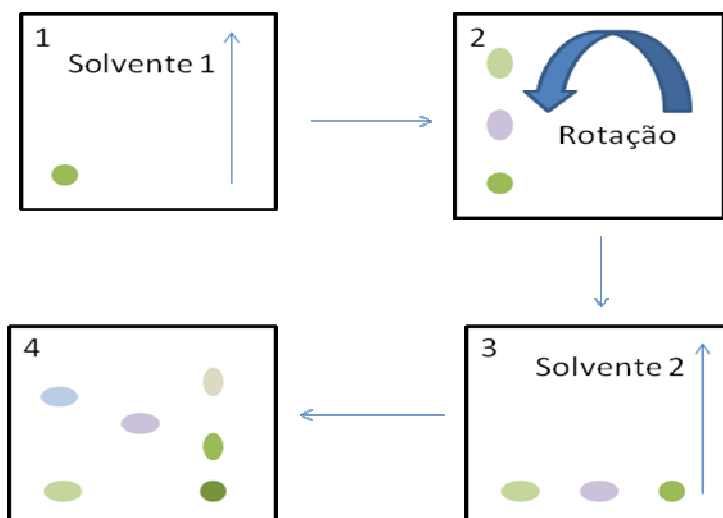
Separações cromatográficas são tradicionalmente conduzidas em formato monodimensional, isto é, a separação é feita usando-se uma única coluna, porém a capacidade de pico (*peak capacity*), que é o número de componentes de uma mistura que podem ser resolvidos, é reduzida.

Técnicas monodimensionais normalmente são inadequadas para separar e caracterizar misturas complexas tais como petroquímicos, ambientais, biomédicas entre outras, que podem conter centenas e até milhares de componentes<sup>49</sup>. Em um

---

<sup>49</sup> Mondello, L.; Lewis A.C.; Bartle, K.D.; In *Multidimensional Chromatography*, J Wiley & Sons. NY 2002.

cromatograma de uma amostra complexa, inevitavelmente, alguns dos picos monodimensionais são resultado de dois ou mais componentes sobrepostos (co-eluídos), o que prejudica tanto a identificação quanto a quantificação dessas substâncias<sup>50</sup>. Essa limitação impulsionou o desenvolvimento da Cromatografia Gasosa Multidimensional no qual a amostra é submetida seqüencialmente a diferentes processos de eluição<sup>51</sup>. Nessa técnica, espécies co-eluídas na primeira etapa podem ser separadas na segunda, especialmente se os mecanismos de separação forem ortogonais – i.e., se as fases estacionárias forem diferentes. Separações bidimensionais são muito usadas em cromatografia planar: a amostra é aplicada no canto de uma cromatoplaça quadrada e eluída, em seguida a placa é seca, girada a 90° e eluída novamente com uma fase móvel diferente da usada na primeira eluição<sup>51</sup> (**Figura 5**).



**Figura 5:** Representação esquemática cromatografia bidimensional planar.

A Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GCxGC, “*Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography*”) é caracterizada pela utilização seqüencial de duas colunas cromatográficas, uma convencional e a outra mais curta, de forma que todo o efluente da primeira coluna é conduzido para a segunda através de um modulador, tal que a eficiência de separação é preservada. A sensibilidade é

<sup>50</sup> Casilli, A.; Tranchida, P.Q.; Lo Presti, M.; Dugo, P.; Dugo G. 35th ISEO, Messina-Italia, **2004**.

<sup>51</sup> Pedroso, M.P.; Godoy, L.A.F.; Fidélis, C.H.V.; Ferreira, E.C.; Poppi, R.J.; Augusto, F.; Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC). *Quím. Nova*, 32, 421-430, **2009**.

significativamente incrementada e a resolução aumenta de forma expressiva, se comparada à cromatografia gasosa monodimensional<sup>52</sup>.

Se a capacidade de resolução de cada estágio for  $n_1$  picos para o primeiro e  $n_2$  para o segundo, a resolução do sistema bidimensional será de até  $n_1 \times n_2$ . Além disso, a combinação de duas colunas cromatográficas com mecanismos de separação ortogonais leva a um significativo aumento de seletividade<sup>53</sup>. Tais características tornam esta técnica extremamente útil para análise de amostras complexas como óleos essenciais, perfumes e petróleo.

A partir do ano 2000 o uso de CG×CG começou a se popularizar. Um levantamento na base de dados do ISI (Web of Science) mostra que entre 1991 e 2000, as publicações sobre CG×CG eram menos de dez ao ano. A partir de 2000 esse número aumentou significativamente, chegando a cerca de 55 em 2005 e pouco mais de 1000 em 2010. Apesar do grande crescimento desta técnica, os equipamentos comerciais só foram disponibilizados a partir de 2003.

### **3.3 Microextração em Fase Sólida - SPME (*Solid Phase Microextraction*)**

A SPME desenvolvida por Pawliszyn em 1990<sup>54</sup> é uma técnica de extração e pré-concentração rápida, simples e que dispensa o uso de solventes para a extração, exigindo quantidades minúsculas de amostra e evitando a manipulação excessiva desta<sup>55</sup>. Utiliza-se uma micro-fibra ou bastão de sílica fundida revestida com uma fina camada de material adsorvente (sólido ou líquido), essa fibra é exposta à amostra ou ao seu espaço confinante chamado *Headspace* (HS). Os analitos contidos na amostra ou no HS são sorvidos pelo material que reveste a fibra e posteriormente transferidos para o instrumento analítico adequado para a análise desejada (**Figura 6**).

---

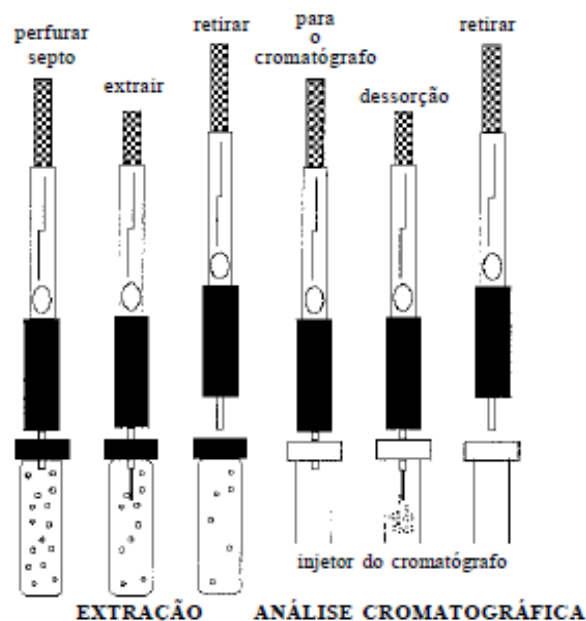
<sup>52</sup> Mühlen, C.; Zini, C.A.; Caramão, E.B.; Marriott P.J.; *Quim. Nova*, 29, 4, 765-775, **2006**.

<sup>53</sup> Dalluge, J.; Beens, J.; Brinkman, U.A.T *J. of Chromatogr. A*, 1000, 69–108, **2003**.

<sup>54</sup> Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148, **1990**.

<sup>55</sup> Sartorato, A.; Análises dos Constituintes Voláteis de Plantas Aromática por Microextração em Fase Sólida acoplada a Cromatografia Gasosa (SPME-CG), Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, **2001**.





**Figura 6:** Representação do uso do amostrador de SPME<sup>56</sup>.

Na HS-SPME-CG<sup>57</sup> os analitos voláteis são extraídos e transferidos para um cromatógrafo a gás sem necessidade de extração com solvente. Essa técnica vem sendo largamente utilizada para análise dos chamados compostos orgânicos voláteis biogênicos (BVOC, Biogenic Volatile Organic Compounds), óleos essenciais e contaminantes, porém a composição dos voláteis adsorvidos depende de alguns fatores: o tipo de fibra usada, polaridade e volatilidade dos componentes a serem extraídos, entre outros. Assim o cromatograma de um óleo essencial, através da injeção direta em um cromatógrafo a gás (CG), é eventualmente bem diferente do obtido com a injeção dos voláteis extraídos por HS-SPME, o que as tornam técnicas complementares.

### 3.4 Análise de Componentes Principais – PCA

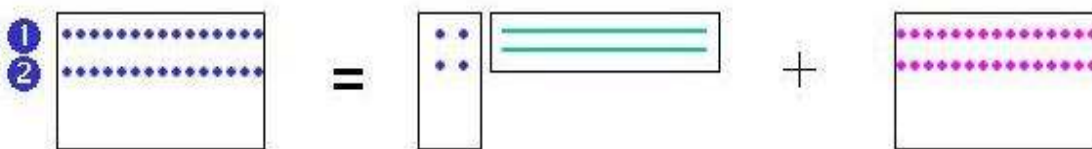
A análise de componentes principais, PCA (*Principal Component Analysis*) é uma técnica estatística muito utilizada para redução do número de variáveis de um conjunto

<sup>56</sup> Pires, A. L.; Augusto, F., Microextração por Fase Sólida, *Quim. Nova*, 23, 523-530, 2000.

<sup>57</sup> Microextração em Fase Sólida no Espaço Confinado acoplada a Cromatografia Gasosa

de análises. Essa ferramenta transforma um conjunto de dados multivariados em componentes principais.

O conjunto de dados é organizado na forma de uma matriz (dados bidimensionais), onde as linhas podem ser amostras e as colunas variáveis<sup>58</sup>, através de cálculos matemáticos essa matriz é decomposta em duas novas matrizes chamadas de escore e loading. O novo conjunto de variáveis (componentes principais) é a combinação linear das variáveis originais.



**Figura 7:** Representação esquemática da decomposição por PCA.

Essa matriz pode ser escrita como produto de dois vetores. Outra maneira de escrever a equação anterior é:

$$X = TP^T \quad (3)$$

Onde **X** é o conjunto original dos dados com n linhas (amostras) e p colunas (variáveis); **T** é a matriz dos escores com n linhas e d colunas (número de componentes principais, novas coordenadas no novo sistema de eixos) **P** é a matriz dos pesos (informação do peso de cada variável original na formação dos novos eixos) com d linhas e p colunas. Os novos eixos são constituídos em ordem decrescente da quantidade de variância que descrevem. Assim, o PCA irá agrupar as variáveis que estão altamente correlacionadas numa nova variável chamada componente principal<sup>59</sup>.

O objetivo da PCA é encontrar um modelo mais representativo e geralmente mais compacto, de um conjunto original de dados o que permite extrair desse conjunto de dados informações relevantes para o seu entendimento.

---

<sup>58</sup> Pereira-Filho, E. R.; Poppi, R. J.; Arruda, M.A.Z., Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens, *Revista Analítica* 06, 38-50, **2003**.

<sup>59</sup> Mareto, D.A., Comparação entre máquinas de vetores de suporte por mínimos quadrados (LS-SVM) e métodos lineares para transferência de calibração. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, **2007**.

## 4. JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Um projeto recente coordenado pela Unicamp<sup>1</sup> envolve o cultivo e a produção do óleo essencial de folhas de pau-rosa em escala piloto-industrial. Desenvolvido experimentalmente em Santarém-PA, conta com apoio da Coordenação da Pós-Graduação “Recursos Naturais da Amazônia” da UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará. O Projeto implantou duas mil mudas de pau-rosa em um campo de 5 hectares na Fazenda Curauá, Santarém, PA. Porém a obtenção de mudas de pau-rosa foi e continua sendo um fator limitante. O acesso e a identificação correta das mudas são extremamente difíceis. Apenas um grupo seletivo de pesquisadores do INPA<sup>60</sup> em Manaus tem acesso a árvores de pau-rosa cultivadas na Reserva Ducke (AM) e somente os produtores de pau-rosa que tem acesso a sementes e mudas de regeneração natural na floresta. Como o projeto em questão visa o plantio de mudas, é necessária a formação de mudas por quaisquer métodos disponíveis: sementes, regeneração natural, estaquia ou clonagem. Experimentos de estaquia e clonagem estão em progresso mas ainda não apresentaram resultados<sup>61</sup>.

Não existem ainda mudas de pau-rosa certificadas para serem adquiridas no mercado, por esse motivo projetos anteriores que também visavam o plantio de pau-rosa foram mal sucedidos. Em 2003 um projeto também desenvolvido pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP) em conjunto com a empresa PEMATEC de Santarém-PA, previa a plantação de 500 mudas de pau-rosa na região de Santarém. Após três anos de projeto, ao primeiro ensaio de destilação do óleo essencial<sup>62</sup> constatou-se por CG que o óleo destilado não tratava-se de pau-rosa. Análises cromatográficas mostraram que mais de 90% das mudas adquiridas e plantadas tratavam-se de *A. parviflora* e não *A. rosaeodora* (pau-rosa).

Na primeira fase desse projeto, durante a aquisição de mudas cresceu a preocupação com relação a essa problemática de falta de mudas certificadas, e com o

---

<sup>60</sup> O Prof. Paulo de Tarso Sampaio do INPA, Manaus-AM tem acesso privilegiado a árvores adultas de 40 anos cultivadas na Reserva Ducke do INPA.

<sup>61</sup> Experimentos de clonagem estão sendo realizados em parceria com a Empresa ProClone de Holambra, SP. Experimento independente de clonagem e estaquia pelo Prof. Sampaio do INPA, Manaus,AM.

<sup>62</sup> Experimento conduzido pelo Prof. Barata em 2007.

fato de ser comum encontrar entre os lotes de mudas de algumas regiões indivíduos de outras espécies principalmente de *A. parviflora* que, como dito anteriormente é facilmente confundida com o pau-rosa e frequentemente aparece como contaminação entre os indivíduos de *A. rosaeodora*. Isso tornou necessário encontrar uma metodologia que pudesse diferenciar principalmente essas duas espécies.

Um direcionamento para a diferenciação das espécies seria a análise do óleo essencial produzido pelas folhas que, apresentam perfis químicos diferentes. Entretanto, para a extração do óleo essencial são necessários sobretudo volume de material vegetal nem sempre existente em quantidade suficiente, principalmente na fase de muda. Além disso o processo de extração de óleo essencial consome tempo de laboratório. Por isso a estratégia foi utilizar a análise dos voláteis das folhas através da Microextração em Fase Sólida do Headspace acoplada a Cromatografia Gasosa (HS-SPME-CG).

## 5. OBJETIVOS GERAIS

1. Desenvolver uma metodologia cromatográfica de diferenciação entre as espécies *Aniba rosaeodora* e *Aniba parviflora*;
2. Determinar perfis cromatográficos dos óleos essenciais de madeira e folhas de *A. parviflora*;

## 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 6.1 Desenvolvimento de uma metodologia de diferenciação entre as duas espécies de *Aniba* (CAPÍTULO I).

1. Otimizar metodologias de HS-SPME para extração de voláteis de folhas de *Aniba rosaeodora* e *Aniba parviflora*;
2. Obter perfis cromatográficos dessas amostras, com separação e detecção por CG-DIC (Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama);
3. Tratar os dados obtidos com a aplicação de ferramentas quimiométricas de análise para diferenciação das espécies de *Aniba*;

### 6.2 Análise dos óleos essenciais de *A. parviflora* (CAPÍTULO II).

1. Análise qualitativa dos óleos essenciais de madeira e folhas de *A. parviflora* por CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas);
2. Análise quantitativa aproximada desses óleos através da CG-DIC e do Fator de Resposta (FR);
3. Análise do óleo essencial de folhas de *A. parviflora* utilizando CG×CG-EM (Cromatografia Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometria de Massas)

7. CAPÍTULO I - DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS DUAS ESPÉCIES DE *Aniba*.

## 7.1 EXPERIMENTAL

A coleta dos dados experimentais foi realizada durante estágio feito pela mestranda no laboratório de pesquisas do The Mediterranean Separation Science Foundation Research (**MSSF**) and Training Center Università di Messina, Itália, sob a supervisão do Prof. Dr. Luigi Mondello.

### 7.1.1 Material vegetal

#### 7.1.1.1 Folhas de *Aniba rosaeodora* e *Aniba parviflora*

Para o desenvolvimento desse projeto foram coletadas amostras de folhas de *Aniba rosaeodora* e *Aniba parviflora* provenientes de mudas de plantios de Manaus-AM e Santarém-PA, respectivamente e em duas épocas diferentes:

**LOTE A1:** 35 amostras de folhas de mudas de *Aniba rosaeodora* com 3 meses de idade.

Origem: Viveiro<sup>63</sup> situado na UEA – Universidade Estadual do Amazonas, Manaus – AM. Amostras gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Paulo de Tarso Sampaio, pesquisador do INPA e da UEA.

As mudas foram mantidas sob cobertura de sombrite 50%, irrigadas regularmente e mantidas com adubo orgânico (cama de frango). As mudas são provenientes de sementes de *Aniba rosaeodora* coletadas na Reserva Ducke - AM cultivadas neste local desde os anos 60.

**Data da coleta:** 18/01/2008

**LOTE A2:** 30 amostras de mudas de *Aniba rosaeodora* com 7 meses de idade. Origem: Viveiro da Fazenda Curauá – Empresa Pematec, Santarém-PA.

---

<sup>63</sup> O viveiro se localiza no campus da UEA situado na Avenida Djalma Baptista.

Amostras originadas de sementes de Maués gentilmente cedidas pelo Sr. Zanoni Magaldi, produtor de óleo de pau-rosa industrial.

As árvores produtoras são originadas de cultivos registrados pelo Ibama-AM e foram identificadas previamente pelo Prof. Dr. Paulo de Tarso Sampaio do INPA.

Exsiccatas das matrizes estão depositadas no herbário do INPA – Manaus - AM.

**Data da coleta:** 23/03/2008

**LOTE B1:** 20 amostras de mudas de *A. parviflora* com 3 meses de idade.

Origem: Fazenda Curauá – Pematec.

As mudas são originadas de sementes de cultivos localizados na própria Fazenda da empresa onde há um plantio de 208 indivíduos adultos, botanicamente identificados pela Embrapa-CPATU, Belém-PA. Exsiccatas das matrizes estão depositadas na Embrapa de Belém.

**Data da coleta:** 18/01/2008

**LOTE B2:** 15 amostras de mudas de *A. parviflora* com 7 meses de idade.

Origem: idem ao anterior.

**Data da coleta:** 25/03/2008

### **7.1.2 Otimização do método de extração por HS-SPME**

Para a otimização de parâmetros várias amostras de folhas de *Aniba rosaeodora* com 3 meses de idade foram misturadas e depois cortadas, afim de se ter uma amostra homogênea e representativa. Foram testados dois tipos de corte: folhas rasgadas a mão e folhas cortadas com tesoura de aço inox aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>. Utilizou-se para cada extração aproximadamente 40 mg das folhas. A otimização foi feito utilizando somente as folhas de *A. rosaeodora*, disponíveis em maior quantidade.

Considerando testes prévios desenvolvidos por Sartorato<sup>55</sup> duas fibras foram testadas: uma fibra trifásica DVB/CAR/PDMS<sup>64</sup> e uma bifásica CAR/PDMS<sup>64</sup> sendo os

---

<sup>64</sup> DVB - Divinilbenzeno, CAR - Carboxen, PDMS - Poldimetilsiloxano



melhores resultados obtidos para a fibra trifásica. Foram testados vários tempos e temperaturas de extração.

A extração foi conduzida em um amostrador automático Shimadzu AOC-5000. Após a extração os voláteis foram dessorvidos em um sistema Shimadzu CG-2010 equipado com injetor tipo *split/splitless* e detector de ionização em chama (DIC).

Após se avaliar os cromatogramas obtidos, foram escolhidas as condições finais para a análise em HS-SPME-CG.

### **7.1.3 Análise do *headspace* por microextração em fase sólida acoplada a Cromatografia Gasosa (HS-SPME-CG)**

A um frasco de 10 mL lacrado com septo de teflon/silicone, foram adicionados 40 mg de material vegetal (folhas secas) cortadas com tesoura de aço inox em aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>. A extração foi conduzida em um amostrador automático Shimadzu AOC-5000. A fibra DVB/CAR/PDMS permaneceu exposta ao *headspace* por 30 minutos a 60°C. Após a extração os voláteis foram dessorvidos em um sistema Shimadzu CG-2010 equipado com injetor tipo *split/splitless* e detector de ionização em chama (DIC). As condições cromatográficas utilizadas foram: temp. inicial 50°C, taxa de aquecimento 3 °C /min até temperatura final de 250 °C. A coluna utilizada foi uma SLB-5MS (Supelco, Milan, Italy) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A temperatura do injetor foi mantida a 270 °C

Foram obtidos perfis cromatográficos para um total de 100 amostras de folhas divididas em 4 lotes sendo 65 amostras de *Aniba rosaeodora* (lotes A1 e A2) e 35 de *Aniba parviflora* (lotes B1 e B2) mediante HS-SPME-CG-DIC (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Informações sobre as amostras de *Aniba* analisadas

Nome (espécie)	Lote	No. de Amostras
pau-rosa ( <i>Aniba rosaeodora</i> )	A1 15/01/08	35
	A2 23/03/2008	30
macacaporanga ( <i>Aniba parviflora</i> )	B1 15/01/08	15
	B2 23/03/2008	20

#### **7.1.4 Tratamento estatístico através da Análise de Componentes Principais (PCA)**

O tratamento dos dados foi realizado em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Ronei J. Poppi do Laboratório de Quimiometria em Química Analítica do IQ - Unicamp. O software utilizado para o tratamento dos dados foi o MatLab 6.5. Antes de construir o PCA os cromatogramas foram alinhados utilizando o algoritmo peakmatch. O método quimiométrico utilizado foi o PCA com 2 componentes principais e primeira derivada como pré-processamento.

## **7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **7.2.1 Otimização do método de extração por SPME das folhas de *Aniba***

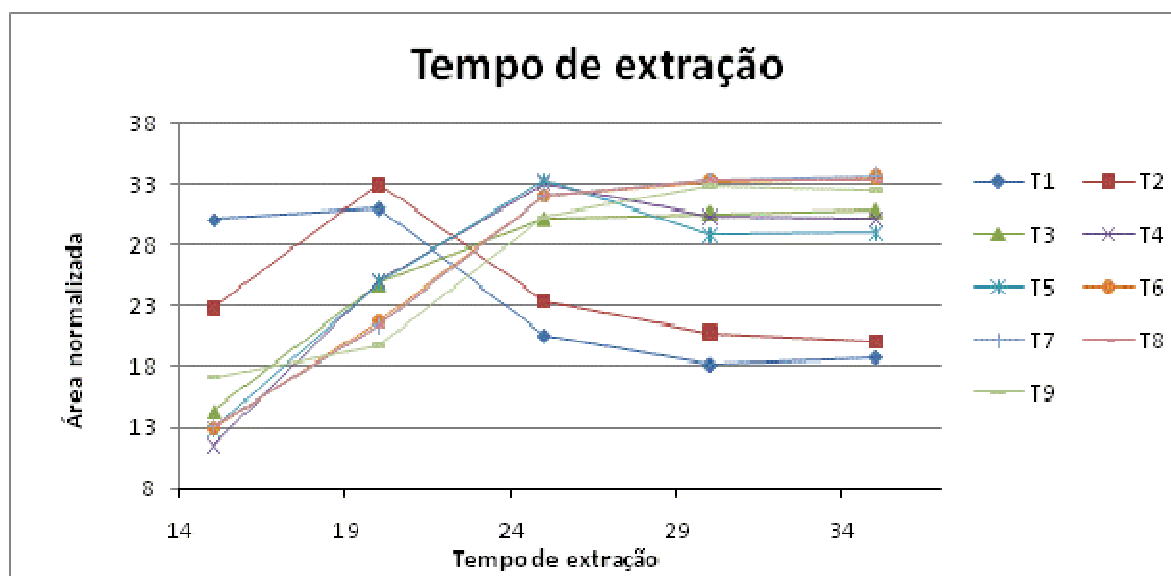
Para a análise dos voláteis das folhas por HS-SPME foi realizado um estudo de otimização dos parâmetros de extração. A determinação das melhores condições visava minimizar o tempo de extração e manter um perfil satisfatório do cromatograma. Nesse estudo foi feita uma série de extrações variando as condições conforme descrito na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Sequência de testes utilizada na otimização do método de extração por SPME de *Aniba* sp.

Teste	1A	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B
Temperatura (°C)	40	40	40	40	40	40	45	50	55	60	65
Tempo (min)	15	15	20	25	30	35	30	30	30	30	30

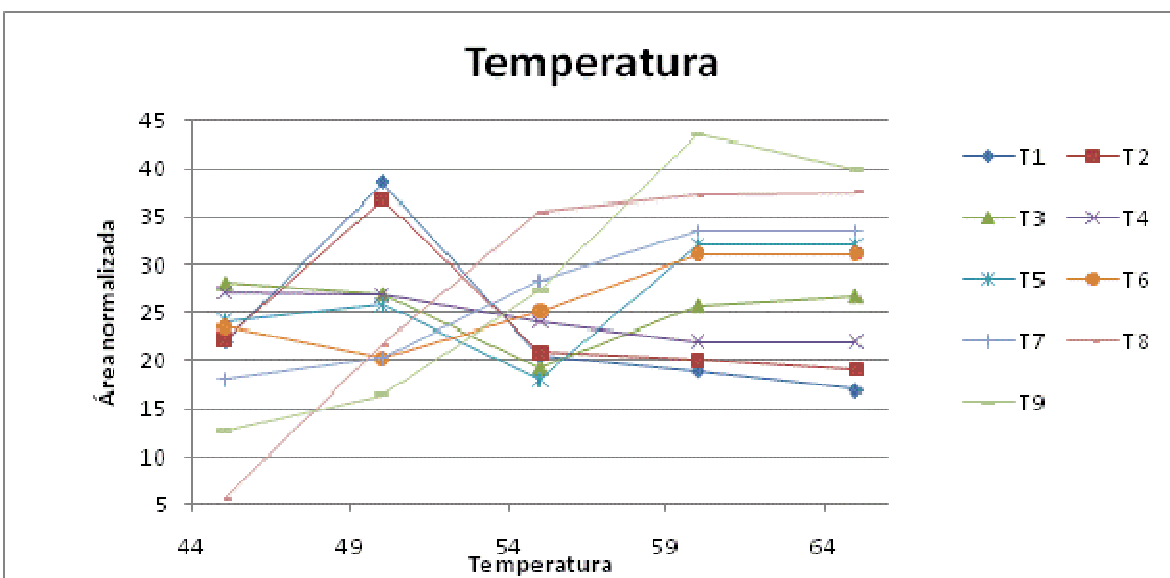
Amostras: A → folhas picadas a mão; B → folhas cortadas com tesoura aprox. 0,5 cm<sup>2</sup>. O tempo de dessorção da fibra foi pré-estipulado em 5 min.

Para a escolha dos parâmetros de extração foram monitorados 9 compostos alvo escolhidos aleatoriamente (T1-T9), em ordem crescente de tempo de retenção a partir do perfil de voláteis obtido do primeiro teste. A partir daí foi feito um acompanhamento da recuperação desses compostos nas diferentes temperaturas e tempos de extração (**Tabela 3**). O gráfico abaixo mostra o comportamento dos compostos alvo com a variação do tempo de extração.



**Figura 8:** Gráfico de recuperação dos compostos alvo para diferentes tempos de extração.

O mesmo foi feito para as diferentes temperaturas de extração e a figura abaixo representa o gráfico para essas condições:



**Figura 9:** Gráfico de recuperação dos alvos para diferentes temperaturas de extração.

Pode-se observar que tanto o aumento do tempo de extração como o da temperatura favorecem a extração dos compostos menos voláteis. A partir dos 30 minutos de extração (a 40°C) o sistema parece atingir o equilíbrio (**Figura 8**). Já as temperaturas testadas mostraram que a partir dos 60 °C não há mais uma grande variação na recuperação dos compostos alvo, sugerindo equilíbrio do sistema novamente (**Figura 9**). Assim, as condições escolhidas para a extração foram: temperatura 60°C e tempo de extração 30 minutos.

Após a escolha dos parâmetros de extração procedeu-se a análise das amostras. Como dito anteriormente, foram obtidos perfis cromatográficos para um total de 100 amostras de folhas divididas em 4 lotes sendo 65 amostras de *Aniba rosaeodora* (lotes A1 e A2) (**Tabela 4**) e 30 de *Aniba parviflora* (lotes B1 e B2) (**Tabela 5**) mediante HS-SPME-CG-DIC. Todos os cromatogramas obtidos encontram-se em anexo (**ANEXO I – pág 67**).

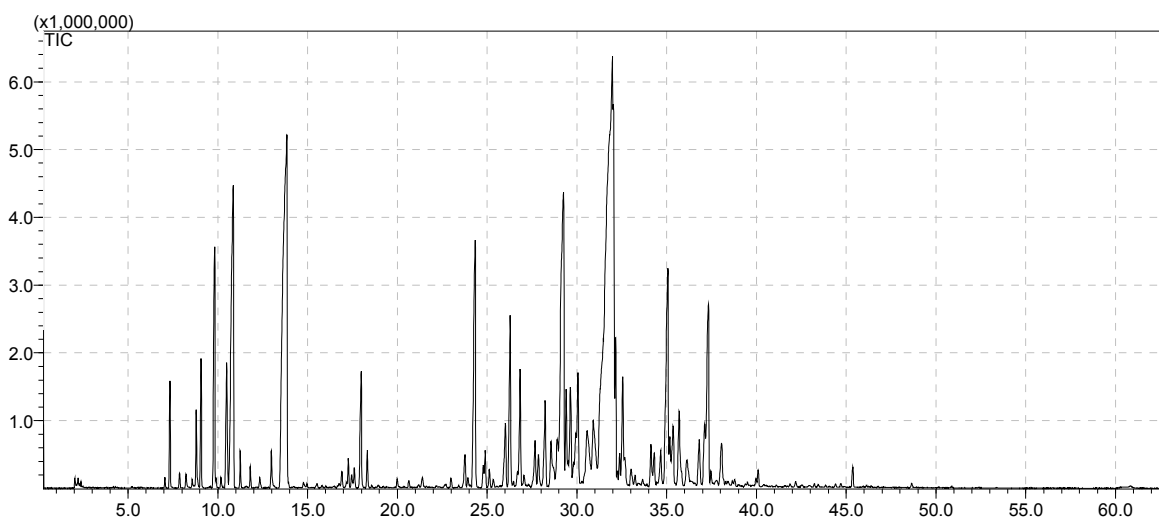
**Tabela 4.** Amostras de pau-rosa (*A. rosaeodora* - **AR**) analisadas.

<b>Amostras (Lote A 1)</b>	<b>Amostras (Lote A 2)</b>
<i>A. rosaeodora</i> - Pau-rosa	<i>A. rosaeodora</i> - Pau-rosa
AR S1	AR I1
AR S2	AR I2
AR S3	AR I3
AR S4	AR I4
AR S5	AR I5
AR S6	AR I6
AR S7	AR I7
AR S8	AR I8
AR S9	AR I9
AR S10	AR I10
AR S11	AR I11
AR S12	AR I12
AR S13	AR I13
AR S14	AR I14
AR S15	AR I15
AR 1	AR P1
AR 2	AR P2
AR 3	AR P3
AR 4	AR P4
AR 5	AR P5
AR 6	AR P6
AR 7	AR P7
AR 8	AR P8
AR 9	AR P9
AR 10	AR P10
AR 11	AR P11
AR 12	AR P12
AR 13	AR P13
AR 14	AR P14
AR 15	AR P15
AR 16	
AR 17	
AR 18	
AR 19	
AR 20	

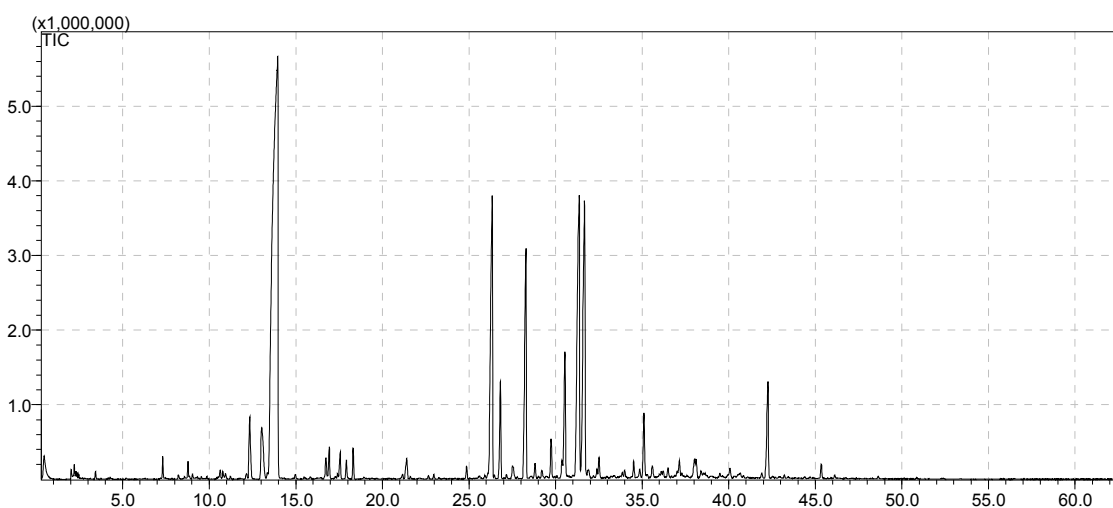
**Tabela 5.** Amostras de macacaporanga (*A. parviflora*- **AP**) analisadas.

<b>Amostras (Lote B 1)</b>	<b>Amostras (Lote B 2)</b>
<i>A. parviflora</i> - macacaporanga	<i>A. parviflora</i> - macacaporanga
AP A1	AP MC1
AP A2	AP MC2
AP A3	AP MC3
AP A4	AP MC4
AP A5	AP MC5
AP S1	AP P1
AP S2	AP P2
AP S3	AP P3
AP S4	AP P4
AP S5	AP P5
AP S6	AP P6
AP S7	AP P7
AP S8	AP P8
AP S9	AP P9
AP S10	AP P10
AP S11	
AP S12	
AP S13	
AP S14	
AP S15	

Abaixo apresenta-se o perfil de um cromatograma obtido para *Aniba parviflora* (Figura 10) e para *Aniba rosaeodora* (Figura 11).



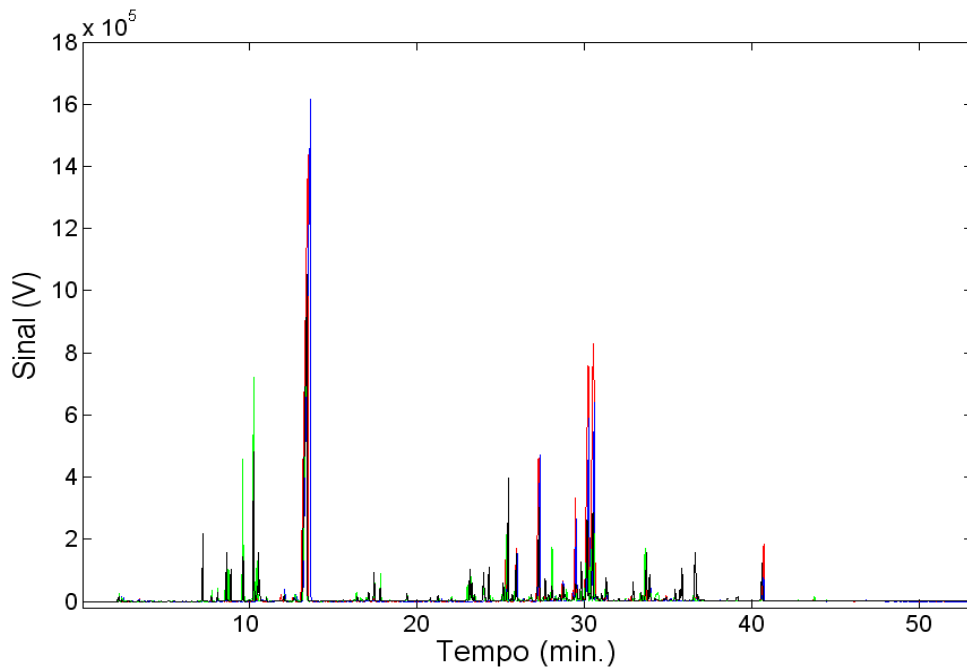
**Figura 10.** Cromatograma representativo de HS-SPME-CG para folhas de *Aniba parviflora* - condições cromatográficas: coluna SLB-5MS, 50°C, 50-250°C (3°C.min<sup>-1</sup>), fluxo constante de He a 1ml.min<sup>-1</sup>.



**Figura 11.** Cromatograma representativo de HS-SPME-CG para folhas de *Aniba rosaeodora*, condições cromatográficas: col. SLB-5MS, 50°C, 50-250°C (3°C.min<sup>-1</sup>), fluxo constante de He a 1ml.min<sup>-1</sup>.

## 7.2.2 Tratamento estatístico através da Análise de Componentes Principais (PCA)

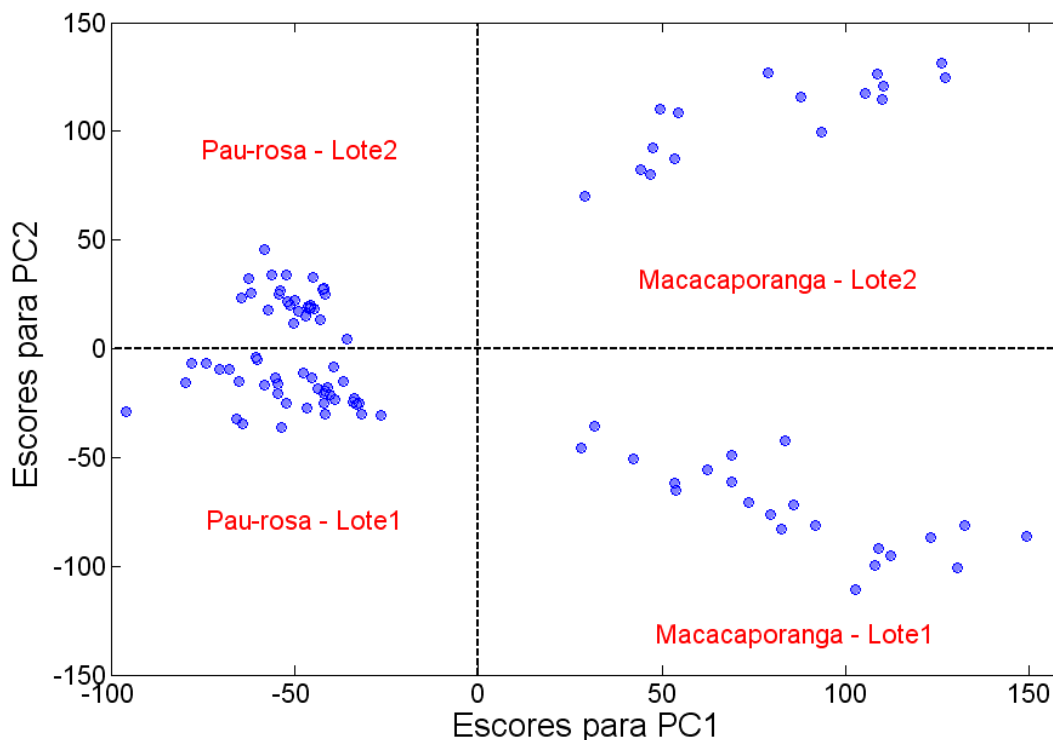
Os 100 cromatogramas obtidos ANEXO I que apresentam-se sobrepostos na **Figura 12** foram processados utilizando-se análise de componentes principais (PCA) como descrito no item 7.1.4.



**Figura 12.** Cromatogramas sobrepostos para *A. rosaeodora* e *A. parviflora*.

A partir desse tratamento foi possível tanto a distinção entre as espécies quanto entre as datas de coleta usando-se apenas os dois primeiros componentes principais gerados na análise (**Figura 13**).





**Figura 13.** Gráfico de escores do PCA.

O primeiro componente principal (PC1) pode ser associado às características de composição química das frações voláteis das folhas de cada espécie de *Aniba*. Para todas as amostras de pau-rosa (*A. rosaeodora*), o escore do PC1 foi negativo enquanto para as amostras de macacaporanga (*A. parviflora*) o escore foi positivo. Já o segundo componente principal (PC2) era associável a variações de maturação na composição das frações voláteis, independente da espécie de *Aniba* estudada: o escore correspondente era negativo para todas as amostras do lote 1 (18/01/2008) e positivo para o lote 2 (23/03/2008). A partir dessa constatação pode-se utilizar essa metodologia como ferramenta analítica de diferenciação entre essas 2 espécies de *Aniba*.

Assim, para análise de uma amostra problema, i.e., aquela que se deseja identificar, é necessário seguir o seguinte procedimento: Coleta das folhas da muda, secagem à sombra, pesagem em frasco apropriado e análise utilizando a HS-SPME-CG-DIC segundo a metodologia descrita no item 7.1.3 deste capítulo (pág. 42), e por fim reprocessá-los utilizando-se a PCA, juntamente com os padrões, assim as amostras que pertencerem a espécie *A. parviflora* ficarão agrupadas nos escores positivos do PC1 e aquelas pertencentes a espécie *A. rosaeodora* ficarão agrupadas nos escores negativos do PC1.

### **7.3 CONCLUSÕES DO CAPITULO I - DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS DUAS ESPÉCIES DE *Aniba*.**

A Microextração em Fase Sólida através do Headspace (HS-SPME) é uma técnica rápida, que usa massas reduzidas de amostra e pouca manipulação. O seu uso combinado à Cromatografia Gasosa (HS-SPME-CG) mostrou-se alternativa vantajosa para a diferenciação das espécies estudadas através da composição de suas frações voláteis.

Os resultados obtidos mostraram que através dessa técnica foi possível não só diferenciar as espécies de *Aniba* como também separá-las por lote, isto é, por data de coleta o que indica que existem influencias do estado de maturação na composição dos voláteis dessas espécies.

A combinação de estratégias quimiométricas adequadas e de técnicas simples de extração e pré-concentração pode ser uma ferramenta poderosa para a obtenção de informações fitoquímicas e taxonômicas a partir de dados cromatográficos complexos, porém de uma forma dinâmica e rápida.

## 8. CAPÍTULO II – ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *A. parviflora*.

Neste capítulo será abordada a análise dos óleos essenciais das folhas e da madeira de *A. parviflora* (macacaporanga).

## 8.1 EXPERIMENTAL

### 8.1.1 Óleos essenciais (OEs) de *A. parviflora*

Foram analisadas amostras dos óleos essenciais das folhas e da madeira da *Aniba parviflora*. Os óleos essenciais foram providos pela empresa Kairós Fitoquímicos e foram extraídos de folhas e de madeira (galhos maiores) provenientes da Estação Experimental de Curuá-Una, no estado do Pará, órgão hoje pertencente à UFOPA (Universidade Federal do Oeste do Para situada na cidade de Santarém - PA). As amostras de óleo foram catalogadas e inseridas ao acervo do **MSSF** com os seguintes códigos **OE235** para o óleo das folhas e **OE241** para o óleo da madeira, numeração que será utilizada neste trabalho.

### 8.1.2 Análise dos óleos essenciais por CG-EM (Análise qualitativa)

As amostras de óleo essencial foram injetadas em um sistema Shimadzu GCMS-QP2010 equipado com um injetor automático AOC-20i e injetor tipo *split/splitless*. A coluna utilizada foi uma SLB-5MS (Supelco, Milan, Italy) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm utilizando a seguinte programação de temperatura: 50 °C (1 min) 3 °C/min até 250 °C (5 min) 10 °C min 270 °C (3 min). A temperatura do injetor mantida a 250 °C e o volume injetado 1 µL.

A temperatura da interface e da fonte foram respectivamente, 250 °C e 200 °C, modo de ionização IE, faixa de massa  $m/z$  40-400 varredura de 1666 µ/s e intervalo de varredura de 0,25 s.

A razão de divisão da amostra (*split*) 1:100 , gás de arraste He a 30 cm/s de velocidade linear e pressão de 99,8 kPa, temperatura do detector 250 °C. Os dados foram adquiridos através do software GC-MS solutions ver. 2.51 (Shimadzu).

Os óleos foram diluídos a uma proporção aproximada 1:50 (20 uL do óleo essencial em 1 mL de diclorometano grau espectroscópico) em vial equipado com septo, próprio para injetor automático.

Para identificação dos compostos, utilizou-se a base de dados para GC-MS (FFNSC ver. 1.3, Shimadzu) dedicada a aromas e fragrâncias.

### **8.1.3 Análise dos óleos essenciais em CG-FID (Análise semi-quantitativa)**

As amostras de óleo essencial foram injetadas em um sistema Shimadzu GC-2010 equipado com um injetor automático AOC-20i e injetor tipo *split/splitless*. A coluna e condições cromatográficas foram as mesmas citadas no item 8.1.3.

A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 50:1, o gás de arraste He a 30 cm/s de velocidade linear e a pressão de 99,8 kPa, temperatura do detector 280 °C, fluxo de H<sub>2</sub> 50 ml/min, fluxo do ar 400 ml/min e fluxo de make-up 50 ml/min. Os dados foram adquiridos através do software GC solutions (Shimadzu).

Para injeção, pesou-se um volume de 100 uL (aproximadamente 0,100 mg) do óleo essencial em um vial equipado com septo, próprio para injetor automático. Adicionou-se 100 uL de uma solução padrão de nonano (0,1 % v/v) em diclorometano e completou-se o volume para 1 mL usando diclorometano grau espectroscópico.

### **8.1.4 Fator de resposta (FR)<sup>65</sup>:**

A quantificação aproximada das substâncias presentes nos óleos essenciais foi feita utilizando o fator de resposta do detector para cada grupo de substâncias, um trabalho desenvolvido por Mondello *et al*<sup>65</sup> determinou o FR<sup>66</sup> médio aproximado para compostos comumente encontrados nos óleos essenciais.

---

<sup>65</sup> Costa, R.; Zellner, B.D.; Crupi, M.L.; De Fina, M.R.; Valentino, M.R.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L., GC-MS, GC-O and enantio-GC investigation of the essential oil of *Tarchoanthus camphorates* L. *Flavor Fragr J.* 23, 40-48, **2008**.

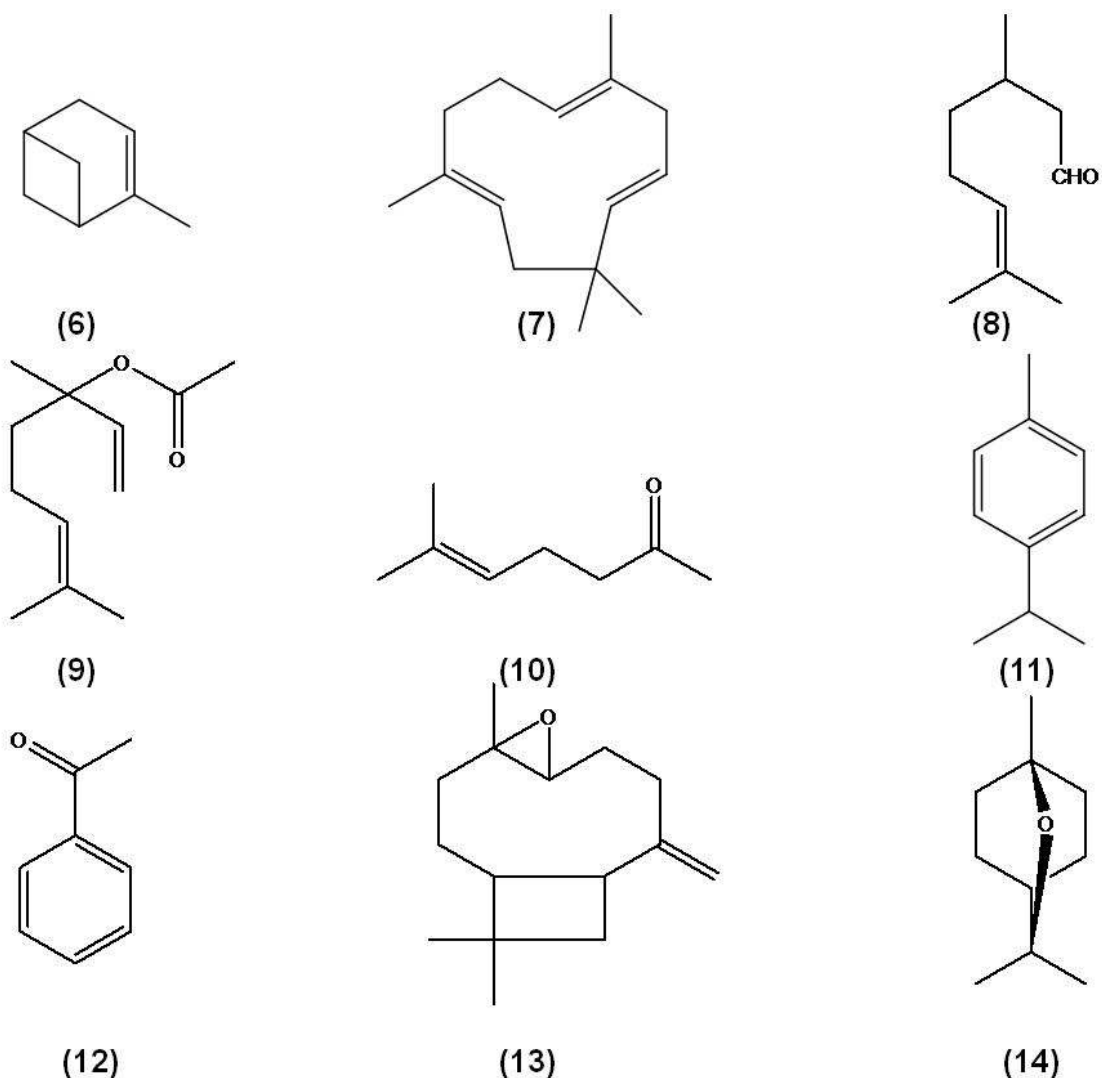
<sup>66</sup> O FR deve ser calculado para o detector do equipamento onde serão feitas as análises.

Para determinar o fator de resposta, compostos comuns nos óleos essenciais foram agrupados, baseados nas suas classes químicas (hidrocarbonetos, aldeídos, etc...) e cada classe foi subdividida de acordo com o tipo de estrutura de cada composto (por ex: monoterpenos, sesquiterpenos, etc...). Foram utilizados padrões das substâncias e em cada caso, quando possível, foram utilizados mais de um padrão por classe de composto (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Fator de resposta para as diferentes classes de compostos<sup>65</sup>.

<b>Classe de Composto</b>	<b>Exemplo</b>	<b>RF</b>
Hidrocarbonetos monoterpênicos	$\alpha$ -Pineno ( <b>6</b> )	1,03 $\pm$ 0,01
Álcoois	Linalol	1,30 $\pm$ 0,02
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	$\alpha$ - Humuleno ( <b>7</b> )	0,98 $\pm$ 0,03
Aldeídos	Citronelal ( <b>8</b> )	1,30 $\pm$ 0,02
Ésteres	Acetato de Linalila ( <b>9</b> )	1,59 $\pm$ 0,02
Cetonas	6-methyl 5-Hepten-2-one ( <b>10</b> )	1,30 $\pm$ 0,01
Hidrocarbonetos aromáticos	p - Cimeno ( <b>11</b> )	0,99 $\pm$ 0,03
Aldeídos aromáticos	Benzaldeído ( <b>12</b> )	1,27 $\pm$ 0,01
Óxidos	Oxido de Cariofileno ( <b>13</b> )	1,53 $\pm$ 0,02
Éteres	Eucaliptol ( <b>14</b> )	1,28 $\pm$ 0,01

Para o cálculo do fator de resposta, aos padrões acima mencionados foi adicionado nonano como padrão interno em uma concentração final de 0,1g/100g e posteriormente injetados por 5 vezes.



A fórmula para o cálculo do FR é:

$$FR = C_{anal} / [(A_{abs\ anal} / A_{abs\ p.i.}) \times C_{p.i.}] \quad (4)$$

Onde  $C_{anal}$  é a concentração do padrão que representa um grupo químico,  $A_{abs\ anal}$  é a área absoluta do pico,  $A_{abs\ pi}$  é a área absoluta do padrão interno,  $C_{p.i.}$  é a concentração do padrão interno.

Uma vez calculado, o fator de resposta pode ser usado para a quantificação absoluta dos voláteis, baseando-se na seguinte fórmula:

$$C_{VOC} = \{[(A_{abs\ VOC} / A_{abs\ p.i.}) \times m_{p.i.} \times RF] / m_{oleo}\} \times 100 \quad (5)$$

Onde  $C_{VOC}$  é a concentração, expressa em g/100 g, do composto volátil alvo,  $A_{abs\ VOC}$  é a área absoluta do pico,  $A_{abs\ pi}$  é a área absoluta do padrão interno,  $m_{p.i.}$  é a massa do padrão interno e  $m_{óleo}$  é a massa de óleo em gramas.

O FR difere de instrumento para instrumento, portanto a análise do óleo deve ser feita sempre utilizando o mesmo instrumento nas mesmas condições.

### **8.1.5 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (CG×CG):**

As amostras de óleo essencial foram injetadas em um sistema Shimadzu CG x CG-MS que consiste em dois cromatógrafos GC 2010 e um espectrômetro de massas QP2010 Plus. O primeiro CG era equipado com um injetor automático AOC-20i, um injetor *split-splitless* (300 °C). Como primeira coluna, usou-se uma Equity 30.0 m x 0.25 mm ID x 0.25  $\mu$ m (100% polydimethylsiloxane) e uma programação de temperatura de: 50 a 280 °C a 3°C/min.

A segunda coluna foi uma Omegawax (100% polyethylene glycol), 1.5 m x 0.1 mm x 0.1  $\mu$ m. O gás de arraste foi He e a modulação criogênica foi aplicada a cada 6 s utilizando um “modulador de loop de duplo estágio”. Parâmetros do EM: modo varredura total com velocidade de varredura de 10000 u/s, intervalo de massa de  $m/z$  40-400 e temperaturas de interface e fonte de íons de 280 e 250 °C, respectivamente.

Os dados foram coletados através do GCMS<sup>®</sup> solution software (Shimadzu) e transformados para ASCII data; os cromatogramas em 2D foram gerados utilizando Comprehensive Chromatography Manager v. 1.0 software.



## 8.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.2.1 Análise dos óleos essenciais em CG-MS (Análise qualitativa)

Para identificação dos compostos, utilizou-se a base de dados para CG-EM (FFNSC<sup>67</sup> ver. 1.3, Shimadzu) dedicada a aromas e fragrâncias desenvolvida pelo Laboratório do Prof. Luigi Mondello. O diferencial dessa base de dados é a introdução do Índice de Retenção Linear (LRI – *Linear Retention Index*) de cada composto na função de busca, que permite, além da comparação dos espectros de massa, a comparação simultânea e automatizada dos LIRs, isto é, além de comparar a similaridade entre os espectros de massa usa o valor de índice como ferramenta de confirmação.

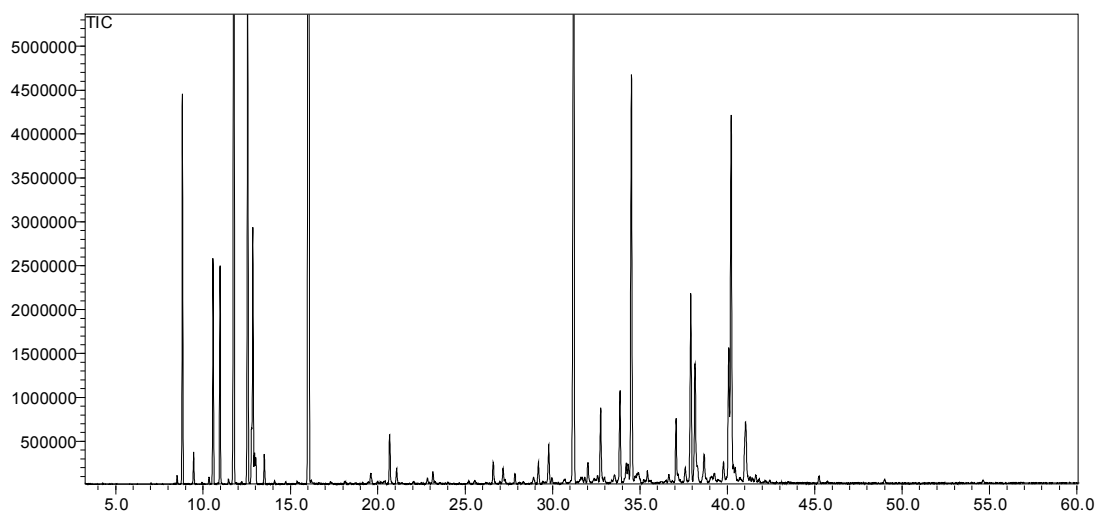
O espectro de fragmentação usado com o LRI aumenta a capacidade de diferenciação e identificação por CG-EM. Na verdade esse parâmetro pode ser usado como um filtro na procura na base de dados, assim a maior similaridade não somente deve ocorrer entre a fragmentação do composto alvo como este deve possuir também o LRI mais próximo.

O uso interativo do Índice de Retenção Linear com a função de pesquisa é extremamente vantajoso quando as matrizes em estudo são os óleos essenciais que na grande maioria são constituídos principalmente por terpenóides, que possuem espectros de massas muito similares podendo acarretar dificuldades na identificação e na discriminação.

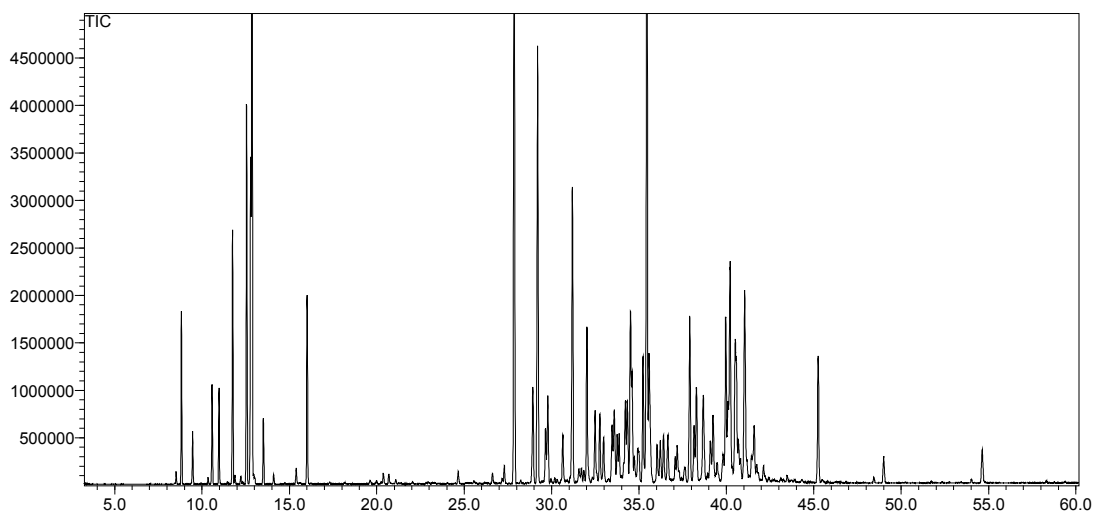
Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais de folhas e madeira de *A. parviflora* são apresentados nas **Figura 14** e **Figura 15** respectivamente.

---

<sup>67</sup> FFNSC - Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds



**Figura 14.** Cromatograma de íons totais de CG-EM para OE de **folhas de *Aniba parviflora***, coluna SLB-5MS, condições: 5 °C (1 min), 50-250°C (3°C.min<sup>-1</sup>), 250-270°C (10°C min), 270°C (5 min), fluxo constante de He a 1ml.min<sup>-1</sup>.



**Figura 15.** Cromatograma de íons totais de CG-EM para OE de **madeira de *Aniba parviflora***, coluna SLB-5MS, condições: 5 °C (1 min), 50-250°C (3°C.min<sup>-1</sup>), 250-270°C (10°C min), 270°C (5 min), fluxo constante de He a 1ml.min<sup>-1</sup>.

A **Tabela 7** apresenta a composição química das amostras **OE235** (óleo de folhas) e **OE241** (óleo da madeira) de macacaporanga, obtida através da análise em CG-EM.

**Tabela 7:** Composição química do OE folhas (OE235) e da madeira (OE241) de *Aniba parviflora* obtida através da análise em CG-EM.

Pico	tR (min)	Compostos	OE235	OE241	LRI Exp.	LRI Lit.
			folhas	mdeira		
			% Área relativa	% Área relativa		
1	8.517	Thujene<alpha->	0,08	0,09	925	927
2	8.821	Pinene<alpha->	3,67	1,32	933	933
3	9.463	Camphene	0,31	0,41	950	953
4	10.346	Sabinene	0,07	0,05	972	972
5	10.575	Pinene<beta->	2,34	0,84	978	978
6	10.975	Myrcene	2,15	0,76	988	991
7	11.458	delta-2-Carene	0,05	0,02	1001	1002
8	11.750	Phellandrene<alpha->	12,51	2,15	1007	1007
9	11.875	Carene<delta-3->	0,07	0,08	1010	1009
10	12.221	Terpinene<alpha->	0,05	0,06	1017	1018
11	12.325	Cymene<ortho->	-	0,01	1020	1022
12	12.550	Cymene <para->	6,28	3,36	1024	1025
13	12.783	Limonene	0,45	2,78	1030	1030
14	12.858	beta-Phellandrene	2,98	6,43	1031	1030
15	13.021	beta-OCIMENEcis	0,26	0,06	1035	1026
16	13.508	Ocimene<(E)-,beta->	0,32	0,57	1045	1046
17	14.100	Terpinene<gamma->	0,07	0,08	1058	1058
18	15.388	Terpinolene	0,14	0,14	1086	1086
19	16.008	Linalool	24,68	1,73	1100	1101
20	17.304	Menth-2-en-1-ol<cis-,para->	-	0,02	1127	1124
21	19.617	Borneol	0,16	0,14	1175	1173
22	19.988	Terpinen-4-ol	0,10	0,09	1183	1180
23	20.250	Cymen-8-ol<para->	0,06	0,06	1188	1189
24	20.367	Cryptone	-	0,11	1190	1187
25	20.688	Terpineol<alpha->	0,66	0,09	1197	1195
26	21.079	NI (134/152)	0,21	-	1205	-
27	22.842	Sabinol trans	0,07	0,06	1242	1140
28	24.658	Phellandral	-	0,13	1280	1277
29	25.558	Carvacrol	-	0,02	1299	1300
30	26.617	NI (126/111)	0,31	0,10	1322	-
31	27.175	Bicycloelemene	0,19	0,02	1335	1338
32	27.292	Elemene<delta->	0,18	0,17	1337	1335
33	27.863	Cubebene<alpha->	0,13	7,70	1350	1349
34	28.929	Cyclosativene	0,08	1,21	1373	1371
35	29.200	Copaene<alpha->	0,30	4,92	1379	1375
37	29.788	cis-beta-Elemene	0,56	1,05	1392	1391
38	30.175	Methyleugenol	-	0,05	1400	1404
39	30.308	Funebreene<alpha->	-	0,05	1403	1403
40	30.646	Gurjunene<alpha->	-	0,52	1411	1409
41	30.821	Maaliene<beta->	-	0,08	1415	1415
42	31.196	Caryophyllene<(E)->	12,25	3,44	1424	1424
43	31.567	Elemene<gamma->	-	0,21	1432	1437
44	31.629	NI	0,07	-	1434	-
45	31.717	Bergamotene<alpha-,trans->	-	0,16	1436	1432
46	31.854	Guaiene<alpha->	0,07	0,14	1439	1438
47	32.025	NI (204)	0,32	1,90	1443	-

**Tabela 7:** (continuação) Composição química do OE folhas (**OE235**) e da madeira (**OE241**) de *Aniba parviflora* obtida através da análise em CG-EM.

Pico	tR (min)	Compostos	OE235	OE241	LRI Exp.	LRI Lit.
			folhas	mdeira		
			% Área relativa	% Área relativa		
48	32.339	NI (204)	-	0,07	1450	-
49	32.492	Farnesene<(E)-,beta->	-	0,93	1453	1452
50	32.582	Valerena-4,7(11)-diene	0,18	0,17	1456	1455
51	32.593	Humulene<alpha->	0,07	0,82	1456	1454
52	32.979	Caryophyllene<9-epi-(E)->	0,08	0,58	1465	1464
53	33.275	Acoradiene<beta->	-	0,05	1471	1471
54	33.462	Cadina-1(6),4-diene	-	0,71	1476	1472
55	33.587	Muuroolene<gamma->	-	1,10	1479	1478
56	33.758	Curcumene<alpha->	-	0,55	1483	1480
57	33.867	Germacrene D	1,33	0,56	1485	1480
58	34.225	Selinene<beta->	0,28	1,24	1493	1492
59	34.337	gamma-Amorphene	0,29	1,03	1496	1492
60	34.517	Bicyclogermacrene	6,12	2,30	1500	1497
61	34.601	Muuroolene<alpha->	-	1,17	1502	1497
62	34.738	Farnesene<(E,E)-,alpha->	0,14	0,36	1505	1504
63	34.942	Bisabolene<beta->	-	0,41	1510	1508
64	35.233	Cadinene<gamma->	0,15	1,57	1517	1513
65	35.450	Cadinene <delta->	0,13	8,21	1523	1518
66	35.579	Calamenene<cis->	-	2,07	1526	1528
67	36.038	NI	-	0,49	1537	1536
68	36.221	Cadinene<alpha->	-	0,54	1541	1538
69	36.404	Calacorene<alpha->	-	0,61	1546	1544
70	36.658	Elemol<alpha->	0,11	0,62	1552	1546
71	37.075	(E)-Nerolidol	0,86	0,27	1562	1563
72	37.183	Germacrene B	0,24	0,47	1564	1557
73	37.913	Spathulenol	2,95	2,08	1582	1576
74	38.158	Caryophylleneoxide	2,14	0,77	1588	1587
75	38.282	Viridiflorol / NI	0,21	1,30	1591	1594
76	38.683	Guaiol	0,46	1,55	1601	1603
77	38.931	NI (222)	-	0,12	1607	1609
78	39.242	Humulene epoxide II / Copaborneol	0,11	1,01	1615	1613
79	39.851	NI (222)	0,31	0,49	1631	-
80	39.971	Epicubenol	-	2,17	1634	1631
81	40.079	Valerianol	2,05	-	1657	1633
82	40.217	Jinkoh eremol	6,18	3,15	1640	1647
83	40.450	NI (204/222) / Muurolol<alpha->	0,09	-	1646	1651
84	41.040	beta-Eudesmol	1,51	3,21	1661	1656
85	41.200	Eudesmol <7-epi-alpha-> / NI	0,06	2,17	1665	1665
86	41.213	Bulnesol / NI	-	0,42	1665	1674
87	41.620	NI	0,09	3,15	1676	-
88	42.420	NI	-	0,06	1696	-
89	43.480	Junipercamphor	-	0,77	1724	1696
90	45.249	Benzylbenzoate	0,10	1,63	1772	1772
91	49.000	Benzylsalicylate	0,14	0,35	1876	1872
92	54.636	NI	0,10	0,50	2043	-

Como citado anteriormente, a identificação dos picos foi feita utilizando uma inovadora biblioteca especialmente construída e dedicada a aromas e fragrâncias, compostos naturais e sintéticos, desenvolvida pelo Laboratório do Prof. Luigi Mondello (FFNSC ver. 1.3, Shimadzu).

Foram identificados na amostra de **óleo de folhas (OE 235)** 57 dos 63 componentes detectados correspondendo a aproximadamente 98 % da área total do cromatograma. A maior fração do óleo corresponde aos hidrocarbonetos monoterpênicos (~32%) e aos monoterpênicos oxigenados (~27%) incluindo os álcoois, cetonas e aldeídos. Já os hidrocarbonetos sesquiterpênicos correspondem a 22% e os sesquiterpênicos oxigenados, ésteres e álcoois a 18%.

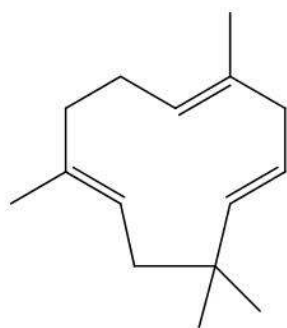
A maior contribuição dos monoterpênicos não oxigenados é dada pelos compostos  $\alpha$ -felandreno (**15**) (10%) e p-cimeno (**11**) (6%) enquanto o composto predominante entre os oxigenados é o linalol (**1**, 25%) e entre os sesquiterpênicos o E- cariofileno (**16**) (12%) componente de grande potencial antiinflamatório.

Já na amostra de **óleo de madeira (OE241)** foram identificados 80 dos 88 componentes detectados, correspondendo a aproximadamente 88 % da área total do cromatograma. Neste caso, a maior fração do óleo corresponde aos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (~47%) e os sesquiterpênicos oxigenados 28%, incluindo álcoois, óxidos e ésteres. Já a fração monoterpênicica corresponde a apenas 20% e os monoterpênicos oxigenados incluindo os álcoois, cetonas aldeídos correspondem a apenas 2% dos compostos identificados.

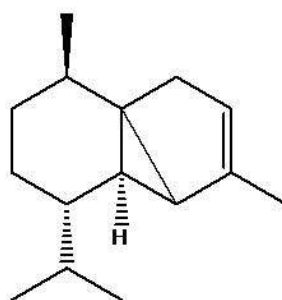
A maior contribuição dos sesquiterpênicos é dada pelos compostos  $\alpha$ -cubebeno (**17**) (7%) e  $\delta$ -cadineno (**18**) (8%) enquanto os compostos predominantes entre os sesquiterpênicos oxigenados foram o espatulenol (**19**) e o epicubenol (**20**) com aproximadamente 2% cada. Entre os monoterpênicos o  $\beta$ -felandreno (**21**) com 6% foi o mais abundante.



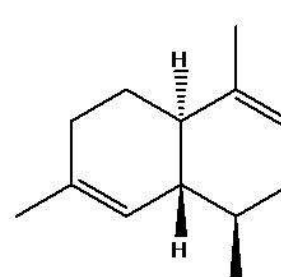
(15)



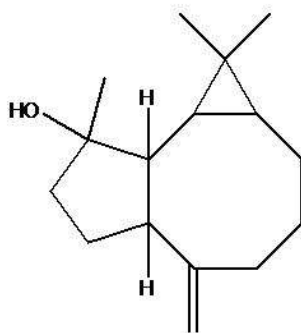
(16)



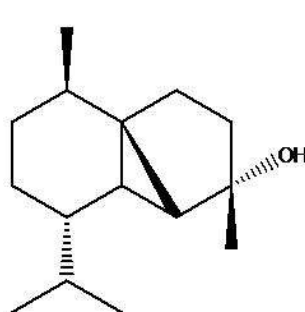
(17)



(18)



(19)

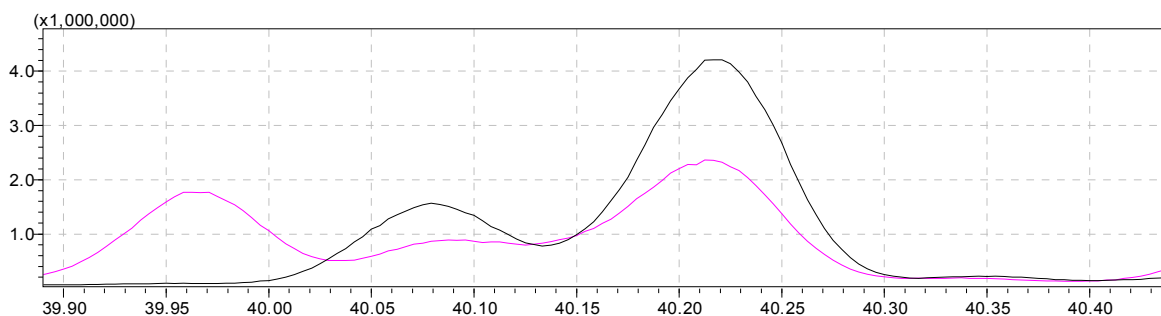


(20)

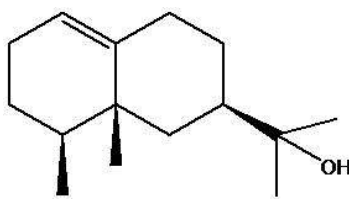


(21)

Durante o estudo da composição dos óleos essenciais, notou-se um pico em 40,21 min (**Figura 16**), com área relativa em torno de 6% na amostra **OE235** e 1% na amostra **OE241** cuja identificação não foi possível mesmo utilizando-se outras bases de dados disponíveis (NIST, Wiley, Hochmuth Modified, entre outras). Como se tratava de um composto em concentração significativa, principalmente no **OE235**, foi feita uma busca na literatura visando a sua identificação. Mattoso<sup>5</sup> em sua dissertação de mestrado analisou o óleo de *Aniba parviflora* e relatou o isolamento e a caracterização de uma substância com área relativa, espectro de massas e índice de retenção (LRI = 1626) compatíveis com as do pico em questão, e que a partir dessa referência foi identificado como jinkoh-eremol (**22**).



**Figura 16:** Expansão dos cromatogramas de íons totais (TIC) sobrepostos para amostra **OE235** e **OE241** na região do pico em 40.212 min.



(22)

## 8.2.2 Análise de óleo essencial em CG-FID (Análise quantitativa aproximada através do FR)

O controle de qualidade de óleos essenciais prioritariamente foca-se na sua composição química, para isso a análise utilizando CG-EM tem sido largamente empregada, pois essa técnica permite além da separação, a identificação das substâncias de maneira acurada, pratica e eficiente. Em muitos casos o controle da qualidade baseia-se na avaliação das áreas relativas dos componentes previamente identificados nos óleos de interesse.

O valor da área dado em porcentagem relativa é feito normalizando-se a somatória das áreas absolutas, porém esse valor não pode ser considerado proporcional à concentração, pois se deve levar em consideração o fator resposta do detector.

Atualmente, devido ao aumento do controle dos compostos alergênicos em cosméticos, é cada vez maior a necessidade de se fazer o controle de qualidade de maneira mais rápida, eficiente, acurada e principalmente confiável.



Quando um estudo mais detalhado de composição é necessário, exigindo a quantificação das substâncias presentes no óleo, existem duas estratégias de análise: Uma consiste em construir curvas analíticas para cada substância de interesse a fim de se fazer a quantificação, chamada por alguns autores de *true quantitation*<sup>68</sup> ou quantificação verdadeira. Uma outra estratégia, muito menos complexa mas tão eficiente quanto a quantificação verdadeira, é o uso de fatores de resposta dos detectores para as diferentes classes de compostos, chamada nesse trabalho de “análise quantitativa aproximada”.

Tanto os detectores do tipo DIC como os do tipo EM sofrem influência da estrutura do analito no sinal gerado. No caso dos detectores do tipo EM, a abundância dos íons gerados depende das características de cada analito, e a quantidade de íons produzidos nem sempre é linearmente proporcional a sua quantidade.

Nos detectores do tipo DIC o sinal gerado é proporcional ao número de carbonos. Os hidrocarbonetos respondem extremamente bem a esses detectores. Isto ocorre, porque os átomos de carbono produzem radicais CH que produzem por sua vez íons CHO<sup>+</sup> na chama oxidante. A presença de heteroátomos ligados ao C como, por exemplo, nos grupos C=O e COOH, diminui a resposta do detector, pois esses grupos não geram íons do tipo CHO<sup>+</sup><sup>69</sup>.

A **Tabela 8** apresenta a análise quantitativa aproximada usando o FR comparado à % relativa de áreas dos **OE235** e **OE241**, ou seja, macacaporanga folhas e madeira respectivamente, obtida através da análise em CG-DIC.

---

<sup>68</sup> Bicchi, C.; Liberto, E.; Matteodo, M.; Sgorbini B.; Mondello, L.; Zellner, B.; Costa, R.; Rubiolo, P., *Review: Quantitative analysis of essential oils: a complex task, Flavour and Fragrance Journal*, 23, 6, 382 – 391, **2008**.

<sup>69</sup> McNair, H.M.; Miller, J.M.; *Basic Gas Chromatography*, Wiley Interscience, New. York, **1998**.

**Tabela 8:** Análise quantitativa para OEs de folhas (OE235) e da madeira (OE241) de *Aniba parviflora* obtida através da análise em CG-DIC.

Pico	tR (min)	Compostos	OE235 folhas		OE241 madeira	
			% Área relativa	% (g/100 g)	% Área relativa	% (g/100 g)
1	8.517	Thujene<alpha->	0,07	0,07	0,09	0,08
2	8.821	Pinene<alpha->	3,95	3,61	1,44	1,25
3	9.463	Camphene	0,32	0,29	0,45	0,39
4	10.346	Sabinene	0,07	0,06	0,05	0,05
5	10.575	Pinene<beta->	2,54	2,32	0,92	0,80
6	10.975	Myrcene	2,35	2,15	0,87	0,75
7	11.458	delta-2-Carene	0,05	0,05	0,02	0,02
8	11.750	Phellandrene<alpha-> (15)	11,47	10,49	2,03	1,76
9	11.875	Carene<delta-3->	0,07	0,06	0,07	0,06
10	12.221	Terpinene<alpha->	0,05	0,05	0,05	0,05
11	12.325	Cymene<ortho->	-	-	0,02	0,01
12	12.550	Cymene <para-> (11)	6,87	6,28	3,56	3,09
13	12.783	Limonene	0,53	0,48	3,67	3,17
14	12.858	beta-Phellandrene	3,10	2,83	6,65	5,76
15	13.021	beta-OCIMENECis	0,25	0,23	0,05	0,04
16	13.508	Ocimene<(E)-,beta->	0,29	0,27	0,58	0,50
17	14.100	Terpinene<gamma->	0,07	0,06	0,07	0,06
18	15.388	Terpinolene	0,05	0,05	0,15	0,13
19	16.008	Linalool (1)	25,70	29,64	1,82	1,99
20	17.304	Menth-2-en-1-ol<cis-,para->	-	-	0,02	0,02
21	19.617	Borneol	0,11	0,13	0,17	0,18
22	19.988	Terpinen-4-ol	0,11	0,13	0,10	0,11
23	20.250	Cymen-8-ol<para->	0,05	0,06	0,06	0,07
24	20.367	Cryptone	-	-	0,02	0,02
25	20.688	Terpineol<alpha->	0,58	0,67	0,03	0,03
26	21.079	NI (134/152)	0,19	0,22	-	-
27	22.842	Sabinol trans	0,28	0,33	0,28	0,31
28	24.658	Phellandral	-	-	0,16	0,17
29	25.558	Carvacrol	-	-	0,03	0,04
30	26.617	NI (126/111)	0,33	0,38	0,14	0,16
31	27.175	Bicycloelemene	0,13	0,11	0,04	0,04
32	27.292	Elemene<delta->	0,24	0,21	0,19	0,16
33	27.863	Cubebene<alpha-> (17)	0,11	0,10	7,56	6,23
34	28.929	Cyclosativene	0,11	0,09	1,15	0,95
35	29.200	Copaene<alpha->	0,24	0,21	4,82	3,97
36	29.658	Sesquithujene<7-epi->	-	-	0,77	0,64
37	29.788	cis-beta-Elemene	0,52	0,45	0,88	0,72
38	30.175	Methyleugenol	-	-	0,06	0,05
39	30.308	Funebreene<alpha->	-	-	0,05	0,04
40	30.646	Gurjunene<alpha->	-	-	0,57	0,47
41	30.821	Maaliene<beta->	-	-	0,07	0,06
42	31.196	Caryophyllene<(E)-> (16)	12,56	10,92	3,82	3,15
43	31.567	Elemene<gamma->	-	-	0,06	0,05
44	31.629	NI	0,06	0,05	-	-
45	31.717	Bergamotene<alpha-,trans->	-	-	0,21	0,17
46	31.854	Guaiene<alpha->	0,08	0,07	0,19	0,15
47	32.025	NI (204)	0,24	0,21	0,56	0,46

**Tabela 8:** (Continuação) Análise quantitativa para OEs de folhas (**OE235**) e da madeira (**OE241**) de *Aniba parviflora* obtida através da análise em CG-DIC

Pico	tR (min)	Compostos	OE235 folhas		OE241 madeira	
			% Área relativa	g/100 g	% Área relativa	g/100 g
48	32.339	NI (204)	-	-	1,33	1,09
49	32.492	Farnesene<(E)-,beta->	-	-	0,83	0,69
50	32.582	Valerena-4,7(11)-diene	0,13	0,11	0,14	0,12
51	32.593	Humulene<alpha->	0,09	0,08	0,78	0,64
52	32.979	Caryophyllene<9-epi-(E)->	1,06	0,92	0,67	0,55
53	33.275	Acoradiene<beta->	-	-	0,05	0,04
54	33.462	Cadina-1(6),4-diene	-	-	0,77	0,63
55	33.587	Murolene<gamma->	-	-	0,75	0,62
56	33.758	Curcumene<alpha->	-	-	0,30	0,25
57	33.867	Germacrene D	0,09	0,07	1,11	0,92
58	34.225	Selinene<beta->	0,09	8%	1,26	1,03
59	34.337	gamma-Amorphene	0,10	0,09	0,98	0,81
60	34.517	Bicyclogermacrene	5,98	5,20	2,32	1,91
61	34.601	Murolene<alpha->	-	-	1,20	0,99
62	34.738	Farnesene<(E,E)-,alpha->	0,18	0,16	0,22	0,18
63	34.942	Bisabolene<beta->	-	-	0,24	0,19
64	35.233	Cadinene<gamma->	-	0,05	1,56	1,28
65	35.450	Cadinene <delta-> ( <b>18</b> )	0,17	0,15	8,76	7,22
66	35.579	Calamenene<cis->	-	-	2,03	1,67
67	36.038	NI	-	-	0,42	0,35
68	36.221	Cadinene<alpha->	-	-	0,51	0,42
69	36.404	Calacorene<alpha->	-	-	0,59	0,49
70	36.658	Elemol<alpha->	0,23	0,27	0,73	0,80
71	37.075	(E)-Nerolidol	0,97	1,12	0,63	0,69
72	37.183	Germacrene B	0,15	0,13	0,47	0,39
73	37.913	Spathulenol ( <b>19</b> )	3,08	3,55	2,24	2,45
74	38.158	Caryophylleneoxide	2,02	2,74	0,92	1,18
75	38.282	Viridiflorol / NI	0,44	0,51	1,34	1,47
76	38.683	Guaiol	0,39	0,46	1,12	1,22
77	38.931	NI (222)	-	-	0,59	0,65
78	39.242	Humulene epoxide II / Copaborneol	0,08	0,09	1,08	1,17
79	39.851	NI (222)	0,38	0,44	0,31	0,34
80	39.971	Epicubenol ( <b>20</b> )	-	-	2,20	2,41
81	40.079	Valerianol	2,09	2,41	-	-
82	40.217	Jinkoh eremol	6,23	7,19	1,01	1,10
83	40.450	NI (204/222) / Muurolol<alpha->	0,11	0,13	-	-
84	41.040	beta-Eudesmol	1,49	1,72	3,73	4,08
85	41.200	Eudesmol <7-epi-alpha-> / NI	0,09	0,10	3,08	3,37
86	41.213	Bulnesol / NI	-	-	0,61	0,67
87	41.620	NI	0,10	0,12	3,30	3,61
88	42.420	NI	-	-	0,61	0,66
89	43.480	Junipercamphor	-	-	1,14	1,24
90	45.249	Benzylbenzoate	0,17	0,25	2,38	3,18
91	49.000	Benzylsalicylate	0,17	0,25	1,08	1,45
92	54.636	NI	0,10	0,14	0,04	0,06

Nas análises dos óleos de macacaporanga acima citados pode-se notar que, nos casos dos monoterpenos e sesquiterpenos, os valores de áreas em porcentagem relativa para o DIC em comparação com o calculado a partir do FR (dada em g/100g) apresentou uma variação muito pequena, isto porque a resposta do DIC em relação aos hidrocarbonetos é diretamente proporcional ao número de carbonos, o fator, portanto, para essa classe de compostos ficou em torno de 1, como esperado ( $FR_{\text{mono}} = 1,03 \pm 0,01$  e  $FR_{\text{sesqui}} = 0,98 \pm 0,03$ ), já quando o composto possui um heteroatomo a resposta do DIC é menor, aumentando seu FR. Observou-se uma redução dos hidrocarbonetos totais em contraposição a um aumento na fração oxigenada, a tabelas abaixo (**Tabela 9** e **Tabela 10**) ilustram essas diferenças.

**Tabela 9:** Comparação dos valores de % área relativa e % em g/100g para o OE das folhas de macacaporanga (**OE235**) obtida através da análise cromatográfica.

Amostra OE 235	% Área relativa	g/100 g	% Área relativa
	FID	FR	MS
Terpenos	32,09	29,33	31,80
Terpenos oxigenados *	27,02	31,17	25,93
Sesquiterpenos	24,35	22,21	25,30
Sesquiterpenos Oxigenados*	16,16	18,75	15,34

**Tabela 10:** Comparação dos valores de % área relativa e % em g/100g para o OE da madeira de macacaporanga (**OE241**) obtida através da análise cromatográfica.

Amostra OE 241	% Área relativa	g/100 g	% Área relativa
	FID	FR	MS
Terpenos	20,74	17,96	19,22
Terpenos oxigenados *	2,67	2,92	2,42
Sesquiterpenos	49,20	40,97	49,00
Sesquiterpenos Oxigenados*	26,38	29,72	24,18

Na amostra **OE235** a principal discrepância apresenta-se para o linalol (**1**), justamente por ser o composto majoritário, os valores foram 25% (área relativa) e 29% (g/100g). Na amostra **OE241**, não houve grandes discrepâncias, pois não existe um componente majoritário, porém o comportamento descrito acima mostra que pode

ocorrer grandes erros de interpretação de composição se não se observam os fatores de resposta.

Essa diferença pode chegar a 60% como, por exemplo, no caso dos ésteres onde o FR = 1,59. Por essa razão fica claro que utilizar as % relativas referindo-se a concentração pode levar a um resultado equivocado e que pode prejudicar a análise e o controle de qualidade.

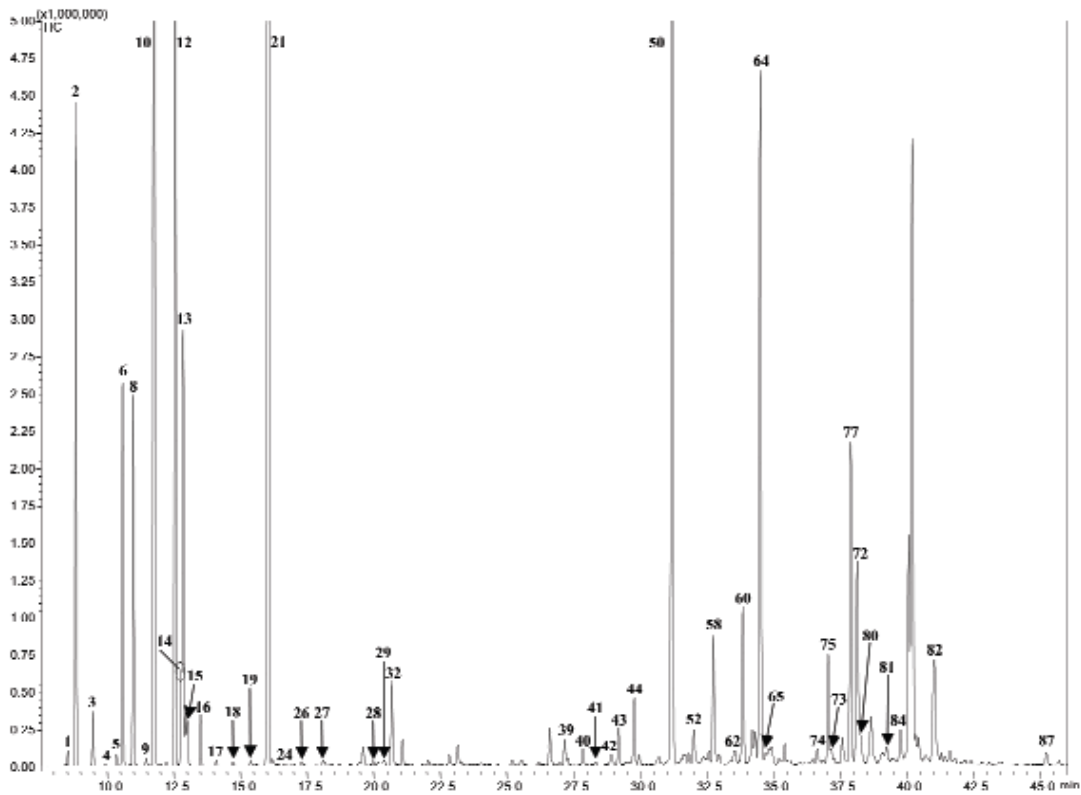
A tabela abaixo ilustra as diferenças e a dimensão que pode atingir um erro quando não se leva em consideração o FR do detector.

**Tabela 11:** Diferenças entre os valores de % área relativa e % em g/100g para **OE235** (OE folhas de macacaporanga).

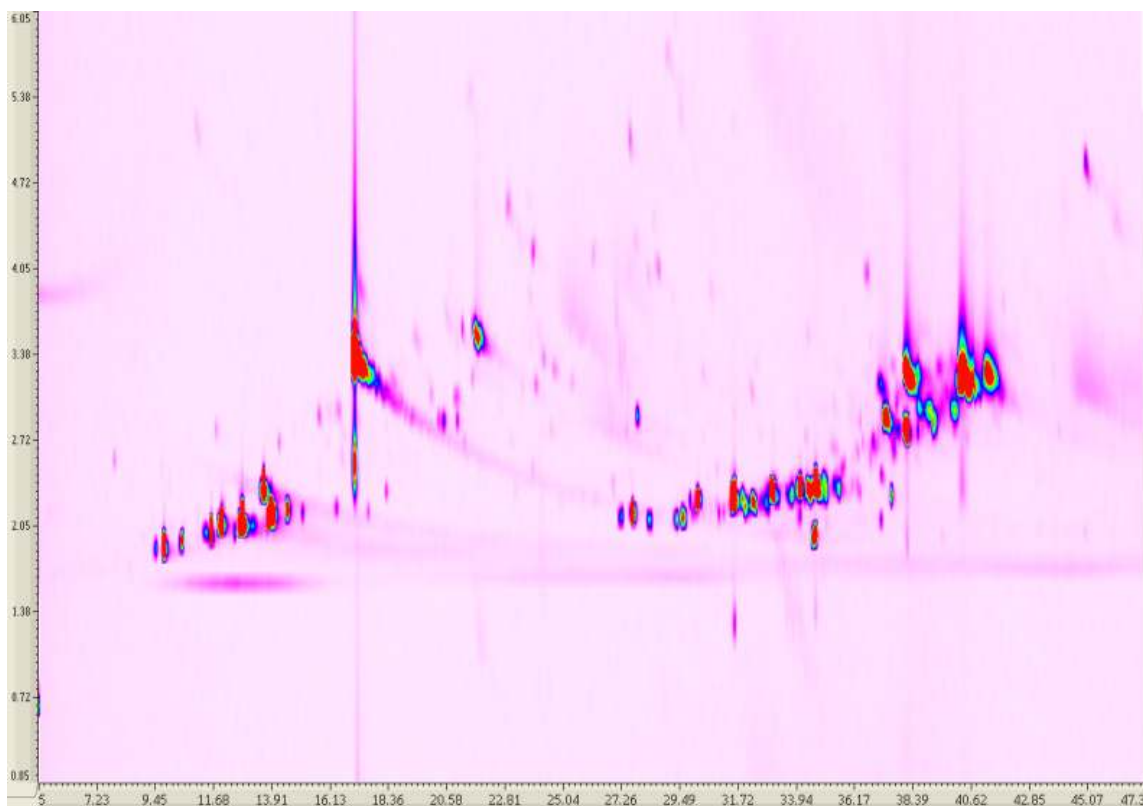
Amostra OE 235	% Área relativa g/100 g		diferença (%)
	FID	FR	
a-felandreno	11,47	10,49	-9,34
p-cimeno	6,87	6,28	-9,39
linalol	25,70	29,64	13,29
óxido cariofileno	2,02	2,74	26,28
jinkoh eremol	6,23	7,19	13,35

### 8.2.3 Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (CG×CG):

Um cromatograma monodimensional e o obtido em sistema CGxCG para o OE de *Aniba parviflora* estão apresentados nas Figuras 17 e 18, respectivamente.



**Figura 17.** Cromatograma de íons totais de CG-EM para OE235 de folhas de *Aniba parviflora*. Condições: coluna HP-5MS, 50°C (1 min), 50-250°C (3 °C.min<sup>-1</sup>), 250-270°C (10°C min), 270°C (5 min), fluxo constante de He a 1ml.min<sup>-1</sup>.



**Figura 18:** Diagrama de contorno obtido por CGxCG–EM para OE de folhas de *Aniba parviflora*.

A **Tabela 12** mostra a composição química do OE de folhas de macacaporanga (amostra **OE235**), através da análise por CGxCG-EM em comparação com a por CG-EM.

**Tabela 12:** Comparação da composição química do OE das folhas de *Aniba parviflora* (OE235) através de CG-EM e CGxCG-EM .

Compostos	pico		Compostos	pico	
	GCxGC-MS	GC-MS		GCxGC-MS	GC-MS
alfa-Tujeno	1	1	β-elemeno	44	29
alfa-Pineno	2	2	β-bourboneno	45	-
Canfeno	3	3	Longipineno	46	-
Benzaldehyde	4	-	alfa-Gurjuneno/Valerena-4,7(11)-dieno	47	30
Sabineno	5	5	beta-Maalieno\<9-epi-(E)->Cariofileno	48	31
beta-Pineno	6	-	isogermacreno D	49	-
6-metil 5-Hepten-2-ona	7	-	(E)-Cariofileno	50	32
Mirceno	8	6	β-Cariofileno	51	-
delta-2-Careno	9	7	Aromadendreno/alfa-Guaieno	52	33
alfa-Felandreno	10	8	NI (204) / beta-funebreno	53	34
delta-3-Careno	11	9	Benzoato de Isopentila	54	35
p-Cimeno	12	10	β-sesquifencheno	55	-
alfa-Terpineno	12A	11	cubeb-11-eno	56	-
beta-Felandreno	13	12	(Z)-β-farneseno	57	-
Limoneno	14	13	alfa-Humuleno	58	36
beta-cis-Ocimeno	15	14	4,5 di epiaristolochene	59	-
beta-E-Ocimeno	16	15	Germacreno D	60	37
gama-Terpineno	17	16	γ-amorfenos	61	38
(Z)-Óxido de linalol	18	-	alfa-Muuroleno	62	39
Terpinoleno	19	17	Isolepidozene/beta-Selineno	63	40
(E)-Óxido de linalol	20	-	Biciclogermacreno	64	41
Linalol	21	18	(E,E)-,alpha-Farneseno	65	42
Perilleno	22	-	beta-Bisabolene	66	43
Hotrienol	23	-	ε-amorfenos	67	-
4,8-Dimetilona-1,3,7-triene (Isomer 2)	24	-	δ-amorfenos	68	-
<neo-allo->Ocimeno	25	-	Italicene ether 10-epi	69	-
<cis-,para->Ment-2-en-1-ol	26	18	Cadina 1-4 dieno	70	-
Borneol/pinocarvona	27	19	Elemicina	71	-
Terpinen-4-ol	28	20	Óxido de Cariofileno	72/78	44
Criptona	29	-	Germacreno B	73	45
para-Cimen-8-ol	30	21	alfa-Elemol	74	46
Mirtenal	31	-	(E)-Nerolidol	75	47
alfa-Terpineol	32	22	(3E,7E)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraeno	76	-
Acetato de Linalila	33	-	Spatulenol	77	48
carotanacetona / sabinol trans	34	23		72/78	49
Piperitone	35	-	Ledol/Guaiol	79	50
(E)-2-decenal	36	-	Viridiflorol / NI	80	51
Ascarido (iso)	37	-	Humuleno epoxido II / Copabomeol	81	52
Felandral	38	-	β-eudesmol	82	53
Bicicloelemeno	39A	24	Intermedeol	83	54
delta-Elemeno	39	25	Valerianol/ 10 epi gama	84	55
alfa-Cubebeno	40	26	Jinkoh eremol/agarospirol	85	56
Lideneacetona de benzila	41	-	α-eudesmol	86	-
Ciclosativeno/α-ylangeno	42	27	Benzoato de benzila	87	57
alfa-Copaeno	43	28			

A análise bidimensional possibilitou a identificação de 87 componentes contra 57 componentes identificados na análise monodimensional da amostra de óleo essencial de folhas (OE235). Em termos de detecção esse número é ainda maior, isto é, foram detectadas substâncias que antes estavam coeluídas, ou que não puderam ser detectadas devido a sua proporção no óleo. Isso é decorrente da enorme capacidade



de separação da CGxCG que aumenta a sensibilidade, resolução e seletividade em comparação com a análise monodimensional. Além disso o uso de detectores do tipo EM também aumentam a capacidade de detecção pois possuem alta velocidade de aquisição, perfeita para detecção de picos estreitos como os da CGxCG.

### 8.3 CONCLUSÕES DO CAPITULO II - ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Aniba parviflora*

Os resultados obtidos na análise quantitativa utilizando CG-DIC, confirmam a viabilidade do uso de fatores de resposta para a quantificação de compostos de diferentes classes. O uso do fator de resposta torna mais prática a quantificação, diminuindo a necessidade do preparo de padrões com diferentes concentrações e facilitando a quantificação de múltiplos componentes em uma mistura complexa como os óleos essenciais.

A determinação do perfil cromatográfico de óleos essenciais usando a inovadora técnica de cromatografia bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (CGxCG-EM) comparada aos resultados com os obtidos em CG-EM, mostraram um ganho significativo em resolução e detectabilidade, confirmando grande vantagem dessa técnica.

## 9. CONCLUSÕES FINAIS

O presente trabalho apresenta contribuições para a valorização de duas espécies de Lauraceae da Amazônia, *Aniba parviflora* (macacaporanga) e *Aniba rosaeodora* (pau-rosa), sendo esta última uma espécie de grande valor econômico para a Amazônia, porém devido à sua exploração descontrolada encontra-se em perigo de extinção. O óleo essencial do pau-rosa está, assim, atrelado às questões ambientais do Brasil, tendo sido introduzido no CITES em março de 2010, o que torna cada vez maior a necessidade da procura por novos métodos de produção sustentável.

O Capítulo I compreendeu objetivos técnicos e econômicos relacionados a diferenciação das espécies de *Aniba* e na importância destes resultados para a indústria do óleo essencial do Pau-rosa.

A metodologia desenvolvida nesse trabalho, incluindo a otimização dos parâmetros da SPME, obtenção de mais de 150 cromatogramas e tratamento desses dados por métodos quimiométricos, possibilitou a diferenciação das espécies ainda na fase de muda, o que poderá facilitar a aquisição de plantas bem identificadas, sem recorrer à identificação botânica, outrossim, inútil neste estágio imaturo, o que permite, portanto, adquirir espécimes confiáveis viabilizando os projetos de plantio atualmente em desenvolvimento e validando os plantios já implantados.

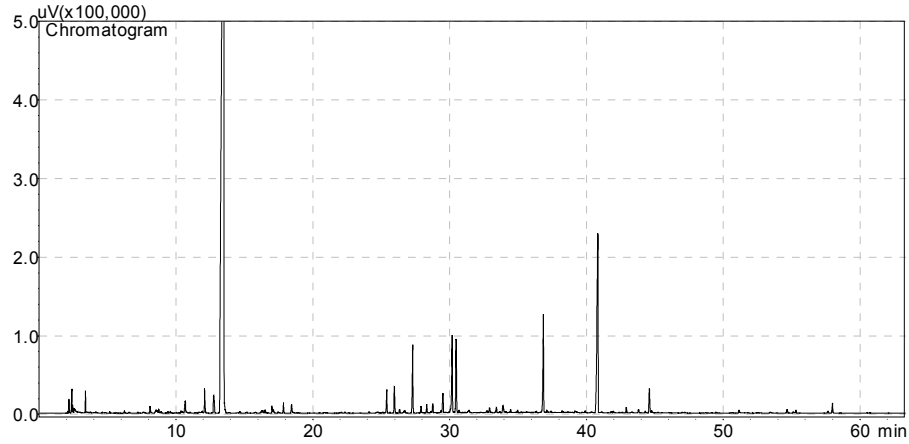
O Capítulo II resultou no estudo completo da composição dos óleos essenciais, de madeira e folhas, da *A. parviflora* (macacaporanga), utilizando técnicas cromatográficas combinadas a diferentes ferramentas, que incluem identificação por espectrometria de massas com uso de bibliotecas de espectros simultaneamente a comparação dos IR e do estudo quantitativo através do uso de fatores de resposta. Utilizou-se também a inovadora técnica de CG x CG, que mostrou aumento significativo no poder de separação e identificação da análise.

Como dito anteriormente, a pesquisa bibliográfica mostrou um número extremamente escasso de referências e, até então, nenhuma publicação em artigo científico em relação à análise do óleo da *A. parviflora*. Os estudos de composição apresentados geraram um artigo científico e 3 trabalhos em congressos especializados até o momento. Foi apresentado um perfil químico detalhado desse óleo, que possui características olfativas peculiares, com grande potencial para tornar-se um novo produto da pauta de exportação da região amazônica mostrando importância científica, tecnológica e econômica desse trabalho.

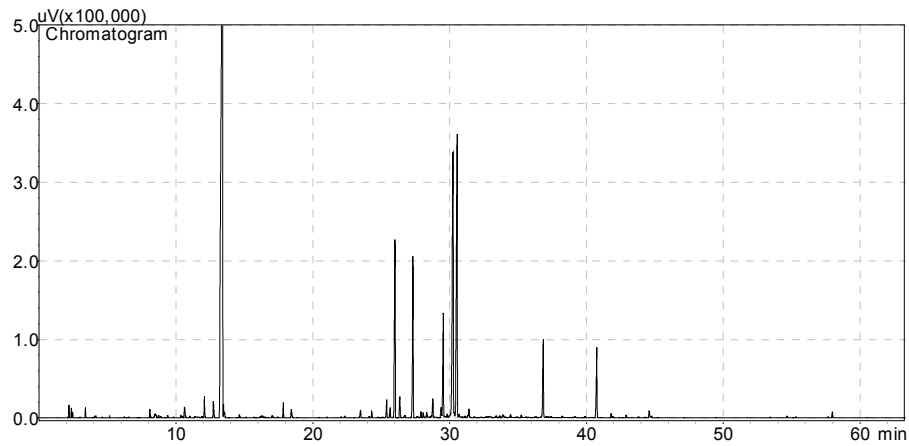
ANEXO I – Cromatogramas obtidos na HS-SPME-CG das folhas de  
*Aniba*.

## *Aniba rosaeodora* – lote 1

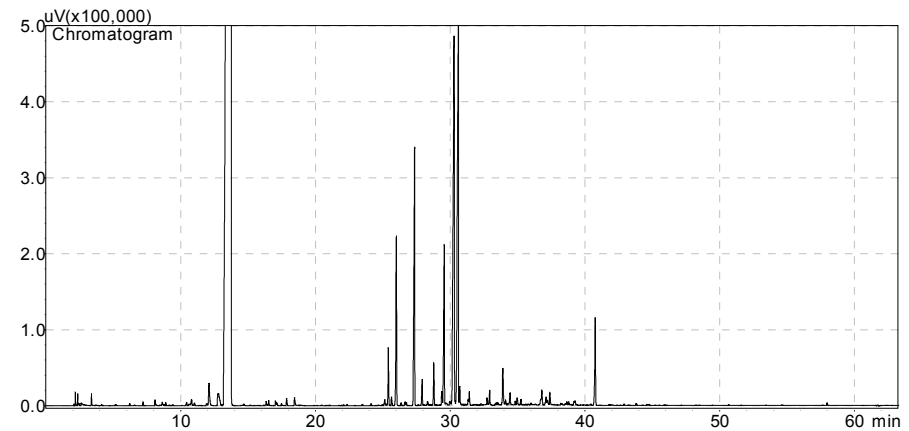
Cromatogramas HS-SPME-CG para folhas de *Aniba rosaeodora*, condições cromatográficas: col. SLB-5MS, 50°C, 50-250°C (3°C.min<sup>-1</sup>), fluxo constante de He a 1ml.min<sup>-1</sup>.



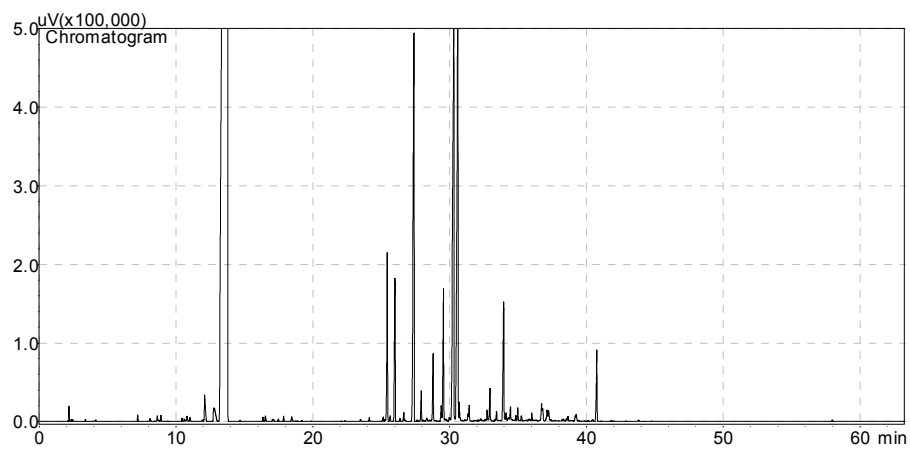
**Figura 19.** Cromatograma para amostra - AR S1



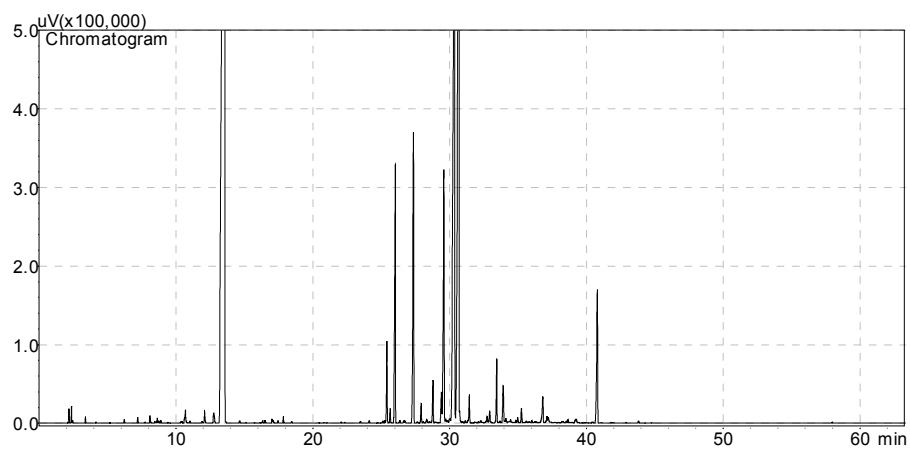
**Figura 20.** Cromatograma para amostra - AR S2



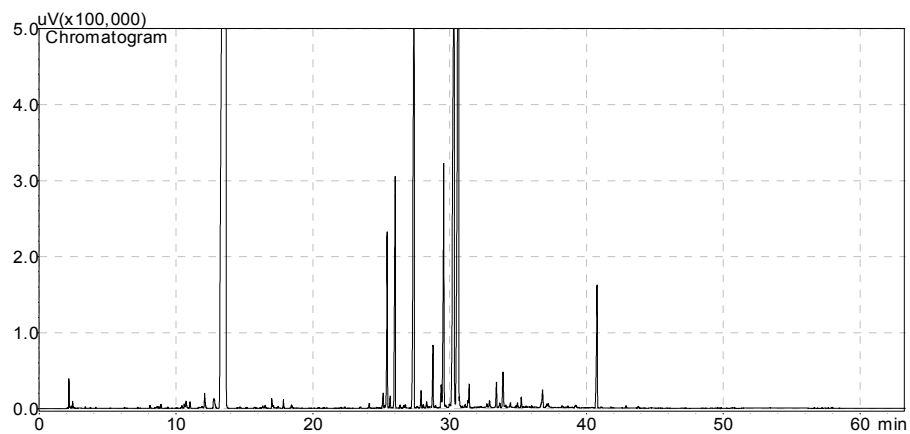
**Figura 21.** Cromatograma para amostra - AR S3



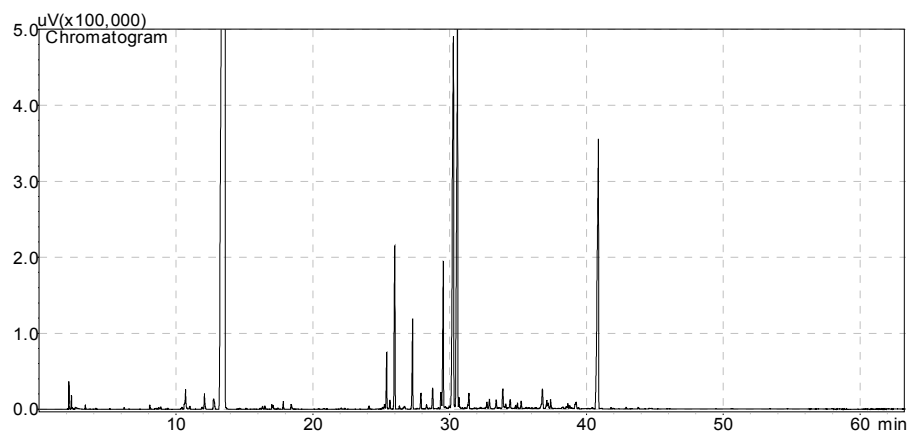
**Figura 22.** Cromatograma para amostra - AR S4



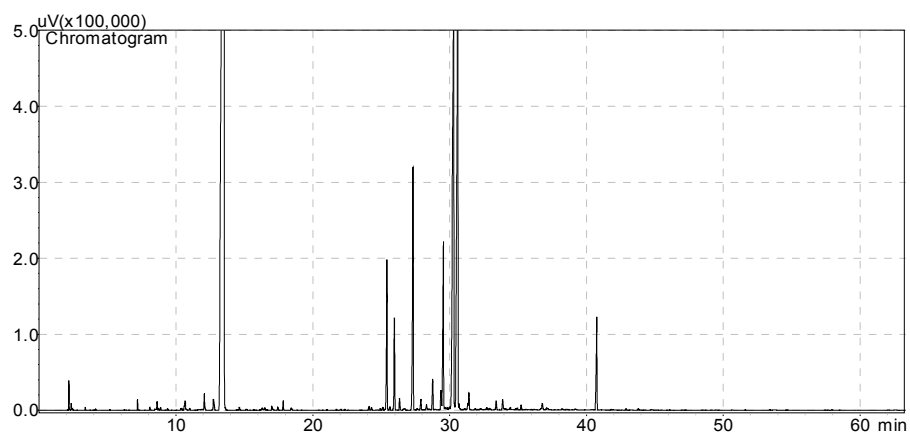
**Figura 23.** Cromatograma para amostra - AR S5



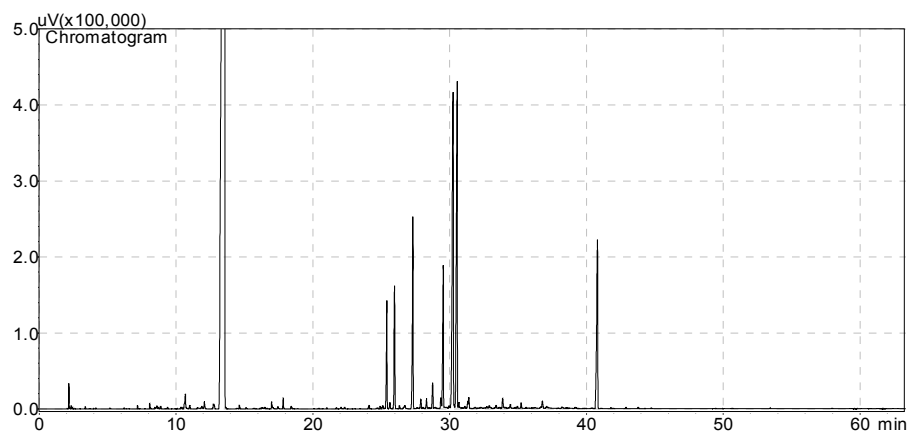
**Figura 24.** Cromatograma para amostra - AR S6



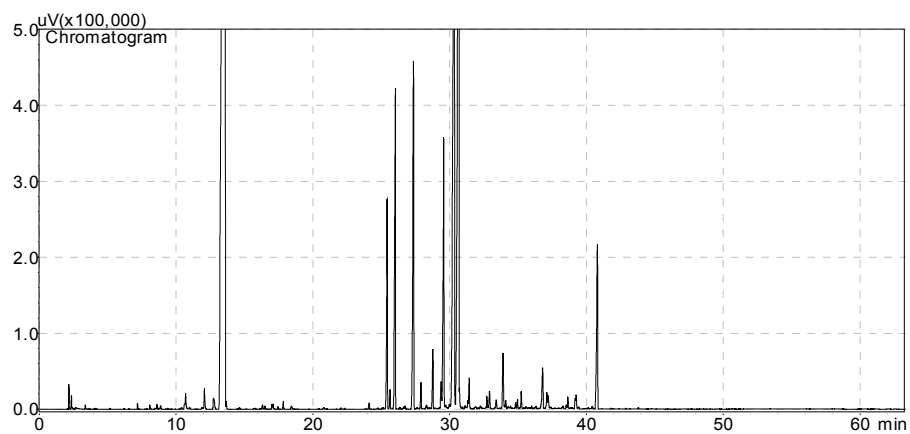
**Figura 25.** Cromatograma para amostra - AR S7



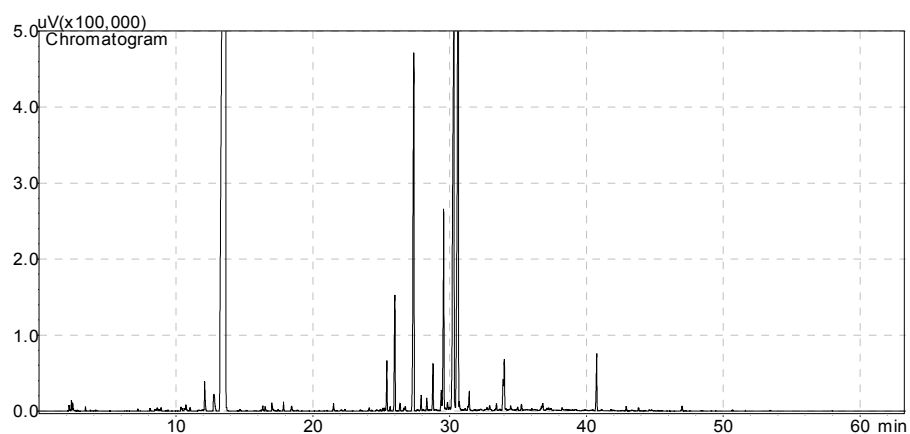
**Figura 26.** Cromatograma para amostra - AR S8



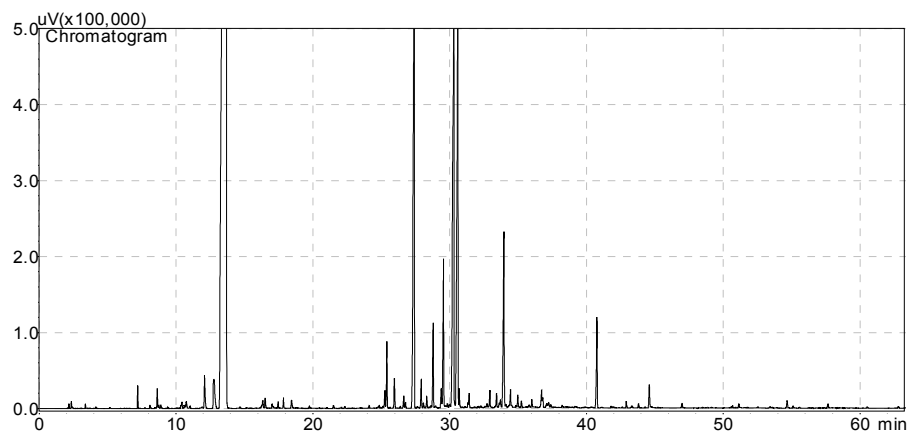
**Figura 27.** Cromatograma para amostra - AR S9



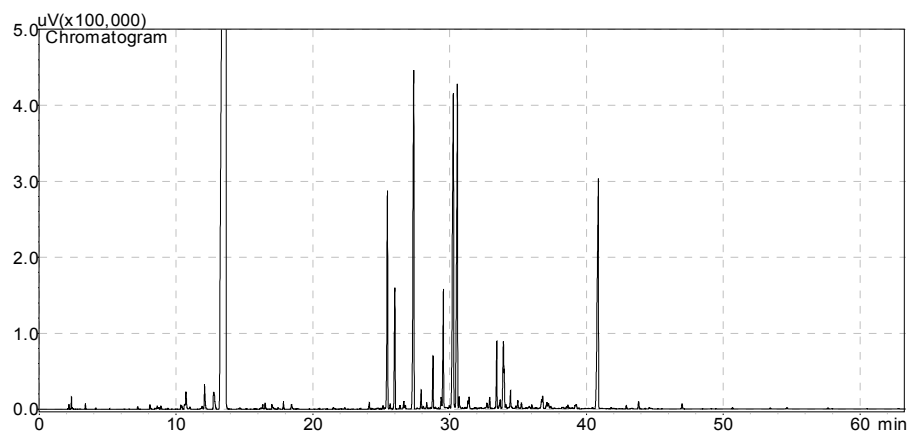
**Figura 28.** Cromatograma para amostra - AR S10



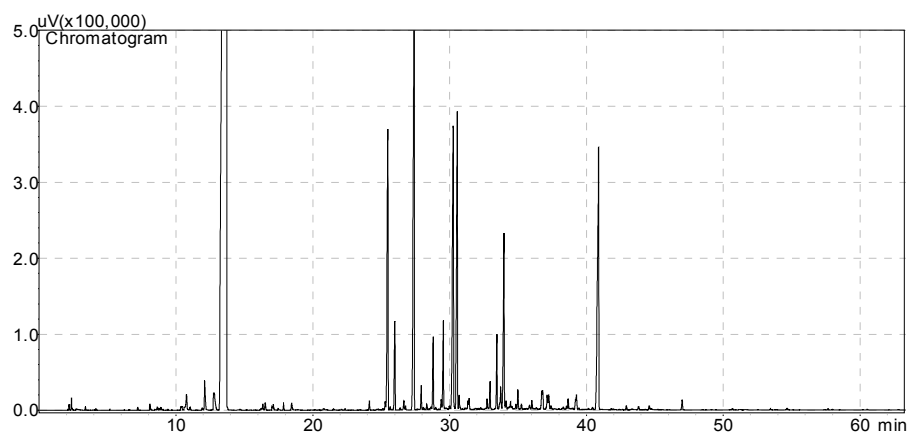
**Figura 29.** Cromatograma para amostra - AR S11



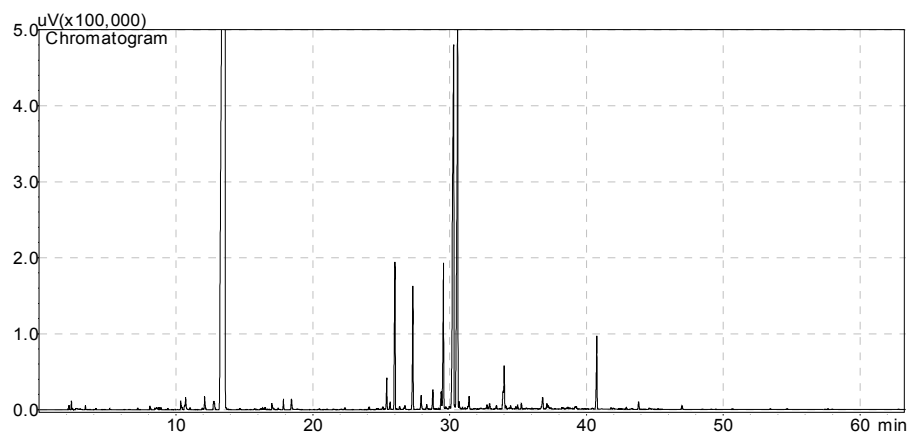
**Figura 30.** Cromatograma para amostra - AR S12



**Figura 31.** Cromatograma para amostra - AR S13

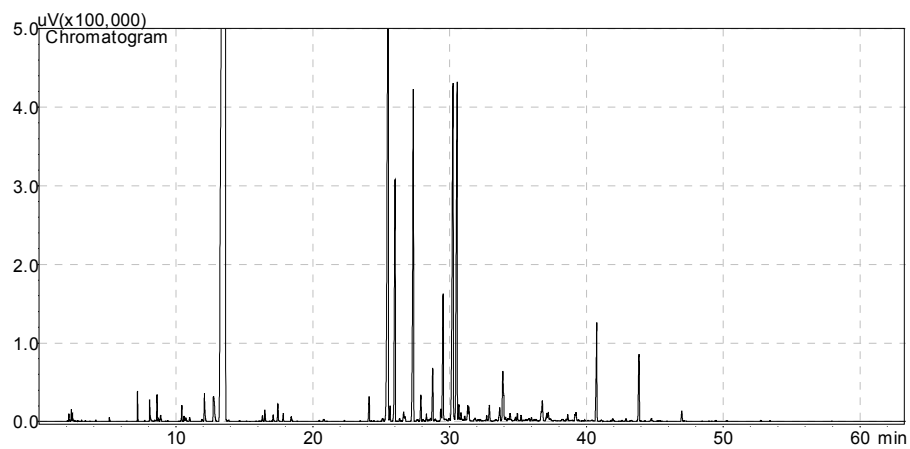


**Figura 32.** Cromatograma para amostra - AR S14

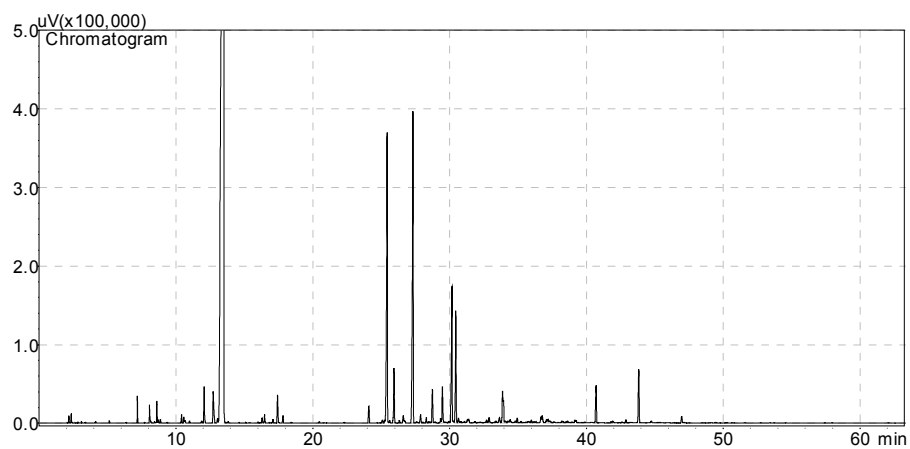


**Figura 33.** Cromatograma para amostra - AR S15

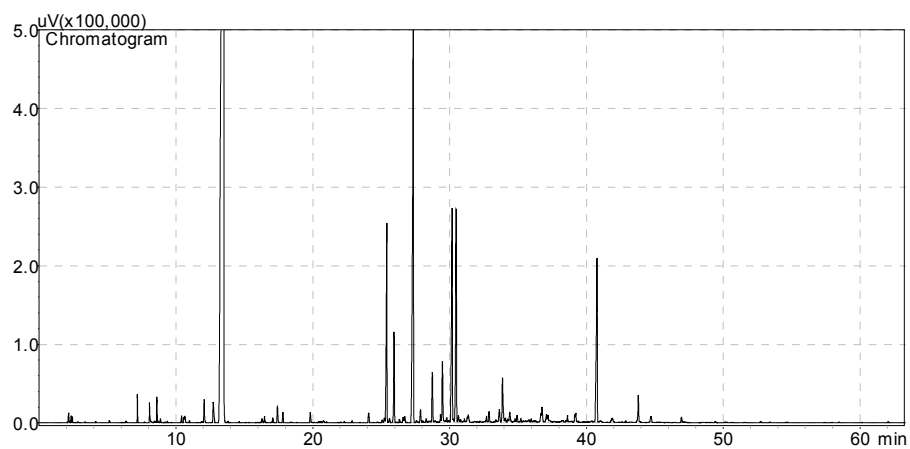




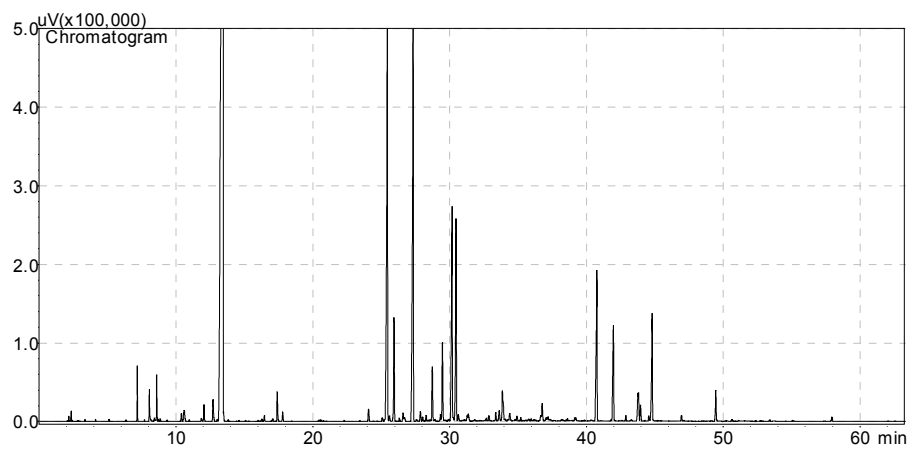
**Figura 34.** Cromatograma para amostra - AR 1



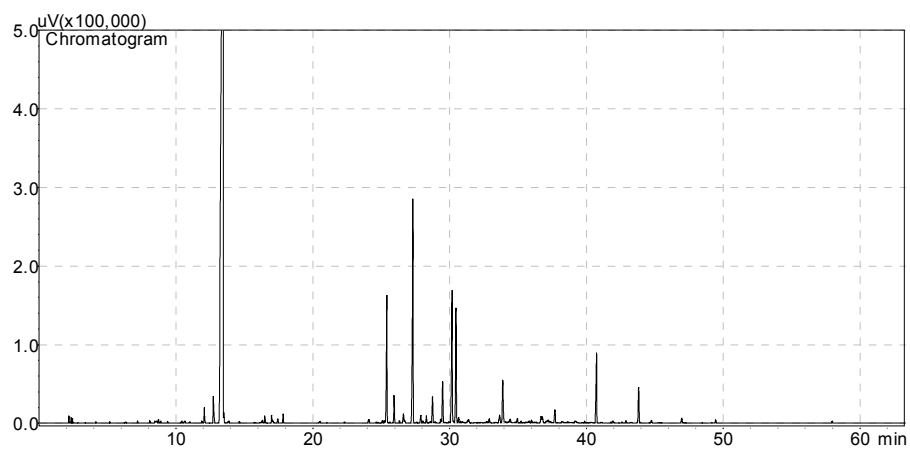
**Figura 35.** Cromatograma para amostra - AR 2



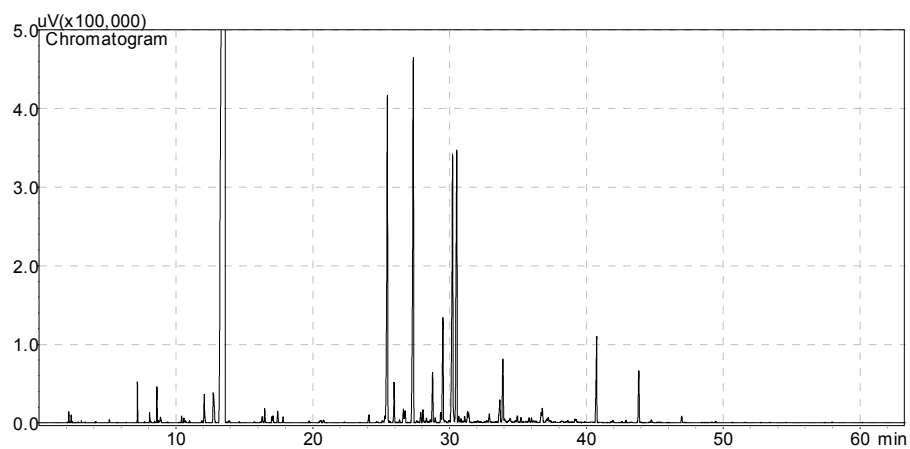
**Figura 36.** Cromatograma para amostra - AR 3



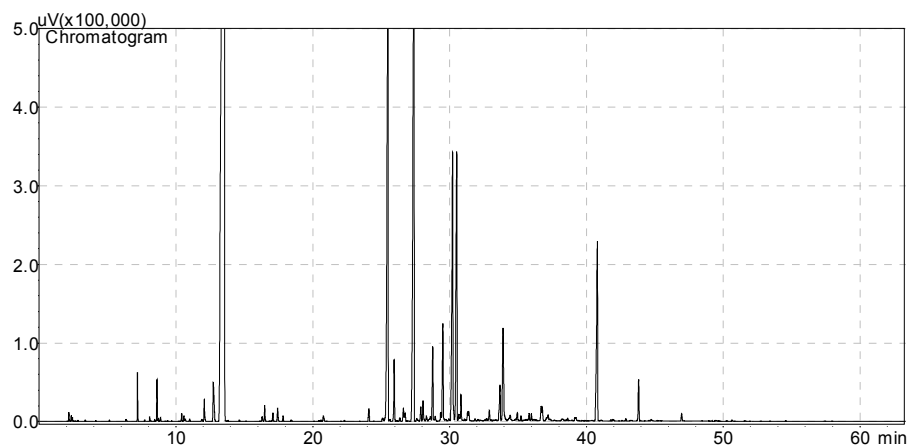
**Figura 37.** Cromatograma para amostra - AR 4



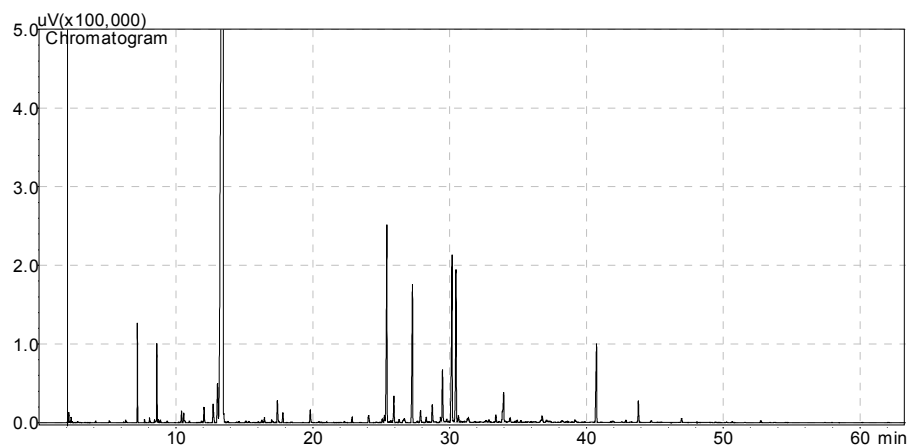
**Figura 38.** Cromatograma para amostra - AR 5



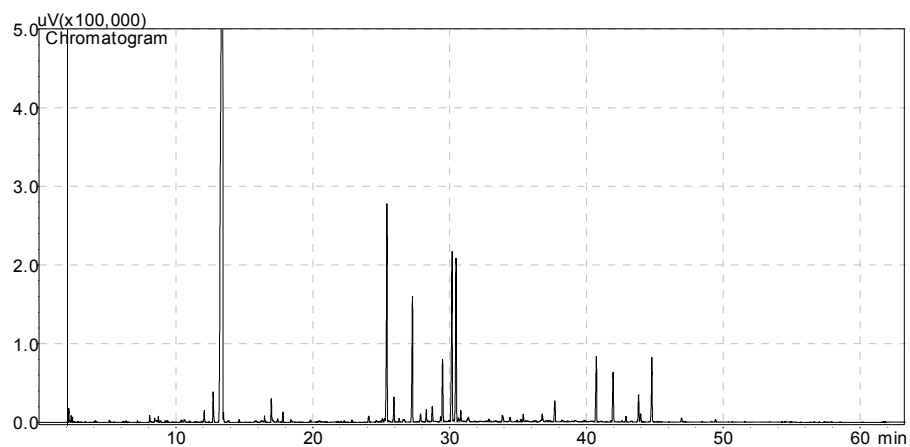
**Figura 39.** Cromatograma para amostra - AR 6



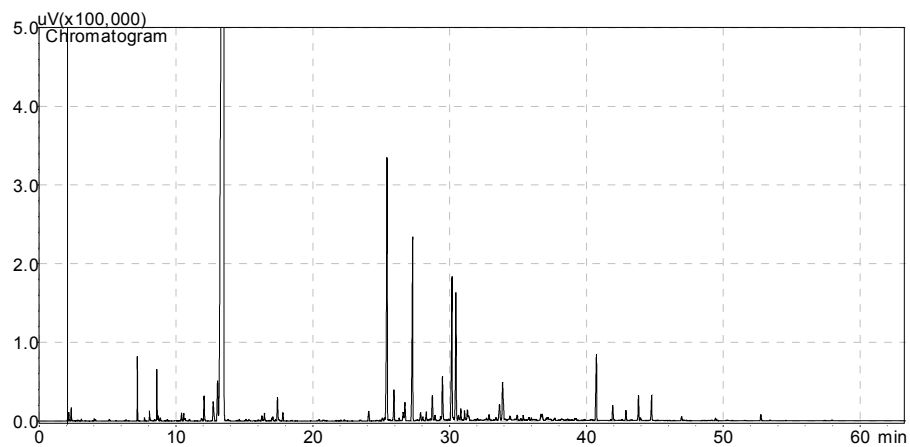
**Figura 40.** Cromatograma para amostra - AR 7



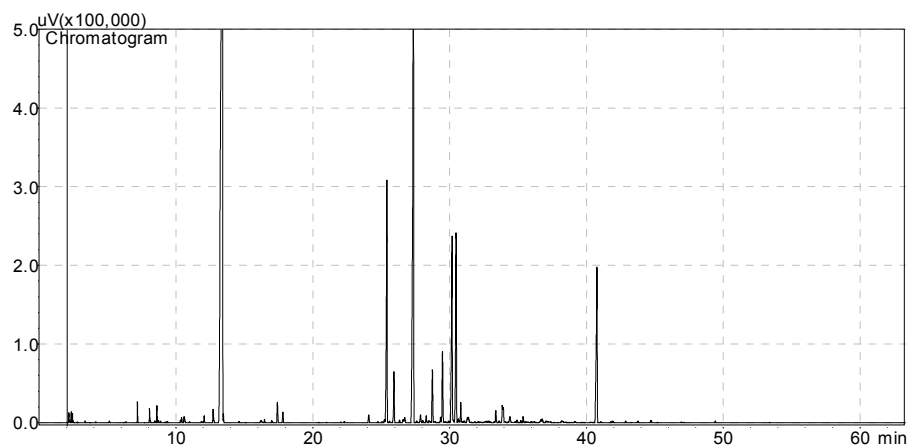
**Figura 41.** Cromatograma para amostra - AR 8



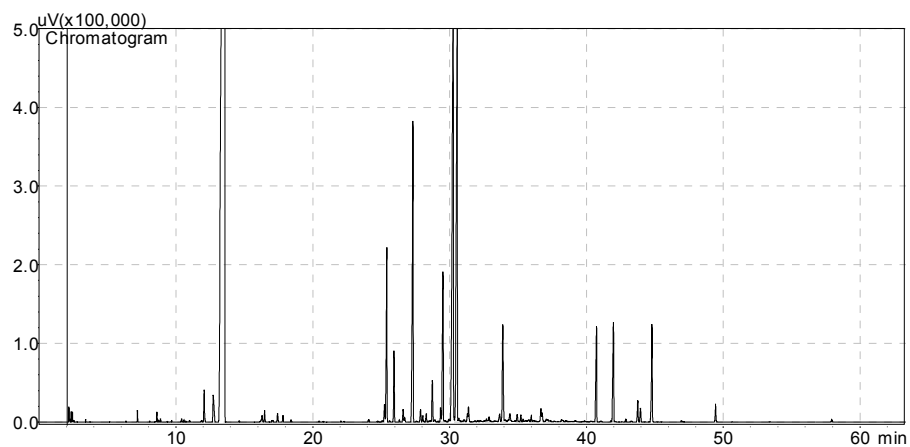
**Figura 42.** Cromatograma para amostra - AR 9



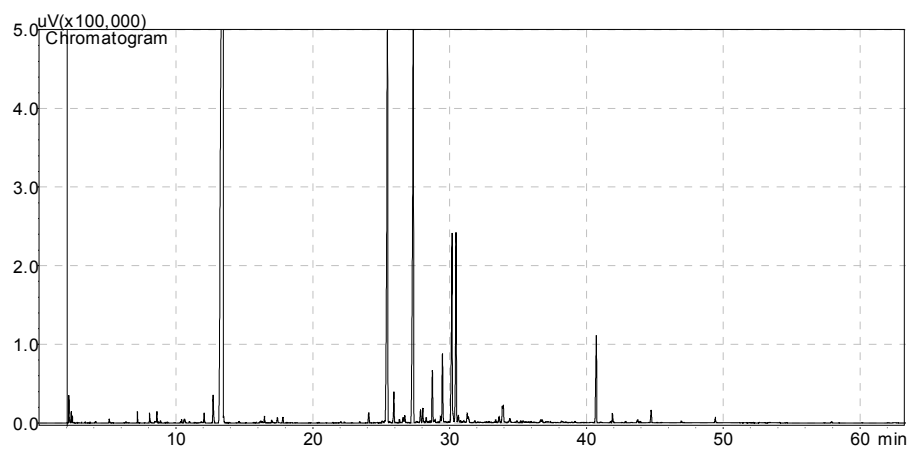
**Figura 43.** Cromatograma para amostra - AR 10



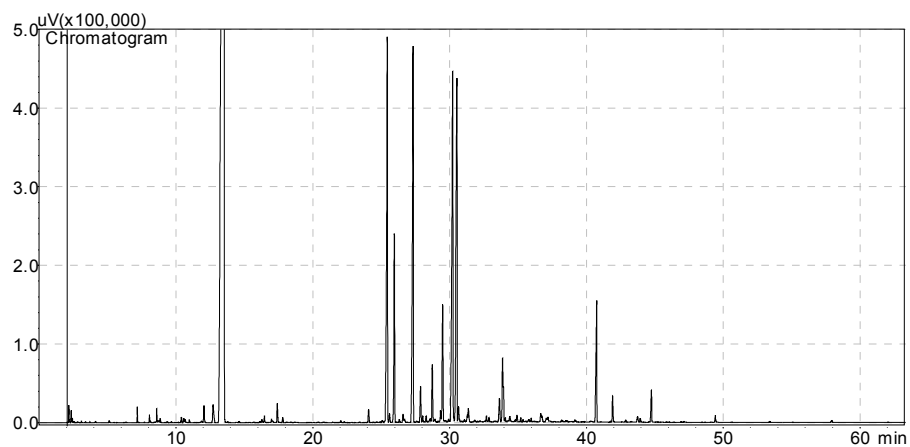
**Figura 44.** Cromatograma para amostra - AR 11



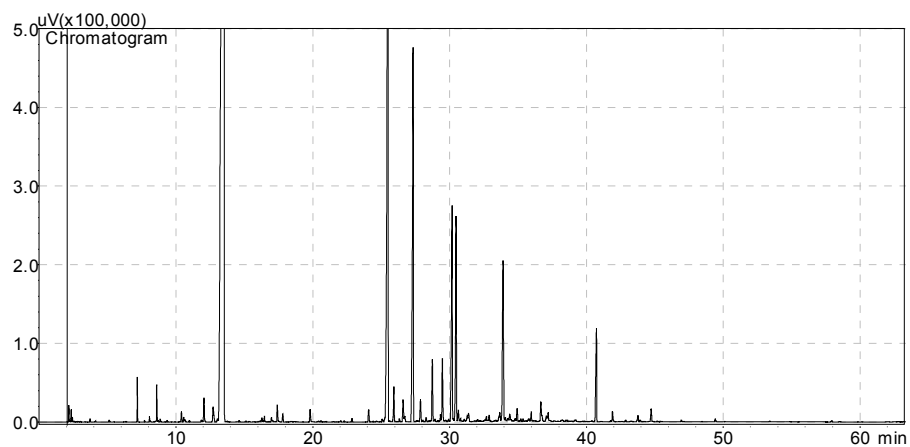
**Figura 45.** Cromatograma para amostra - AR 12



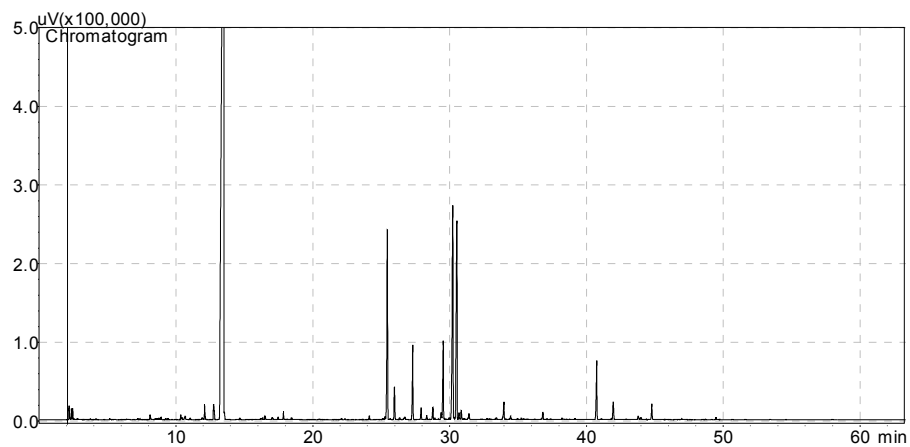
**Figura 46.** Cromatograma para amostra - AR 13



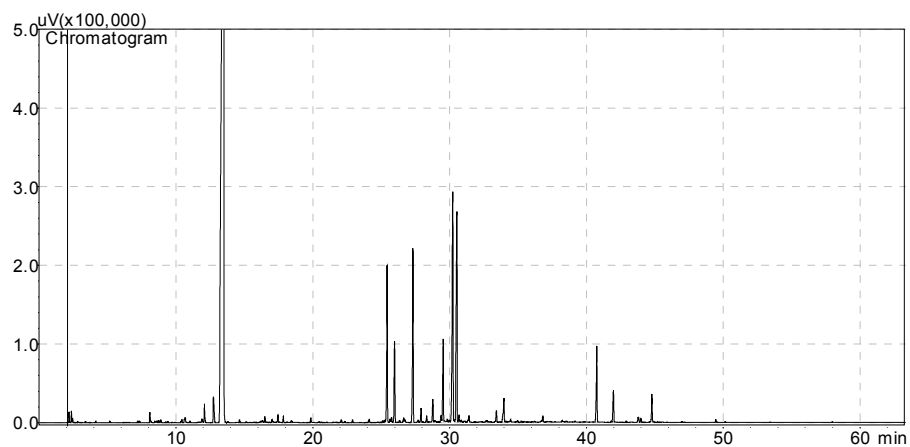
**Figura 47.** Cromatograma para amostra - AR 14



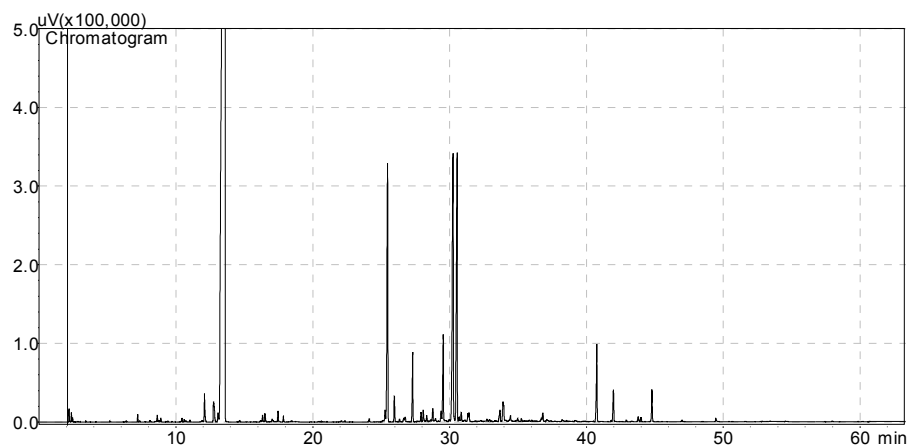
**Figura 48.** Cromatograma para amostra - AR 15



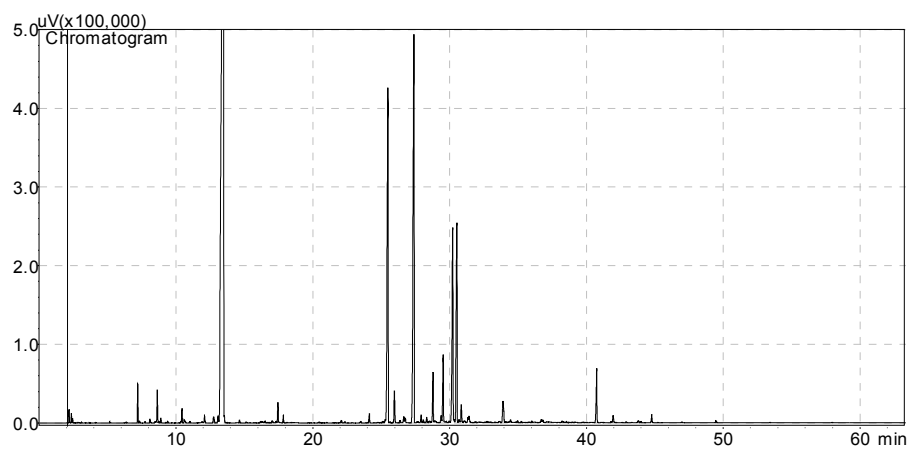
**Figura 49.** Cromatograma para amostra - AR 16



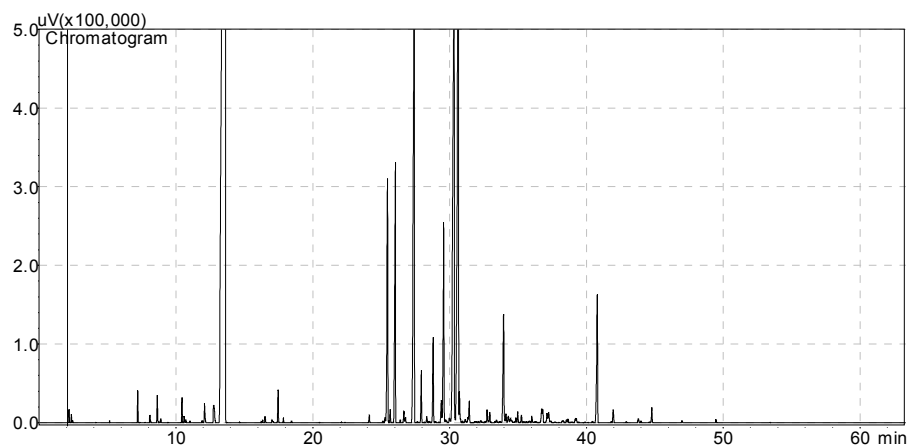
**Figura 50.** Cromatograma para amostra - AR 17



**Figura 51.** Cromatograma para amostra - AR 18

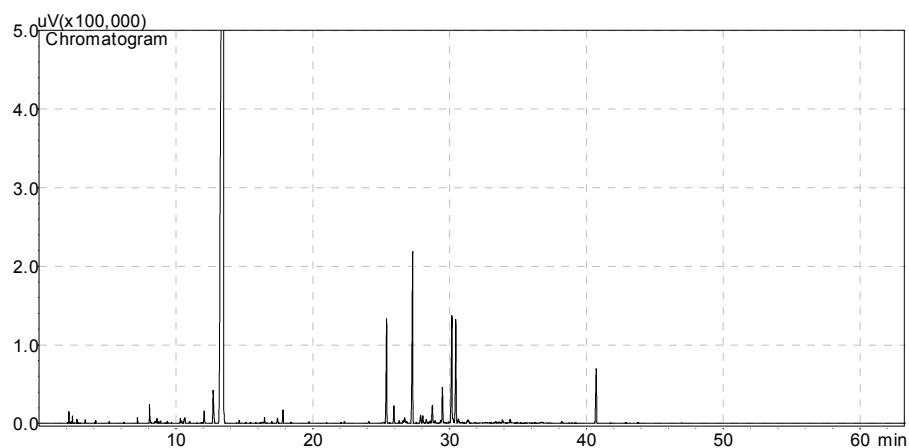


**Figura 52.** Cromatograma para amostra - AR 19

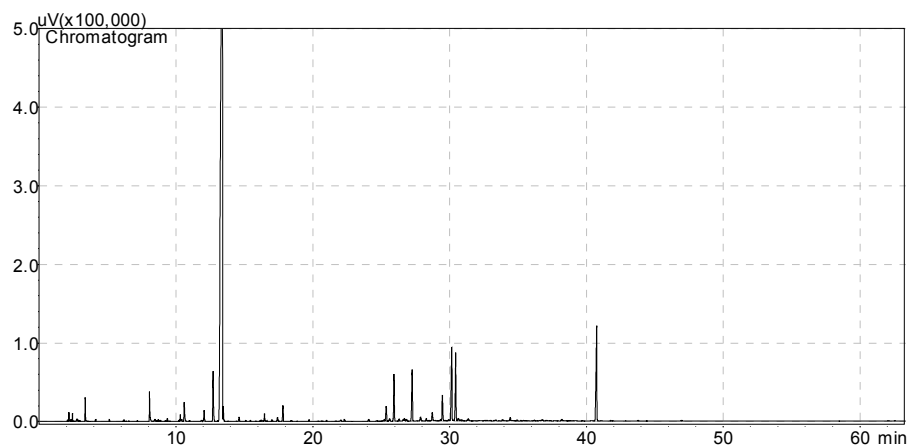


**Figura 53.** Cromatograma para amostra - AR 20

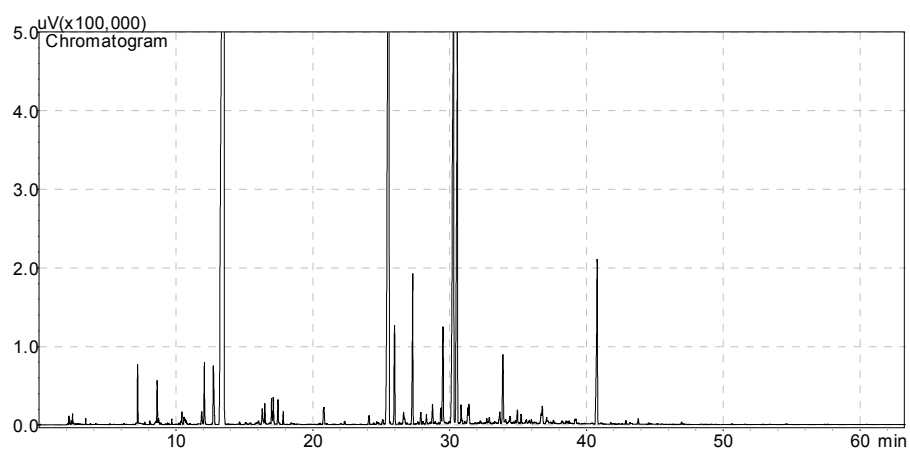
*Aniba rosaeodora* – lote 2



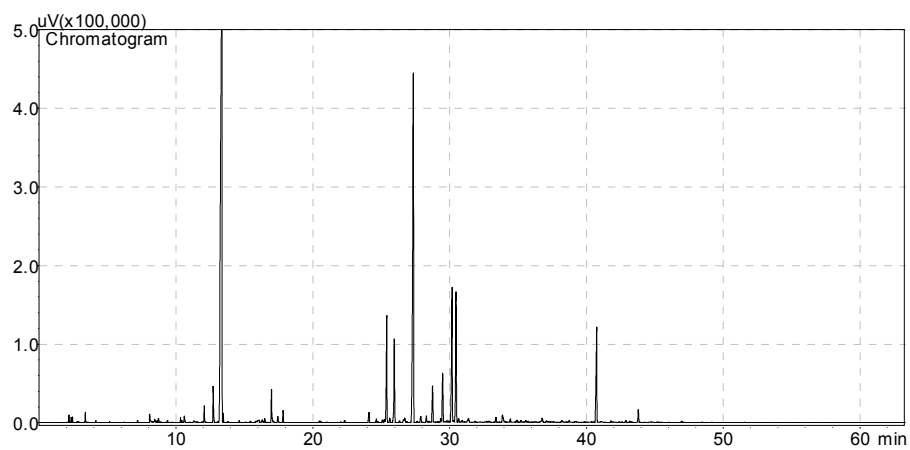
**Figura 54.** Cromatograma para amostra - AR I1



**Figura 55.** Cromatograma para amostra - AR I2

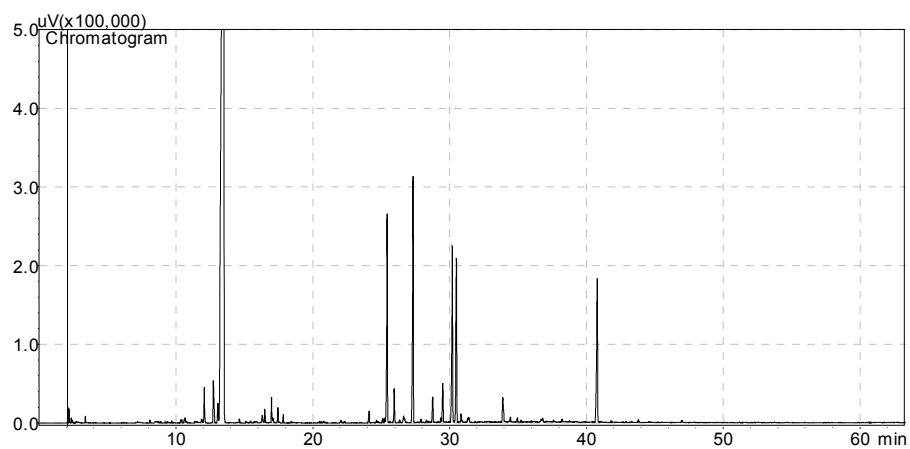


**Figura 56.** Cromatograma para amostra - AR I3

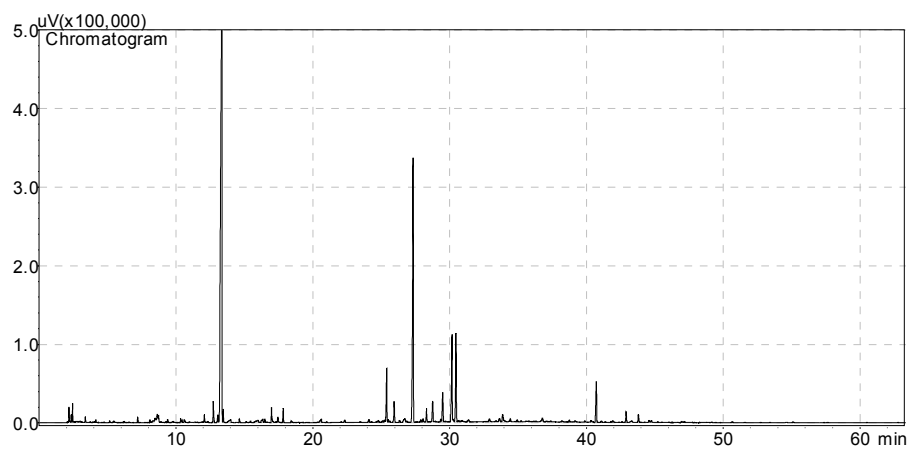


**Figura 57.** Cromatograma para amostra - AR I4

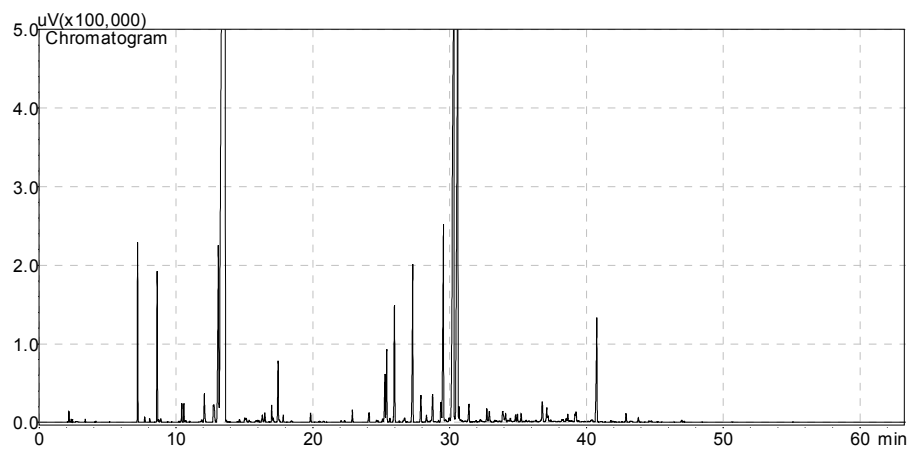




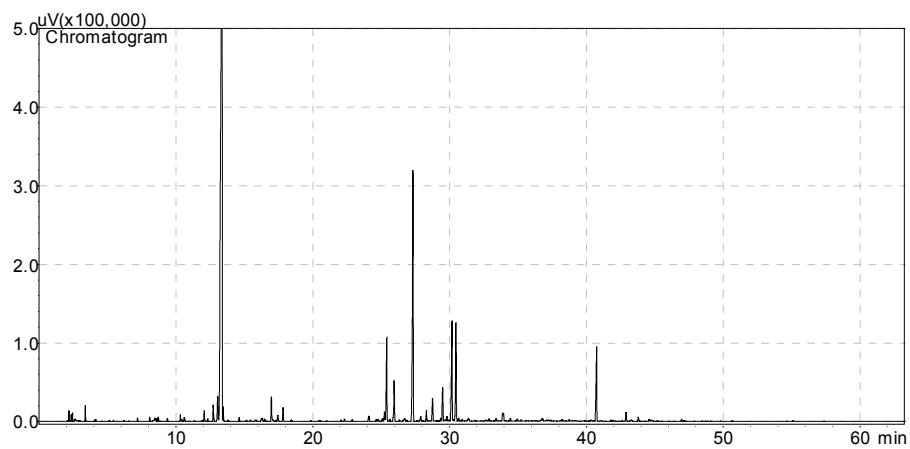
**Figura 58.** Cromatograma para amostra - AR I5



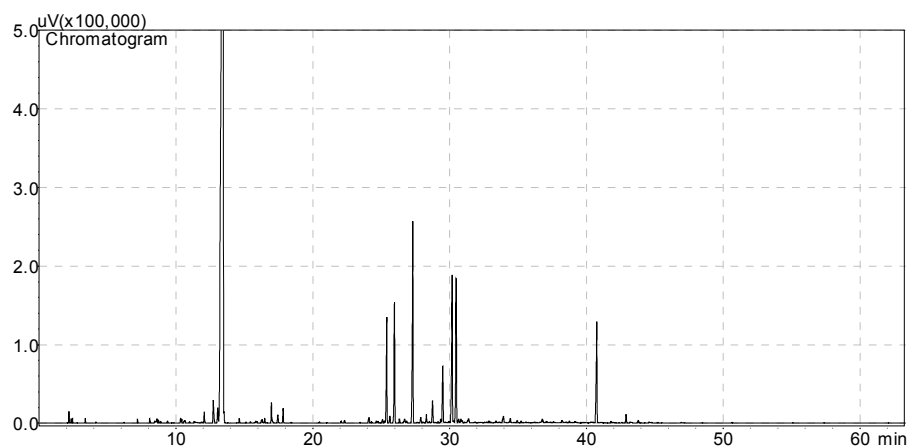
**Figura 59.** Cromatograma para amostra - AR I6



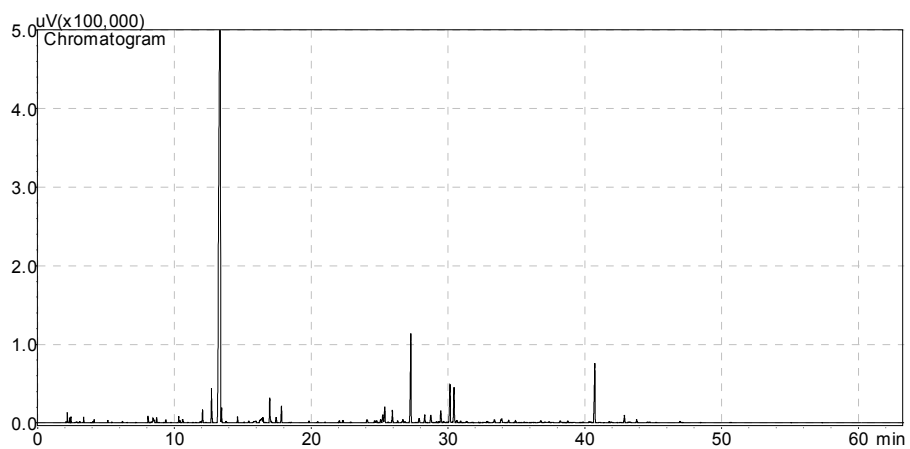
**Figura 60.** Cromatograma para amostra - AR I7



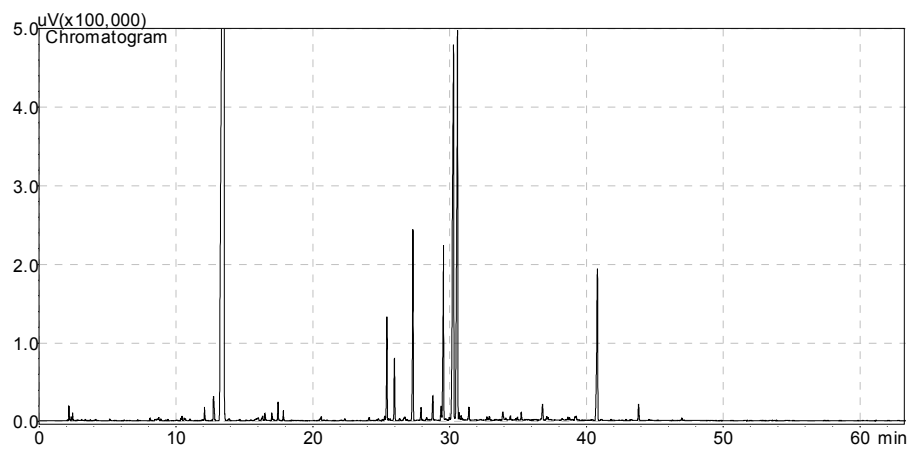
**Figura 61.** Cromatograma para amostra - AR I8



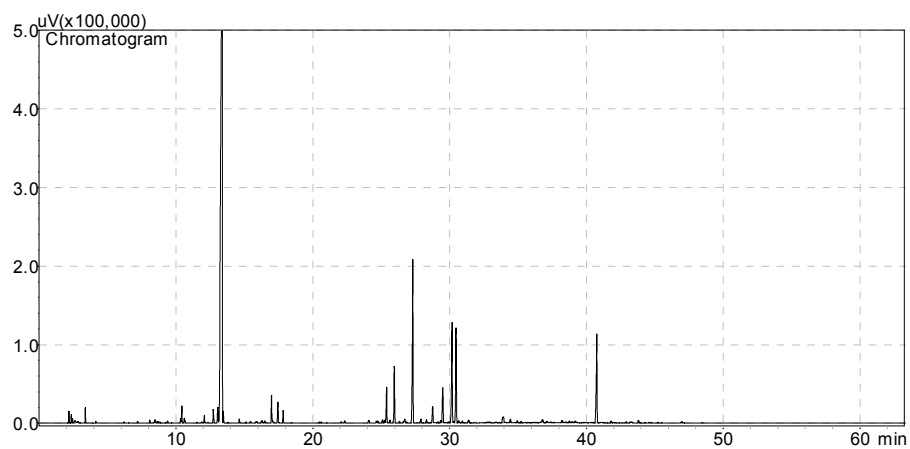
**Figura 62.** Cromatograma para amostra -AR I9



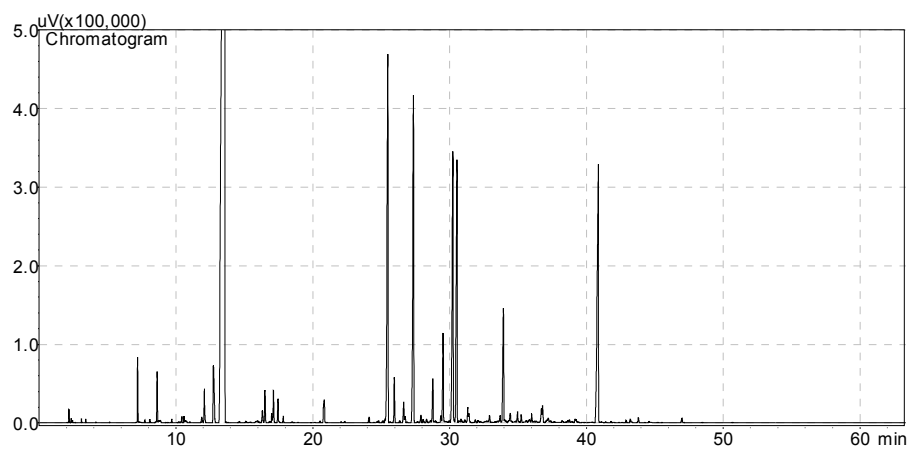
**Figura 63.** Cromatograma para amostra - AR I10



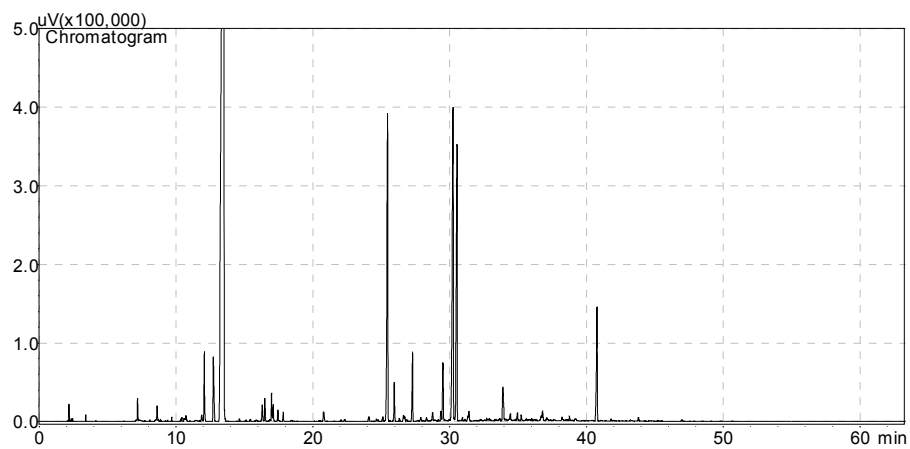
**Figura 64.** Cromatograma para amostra - AR I11



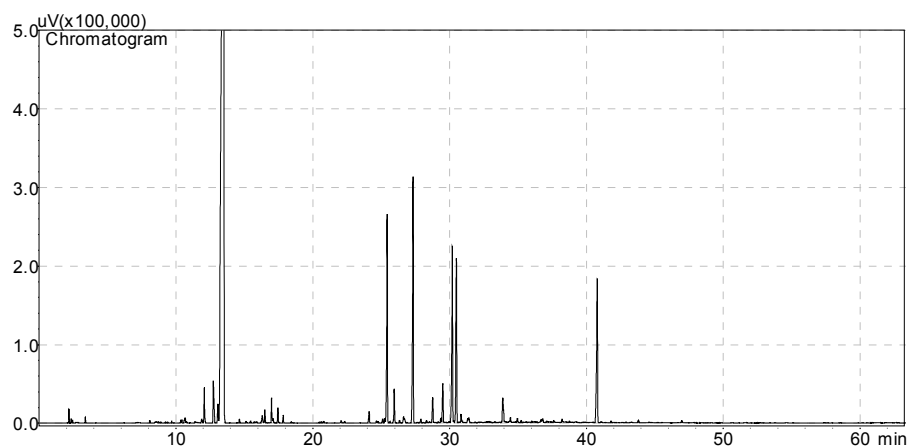
**Figura 65.** Cromatograma para amostra - AR I12



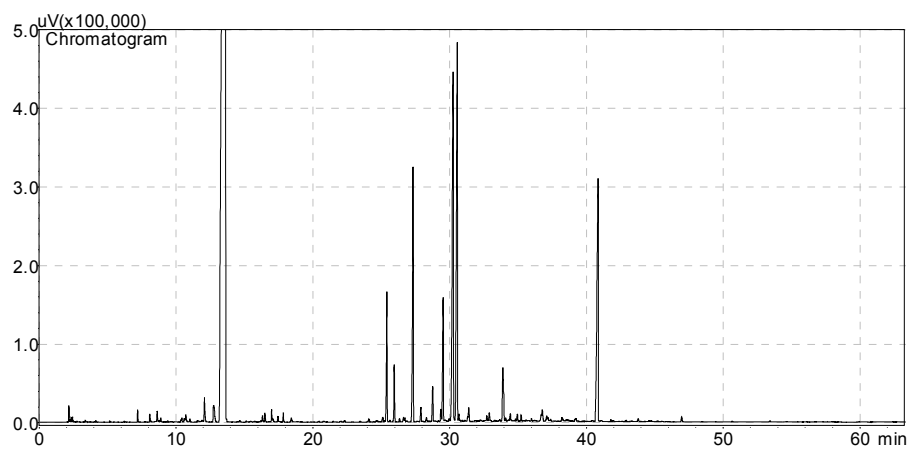
**Figura 66.** Cromatograma para amostra - AR I13



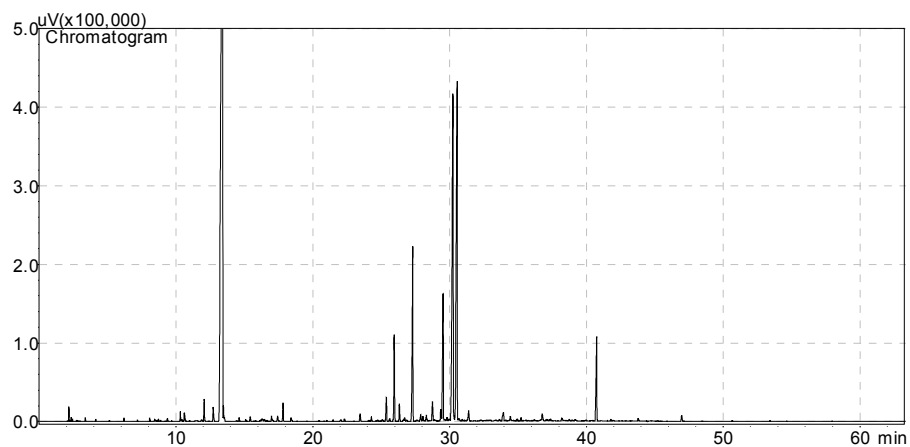
**Figura 67.** Cromatograma para amostra - AR I14



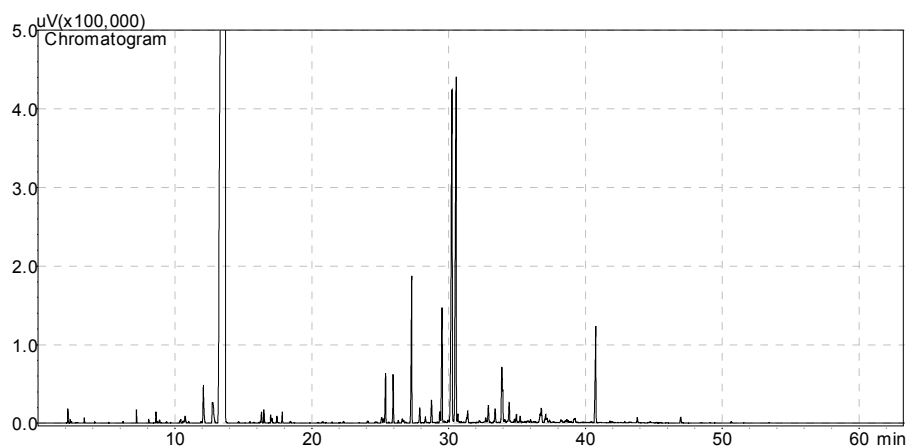
**Figura 68.** Cromatograma para amostra - AR I15



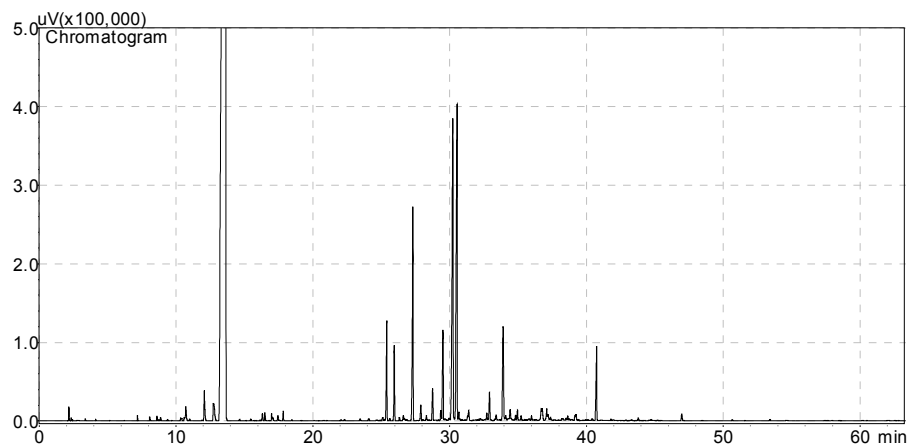
**Figura 69.** Cromatograma para amostra - AR P1



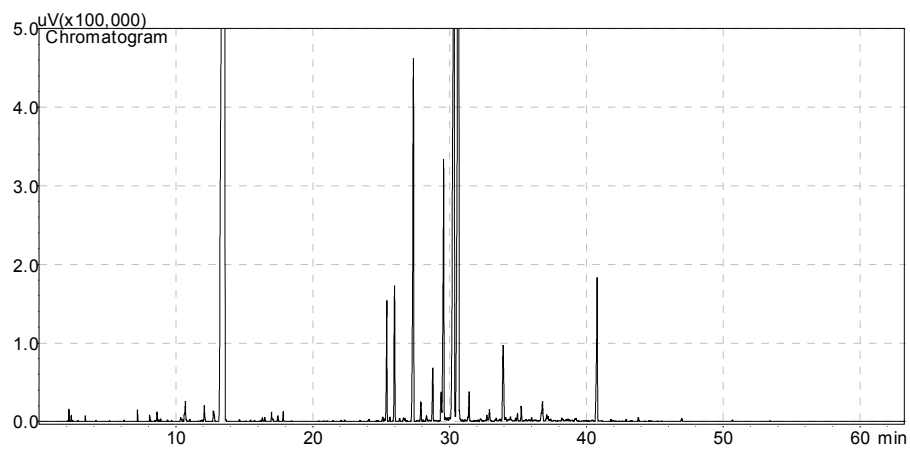
**Figura 70.** Cromatograma para amostra - AR P2



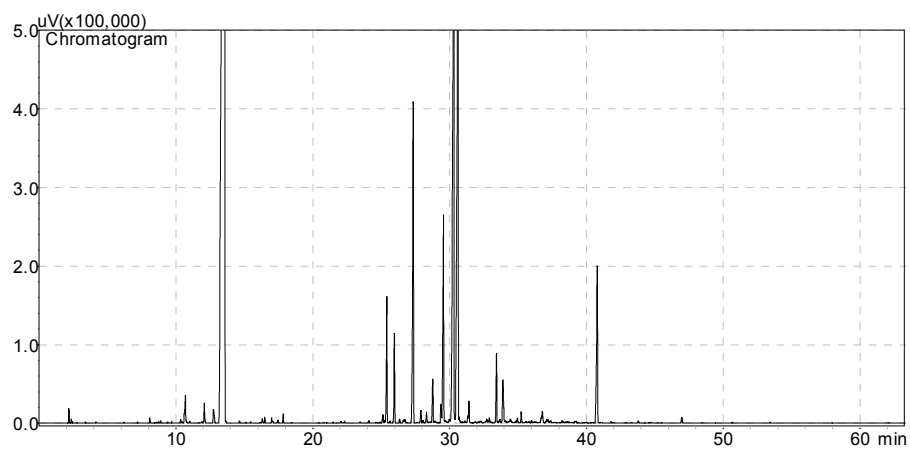
**Figura 71.** Cromatograma para amostra - AR P3



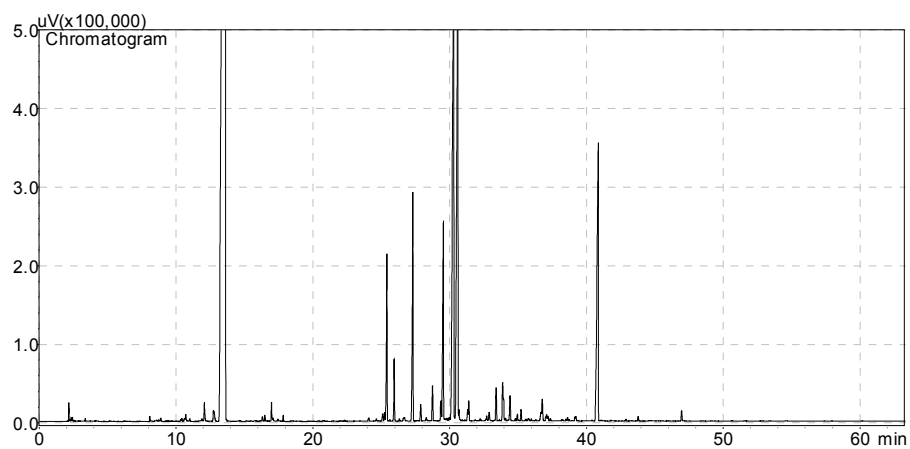
**Figura 72.** Cromatograma para amostra - AR P4



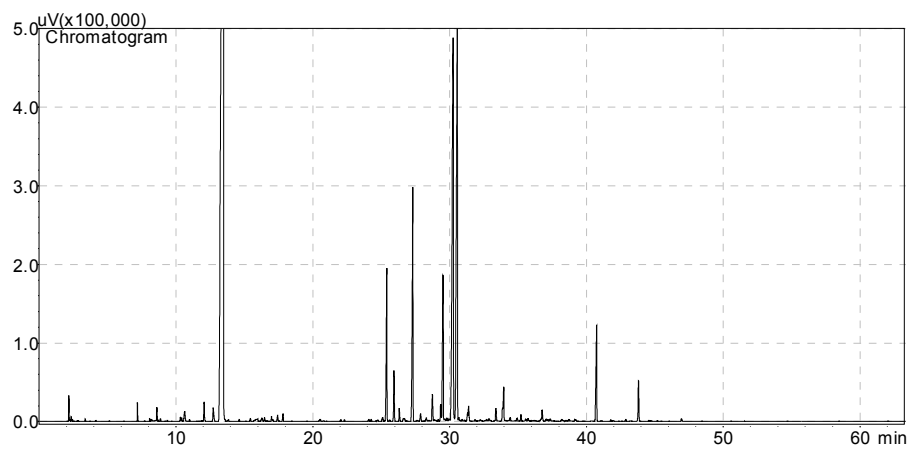
**Figura 73.** Cromatograma para amostra - AR P5



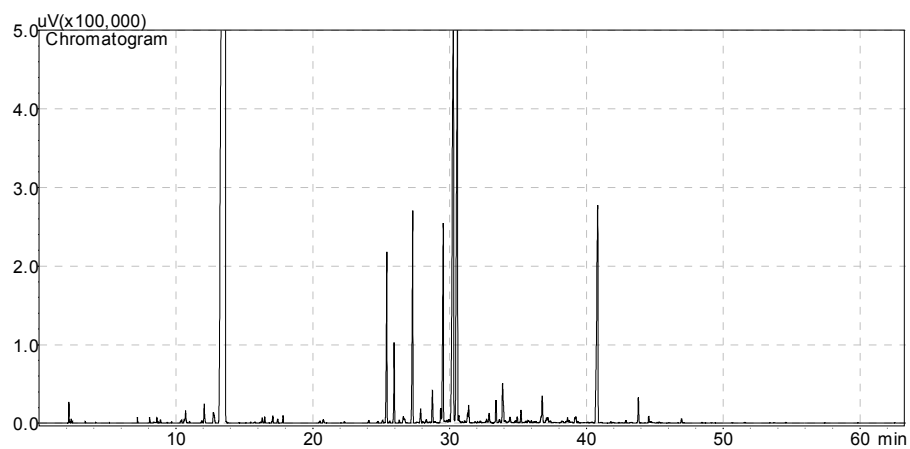
**Figura 74.** Cromatograma para amostra - AR P6



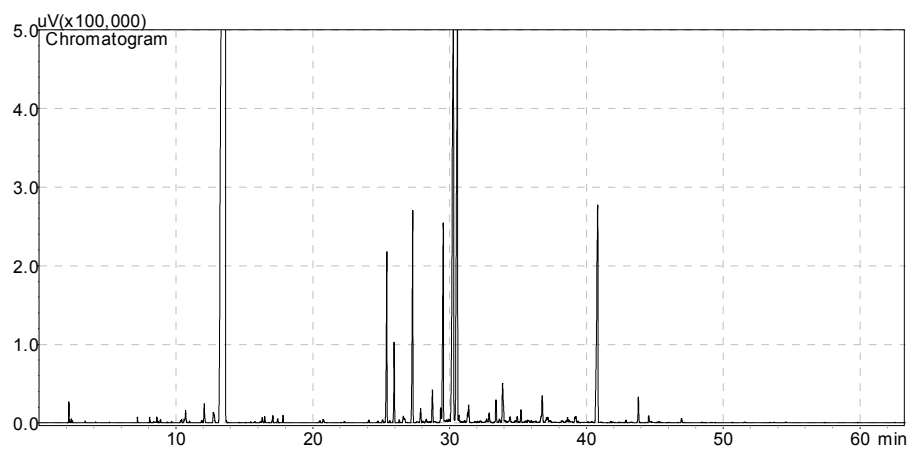
**Figura 75.** Cromatograma para amostra - AR P7



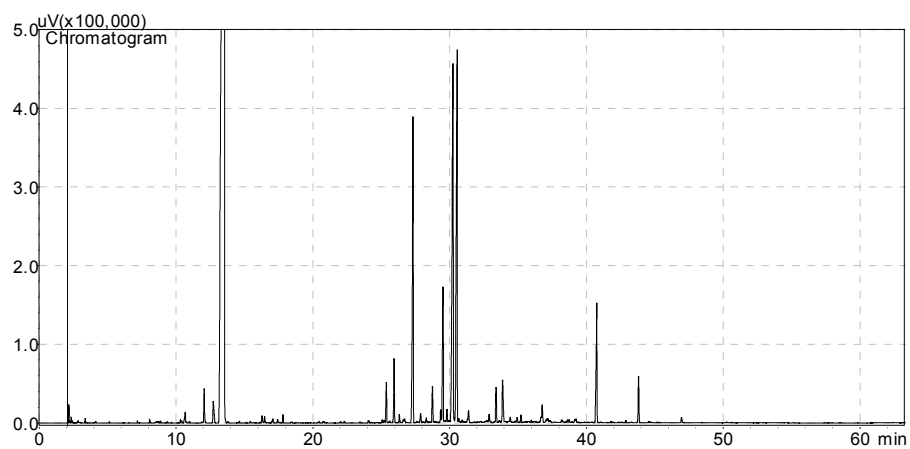
**Figura 76.** Cromatograma para amostra - AR P8



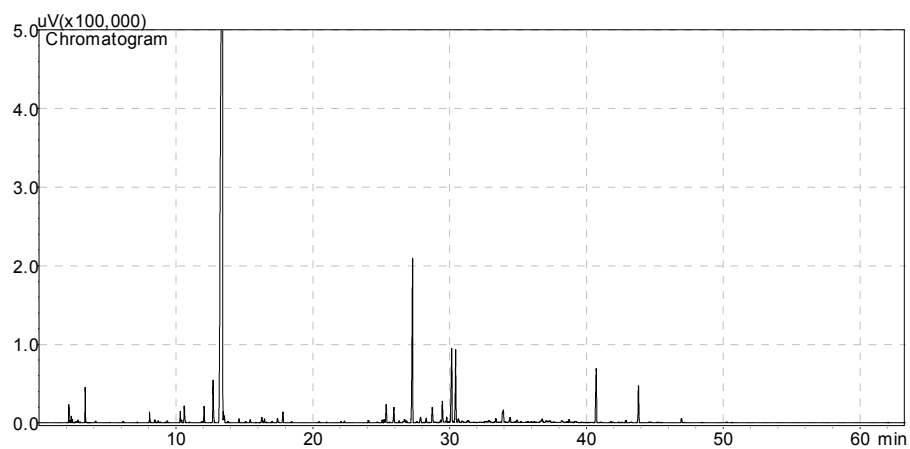
**Figura 77.** Cromatograma para amostra - AR P9



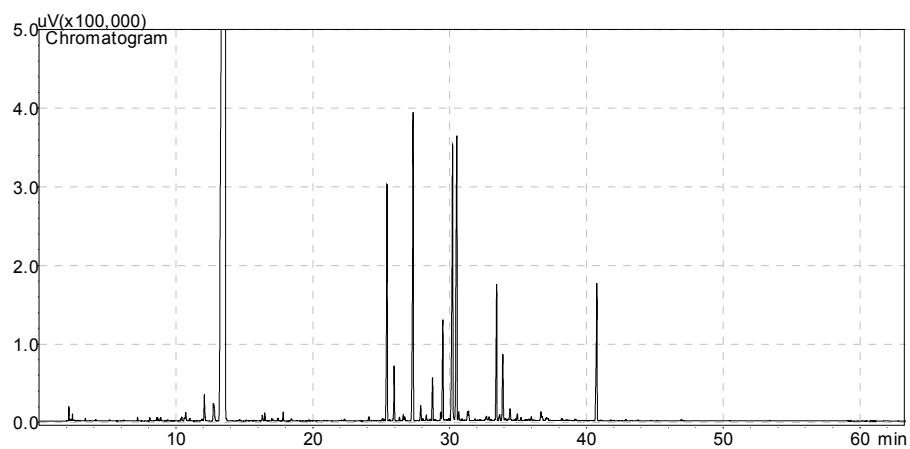
**Figura 78.** Cromatograma para amostra - AR P10



**Figura 79.** Cromatograma para amostra - AR P11

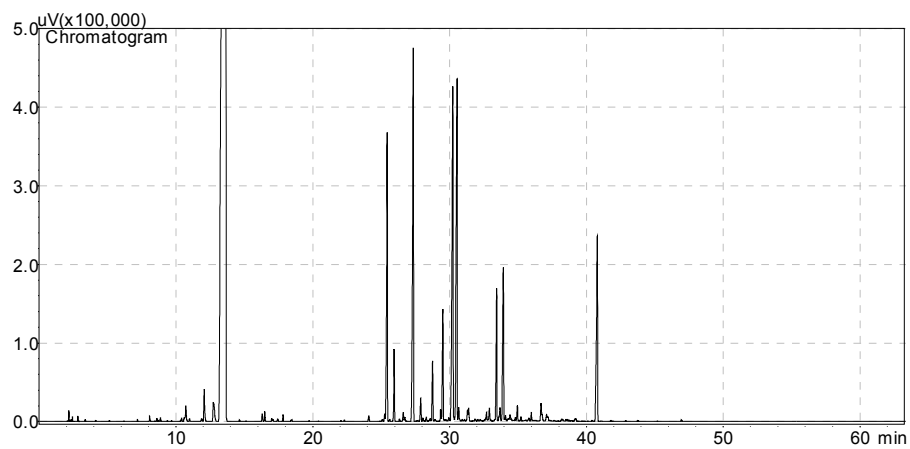


**Figura 80.** Cromatograma para amostra - AR P12

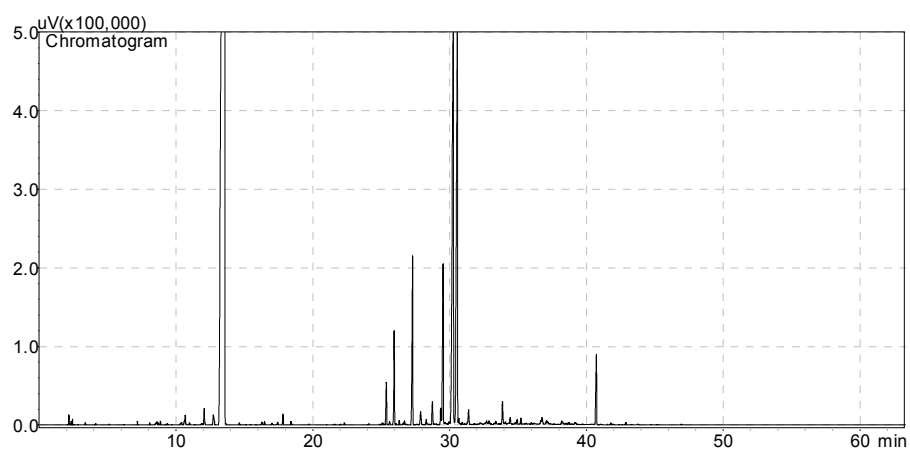


**Figura 81.** Cromatograma para amostra - AR P13



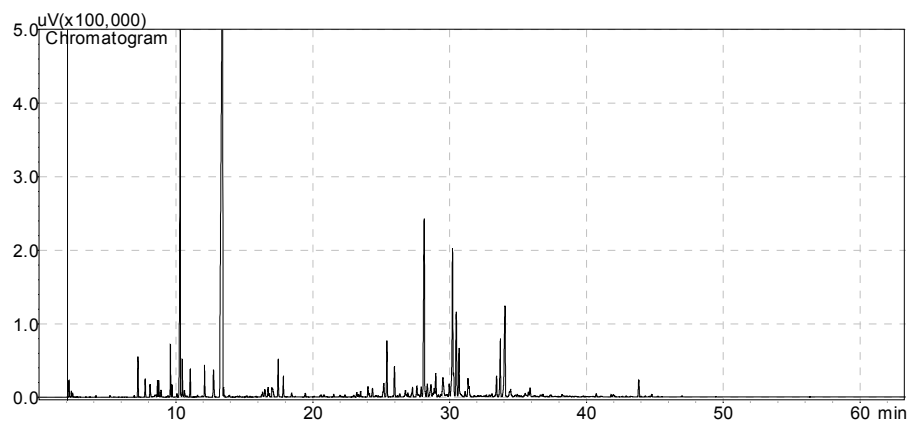


**Figura 82.** Cromatograma para amostra - AR P14

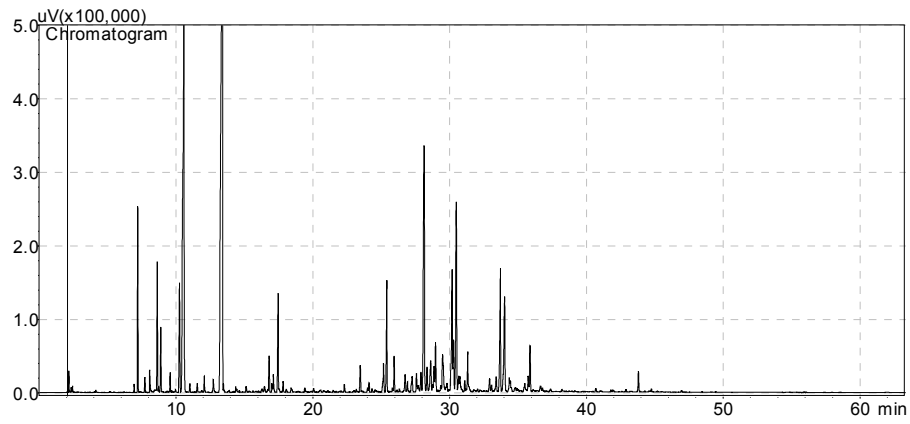


**Figura 83.** Cromatograma para amostra - AR P15

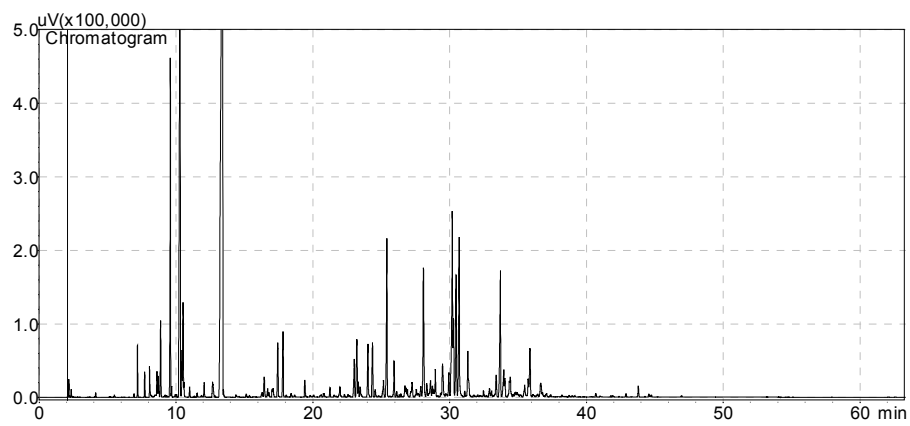
*Aniba parviflora* – lote 1



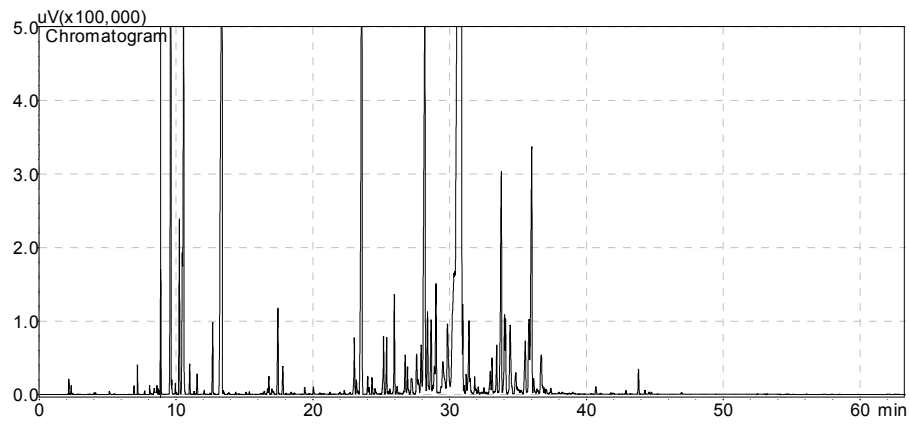
**Figura 84.** Cromatograma para amostra - AP A1



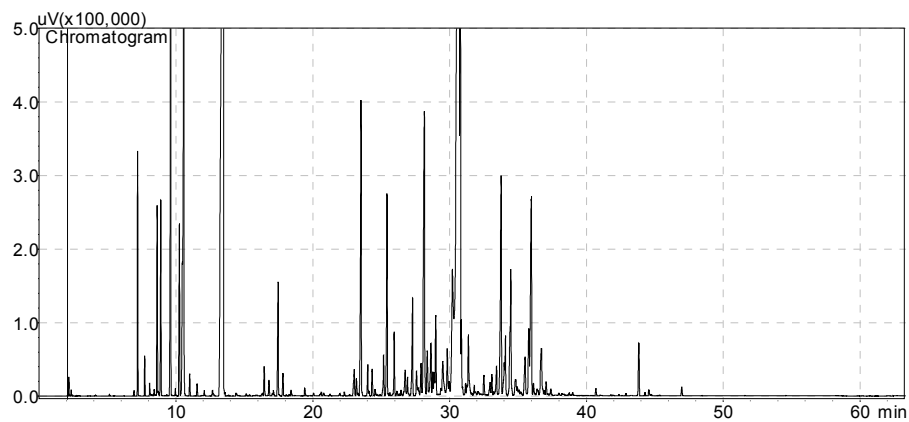
**Figura 85.** Cromatograma para amostra - AP A2



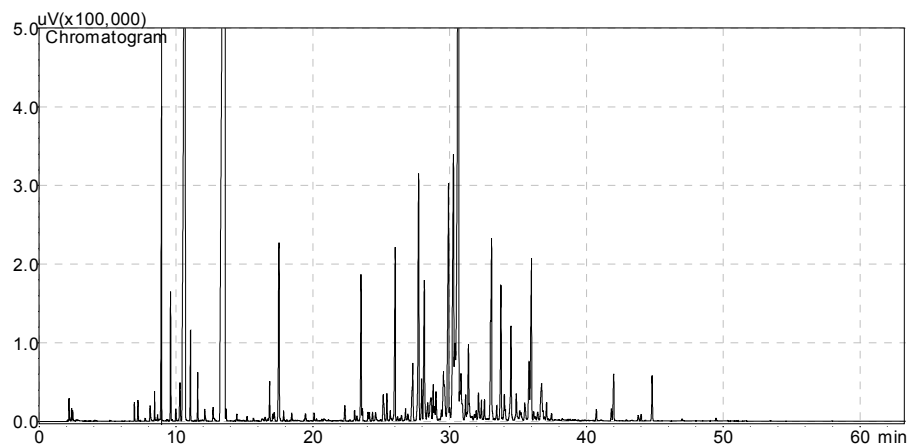
**Figura 86.** Cromatograma para amostra - AP A3



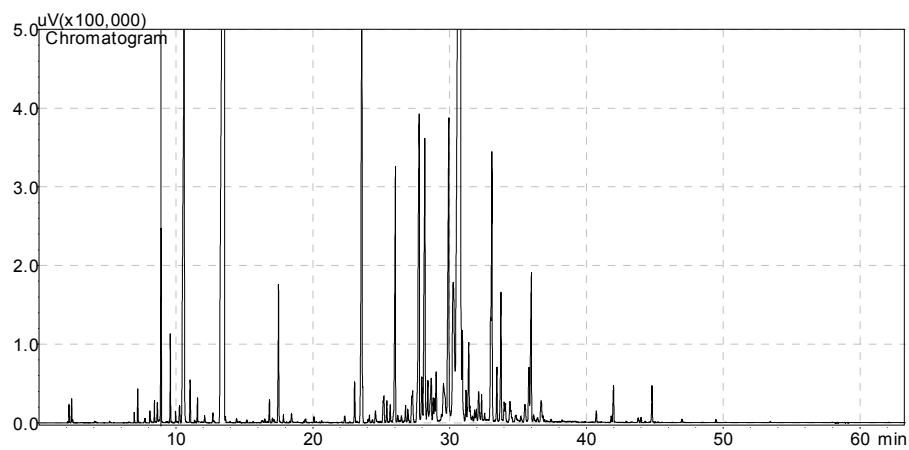
**Figura 87.** Cromatograma para amostra - AP A4



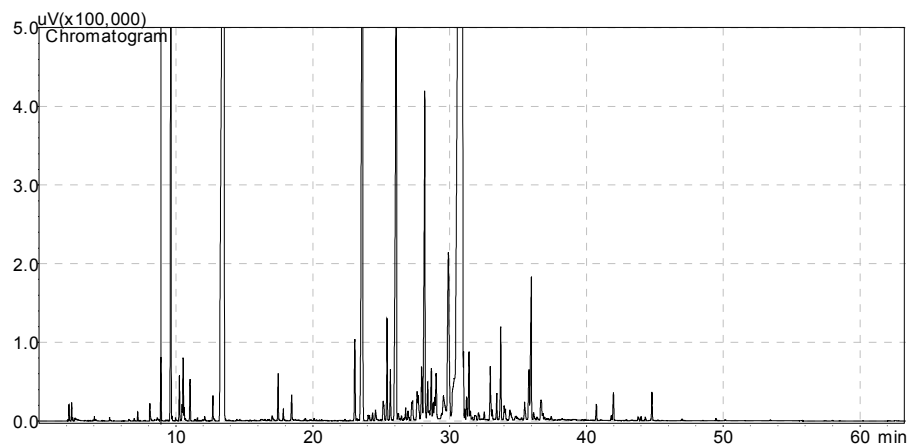
**Figura 88.** Cromatograma para amostra - AP A5



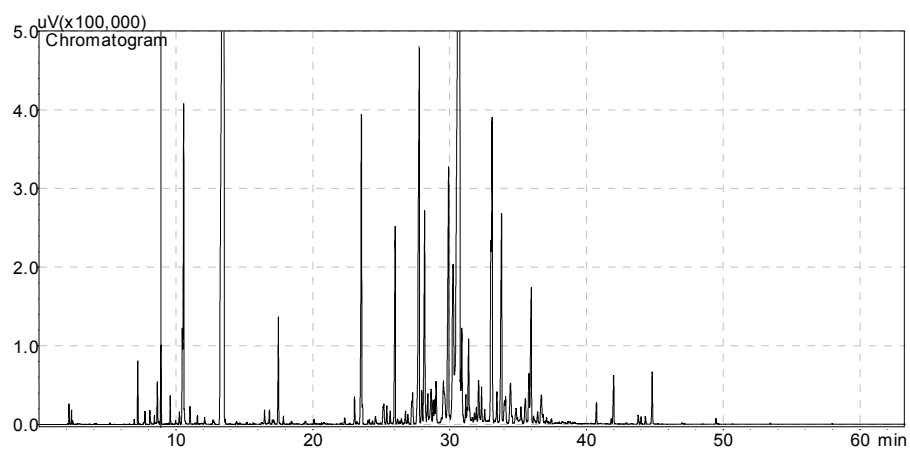
**Figura 89.** Cromatograma para amostra - AP S1



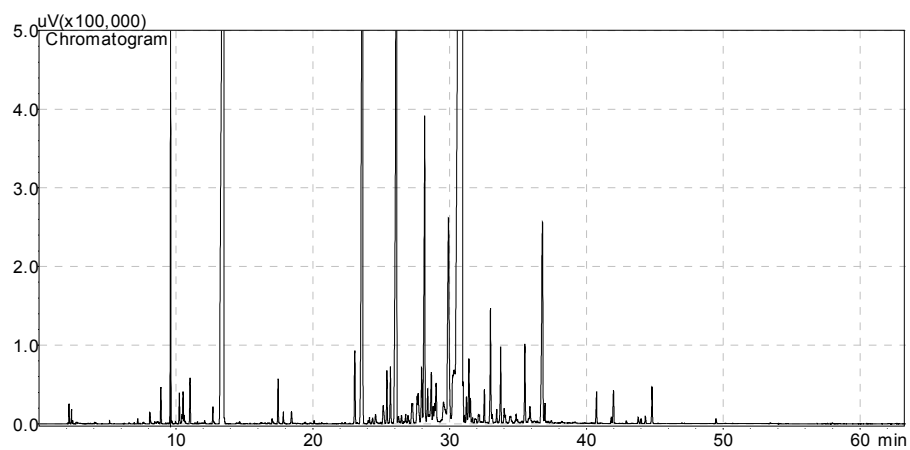
**Figura 90.** Cromatograma para amostra - AP S2



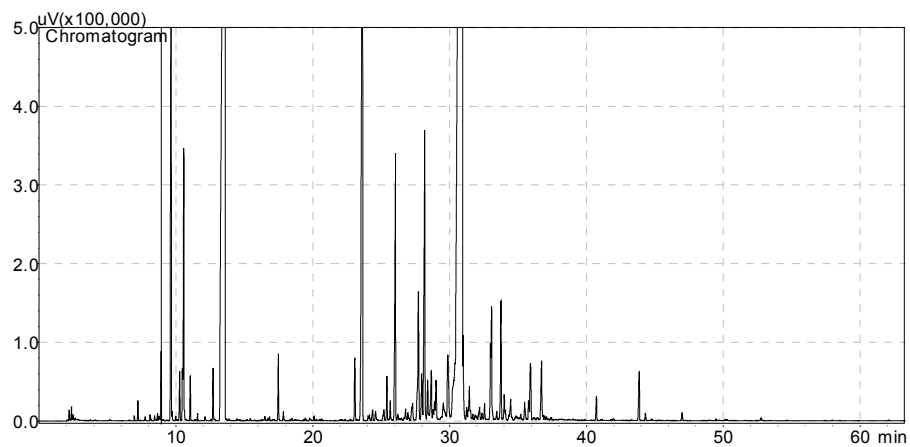
**Figura 91.** Cromatograma para amostra - AP S3



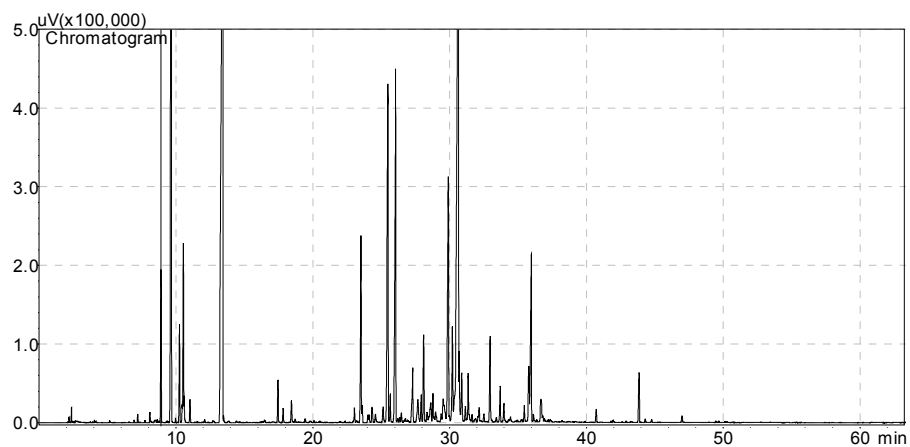
**Figura 92.** Cromatograma para amostra - AP S4



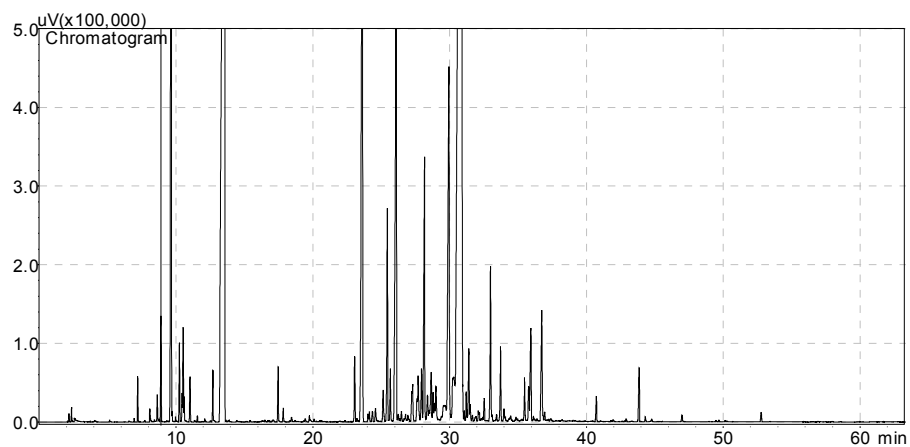
**Figura 93.** Cromatograma para amostra - AP S5



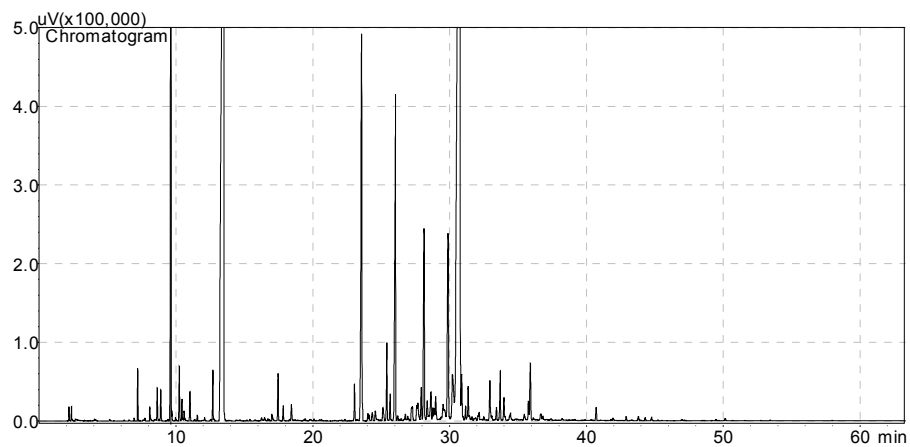
**Figura 94.** Cromatograma para amostra - AP S6



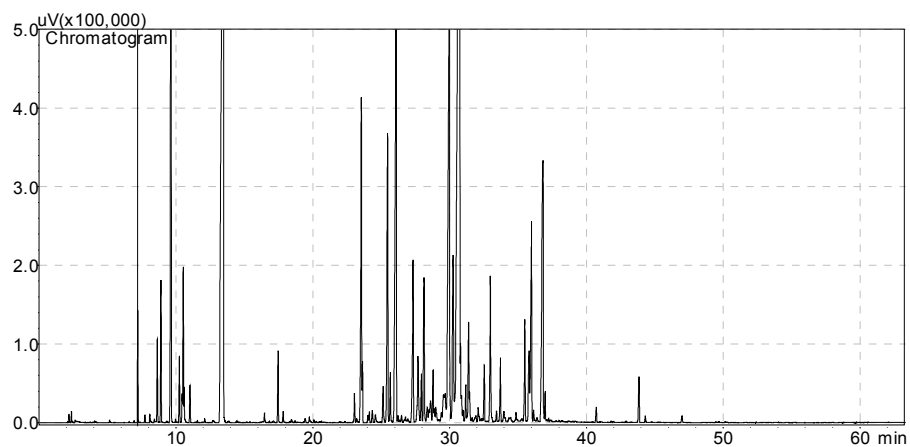
**Figura 95.** Cromatograma para amostra - AP S7



**Figura 96.** Cromatograma para amostra - AP S8

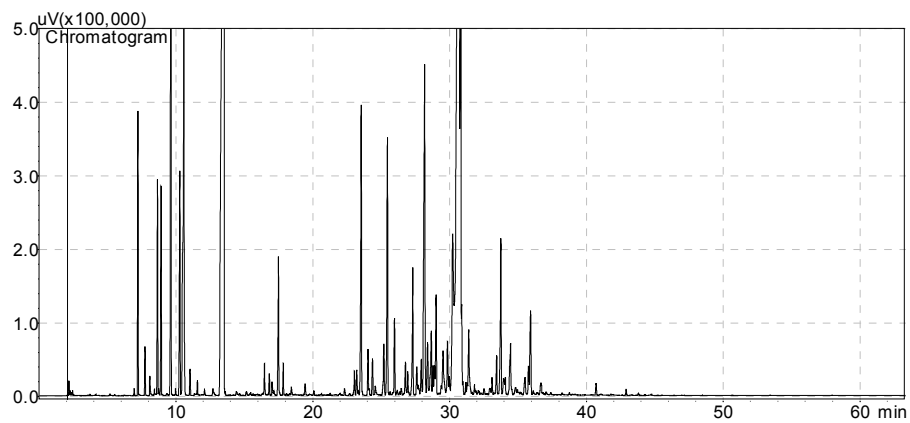


**Figura 97.** Cromatograma para amostra - AP S9

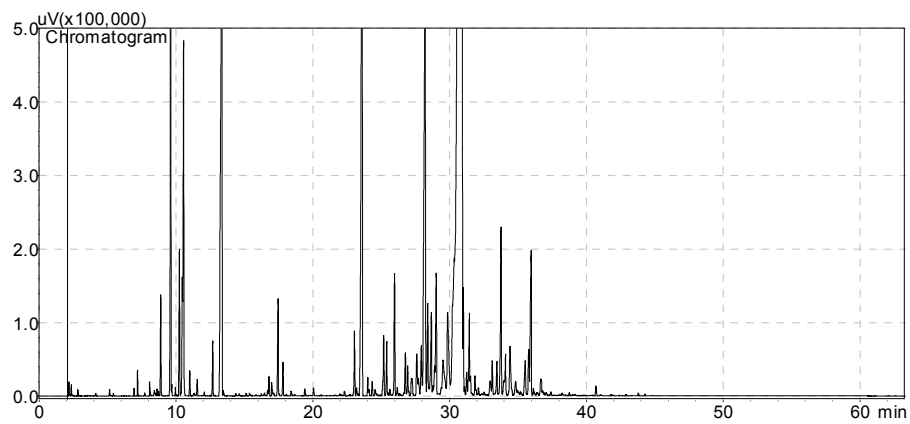


**Figura 98.** Cromatograma para amostra – AP S10

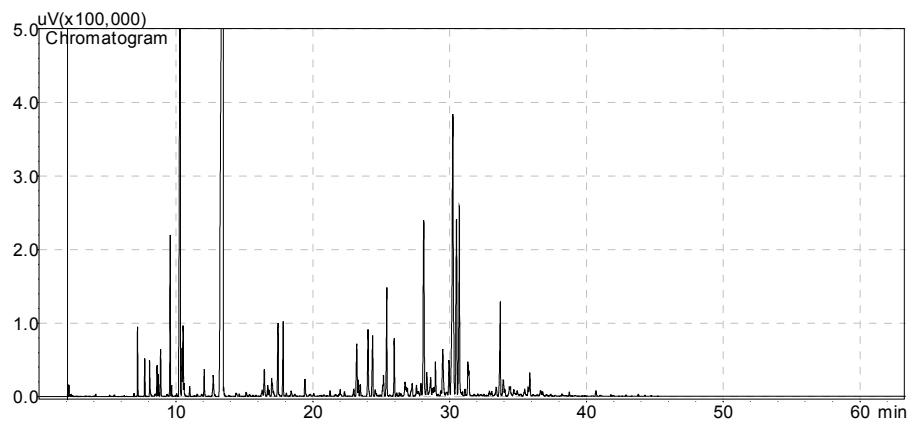
*Aniba parviflora* – lote 2



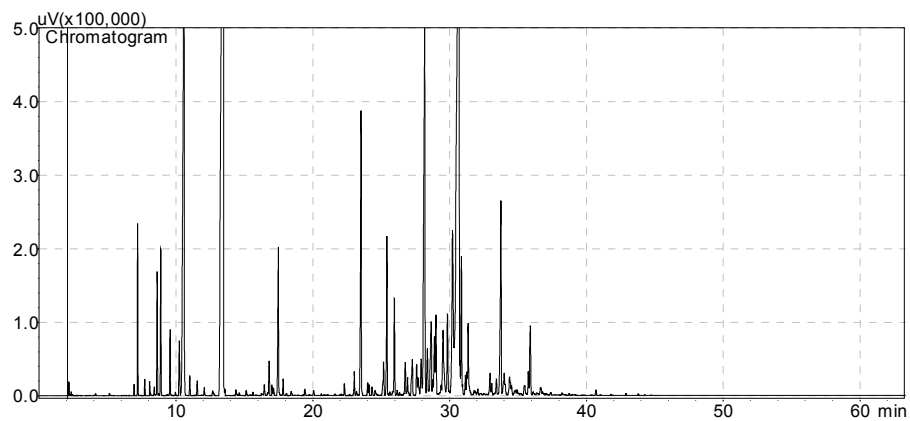
**Figura 99.** Cromatograma para amostra - AP MC1



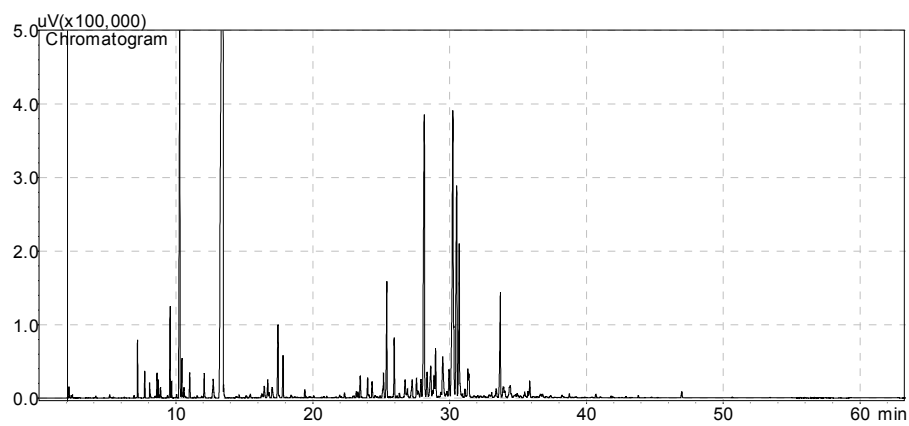
**Figura 100.** Cromatograma para amostra - AP MC2



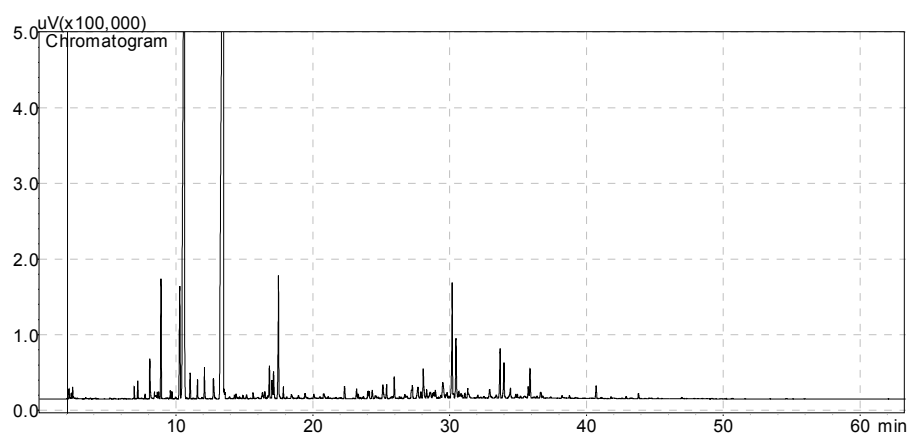
**Figura 101.** Cromatograma para amostra - AP MC3



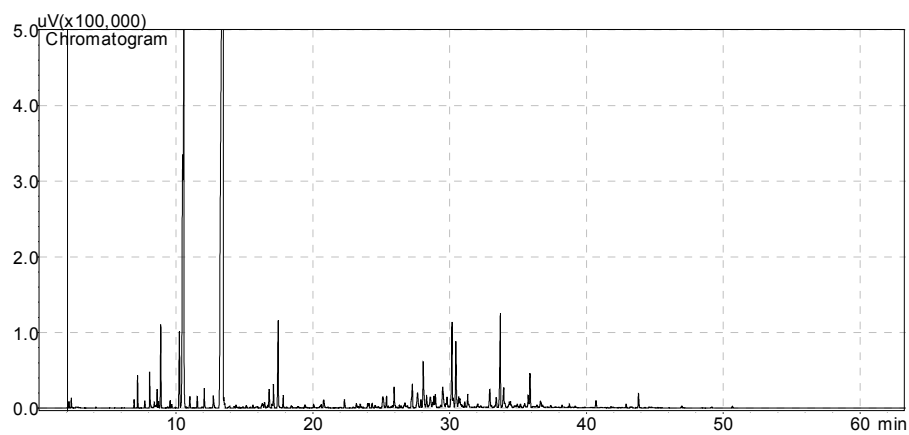
**Figura 102.** Cromatograma para amostra - AP MC4



**Figura 103.** Cromatograma para amostra - AP MC5

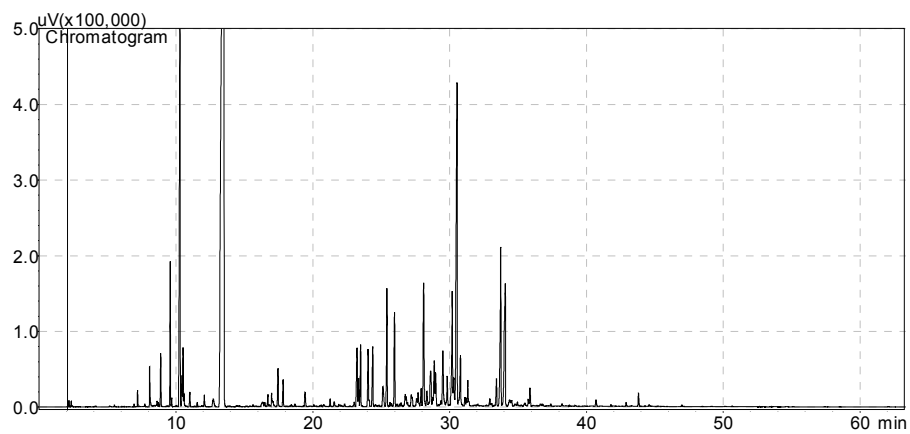


**Figura 104.** Cromatograma para amostra - AP P1

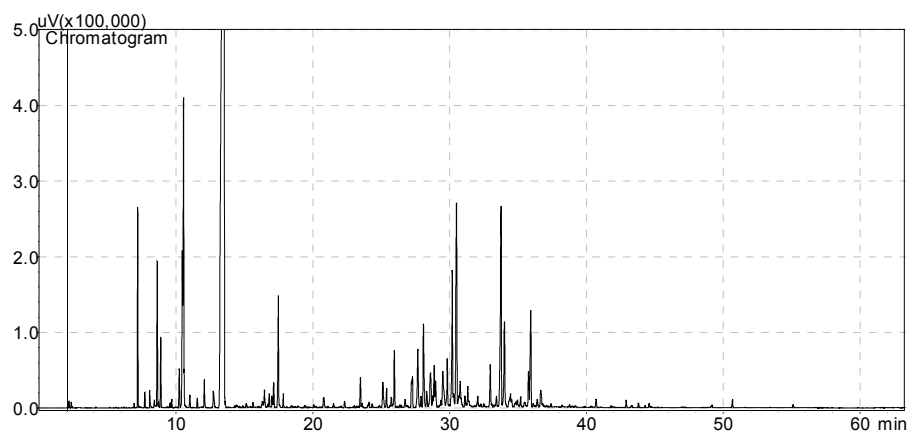


**Figura 105.** Cromatograma para amostra - AP P2

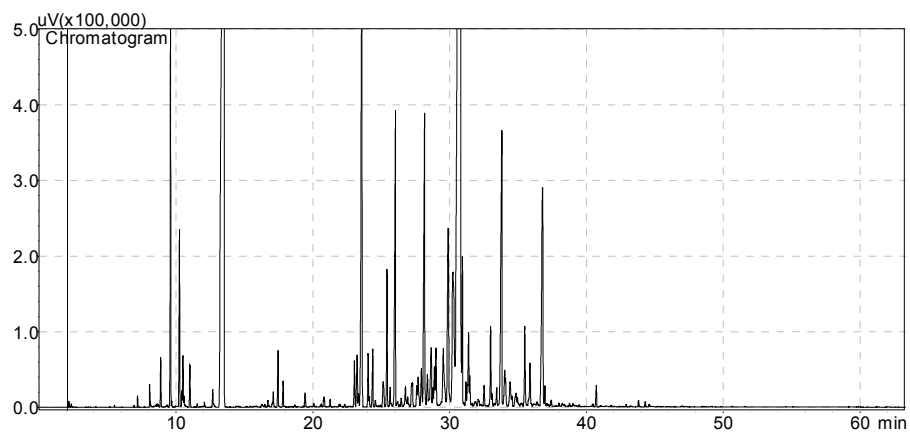




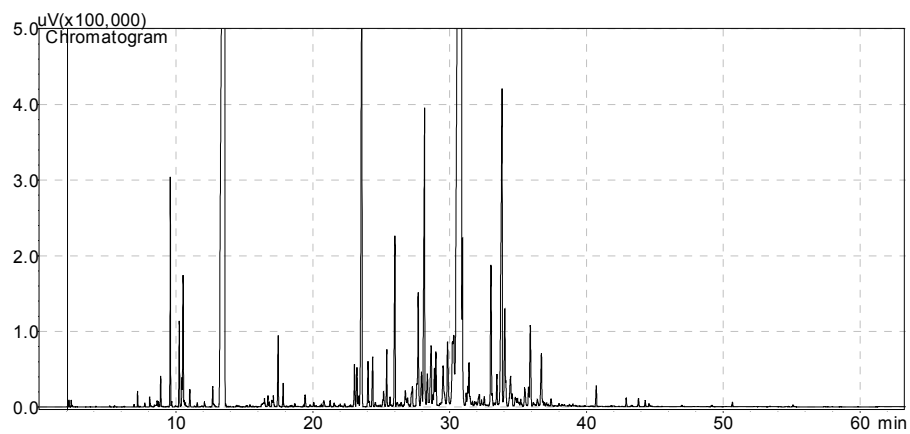
**Figura 106.** Cromatograma para amostra - AP P3



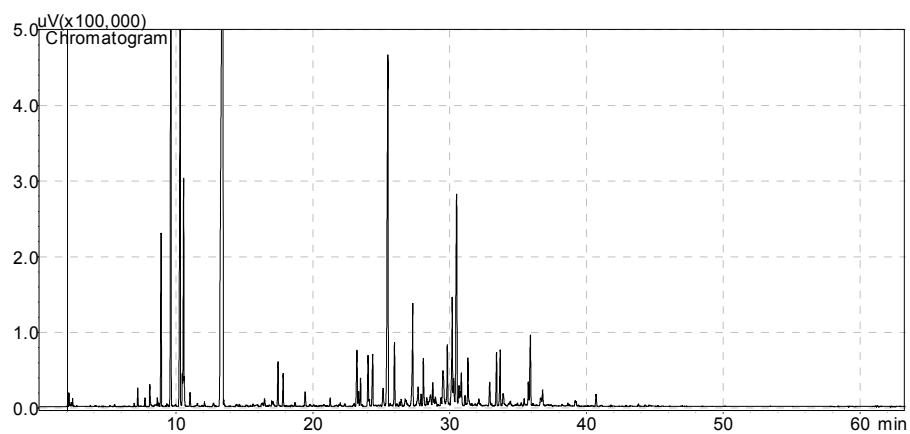
**Figura 107.** Cromatograma para amostra - AP P4



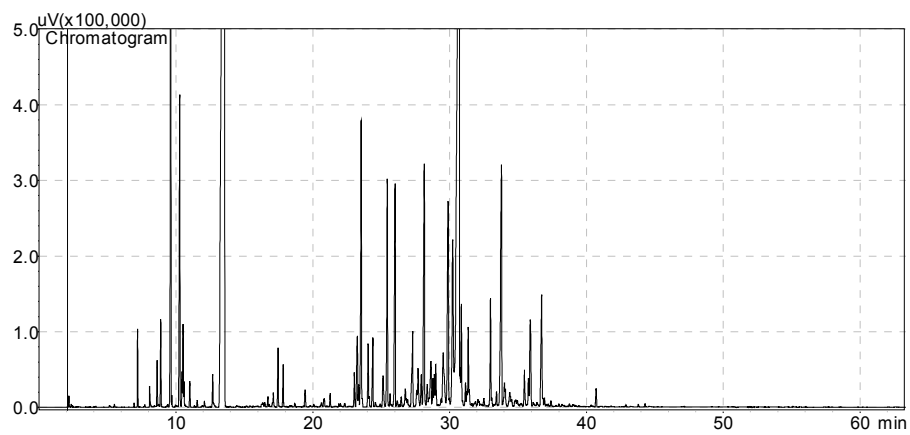
**Figura 108.** Cromatograma para amostra - AP P5



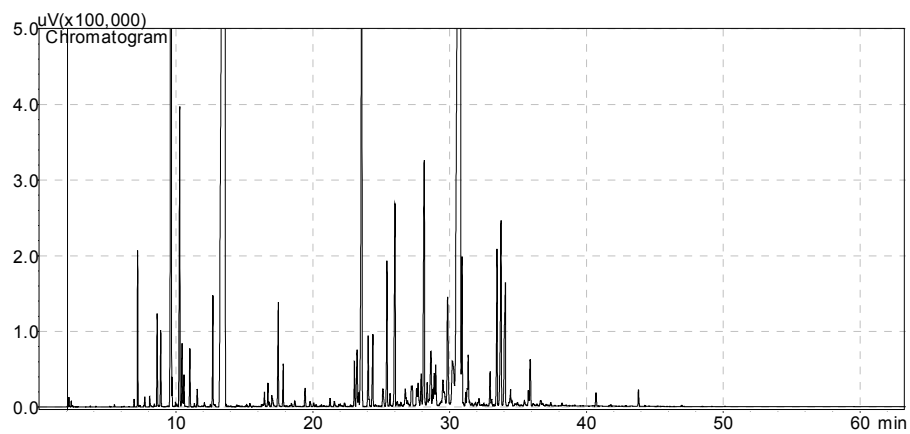
**Figura 109.** Cromatograma para amostra - AP P6



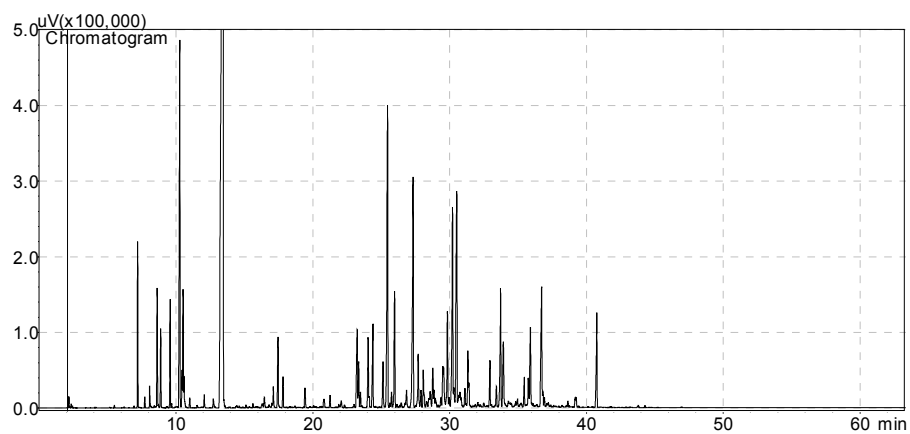
**Figura 110.** Cromatograma para amostra - AP P7



**Figura 111.** Cromatograma para amostra - AP P8



**Figura 112.** Cromatograma para amostra - AP P9



**Figura 113.** Cromatograma para amostra - AP P10