

Érica Aparecida Souza Silva

**Estudos dos óleos essenciais extraídos de resinas
de espécies *Protium spp.***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
(Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice.

São Carlos

2006

Dedicatória

A **Deus**

Que me permitiu trilhar este caminho
Protegendo-me dos males
Confortando-me no desalento
Dando-me forças para continuar
Sempre.

À minha mãe **Joelita**,
Mulher guerreira e determinada,
Minha maior fonte de inspiração na vida
Sempre com as palavras certas,
Gestos de bondade e compreensão suprema comigo,
Ensinou-me os valores
Mais importantes de minha vida,
A própria expressão do **Amor**.

À minha avó **Francisca** (*in memoriam*),
Por seu pulso forte, imprescindível,
Pelos ensinamentos infinitos,
Pelas histórias contadas sob a mangueira,
Momentos inesquecíveis,
Meu eterno **Amor e Gratidão**.

À **Aia**,
Por ser o anjo de nossas vidas,
Nossa pedra mais preciosa.

Ao **Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice**,

Pela orientação neste trabalho,

Pela paciência e confiança,

E especialmente,

Pela amizade.

À amiga **Sandra**,

Pelo companheirismo,

Não mediu esforços ajudando-me neste trabalho e,

Pela amizade verdadeira que nasceu.

Aos meus amigos,

Luccy, Júnior, Fabiana e Rachel,

Um agradecimento especial,

Pela lealdade, incentivo e

Infinita compreensão.

Agradecimentos

Aos amigos do Alojamento C-1, pela hospitalidade, amizade e momentos de descontração.

Aos amigos do Alojamento B-4 (Olimpo), pela amizade, momentos de diversão e discussões surreais.

Aos amigos Rafa, Daniel (Salame), Allan (Calcinha) pelo convívio e amizade durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Mário Sergio Galhiane do Laboratório de Química Analítica e Cromatografia Gasosa da UNESP de Bauru, pela ajuda imensurável neste trabalho, discussões, sugestões e, palavras de ensinamentos.

Ao Marcos Vinicius do Laboratório de Química Analítica e Cromatografia Gasosa da UNESP de Bauru, pela extrema solicitude durante as análises cromatográficas.

Ao Miguel Frasson pela super ajuda na editoração deste trabalho.

Aos colegas (alunos, técnicos e professores) dos grupos LATEQS e GQATP pela convivência no laboratório e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos do CAQI (Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC) pela simpatia e disposição em ajudar-me.

Ao Prof. Dr. Jamal Chaar da Universidade do Amazonas pelo envio das amostras.

Ao Dr. Paulo de Tarso Sampaio do Departamento de Silvicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela coleta e identificação das amostras.

Ao Dr. Antonio Carlos Siani da FioCruz, pela concessão dos artigos.

Às bibliotecárias do IQSC, por toda ajuda no transcorrer deste trabalho.

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira, pelas conversas no corredor do IQSC, serenidade e palavras de incentivo, sempre.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças, e ao Guilherme Miola do Grupo CROMA, por conceder o uso do CG/EM e por toda ajuda durante a análise das amostras.

À Silvia e Andréia do serviço de pós-graduação, pela paciência, simpatia e solicitude no atendimento.

Aos amigos do Centro Acadêmico (CAASO).

Aos meus familiares por acreditaram em mim.

A todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas e Siglas

Resumo

Abstract

1 – Introdução	15
1.1 – O Brasil e a Fitoquímica.....	15
1.2 – Óleos Essenciais	17
1.2.1 – Composição	18
1.2.2 – Características	21
1.2.3 – Toxicidade	21
1.2.4 – Localização	22
1.2.5 – Função biológica	22
1.2.6 – Aplicações	23
1.2.7 – Aspectos Econômicos	25
1.3 – Métodos de Extração de Óleos Essenciais.....	26
1.3.1 – Enfloração	26
1.3.2 – Prensagem	27
1.3.3 – Extração com Solvente Orgânico.....	27
1.3.4 – Extração por Fluido Supercrítico	27
1.3.5 – Arraste por Vapor d'Água.....	28
1.4 – <i>Protium spp.</i>	29
1.5 – Técnicas Espectrométricas.....	33
1.5.1 – Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Vísivel.....	33
1.5.2 – Espectrometria Vibracional na região do Infravermelho (IV) [42].....	35
1.5.3 – Espectrometria de Massas (EM)	35
1.6 – Técnicas Cromatográficas	37
1.6.1 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	37
1.6.2 – Cromatografia em Fase Gasosa (CG).....	38
1.6.2.1 – Detectores	39
1.6.2.1.1 – Detector de Massas (EM)	40
1.7 – Métodos de Quantificação	41
1.7.1 – Método do Padrão Externo	41
1.7.2 – Método de Adição de Padrão	41
1.7.3 – Método de Padrão Interno.....	42

Sumário

1.7.4 – Método de Normalização	42
1.8 – Objetivos do Trabalho	43
2 – Parte Experimental	44
2.1 – Identificação, Coleta e Armazenamento das Amostras	44
2.1.1 – Coleta e Identificação das Espécies <i>Protium spp.</i>	44
2.1.2 – Armazenamento das Amostras	44
2.2 – Extração dos Óleos Essenciais.....	44
2.2.1 – Determinação do Tempo de Extração.....	45
2.3 – Características Físicas dos Óleos Essenciais	45
2.3.1 – Densidade	45
2.3.2 – Índice de Refração	46
2.3.3 – Ponto de Ebulição	46
2.4 – Técnicas Espectroscópicas e Cromatográficas Utilizadas para Análise dos Óleos Essenciais.....	47
2.4.1 – Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV).....	47
2.4.2 – Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta (UV)	47
2.4.3 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	48
2.4.3.1 – Aplicação da Amostra	48
2.4.3.2 – Escolha da Fase Móvel	49
2.4.3.3 – Separação e Revelação	51
2.4.4 – Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas.....	52
2.4.4.1 – Quantificação	53
3 – Resultados e Discussão	54
3.1 – Extração dos Óleos Essenciais por Hidrodestilação.....	54
3.2 – Tempo de Extração dos Óleos Essenciais	55
3.3 – Propriedades Físico-Químicas dos Óleos Essenciais	57
3.4 – Análises Espectroscópicas dos Óleos Essenciais	60
3.4.1 – Análises por Infravermelho.....	60
3.4.2 – Análises por Ultravioleta.....	64
3.5 – Análises Cromatográficas dos Óleos Essenciais.....	65
3.5.1 – Análises por CG/EM.....	66
3.5.2 – Separação por CCD	112
3.5.3 – Quantificação dos Constituintes por Normalização Simples de Área	127
4 – Conclusões	131
4.1 – Perspectiva de Trabalhos Futuros	132
5 – Apêndice: Fragmentogramas Teóricos	133
6 – Apêndice: Fórmulas Estruturais	146
7 – Bibliografia	151

Lista de Figuras

Figura 1 – Biossíntese dos terpenos via ácido mevalônico [7].	20
Figura 2 – Sistema de cleverger modificado.	28
Figura 3 – Resina recém exsudada do tronco de <i>P. pallidum</i> (A); Resina envelhecida no tronco (B).	31
Figura 4 – Suporte de vidro com saída capilar pra DSC.	47
Figura 5 – Fluxograma genérico da metodologia experimental utilizada na CCD.	52
Figura 6 – Rendimento na extração do óleo essencial em função do tempo.	56
Figura 7 – Curvas termoanalíticas de DSC para os óleos essenciais das resinas <i>Protium spp.</i>	58
Figura 8 – Espectro de Infravermelho do óleo essencial extraído da resina de <i>P. hebetatum</i> .	61
Figura 9 – Espectro de Infravermelho do óleo essencial extraído da resina de <i>P. nitidifolium</i> .	61
Figura 10 – Espectro de Infravermelho do óleo essencial extraído da resina de <i>P. amazonicum</i> .	62
Figura 11 – Espectro de Infravermelho do óleo essencial extraído da resina de <i>P. divarictium</i> .	62
Figura 12 – Espectros de absorção no UV dos óleos essenciais extraídos das espécies <i>Protium ssp.</i>	65
Figura 13 – Cromatograma CG/EM do óleo essencial extraído da resina de <i>Protium hebetatum</i> .	66
Figura 14 – Cromatograma CG/EM do óleo essencial extraído da resina de <i>Protium nitidifolium</i> .	67
Figura 15 – Cromatograma CG/EM do óleo essencial extraído da resina de <i>Protium divarictium</i> .	67
Figura 16 – Cromatograma CG/EM do óleo essencial extraído da resina de <i>Protium amazonicum</i> .	68
Figura 17 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Triciclano (pico 1) na amostra <i>P. hebetatum</i> .	71
Figura 18 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Pineno (pico 2): a) <i>P. hebetatum</i> ; b) <i>P. nitidifolium</i> ; c) <i>P. divarictium</i> ; d) <i>P. amazonicum</i> .	73

Lista de Figuras

Figura 19 – Fragmentograma experimental do componente identificado como α -Fencheno (pico 3) na amostra <i>P. hebetatum</i>	74
Figura 20 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Canfeno (pico 4): a) <i>P. hebetaum</i> ; b) <i>P. nitidifolium</i> ; c) <i>P. divarictium</i> ; d) <i>P. amazonicum</i>	76
Figura 21 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Sabineno (pico 5) na amostra <i>P. nitidifolium</i>	76
Figura 22 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como β -Pineno (pico 6): a) <i>P. hebetaum</i> ; b) <i>P. nitidifolium</i> ; c) <i>P. divarictium</i> ; d) <i>P. amazonicum</i>	78
Figura 23 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como cis-Pinano (pico 7): a) <i>P. nitidifolium</i> ; b) <i>P. divarictium</i> ;.....	79
Figura 24 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como 3-p-Menteno (pico 8): a) <i>P. hebetatum</i> ; b) <i>P. divarictium</i> ; c) <i>P. amazonicum</i>	81
Figura 25 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Felandreno (pico 9): a) <i>P. hebetatum</i> ; b) <i>P. divarictium</i>	82
Figura 26 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como δ -2-Careno (pico 10): a) <i>P. hebetaum</i> ; b) <i>P. divarictium</i>	83
Figura 27 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como o-Cimeno (pico 11): a) <i>P. hebetaum</i> ; b) <i>P. nitidifolium</i> ; c) <i>P. divarictium</i> ; d) <i>P. amazonicum</i>	85
Figura 28 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Limoneno (pico 12): a) <i>P. hebetaum</i> ; b) <i>P. nitidifolium</i> ; c) <i>P. divarictium</i> ; d) <i>P. amazonicum</i>	87
Figura 29 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como γ -Terpineno (pico 13): a) <i>P. hebetaum</i> ; b) <i>P. nitidifolium</i>	88
Figura 30 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Terpinoleno (pico 14) na amostra <i>P. nitidifolium</i>	88
Figura 31 – Fragmentograma experimental do componente identificado como p-Cimeneno (pico 15) na amostra <i>P. divarictium</i>	89
Figura 32 – Fragmentograma experimental do componente identificado como trans-Sabinol (pico 16) na amostra <i>P. nitidifolium</i>	89
Figura 33 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Terpin-4-ol (pico 17): a) <i>P. hebetaum</i> ; b) <i>P. nitidifolium</i> ; c) <i>P. divarictium</i>	91
Figura 34 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Terpineol (pico 18): a) <i>P. hebetatum</i> ; b) <i>P. nitidifolium</i> ; c) <i>P. divarictium</i>	92
Figura 35 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Tuj-3-em-10-al (pico 19) na amostra <i>P. nitidifolium</i>	93
Figura 36 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Verbenona (pico 20) na amostra <i>P. nitidifolium</i>	93

Lista de Figuras

Figura 37 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como δ -Elemeno (pico 21): a) <i>P. nitidifolium</i> ; b) <i>P.a amazonicum</i>	94
Figura 38 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Cubebeno (pico 22): a) <i>P. hebetatum</i> ; b) <i>P. divarictium</i> ; c) <i>P. amazonicum</i>	96
Figura 39 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Ciclosativeno (pico 23): a) <i>P. divarictium</i> ; b) <i>P. amazonicum</i>	97
Figura 40 – Fragmentograma experimental do componente identificado como β -Elemeno (pico 24) na amostra <i>P. amazonicum</i>	97
Figura 41 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Z-cariofileno (pico 25) na amostra <i>P. amazonicum</i>	98
Figura 42 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como E-Cariofileno (pico 26): a) <i>P. hebetatum</i> ; b) <i>P. nitidifolium</i> ; c) <i>P. divarictium</i> ; d) <i>P. amazonicum</i>	100
Figura 43 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Cedrano (pico 27): a) <i>P. divarictium</i> ; b) <i>P. amazonicum</i> ;	101
Figura 44 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Humuleno (pico 28): a) <i>P. nitidifolium</i> ; b) <i>P. divarictium</i> ; c) <i>P. amazonicum</i>	102
Figura 45 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Seicheleno (pico 29): a) <i>P. hebetatum</i> ; b) <i>P. divarictium</i>	103
Figura 46 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como γ -Muuroleno (pico 30): a) <i>P. nitidifolium</i> ; b) <i>P. amazonicum</i>	104
Figura 47 – Fragmentograma experimental do componente identificado como α -Selineno (pico 31) na amostra <i>P. nitidifolium</i>	105
Figura 48 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como δ -Cadideno (pico 32): a) <i>P. hebetatum</i> ; b) <i>P. divarictium</i> ; c) <i>P. amazonicum</i>	106
Figura 49 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Elemol (pico 33) na amostra <i>P. nitidifolium</i>	107
Figura 50 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Óxido de Cariofileno (pico 34) na amostra <i>P. divarictium</i>	107
Figura 51 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como cis-diidro-Acetato de Ocidentalol (pico 35): a) <i>P. nitidifolium</i> ; b) <i>P. amazonicum</i>	108
Figura 52 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Drimenol (pico 36) na amostra <i>P. divarictium</i>	109
Figura 53 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como trans-diidro-Acetato de Ocidentalol (pico 37): a) <i>P. divarictium</i> ; b) <i>P. amazonicum</i>	110

Lista de Figuras

Figura 54 – Fragmentograma experimental do componente identificado como 2-Acetato de Fenil-Etil-Fenila (pico 38) na amostra <i>P. divarictium</i>	110
Figura 55 – Metodologia empregada na análise por CCD.....	113
Figura 56 – Visualização sob luz UV _{254 nm} da separação dos constituintes dos óleos essenciais de <i>Protium spp.</i> por CCD (fase móvel 1).	114
Figura 57 – Visualização sob luz UV _{254 nm} da separação dos constituintes dos óleos essenciais de <i>Protium spp.</i> por CCD (fase móvel 2).	114
Figura 58 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F1 (<i>P. hebetatum</i>).	115
Figura 59 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F5 (<i>P. hebetatum</i>).	116
Figura 60 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F6 (<i>P. nitidifolium</i>).	117
Figura 61 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F7 (<i>P. divarictium</i>).	118
Figura 62 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F8 (<i>P. amazonicum</i>).	118
Figura 63 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F9 (<i>P. hebetatum</i>).	119
Figura 64 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F10 (<i>P. nitidifolium</i>).	120
Figura 65 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F10 (<i>P. divarictium</i>).	120
Figura 66 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F12 (<i>P. hebetatum</i>).	121
Figura 67 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F14 (<i>P. amazonicum</i>).	122
Figura 68 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F15 (<i>P. hebetatum</i>).	123
Figura 69 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F16 (<i>P. nitidifolium</i>).	124
Figura 70 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F17 (<i>P. divarictium</i>).	124
Figura 71 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F18 (<i>P. amazonicum</i>).	125
Figura 72 – Fragmentograma teórico do composto Triciclano (1).	133
Figura 73 – Fragmentograma teórico do composto α -Pinoeno (2).	133
Figura 74 – Fragmentograma teórico do composto α -Fencheno (3).	133
Figura 75 – Fragmentograma teórico do composto Canfeno (4).	134
Figura 76 – Fragmentograma teórico do composto Sabineno (5).	134
Figura 77 – Fragmentograma teórico do composto β -Pinoeno (6).	134
Figura 78 – Fragmentograma teórico do composto cis-Pinano (7).	135
Figura 79 – Fragmentograma teórico do composto 3-p-Menteno (8).	135
Figura 80 – Fragmentograma teórico do composto α -Felandreno (9).	135
Figura 81 – Fragmentograma teórico do composto 2- δ -Careno (10).	136
Figura 82 – Fragmentograma teórico do composto o-Cimeno (11).	136
Figura 83 – Fragmentograma teórico do composto Limoneno (12).	136
Figura 84 – Fragmentograma teórico do composto γ -Terpineno (13).	137
Figura 85 – Fragmentograma teórico do composto γ -Terpinoleno (14).	137
Figura 86 – Fragmentograma teórico do composto p-Cimeno (15).	137

Lista de Figuras

Figura 87 – Fragmentograma teórico do composto trans-Sabinol(16).	138
Figura 88 – Fragmentograma teórico do composto Terpin-4-ol (17).	138
Figura 89 – Fragmentograma teórico do composto α -Terpineol (18).	138
Figura 90 – Fragmentograma teórico do composto Tuj-3-en-10-al (19).	139
Figura 91 – Fragmentograma teórico do composto Verbenona (20).	139
Figura 92 – Fragmentograma teórico do composto δ -Elemeno (21).	139
Figura 93 – Fragmentograma teórico do composto α -Cubebeno (22).	140
Figura 94 – Fragmentograma teórico do composto Ciclosativeno (23).	140
Figura 95 – Fragmentograma teórico do composto β -Elemeno (24).	140
Figura 96 – Fragmentograma teórico do composto Z-Cariofileono (25).	141
Figura 97 – Fragmentograma teórico do composto E-Cariofileono (26).	141
Figura 98 – Fragmentograma teórico do composto Cedrano (27).	141
Figura 99 – Fragmentograma teórico do composto α -Humuleno (28).	142
Figura 100 – Fragmentograma teórico do composto Seicheleno (29).	142
Figura 101 – Fragmentograma teórico do composto γ -Muuroleno (30).	142
Figura 102 – Fragmentograma teórico do composto α -Selineno (31).	143
Figura 103 – Fragmentograma teórico do composto δ -Cadideno (32).	143
Figura 104 – Fragmentograma teórico do composto Elemol (33).	143
Figura 105 – Fragmentograma teórico do composto Óxido de Cariofileno (34).	144
Figura 106 – Fragmentograma teórico do composto cis-Diidro Acetato de Ocidentalol (35).	144
Figura 107 – Fragmentograma teórico do composto Drimenol (36).	144
Figura 108 – Fragmentograma teórico do composto trans-Diidro Acetato de Ocidentalol (37).	145
Figura 109 – Fragmentograma teórico do composto 2-Acetato de di-Fenil Etila (38).	145

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Dados encontrados na literatura sobre a composição dos óleos essenciais extraídos de espécies <i>Protium</i>	32
Tabela 2 – Mistura de solventes utilizados para o desenvolvimento das cromatoplasas.	50
Tabela 3 – Rendimento dos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação.....	54
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas dos óleos essenciais extraídos das resinas das espécies <i>Protium spp.</i>	59
Tabela 5 – Possível identificação dos constituintes nos óleos essenciais de <i>Protium spp.</i> ...	69
Tabela 6 – Concentração relativa dos componentes possivelmente identificados nos óleos essenciais de <i>Protium spp.</i>	128

Lista de Abreviaturas ou Siglas

α	Alfa
β	Beta
λ	Comprimento de Onda
δ	Delta
γ	Gama
ϵ°	Constante Dielétrica
$^\circ\text{C}$	Graus Celsius
$^\circ\text{C min}^{-1}$	Graus Celsius por Minuto
μL	Microlitro
$\epsilon_{\text{máx}}$	Absortividade Molar
A	Absorbância
Acetil CoA	Acetil Coenzima A
AcOEt	Acetato de Etila
AM	Amazonas
AMV	Ácido Mevalônico
b	Caminho Ótico
c	Concentração
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM	Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas
CGC	Cromatografia Gás-Sólido
CH_2Cl_2	Diclorometano
CHCl_3	Clorofórmio
CLC	Cromatografia Gás-Líquido
cm^{-1}	Número de Ondas
DMAPP	Pirofosfato de 3,3-Dimetilalila
DSC	Differential Scanning Calorimetry
eV	Elétron Volt
FPP	Pirofosfato de Farnesila
g	Gramas

Lista de Abreviaturas e Siglas

GGPP	Pirofosfato de Geranil Geraniol
GPP	Pirofosfato de Geranila
h	Horas
Hex	Hexano
I.E.	Impacto de elétrons
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
IPP	Pirofosfato de Isopentila
ISO	Organização Internacional de Padrão
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de Potássio
LM	Lanças & Mário
M ^{•+}	Cátion Radical
m/z	Massa/Carga
m ²	Metros Quadrados
min.	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mol. L ⁻¹	Mol por Litro
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio
Nm	Nanômetro
<i>P.</i>	<i>Protium</i> (gênero)
P.I.	Padrão Interno
R _f	Fator de Retenção
s	Segundos
T	Transmitância
T _R	Tempo de Retenção
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	Ultravioleta
v	Volume
v/v	Volume/Volume
W g ⁻¹	Watt por Grama

Resumo

Protium é o principal gênero pertencente à família Burseraceae e um dos gêneros mais comum na América do Sul, sendo representativo na flora da Região Amazônica. Na medicina popular, as oleorresinas das espécies *Protium* são amplamente utilizadas para diversos propósitos pelas tribos nativas das regiões onde estas espécies ocorrem. No presente estudo, os óleos essenciais de quatro espécies *Protium* foram extraídos, quantitativamente por hidrodestilação. Estas resinas foram coletadas de árvores catalogadas no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), na Reserva Ducke, Manaus/AM, em novembro de 2004. Foram determinadas as características físico-químicas destes óleos. Técnicas espectroscópicas, como espectrometria de absorção no infravermelho (IV), espectrometria de absorção no ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (EM), foram utilizadas como ferramentas qualitativas nas análises destes óleos. Foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD) para a separação dos constituintes destes óleos em frações. Para identificação e quantificação dos componentes destes óleos foi utilizada cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os espectros de massas obtidos para os componentes individuais dos óleos foram analisados por comparação com os espectros da literatura [52]. Os rendimentos nas extrações foram: 3,1% (*P. hebetatum*), 3,33% (*P. nitidifolium*), 2,6% (*P. divarictium*) e 2,77% (*P. amazonicum*). No óleo extraído da espécie *P. hebetatum* foram identificados 17 compostos, sendo os monoterpenos constituintes predominantes na composição deste óleo. No óleo extraído das espécies *P. nitidifolium* e *P. divarictium* foram identificados 21 e 23 componentes, respectivamente. No óleo extraído da espécie *P. amazonicum* foram identificados 18 compostos. Uma característica notável nesta amostra é a predominância de sesquiterpenos em sua composição. A literatura relata a predominância de sesquiterpenos exclusivamente em óleos essenciais extraídos de folhas de espécies *Protium spp.* É importante salientar ainda, que não há relatos na literatura acerca de óleos essenciais das espécies *P. amazonicum* e *P. divarictium*.

Abstract

Protium is the main genus in the Burseraceae family and is one of the most widespread genera in South America, being very representative in the flora of the Amazon region. In the folk medicine, the oleoresins from species of *Protium* are widely used for several purposes by the native tribes in the regions where they occur. In the present study the essential oils of four species of *Protium* were extracted quantitatively by hidrodestillation from aged resins. These samples were collected from trees catalogued by the National Institute of Resesarch of Amazonia (INPA), in the National Forest Ducke, Manaus – Amazonas, in November 2004. The oils extracted were analyzed in order to determine its physical-chemical characteristics. Spectroscopic techniques such as infrared absorption spectroscopy, ultraviolet absorption spectroscopy and mass spectrometry were used to analyze these oils. Thin layer chromatography was used to separate the fractions of the components from these samples. For the identification and quantification of the components, the coupled gas chromatography-mass spectrometry technique was employed. The registered mass spectra of these oils compounds were compared with those of the literature [52]. The extractions yields were 3.1% (*P. hebetatum*), 3.33% (*P. nitidifolium*), 2.6% (*P. divarictium*) and 2.77% (*P. amazonicum*). In the *P. hebetatum* oil 17 compounds were identified, being the monoterpenes predominate in this oil composition. In the *P. nitidifolium* oil 21 compounds were identified and, in the *P. divarictium* oil 23 compounds. In the *P. amazonicum* oil 18 compounds were identified, and the major constituent identified was the sesquiterpene cedrane. A noticeable feature is the predominance of sesquiterpenes in the composition of the *P. amazonicum* oil. These compounds are reported to be majoritary in essential oils extracted of *Protium* species leaves. It is important to notice that, in the present moment, no data was reported about *P. amazonicum* and *P. divarictium* essential oils. The results show a high potential of these species as a relevant research area, mainly in Brazil that owns the major flora of the world, the Amazon Forest.

1 – Introdução

Essa introdução dará uma visão sobre os principais tópicos abordados nesta dissertação, desde a importância de estudos fitoquímicos no contexto brasileiro, aspectos econômicos, e menções sobre as espécies em estudo *Protium spp*, passando pelos meios de extração e técnicas de caracterização do óleo essencial, bem como a finalização do trabalho com a quantificação dos componentes majoritários destes óleos essenciais.

1.1 – O Brasil e a Fitoquímica

A fitoquímica é a ciência destinada ao estudo dos componentes químicos das plantas. A aplicação dos estudos fitoquímicos pode se ramificar para a área médica, assim como para a taxonomia e química, entre outras aplicações.

Os vegetais produzem uma diversidade de substâncias, produtos do metabolismo secundário, alguns responsáveis pela coloração e aroma de flores e frutos, outras vinculadas com a interação ecológica. O conhecimento dos constituintes químicos de diversas partes da planta favorece o seu uso sustentável e contribui para sua conservação.

As fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação as possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância medicinal ou comercial [1].

A diversidade de estruturas moleculares foi indicada como razão fundamental do atual interesse das grandes indústrias pelos produtos naturais [1].

Por volta de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu o valor das plantas medicinais, considerando os promissores e consagrados resultados da medicina tradicional chinesa [1].

Como consequência do retorno aos produtos naturais como fonte de medicamentos, muitos fármacos importantes foram desenvolvidos de 1980 até o presente [1].

O panorama atual para a fitoquímica é muito mais importante, decisivo e perigoso para o Brasil, ao considerarmos sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo, as possibilidades, e a falta de estímulo e legislação visando o desenvolvimento científico nesta área [2].

Em solo brasileiro estão seis ecossistemas, entre eles a maior floresta tropical do mundo, a Amazônia. Em, aproximadamente, cada 100 m² da mata encontra-se de 100 a 300 espécies de plantas. Um gigantesco laboratório da natureza que garante ao Brasil o título de país de maior biodiversidade da terra [3]

A biodiversidade da flora existente no Brasil e, em particular na floresta amazônica, representa um grande potencial para o estudo fitoquímico, porém tal estudo deve ser realizado com responsabilidade, de modo a não acarretar o desaparecimento de suas espécies [2].

Tomando como exemplo as espécies produtoras de óleos essenciais, de acordo com a família que pertencem, estas espécies acumulam esse óleo em órgãos anatômicos específicos. Do ponto de vista da exploração da biodiversidade vegetal, quando este órgão representa um substrato renovável (resina, folha, flor,

fruto ou semente), é possível extrair-se o óleo essencial sem eliminar a planta. Isso a torna uma fonte de óleo ecologicamente correta [4].

Caso, não seja possível a preservação desta planta, um reflorestamento compensador deve ser feito. Trata-se de um problema de grande proporção, pois dentro de algumas décadas as reservas naturais poderão estar chegando ao seu fim, devido à prática extrativa indiscriminada.

Uma empresa suíça, a Novartis, fez um acordo, no início desta década, com a organização social brasileira BioAmazônia para a exploração de matéria-prima na Amazônia. Este acordo previa o envio em larga escala, para o exterior, de derivados da biodiversidade amazônica, permitindo que a Novartis patenteasse e controlasse, com exclusividade, os produtos desenvolvidos por ela a partir de microorganismos, fungos e plantas coletadas pela BioAmazônia [5].

Caso o Brasil não revise sua atual política extrativista, diante desta nova busca mundial pelos produtos naturais, corre o risco de perder seu patrimônio vegetal, por não ter uma rígida legislação que cuide do controle sustentável da biodiversidade do país.

1.2 – Óleos Essenciais

A ISO (International Standardization Organization) define óleos essenciais ou, óleos voláteis, como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água [6].

Os óleos essenciais são misturas complexas e muito variáveis de constituintes voláteis que pertencem de forma quase exclusiva a duas séries,

caracterizadas por suas origens biossintéticas distintas: a série terpênica e a série, muita menos freqüente, dos fenilpropanóides [7].

Também podem ser chamados de óleos essenciais, óleos etéreos, ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físicas, como por exemplo, a de terem aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo, daí, a designação de óleo.

1.2.1 – Composição

A composição dos óleos essenciais das plantas é determinada geneticamente, podendo variar com os seguintes fatores: a) origem botânica (a composição de um óleo essencial está em função da espécie produtora); b) quimiotipo (os constituintes químicos do óleo essencial variam com a geografia); c) ciclo vegetativo (dependendo da época do ano pode variar a porcentagem dos constituintes); d) fatores da natureza, climáticos e tipo de solo influenciam na produção do óleo essencial; e) procedimento de obtenção (o modo de extração pode influenciar na composição química do óleo, extraindo ou não determinados constituintes) [7].

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. O primeiro, essencial a todos os seres vivos, são os metabólitos primários, ou macromoléculas, como os lipídios, proteínas e glicídios que, às custas de energia originam o segundo grupo de compostos químicos, os metabólitos secundários, que são micromoléculas com estruturas complexas, possuindo atividades biológicas com funções variadas [8].

Destaca-se como a principal função das substâncias produzidas pelo metabolismo secundário a de proteger os organismos que as produzem.

Os óleos essenciais, no entanto, são formados por constituintes variados, desde hidrocarbonetos terpênicos, alcalóides, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até compostos sulfurados, constituintes do metabolismo secundário. Entretanto, a grande maioria dos óleos essenciais é formada por terpenos voláteis.

Os terpenos são substâncias que possuem como unidade básica a molécula de isopreno $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH=CH}_2$. Seu precursor na natureza, no entanto, é o ácido mevalônico, produzido a partir do acetil CoA (acetato ativo), que dá origem ao pirofosfato de isopentila (IPP) e ao pirofosfato de 3,3-dimetilalila (DMAPP) [5,9].

O próprio isopreno não intervém na biossíntese e esta “regra isoprênica” utilizada na classificação dos terpenos é meramente teórica, mas tem a vantagem de mostrar perfeitamente a unidade biossintética deste grupo, e de dar conta da subdivisão dos terpenos segundo o número de unidades que intervêm: monoterpenos (10 unidades de carbono); sesquiterpenos (15 unidades de carbono); diterpenos (20 unidades de carbono); sesteterpenos (25 unidades de carbono); triterpenos e esteróides (30 unidades de carbonos); tetraterpenos ou carotenóides (40 unidades de carbono).

Na síntese dos terpenos é fundamental a ocorrência de três seqüências reacionais:

1. Formação do “isopreno ativo” a partir do acetato via ácido mevalônico;
2. Acoplamento “cabeça-cauda” das unidades de C5 que justifica a existência de mono, sesqui, di e sesteterpenos;
3. Acoplamento “cauda-cauda” das unidades de C15 ou C20 que justifica a existência de triterpenos, esteróides e carotenóides [7].

A **Figura 1** ilustra a rota de biossíntese dos terpenos via ácido mevalônico.

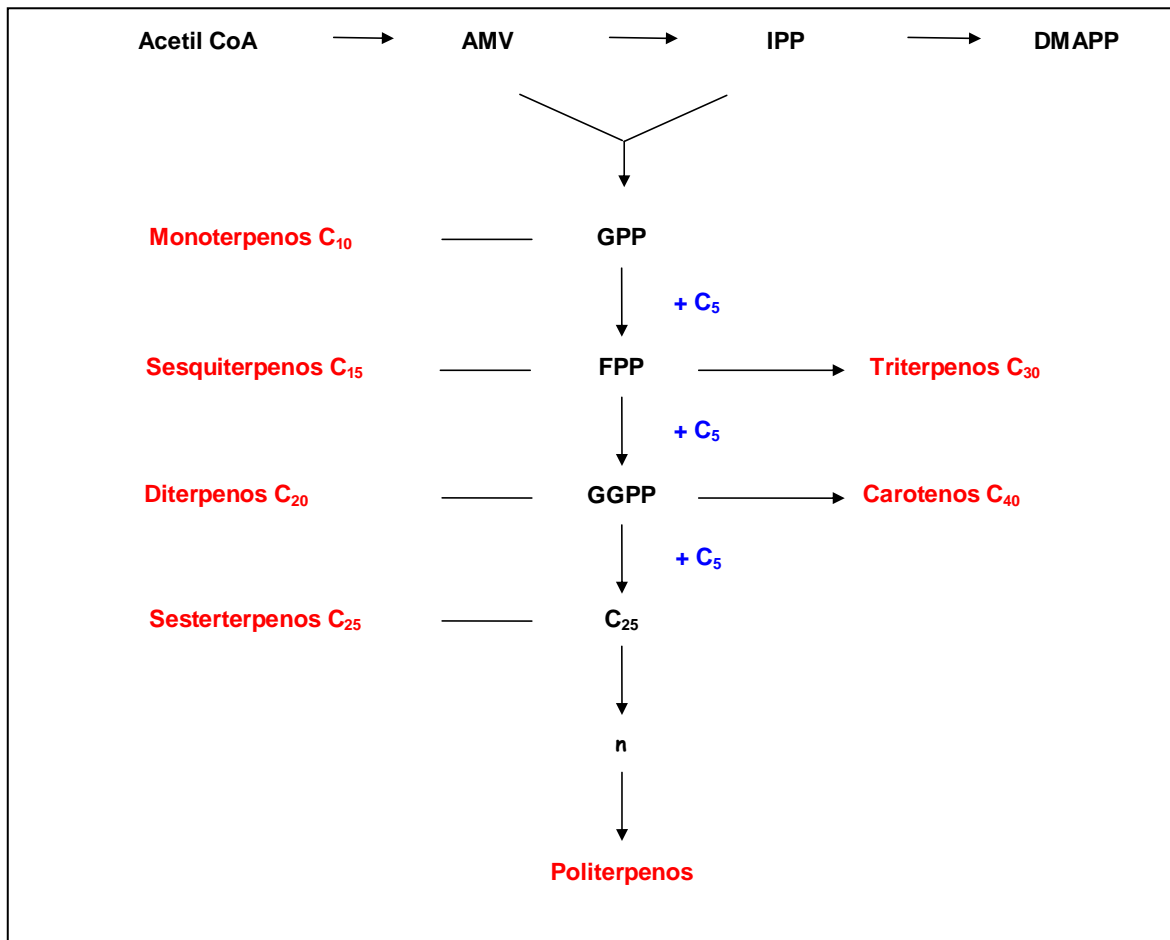


Figura 1 – Biossíntese dos terpenos via ácido mevalônico [7].

Os terpenos e seus derivados oxigenados podem ser de cadeias abertas ou cíclicas, suas diversidades estruturais resultam nas diferentes atividades biológicas observadas nos óleos essenciais.

Rearranjos, degradação oxidativa ou introdução de novos átomos de carbono podem transformar um esqueleto terpênico em outro que não apresenta a seqüência normal de átomos de carbono que caracteriza a classe. Substâncias assim formadas são também consideradas como terpenos, uma vez que a rota de biossíntese inicial é a mesma [10].

1.2.2 – Características

A principal característica dos óleos essenciais é a volatilidade, diferindo-se assim, dos óleos fixos que são misturas de substâncias lipídicas, obtidos geralmente das sementes.

Os óleos essenciais são líquidos à temperatura ambiente, tem coloração clara e, em geral, sua densidade é menor que a da água. Quase sempre dotados de poder de rotação, têm índice de refração elevado. Solúvel em álcoois, e em solventes orgânicos habituais, são lipossolúveis e muito pouco solúveis em água, são arrastáveis por vapor d'água [7].

1.2.3 – Toxicidade

A conotação “produto natural” colocada ao público pode levar a uma interpretação errada, levando, algumas vezes, a um emprego abusivo destas substâncias, ou, a uma automedicação perigosa.

1.2.4 – Localização

Os óleos essenciais são raramente encontrados no grupo das Gimnospermas (com exceção das coníferas). Ao contrário, as Angiospermas são plantas ricas em óleos essenciais tais como as encontradas nas famílias Lauraceae, Piperaceae, Rutaceae, Burseraceae, entre outras [8].

Dependendo da família a síntese e o acúmulo dos óleos essenciais vem associados a presença de estruturas histológicas especializadas, localizadas em determinados pontos do tecido vegetal, como em pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos e bolsas que podem estar presentes em alguns dos seguintes órgãos das plantas: flores, frutos, lenhos, cascas, raízes e sementes [7-8].

1.2.5 – Função biológica

A formação dos óleos essenciais ainda é muito discutida, assim como sua função na planta. Para alguns citologistas os óleos essenciais seriam matérias-primas residuais resultantes de fenômenos metabólicos, que a planta excretaria de suas células afim de eliminá-los.

Sabe-se, porém, que a formação destes óleos essenciais tem íntima ligação com a qualidade de vida ou, por assim dizer, sobrevivência da planta.

Estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microorganismos e predadores, e também, na atração de insetos e outros agentes fecundadores [4].

Exalados como bálsamos ou resinas, agem nas árvores como selos protetores contra doenças ou parasitas. Os componentes dos óleos essenciais são

quimicamente ativos podendo participar de reações metabólicas, assim como a complexidade de sua composição permite uma interação química complexa e seletiva da planta frente ao meio ambiente [8].

Os óleos essenciais são quase sempre bacteriostáticos e, freqüentemente bactericida. Tem função na polinização, como meio de defesa frente à predadores, microorganismos, parasitas, insetos e herbívoros. Possuem ação tóxico-protetora sobre a germinação, ação esta facilitada pela localização periférica dos órgãos secretores [7,11].

1.2.6 – Aplicações

O uso de óleos essenciais como agentes medicinais é conhecido desde a remota antiguidade. Há registros pictóricos de seis mil anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males, às unções de realeza, e a busca de bem estar físico através de aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, flores, folhas e sementes.

As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, através do processo de destilação introduzido pelos cientistas mulçumanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos [4].

Sem dúvida, os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos. Esta capacidade, presente na maioria destes compostos, de certa maneira, representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos patogênicos.

A maior parte dos trabalhos sobre atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais na literatura especializada versa sobre o aspecto antimicrobiano destes (bactericida e fungicida) [12-17].

Muitos autores associam a atividade bactericida dos óleos aos seus constituintes hidrocarbonetos, sugerindo que maior será a atividade bactericida deste óleo quanto maior for sua composição de monoterpenos hidrocarbonetos.

Algum trabalho também já foi feito com o intuito de comprovar que estes monoterpenos também são responsáveis pela atividade antifúngica dos óleos essenciais [13].

Há ainda na literatura relatos sobre atividades antiinflamatória, antioxidante e inseticida de óleos essenciais [12,15,16,18,20].

Seguindo um paradigma análogo ao papel dos terpenóides nas plantas, a pesquisa dos óleos essenciais como agentes repelentes de insetos vem revelando o potencial destes compostos nesta área. Foram realizados com sucesso alguns testes biológicos de repelência aos insetos vetores de doenças, como os mosquitos do gênero *Aedes*, transmissores da dengue, e o transmissor da doença de chagas [21-23].

Alguns óleos essenciais mostraram-se ativos em testes in vitro contra o agente infectante da malária, outros demonstraram atividade inibidora em alguns vírus, incluindo herpes simplex 1, influenza e HIV [24-26].

Esta série de resultados confirma o potencial uso dos óleos essenciais de plantas em indústrias farmacêuticas, e alimentícias na preservação de produtos alimentícios contra fungos e bactérias, e no combate a doenças de origem

microbiológica. Podendo ainda, alguns destes óleos serem sugeridos como alternativa ecologicamente correta de inseticida.

1.2.7 – Aspectos Econômicos

Pela utilização crescente nas indústrias de alimentos, cosméticos, e farmacêuticas, o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos essenciais constituem importantes atividades econômicas. Assim sendo, há na economia mundial um movimento enorme de capital pelas indústrias de essências.

Algumas indústrias consomem quantidades importantes de essências específicas, utilizando-as na flotação de minérios, preparação de agentes molhantes, inseticidas, bem como na medicina, onde ainda fornecem compostos de partida para a síntese de outras substâncias úteis na indústria farmacêutica [5].

O Brasil ocupa atualmente um lugar de destaque neste vasto campo. O maior incentivo foi a escassez de vários óleos essenciais durante a Segunda Guerra Mundial. O Brasil chegou a conquistar o primeiro lugar na produção de alguns óleos, tanto de plantas de sua flora, quanto de culturas organizadas, uma vez que, grande parte dos óleos essenciais mundialmente comercializados são oriundos de culturas racionalizadas, visando a maior reprodutibilidade do perfil químico do produto.

O maior problema para o desenvolvimento das indústrias produtoras de óleos essenciais é a grande concorrência com os similares sintéticos. Estes óleos sintéticos podem ser imitações dos naturais, porém de constituição limitada em relação à diversidade de compostos presentes nos naturais. Por isso, em alguns setores, como, por exemplo, nas indústrias cosmética e alimentícia, há uma

preferência pelo produto natural, pois o sintético não confere as mesmas propriedades do natural, principalmente no que se refere ao aroma [27].

São os casos da empresa de cosméticos Natura, que utiliza plantas originalmente brasileiras, mas cultivadas em culturas organizadas e certificadas, na fabricação de alguns produtos e, da empresa alimentícia Nestlé, que vem utilizando flavorizantes naturais, os quais correspondem a 75% do total utilizado por esta indústria.

1.3 – Métodos de Extração de Óleos Essenciais

Os processos de extração variam conforme a localização do óleo essencial na planta e com a finalidade de utilização do mesmo. A seguir, encontram-se alguns exemplos dos métodos de extração mais utilizados.

1.3.1 – Enfloração

Esse método já foi muito utilizado, mas atualmente é empregado apenas por indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial, como na extração do óleo essencial de pétalas de flores. O método consiste no depósito das pétalas, à temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um certo tempo. Em seguida, essas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura, baixa pressão e o produto assim obtido possui alto valor comercial [7].

1.3.2 – Prensagem

Esse método é empregado para a extração dos óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é então separada. Posteriormente o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada [7].

1.3.3 – Extração com Solvente Orgânico

Os óleos essenciais são extraídos, preferencialmente, com solventes orgânicos (éter, éter de petróleo ou diclorometano) que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além do óleo essencial. Por isso, os produtos assim obtidos raramente possuem valor comercial [7].

1.3.4 – Extração por Fluido Supercrítico

Esse método permite recuperar de modo bastante eficiente não somente os aromas de óleos essenciais, como vários outros tipos, sendo atualmente um dos principais métodos de escolha para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31°C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação [6,27].

1.3.5 – Arraste por Vapor d'Água

Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o Sistema de Clevenger [28]. Com uma variação deste método, inclusive no sistema de Clevenger, faz-se a extração do óleo volátil pela mistura do material vegetal à água. Chamada de hidrodestilação obtém-se também o hidrolato, que é a parte aquosa com a presença de uma porcentagem do óleo essencial que é solúvel nesta. O óleo coletado deve ser seco com Sulfato de Sódio (Na_2SO_4) Anidro [2,6,11].

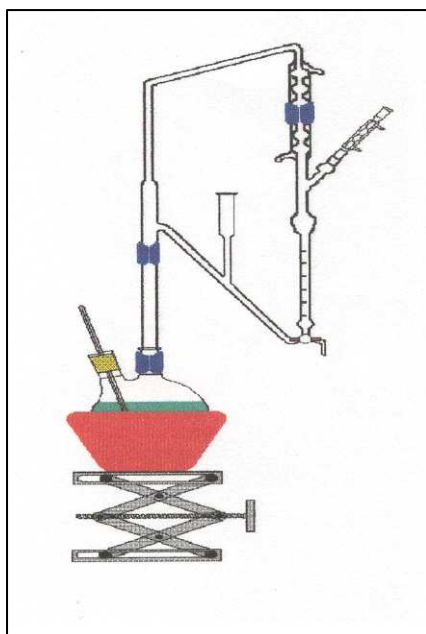


Figura 2 – Sistema de clevenger modificado.

1.4 – *Protium* spp.

A família Burseraceae compreende aproximadamente 600 espécies e 21 gêneros distribuídos em três tribos: Protieae (4 gêneros) , Bowellieae (8 gêneros) e Canarieae (9 gêneros) [29].

Espécies desta família são caracterizadas por exsudar resinas, que se encontram armazenadas em dutos ou cavidades. As Burseraceae quase sempre têm traços de látex branco resinoso tanto em seus ramos, como dispersos em formas de gotículas em talhos feitos na casca. Ferimentos nos troncos são caracterizados pelo esbranquiçamento, devido à rápida secagem da resina aromática [29].

O fluxo natural da resina é obtido também pela ação de insetos e, uma escala de produção comercial pode ser eventualmente induzida por meios químicos [29].

A presença desta resina exsudada é, em muito, responsável pela proeminência destas espécies Burseraceae na etnobotânica das regiões onde estas ocorrem, e mostra-se como uma fonte botânica muito atrativa, comercialmente, de compostos aromáticos [29-30].

O gênero *Protium*, que têm cerca de 135 espécies, é o maior e mais heterogêneo gênero na tribo Protieae, predominante nos Neotrópicos. Mais de 80% das espécies Burseraceae na região amazônica, por exemplo, pertencem a este gênero [29].

O gênero *Protium* é amplamente encontrado na região amazônica, onde suas óleo-resinas são popularmente conhecidas como “breus” [31-34].

Estas resinas são colhidas na floresta sob as árvores e então vendidas nos mercados da região amazônica para vários propósitos [30].

Na medicina popular é considerada um importante agente terapêutico, sendo utilizada como antiinflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante [31-32].

Baseado nas experiências das populações nativas em utilizar este gênero como antiinflamatório, Otuki *et al* (2005) obteve excelentes resultados utilizando o extrato etéreo de *Protium kleinii*, como antiinflamatório de uso tópico [35].

A resina é utilizada também na indústria de verniz e calefetação de embarcações e outros objetos de madeira [31-32,36], e também é popularmente queimada pela sua ação repelente de insetos [30].

O mercado internacional é muito receptivo a este tipo de resina, por exemplo, como fonte de fixadores para tintas artísticas, uma propriedade devido a riqueza de triterpenos nas resinas de *Protium spp* [30].

Um exemplo disto é o trabalho apresentado por Cruz-Canizares *et al* (2005) onde se estudou as resinas Burseraceae utilizadas em selantes e vernizes para obras-de-arte, e foi ainda proposto neste trabalho o uso de alguns triterpenos derivados destas resinas como marcadores, devido à estabilidade destes compostos durante longos períodos de tempo [37]. Este resultado mostra-se interessante, por exemplo, na avaliação da veracidade de heranças culturais em geral.

Desta forma, atualmente os estudos envolvendo os óleos essenciais extraídos deste gênero têm merecido especial atenção.

Estes óleos essenciais podem ser obtidos de diferentes partes da planta, como resina, caule, folhas e frutos. É preciso salientar ainda, que diferenças quantitativas e qualitativas, na composição química destes óleos, são encontradas

quando se trabalha com óleos extraídos de partes diferentes de uma mesma planta [18,31,33].

Siani *et al* (2004) pesquisando os constituintes voláteis da resina, frutos e folhas da espécie *Protium icicariba*, encontrou predominantemente monoterpenos no óleo extraído da resina, enquanto que na amostra de óleo extraída da folhas houve a prevalência de sesquiterpenos [29].

Quanto a atividade biológica destes óleos essenciais, resultados importantes foram relatados por Siani *et al* (1999), onde foi demonstrada a atividade antiinflamatória, antinociceptiva e antineoplásica de óleos essenciais extraídos de resina e folhas de algumas espécies *Protium* [18].

O óleo essencial extraído da resina de *Protium heptaphyllum* March foi testado por Citó *et al* (2003) frente a *Artemia Salina* Leach, e o teste de toxicidade sugeriu uma significativa atividade citotóxica deste óleo[17].

Os dados acima apresentados torna, sobretudo, importante o conhecimento da constituição química destas espécies para contribuir com o aproveitamento e o controle na medicina e na indústria.

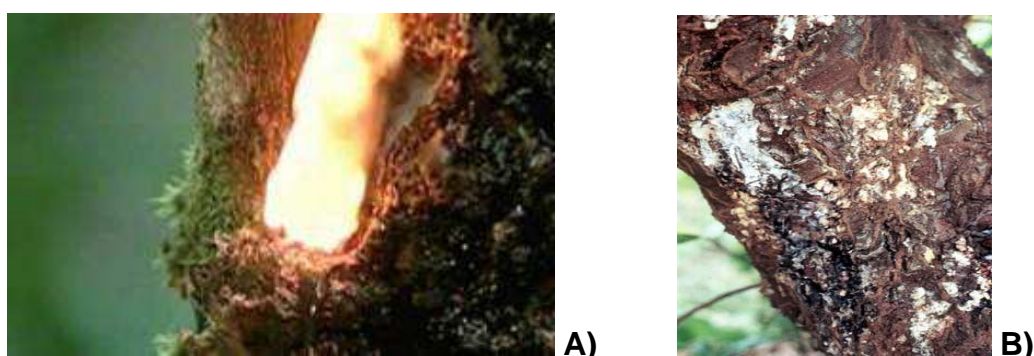


Figura 3 – Resina recém exsudada do tronco de *P. pallidum* (A); Resina envelhecida no tronco (B).

Os trabalhos com óleos essenciais deste gênero ainda são muito recentes, e apenas algumas espécies já foram estudadas.

A **Tabela 1** mostra alguns dados encontrados na literatura sobre a composição dos óleos essenciais extraídos de espécies *Protium*.

Tabela 1 – Dados encontrados na literatura sobre a composição dos óleos essenciais extraídos de espécies *Protium*.

Espécie	Constituintes majoritários no óleo essencial	Referência
<i>P. icariba</i>	Resina: p-cimeno, α -pineno, α -terpinoleno e limoneno. Folhas: germacreno, α -copaeno, γ -elemeno e δ -cadineno.	29
<i>P. strumosum</i>	Resina: p-cimeno, terpinoleno, α -terpineol e p-cimen-8-ol.	30
<i>P. spruceanum</i>	Resina: β -felandreno, α -pineno, α -felandreno, p-cimeno, e p-ment-3-eno.	30
<i>P. nitidifolium</i>	Resina: p-cimeno, α -pineno, β -felandreno, e sabineno.	30
<i>P. panicullatum</i>	Resina: p-cimeno, α -terpineno, p-ment-3-eno e β -felandreno	30
<i>P. hebetatum</i>	Resina: α -pineno, β -felandreno, p-cimeno, α -terpineno e α -felandreno.	30
<i>P. altsonii</i>	Resina: α -pineno, α -felandreno, p-cimeno, β -felandreno e 1,8-cineol	30
<i>P. spruceanum</i>	Folhas: sabineno, terpinen-4-ol, β -cariofileno e limoneno. Resina: epi- α -cadinol, cânfor, terpinen-4-ol e limoneno.	33
<i>P. heptaphyllum</i>	Resina: α -terpinoleno, p-cimeno, p-cimen-8-ol e limoneno.	18
<i>P. lewellyni</i>	Folhas: limoneno, α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno e δ -cadineno.	18
<i>P. hebetatum</i>	Folhas: p-cimeneno, β -cariofileno, α -humuleno, α -copaeno, viridifloreno, δ -cadineno, e epi- α -cadinol.	18

<i>P. unifoliolatum</i>	Folhas: trans-cariofileno, limoneno e α -humuleno.	38
<i>P. heptaphyllum</i>	Resina: terpinoleno, limoneno, felandreno e α -pineno.	39
<i>P. hebetatum</i>	Resina: p-cimeno, cis- β -dihidro-terpineol, limoneno, α -pineno, β -pineno e α -felandreno.	40
<i>P. alsonii</i>	Folhas: α -pineno, limoneno, germacreno e trans-cariofileno.	41
<i>P. hebetatum</i>	Folhas: trans-cariofileno, α -humuleno e óxido de cariofileno.	40

1.5 – Técnicas Espectrométricas

1.5.1 – Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Vísivel

Muitas moléculas orgânicas e grupos funcionais são transparentes em porções do espectro eletromagnético que chamamos de ultravioleta (UV) e visível (VIS), que é a região compreendida entre 190 nm a 800 nm. Quando uma radiação contínua passa através de um material transparente, que esteja em uma cela de amostra de quartzo, uma parte da radiação pode ser absorvida. Se isto ocorre, a radiação residual, quando é passada através de um prisma, produz um espectro com fendas chamado de espectro de absorção. Como resultado da absorção de energia, átomos ou moléculas passam de um estado de baixa energia (estado fundamental) para um estado de maior energia (estado excitado). A radiação eletromagnética que é absorvida tem energia exatamente igual à diferença entre os estados excitado e fundamental. Como a energia absorvida é quantizada, o espectro que se origina de uma única transição eletrônica deveria corresponder a uma linha única e discreta. Isto não se confirma, já que a absorção eletrônica superpõem-se

os subníveis rotacionais e vibracionais, originando, então, as bandas de absorção que possuem posição correspondente ao comprimento de onda cuja energia é igual à energia necessária para que ocorra a transição eletrônica.

A intensidade de uma absorção pode ser expressa em transmitância (T), definida como $T = I/I_0$, onde I_0 é a intensidade da energia radiante que incide na amostra e I é a intensidade de radiação que emerge da amostra. Uma expressão mais convincente é obtida da Lei de Lambert-Beer que relaciona a transmitância com a espessura da cela de amostra e a concentração das espécies que absorvem:

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = k.c.b$$

onde k é igual à constante característica do soluto, c é a concentração do soluto, b é o comprimento do caminho ótico através da amostra e A é a absorbância. Quando c é expresso em moles.L⁻¹ e o comprimento do caminho ótico em centímetros, a expressão acima torna-se,

$$A = \epsilon.b.c$$

A intensidade de uma banda de absorção em um espectro no UV-VIS é usualmente expressa como absortividade molar no máximo de absorção, $\epsilon_{\text{máximo}}$ ou $\log_{10}(\epsilon_{\text{máximo}})$. Quando não se conhece o material que absorve, pode-se exprimir a intensidade de absorção como,

$$\epsilon_{1cm}^{1\%} = \frac{A}{c.b}$$

onde c é igual à concentração em g/100 mL e b é o caminho ótico através da amostra em cm.

1.5.2 – Espectrometria Vibracional na região do Infravermelho (IV) [42]

A radiação infravermelha (IV) corresponde, aproximadamente, a parte do espectro situada entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior utilidade está situada entre 4.000 e 400 cm^{-1} .

A radiação no infravermelho em frequência menor que aproximadamente 100 cm^{-1} converte-se, quando absorvida por uma molécula orgânica, em energia de rotação molecular.

A radiação na faixa de aproximadamente 10.000 à 100 cm^{-1} converte-se, quando absorvida, em energia de vibração molecular. Estas vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais ou deformações angulares.

As intensidades das bandas podem ser expressas como transmitância (T) ou Absorbância (A). A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide ($T = I/I_0$). A Absorbância é o logaritmo decimal do inverso da Transmitância, isto é, $A = \log(1/T)$.

Uma resposta positiva a um grupo funcional através da análise de espectro IV deve ser somada a outras técnicas espectrométricas como espectrometria de massas (EM) e, ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para uma determinação mais exata.

1.5.3 – Espectrometria de Massas (EM)

A espectrometria de massas é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas.

Na técnica de impacto de elétrons (I.E), um espectrômetro de massas bombardeia as moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia,

usualmente de 70 eV. O evento mais simples que ocorre é a remoção de um elétron da molécula isolada, com formação de um íon molecular, um cátion radical ($M^{\bullet+}$). Os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico, e separados. O resultado é então registrado como um espectro de íons separados de acordo com a razão entre sua massa e sua carga elétrica, m/z [42].

Um espectro de massas é um gráfico que contém as massas dos fragmentos positivos, em suas concentrações relativas. O pico mais intenso do espectro é chamado de pico base, tem arbitrariamente a intensidade de 100%. As intensidades dos demais picos, incluindo o pico do íon molecular aparecem como frações do pico base [42].

As principais aplicações da espectrometria de massas (EM) são [43]:

- a) determinar a massa molecular, a qual permite deduzir a fórmula molecular;
- b) identificação dos compostos eluídos por um sistema cromatográfico;
- c) detecção de compostos conhecidos em baixos níveis de concentração;
- d) ajudar na determinação estrutural, pela análise do pico base (100%) e do íon molecular (M^+).

Para identificação dos compostos, utilizam-se geralmente espectros de massas contidos na “biblioteca” (ex: NBS library, com 40.000 registros) do computador do espectrômetro, na qual consta diversos terpenóides. Uma listagem dos dez compostos mais prováveis é fornecida por comparação dos 6 a 8 picos mais intensos da amostra com os dados da biblioteca [43].

1.6 – Técnicas Cromatográficas

A cromatografia é um método de separação no qual os componentes de uma amostra dividem-se entre duas fases: uma permanece imóvel (fase estacionária) e a outra percola através dela (fase móvel). Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais de cada um destes componentes [44-47].

A classificação dos diferentes tipos de cromatografia se dá de acordo com: o estado físico da fase móvel (gasosa, líquida ou fluido supercrítico); a disposição da fase estacionária (coluna ou planar); e o mecanismo de separação (adsorção, partição, troca iônica, exclusão por tamanho, etc.) [44-47].

A separação e a purificação dos constituintes químicos das plantas são freqüentemente efetuadas utilizando-se uma ou mais técnicas cromatográficas. Entre os métodos modernos de análise a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade de efetuar a separação, a identificação e a quantificação das espécies químicas, por si mesma, ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise

1.6.1 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto em extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação [1, 7-8].

A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada de adsorvente retido sobre uma superfície plana [48].

O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. Neste caso, a sílica é seguramente um dos adsorventes mais utilizados. Em geral, a sílica é empregada na separação de compostos lipofílicos [48].

Na escolha da fase móvel deve-se levar em conta a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da fase móvel, uma vez que existe uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra pela superfície do adsorvente [48].

Após o desenvolvimento dos cromatogramas as placas são secas e reveladas. A etapa de revelação consiste em tornar visíveis as substâncias incolores presentes na amostra. A visualização das manchas pode ser feita através de métodos físicos (luz ultravioleta), químicos (reagentes) ou biológicos (enzimas) [48].

1.6.2 – Cromatografia em Fase Gasosa (CG)

As substâncias voláteis ou semivoláteis (termo estáveis) são preferencialmente analisadas por cromatografia gasosa, devido ao grande poder de separação desta técnica, sendo capaz de separar compostos orgânicos com isomeria plana similar, isomeria óptica e homólogos com grande pureza [49].

A cromatografia gasosa é um procedimento físico utilizado para separar-se uma amostra em seus componentes individuais. A base para esta separação é a distribuição da amostra entre duas fases: uma estacionária e uma fase gasosa

móvel. A amostra é vaporizada e carregada pela fase móvel (ou gás de arraste, uma vez que se trata de um gás inerte cuja finalidade é transportar as moléculas separadas) através da coluna onde se encontra a fase estacionária [44-47].

No caso da cromatografia gás-sólido (CGS), a fase estacionária é um sólido de grande área superficial, usualmente um adsorvente como carvão vegetal, sílica gel ou peneira molecular. A adsorção diferencial dos componentes da mistura a ser separada sobre a superfície sólida é a base para a separação cromatográfica na CGS [44].

Na cromatografia gás-liquído (CGL), a fase estacionária é uma película delgada líquida, a qual recobre um sólido inerte denominado suporte, que se encontra acondicionado dentro de uma coluna, através da qual o gás de arraste flui continuamente. As moléculas da amostra irão distribuir-se entre o gás de arraste e a fase líquida. As espécies mais solúveis na fase estacionária líquida permanecerão menos tempo na fase gasosa em movimento, e como consequência irão deslocar-se mais lentamente através da coluna [44].

1.6.2.1 – Detectores

Em um sistema de cromatografia em fase gasosa o detector é, sem dúvida, o principal responsável pela quantidade mínima de substância a ser detectada, enquanto que cabe, em princípio, à coluna a responsabilidade de estabelecer a quantidade máxima [47].

A função do detector em um sistema cromatográfico é acusar a presença e medir a quantidade de componentes no efluente da coluna [47]. Um sinal elétrico é gerado, de acordo com a variação na composição do gás de arraste que sai da

coluna cromatográfica, ou seja, é dada uma resposta proporcional à concentração ou a massa de analito eluído [46].

Neste trabalho foi utilizado um sistema de cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (CG/EM), descrito a seguir.

1.6.2.1.1 – Detector de Massas (EM)

Um sistema muito utilizado para análise de amostras é o uso de um espectrômetro de massas, que funciona como detector, acoplado a um cromatógrafo à gás. Nesta técnica conhecida como CG/EM, o gás de arraste emergente do cromatógrafo é transferido através de uma válvula dentro de um tubo, onde ele passa por uma fenda molecular. Uma parte do fluxo de gás é então transferido para dentro da câmara de ionização do espectrômetro de massas. Cada pico eluído da coluna cromatográfica é bombardeado com uma fonte ionizante, conseguindo fragmentar o composto em uma grande diversidade de íons, que são separados e registrados de acordo com suas razões m/z [44-45,47].

No sistema (CG/EM) é necessário o uso de uma rápida varredura pelo espectrômetro de massas. O instrumento deve determinar o espectro de massa de cada componente na mistura, separado pela coluna cromatográfica, antes mesmo do próximo componente entrar na câmara de ionização, de maneira que uma substância não seja contaminada pela próxima fração antes que seu espectro tenha sido obtido [2]

Com um sistema CG/EM é possível também analisar uma mistura e conduzir uma busca em uma biblioteca de dados existente no sistema, podendo desta maneira procurar cada componente da mistura por tentativas e comparações [2].

1.7 – Métodos de Quantificação

Na análise quantitativa são necessárias precauções em todas as etapas para minimizar ou evitar erros. A alíquota a ser analisada deve ser representativa da amostra. Em cromatografia, a etapa de separação dos componentes da amostra no cromatógrafo pode acarretar erros como a adsorção irreversível de parte da amostra na fase estacionária ou suporte, resposta do detector afetada por alterações de temperatura e vazão de gás e quantidade de amostra injetada fora da faixa linear do detector [50].

A concentração de uma substância na amostra pode ser determinada por um dos métodos determinados a seguir.

1.7.1 – Método do Padrão Externo

No método do padrão externo é primeiramente construída uma curva analítica do padrão puro, onde se verifica a linearidade de resposta para o componente de interesse na faixa de concentração esperada. Assim, a percentagem em massa de uma amostra de concentração desconhecida é determinada a partir da equação da reta gerada na curva analítica. Alguns parâmetros estatísticos são calculados a partir dessa curva, tais como o desvio padrão e o limite de detecção do método. O método é muito funcional quando a concentração do analito é relativamente alta, porém para concentrações relativamente muito baixas é limitado [51].

1.7.2 – Método de Adição de Padrão

Neste método, um analito de interesse, dentro de uma mistura, pode ser analisado pela adição de quantidades conhecidas crescentes de seu padrão. Uma

curva analítica é obtida e a partir da equação da reta é determinada a concentração do analito. A adição de padrão é usada em muitas técnicas analíticas, principalmente quando a concentração do analito é muito baixa e existem efeitos de diluição em matrizes [50-51].

1.7.3 – Método de Padrão Interno

O padrão interno (P.I.) é uma substância de concentração conhecida adicionada à amostra, contendo o componente cuja concentração deve ser determinada, de forma que não interfira na análise. O P.I. não deve ser encontrado na amostra, deve ter elevado grau de pureza, ser adicionado em concentrações similares ao composto analisado e ter boa resolução em relação às outras substâncias. Uma curva analítica deve ser construída tal como no método do padrão externo, de forma que, pela relação entre as áreas e massas da amostra e do P.I., a concentração do analito seja determinada. O P.I. é usado, especialmente, na ausência do padrão do analito [50-51].

1.7.4 – Método de Normalização

Neste método, a área de cada pico é obtida de uma série de injeções de réplicas de uma mistura contendo quantidades iguais ou conhecidas de todos os componentes. Um componente deve ser escolhido como referência e as respostas relativas dos outros componentes são determinadas pela razão entre as suas áreas e a do componente de referência. Este método é muito usado, especialmente, quando não há padrão do analito [51].

1.8 – Objetivos do Trabalho

- ❖ Extrair qualitativamente e quantitativamente os óleos essenciais das resinas de espécies *Protium spp*;
- ❖ Estudar a eficiência na obtenção dos óleos com a variação no tempo de extração;
- ❖ Identificar qualitativamente os óleos obtidos por espectroscopia de ultravioleta, espectrometria no infravermelho (IV) e espectrometria de massas acoplada à cromatografia em fase gasosa (CG/EM).
- ❖ Isolar os componentes dos óleos por cromatografia em camada delgada (CCD), e identificá-los por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM);
- ❖ Quantificar os componentes majoritários presentes nos óleos essenciais utilizando o método de normalização simples de área.

2 – Parte Experimental

2.1 – Identificação, Coleta e Armazenamento das Amostras

2.1.1 – Coleta e Identificação das Espécies *Protium spp.*

As amostras analisadas foram coletadas em árvores catalogadas no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), na Reserva Ducke (Manaus/AM) em novembro de 2004.

A identificação das espécies foi feita pelo Departamento de Silvicultura do INPA.

2.1.2 – Armazenamento das Amostras

As amostras recebidas já secas foram armazenadas em embalagens plásticas, vedadas, acondicionadas em caixas de papel devidamente identificadas, em local isento de umidade e luz, à temperatura ambiente.

2.2 – Extração dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos pesando-se 25 g de resina seca triturada, que foram introduzidas em balão de destilação de fundo redondo com capacidade de 500 mL, no qual foram adicionados 250 mL de água destilada, e posteriormente o mesmo foi acoplado ao sistema de extração de Clevenger

modificado (**Figura 2**). O tempo utilizado para as extrações foi de 3 horas, mantendo a temperatura constante à 98 °C durante a hidrodestilação.

Após a extração mediu-se o volume dos óleos obtidos na escala graduada do sistema de extração. Em seguida, aos óleos recolhidos foram adicionados 10mg de Na₂SO₄ anidro, para eliminação da água residual, e posterior filtração em lã de vidro.

Os óleos obtidos foram armazenados em frascos de vidro fechados e sob refrigeração (-10 °C) para evitar perdas por evaporação dos constituintes voláteis.

2.2.1 – Determinação do Tempo de Extração

O tempo de extração foi estudado, buscando-se obter rendimento máximo em tempo mínimo. O estudo foi realizado nos seguintes tempos de extração: 1; 2; 3; 4; 5 e 6 horas. Exceto o tempo de extração, todas as outras condições experimentais foram mantidas constantes como descritas anteriormente.

2.3 – Características Físicas dos Óleos Essenciais

2.3.1 – Densidade

Não foi utilizado balão volumétrico de 1mL para a medida da densidade dos óleos essenciais por não haver volume suficiente de óleo todas as espécies para esta medida. Optou-se por uma micropipeta volumétrica para se medir 500 µL de cada óleo essencial.

Uma ponteira para 500 µL foi pesada com e sem os óleos essenciais. A diferença de massa correspondeu a massa de óleo medida. Utilizou-se, então a seguinte relação:

$$d = m / v$$

onde, **d** é a densidade procurada, **m** é a massa de óleo essencial e **v** é o volume correspondente.

Instrumentos utilizados:

- Balança analítica digital Sartorius – modelo BP121S, com precisão de 10^{-4} unidades.

- Micro-pipeta Eppendorf ReferenceOxford.

2.3.2 – Índice de Refração

O índice de refração foi medido à $T = 27\text{ °C}$ e $P = 692\text{ mmHg}$ em Refratômetro Abbe modelo 2WAJ.

2.3.3 – Ponto de Ebulição

O ponto de ebulição dos óleos essenciais foram medidos utilizando-se aparelho Eletrothermal em tubo capilar a uma pressão de 696 mmHg , e por Análise Térmica (DSC), de onde obtém-se uma curva de Calorimetria Exploratória Diferencial, indicando a faixa de ebulição destes óleos.

A curva DSC foi obtida no Termoanalizador Dupont 9900 acoplado ao módulo Calorimétrico DSC 910. A vazão de gás N_2 foi fixada em 50 mL min^{-1} sob uma razão de aquecimento da amostra de 10 °C min^{-1} , iniciando em 0 °C até 300 °C . A massa de óleo essencial utilizada de 12 mg , colocada no suporte com saída capilar, desenvolvimento especialmente para este fim, que está apresentado na **Figura 4**.

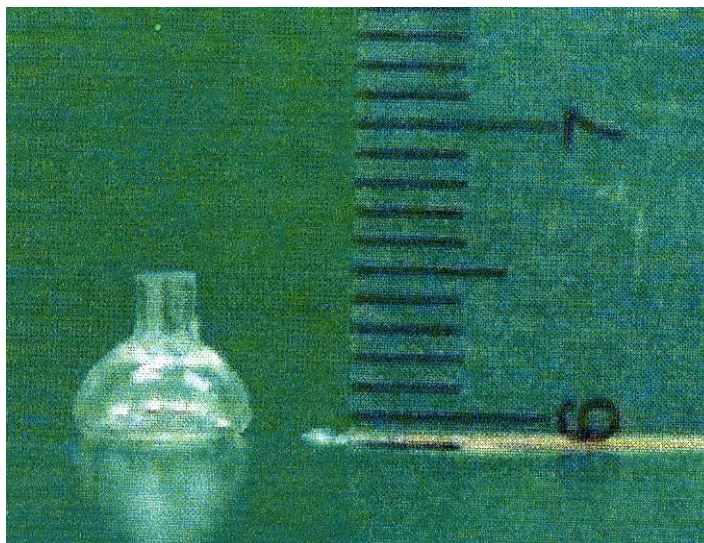


Figura 4 – Suporte de vidro com saída capilar pra DSC.

2.4 – Técnicas Espectroscópicas e Cromatográficas Utilizadas para Análise dos Óleos Essenciais

2.4.1 – Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Analisou-se os óleos essenciais por IV no espectrofotômetro Nicolet – 5SXC FTIR, utilizando-se janelas de KBr, com 32 varreduras e 16 cm^{-1} de resolução, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.4.2 – Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta (UV)

Nas análises dos óleos essenciais por UV, utilizou-se um espectrofotômetro MultiSpec-1501, com varreduras entre 190 e 400 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 10 mm, e etanol como solvente.

2.4.3 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Utilizaram-se placas de vidro de 8 x 20 cm recobertas com uma camada de 0,5 mm de espessura, utilizando-se como fase estacionária sílica G-60 e GF₂₅₄ Merck[®], na proporção 1:10 (m/m).

As placas foram limpas com água e detergente, e em seguida mergulhadas em solução sulfocrômica por uma noite. Após este período, as placas de vidro foram retiradas da solução e enxaguadas em água corrente e, em água destilada e seca em estufa para uso posterior.

Depois de secas, as placas foram acomodadas uma ao lado da outra numa prancheta horizontal, feita de alumínio, tendo um bordo retangular longitudinal e outro transversal, que as mantêm em ordem, lado a lado, para a aplicação da camada adsorvente.

A aplicação da camada adsorvente (0,25 mm) foi efetuada com ajuda de um aparelho espalhador especial, que tem um dispositivo que permite a variação de sua espessura. Colocou-se a suspensão de adsorvente sobre a primeira placa a ser recoberta, deslocando-se então o aparelho sobre as placas em cima da prancheta, fazendo-se a deposição da suspensão. Após esta deposição, as placas foram secas à temperatura ambiente e então ativada em estufa a 140 °C por quatro horas.

2.4.3.1 – Aplicação da Amostra

As amostras de óleos essenciais foram diluídas em clorofórmio ($\epsilon^{\circ} = 4,8$) padrão analítico, na relação 1:10 (v/v).

A aplicação da amostra sobre a cromatoplaça foi feita utilizando-se um tubo capilar a uma distância de dois centímetros do extremo inferior da cromatoplaça.

Efetuu-se a aplicação da amostra em frações consecutivas, com intervalos suficientes para a evaporação do solvente.

2.4.3.2 – Escolha da Fase Móvel

Para a escolha dos solventes apropriados, os valores das constantes dielétricas foram obtidos das escalas eluotrópicas, nas quais os solventes estão relacionados em ordem crescente de seu poder de eluição.

Os solventes estudados como fase móvel durante o desenvolvimento do método são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Mistura de solventes utilizados para o desenvolvimento das cromatoplacas.

Solventes (v/v)	ϵ^0 (constante dielétrica)
Acetato de Etila : Hexano (1:60)	1,96
Acetato de Etila : Hexano (1:30)	2,02
Acetato de Etila : Hexano (1:10)	2,27
Acetato de Etila : Hexano (1:5)	2,59
Acetato de Etila : Hexano (1:2)	3,29
Acetato de Etila : Hexano (1:1)	3,98
Acetato de Etila : Hexano (2:1)	4,68
Acetona : Hexano (1:60)	2,20
Acetona : Hexano (1:30)	2,50
Acetona : Hexano (1:10)	3,60
Acetona : Hexano (1:7,5)	4,10
Acetona : Hexano (1:5)	5,02
Diclorometano : Hexano (1:10)	2,54
Diclorometano : Hexano (1:5)	3,09
Diclorometano : Hexano (1:2)	4,29
Diclorometano : Hexano (1:1)	5,48
Diclorometano : Hexano (1,5:1)	6,20
Diclorometano : Hexano (2:1)	6,69

2.4.3.3 – Separação e Revelação

Após a aplicação da amostra, as cromatoplasmas foram inseridas na cuba cromatográfica, em contato com a fase móvel.

A altura da fase móvel na cuba cromatográfica foi de aproximadamente 1,0 cm abaixo do ponto de aplicação da amostra. Para a saturação da cuba utilizou-se uma tira de papel de filtro, previamente embebida com a mistura de solventes, que foi aderida à parede da cuba cromatográfica.

Após a fase móvel ter atingido a delimitação superior nas cromatoplasmas, estas foram retiradas da cuba e secas ao ar. A revelação, isto é, a visualização das manchas foi realizada por meio da irradiação com luz ultravioleta (λ 254 e 354 nm) sobre as cromatoplasmas.

As substâncias cromatografadas foram recuperadas por meio de sucessivas extrações da sílica gel com 100 μ L de solventes (fase móvel).

Estas frações recuperadas foram armazenadas em frascos de vidro fechados e sob refrigeração, para posterior análise.

A metodologia utilizada na separação dos constituintes dos óleos essenciais por cromatografia em camada delgada (CCD) encontra-se resumida na **Figura 5**.

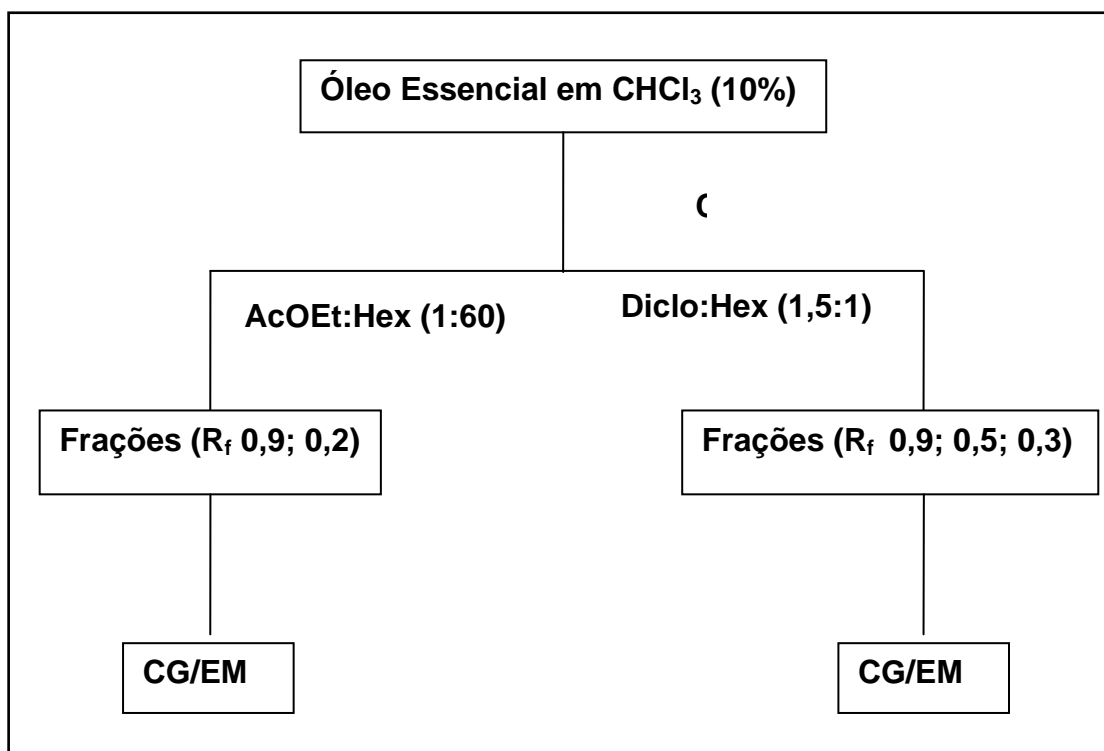


Figura 5 – Fluxograma genérico da metodologia experimental utilizada na CCD.

2.4.4 – Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

Os óleos essenciais e as frações separadas por CCD foram analisados por CG/EM em um cromatógrafo em fase gasosa Hewlett-Packard modelo HP-5890, acoplado a um detector seletivo de massas HP-5970 de modo impacto eletrônico, com uma energia de 70 eV, temperatura da interfase de transferência de 300 °C e banco de dados NBS-Reve (40.000 registros).

Condições cromatográficas:

- Coluna LM-5 (50 m x 0,25 mm i.d. x 0,42 µm)
- Temperatura inicial = 60 °C

-
-
- Tempo inicial = 11 minutos
 - Tempo final = 20 minutos
 - Temperatura final = 250 °C
 - Temperatura do injetor = 250 °C
 - Temperatura do detector = 280 °C
 - Gás de arraste = He
 - Rampa : 60 °C até 100 °C na razão de 7 °C/min, depois 100 °C até 250 °C na razão de 12 °C/min.
 - Split = 1:50
 - μ = 36 cm/seg.
 - Modo Scan: 30 a 300 Da

2.4.4.1 – Quantificação

Para a quantificação dos componentes por normalização simples de área, utilizou-se as condições descritas no **item 1.7.4**. A quantificação nos constituintes nos óleos foi realizada a partir de soluções 10 % (óleo em clorofórmio) pela normalização simples da área do pico de cada composto, sendo a área total a somatória de todas as áreas do cromatograma (100 %).

3 – Resultados e Discussão

3.1 – Extração dos Óleos Essenciais por Hidrodestilação

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas de acordo com as condições descritas no **item 2.2**.

A **Tabela 3** indica o rendimento dos óleos essenciais das resinas das espécies *Protium spp*, para o tempo de extração de 3 horas.

Tabela 3 – Rendimento dos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação.

Espécie	Rendimento (%)
<i>P. hebetatum</i>	3,10
<i>P. nitidifolium</i>	3,33
<i>P. amazonicum</i>	2,60
<i>P. divarictium</i>	2,77

Encontra-se na literatura resultados bastante discrepantes a respeito dos rendimentos dos óleos obtidos de espécies *Protium*. Isto se deve ao fato de que a quantidade de óleo essencial extraído de matrizes vegetais está muito relacionado à estrutura de armazenamento destes óleos nas plantas, assim, como também à época do ano, uma vez que a produção destes óleos varia durante o ciclo vegetativo.

Não há documentação acerca da idade das plantas de onde foram coletadas estas resinas, no entanto, todas as resinas utilizadas neste trabalho foram coletadas na mesma época do ano, e apresentavam aspecto âmbar ou rochoso, típico de resinas envelhecidas.

3.2 – Tempo de Extração dos Óleos Essenciais

No material vegetal, os óleos essenciais estão armazenados em estruturas especializadas. Desta forma, torna-se evidente que o tempo necessário para remover o óleo essencial do material vegetal é altamente dependente da estrutura onde este está armazenado. De forma geral, o tempo para a remoção dos óleos presentes em matrizes como cascas, raízes, sementes, depende da razão de difusão dos vários constituintes do óleo, que devem permear através do tecido vegetal para serem extraídos.

O tempo de extração é um dos principais parâmetros no estudo dos óleos essenciais, está diretamente relacionado com a qualidade e, com a viabilidade econômica deste processo de extração.

O rendimento na extração e a composição do óleo podem variar em função do tempo de extração. Uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo predominantemente constituintes mais voláteis. A destilação mais lenta permite, portanto uma maior recuperação dos componentes mais pesados.

O óleo deve ser extraído qualitativa e quantitativamente, ou seja, quantidades significativas dos compostos de interesse no menor tempo de extração possível.

Para estudar-se o efeito do tempo de extração no rendimento dos óleos essenciais, inicialmente todas as amostras foram extraídas por 4 horas, obteve-se um rendimento similar para as quatro espécies. Com base neste experimento efetuaram-se as extrações em diferentes tempos somente com a espécie *P. hebetatum*, uma vez que esta foi a única amostra em quantidade suficiente para a realização deste estudo.

A **Figura 6** apresenta o estudo relacionado ao tempo de extração do óleo essencial por hidrodestilação da resina da espécie *P. hebetatum*.

A massa de resina foi fixada em 25,0 g para um volume de 250 mL de água. Os tempos de extrações estudados foram de 1h; 2h; 3h; 4h; 5h e 6h.

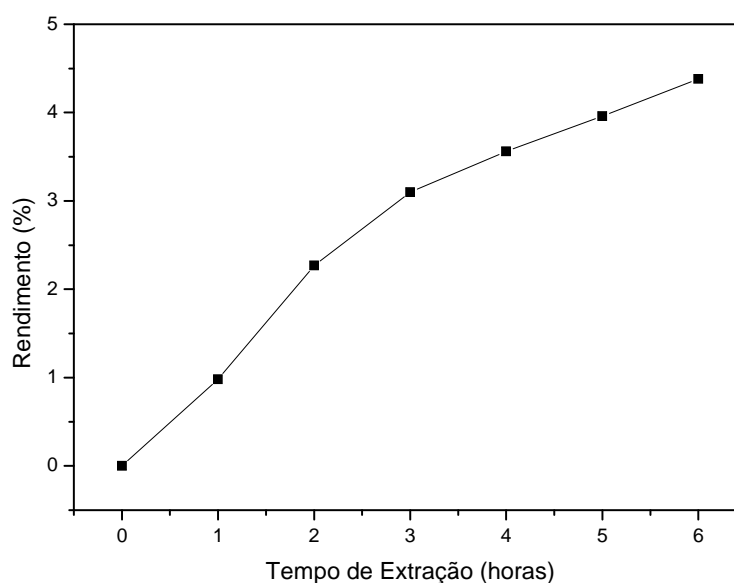


Figura 6 – Rendimento na extração do óleo essencial em função do tempo.

Como pode ser observado no gráfico (**Figura 6**), há um grande aumento no rendimento entre os intervalos de tempo de 1 à 3 horas de extração, porém, após 3

horas de extração o aumento no rendimento é significativo, mas não o suficiente para impor este aumento de tempo na extração. Baseando-se no melhor custo x benefício do processo, o tempo de extração de 3 horas foi escolhido como sendo o mais viável.

3.3 – Propriedades Físico-Químicas dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais podem sofrer alterações pela ação das condições naturais, dependendo da natureza química de seus constituintes. O ar, a luz, o calor, a água e impurezas diversas de origem natural ou oriundas de falsificações estão entre os principais parâmetros que os modificam. As alterações podem ser reconhecidas tanto por mudanças de suas características organolépticas (aroma, cor, sabor, transparências, fluidez), como também dos valores de suas propriedades químicas e físicas. Assim, diminuindo as suas qualidades, reduz-se de igual modo sua utilização nas indústrias de perfumaria, cosmético, alimentos, químicas, etc.

Foram determinados alguns valores referentes às propriedades físico-químicas dos óleos essenciais obtidos das quatro espécies *Protium spp.*

Para a determinação do ponto de ebulição destes óleos utilizou-se primeiramente um aparelho Electrothermal, medindo-se os pontos de ebulição destes óleos em capilar. Sendo os óleos essenciais misturas complexas de componentes, houve certa dificuldade na medição exata dos pontos de ebulição destes óleos.

Dessa forma, utilizou-se a técnica DSC (Diferencial Scanning Calorimetry) para uma determinação mais precisa destes pontos de ebulição.

As curvas DSC obtidas com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e 12 mg de amostra para os óleos essenciais das resinas apresentaram um pico largo endotérmico. As temperaturas médias de ebulição, para cada óleo, foram determinadas no mínimo destes picos.

As curvas de DSC foram realizadas ao final deste trabalho e, não foi possível a obtenção deste dado para amostra de *P. nitidifolium*, pois a quantidade de amostra disponível foi insuficiente para esta medida.

As curvas DSC para as determinações dos pontos de ebulição dos óleos essenciais extraídos das resinas de *Protium spp.* são mostrados na **Figura 7**.

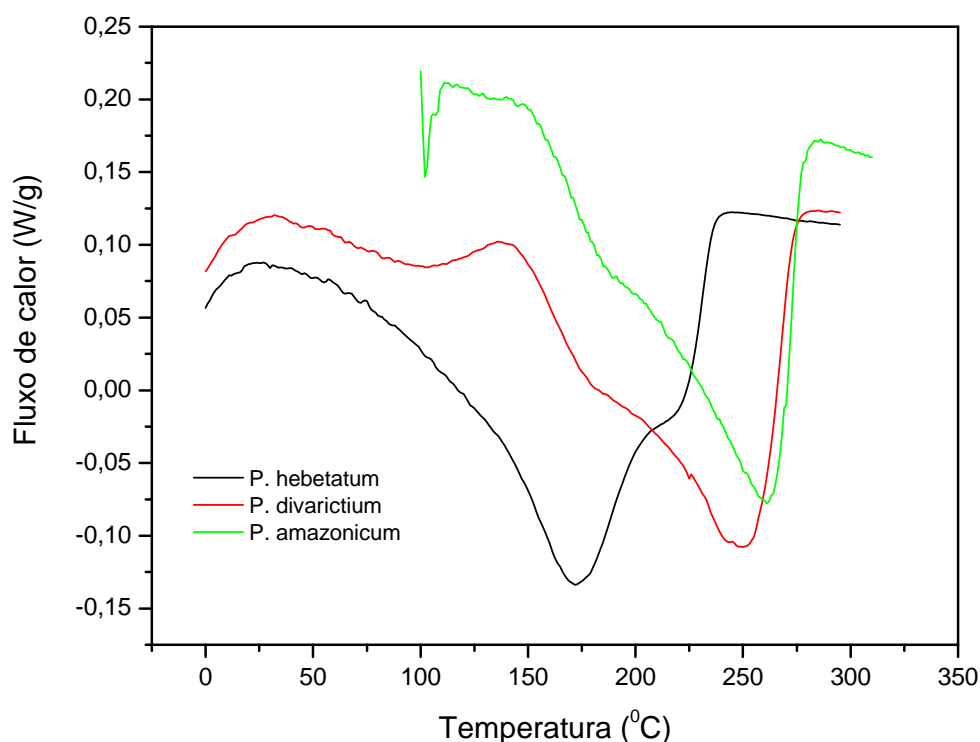


Figura 7 – Curvas termoanalíticas de DSC para os óleos essenciais das resinas *Protium spp.*

Os valores das determinações físico-químicas dos óleos essenciais estão contidos na **Tabela 4**.

Não foram encontradas na literatura informações acerca das propriedades físico-químicas dos óleos estudados neste trabalho, para que uma comparação fosse feita.

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas dos óleos essenciais extraídos das resinas das espécies *Protium spp.*

Propriedades	Espécies			
	<i>P. hebetatum</i>	<i>P. nitidifolium</i>	<i>P. amazonicum</i>	<i>P. divarictium</i>
Cor	Incolor	Amarelo claro	Amarelo	Incolor
Aparência	Límpido	Límpido	Límpido	Límpido
Densidade (g/cm ³)	0,8418	0,8805	0,8314	0,8498
Índice de refração	1,478	1,491	1,493	1,476
Ponto de ebulição (°C) (Electrothermal)	185,8	168,2	244,8	239,4
Ponto de ebulição (°C) (DSC)	172,35	–	260,90	250,07

3.4 – Análises Espectroscópicas dos Óleos Essenciais

Com a finalidade de se obter informações qualitativas a respeito dos óleos essenciais extraídos foram efetuadas medidas em Infravermelho e Ultravioleta destes óleos.

Os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

3.4.1 – Análises por Infravermelho

A espectroscopia no Infravermelho é uma técnica amplamente empregada para a determinação dos grupos funcionais presentes em um determinado composto. Tratando-se, desta forma, de uma técnica qualitativa. Do ponto de vista quantitativo o IV não é uma boa escolha, sendo uma técnica pouco sensível para fins de quantificação.

Escolheu-se analisar os óleos essenciais neste trabalho por IV a fim de se verificar as bandas características dos grupos funcionais, que pudessem sugerir diferenças referentes aos constituintes destes óleos.

As **Figuras 8 à 11** apresentam os espectros de Infravermelho obtidos para os óleos essenciais.

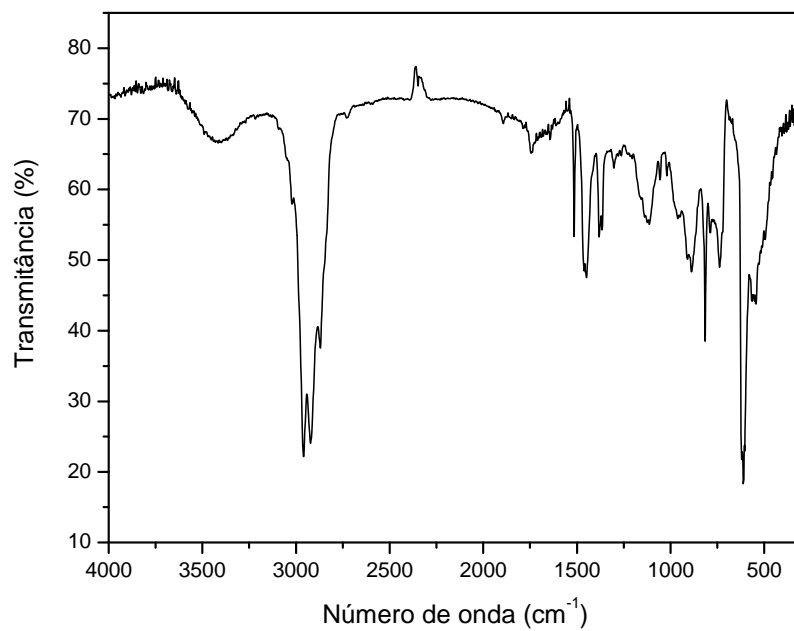


Figura 8 – Espectro de Infravermelho do óleo essencial extraído da resina de *P. hebetatum*.

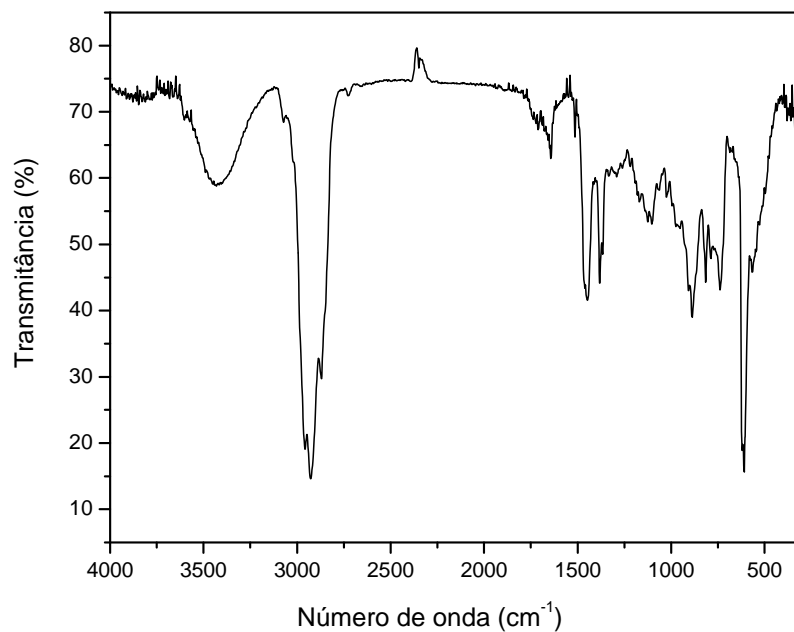


Figura 9 – Espectro de Infravermelho do óleo essencial extraído da resina de *P. nitidifolium*.

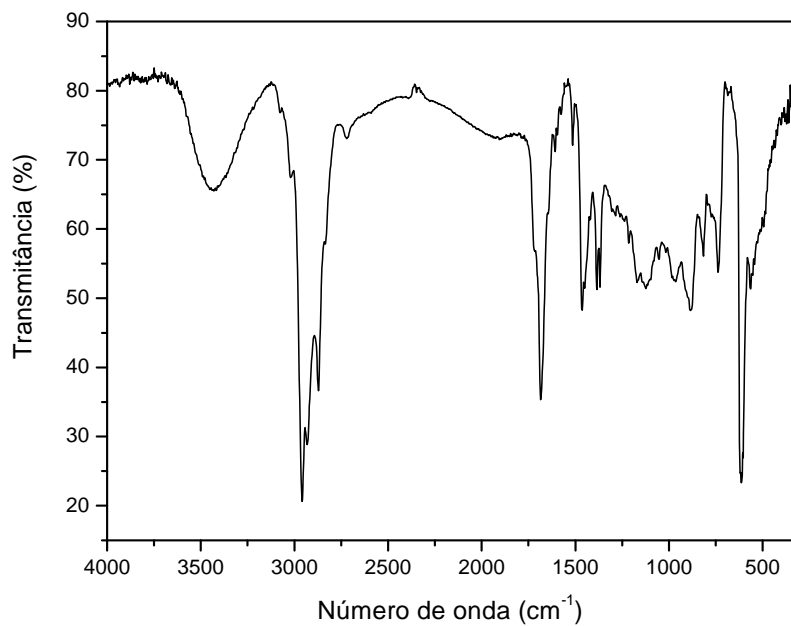


Figura 10 – Espectro de Infravermelho do óleo essencial extraído da resina de *P. amazonicum*.

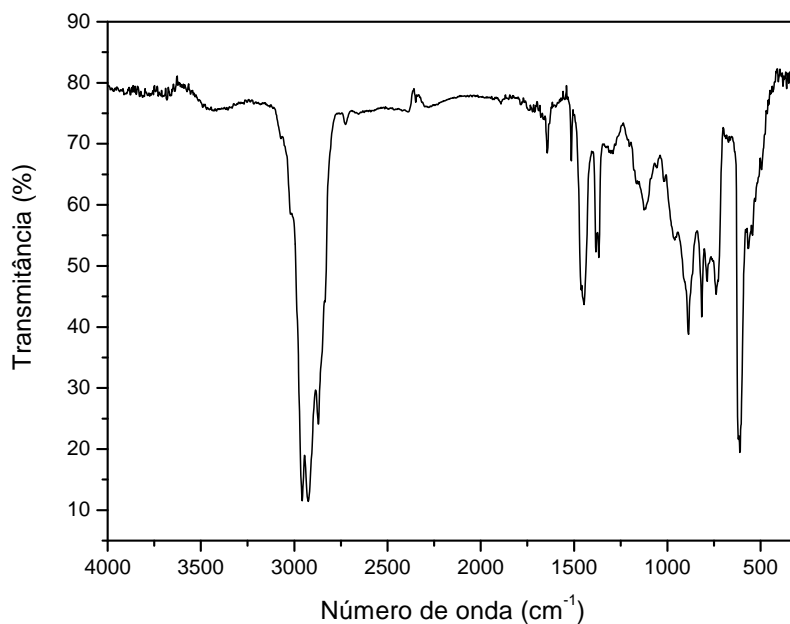


Figura 11 – Espectro de Infravermelho do óleo essencial extraído da resina de *P. divarictium*.

Observa-se em todos os espectros IV a banda triplete entre aproximadamente 2850 – 2950 cm^{-1} referente a deformação axial =C–H , característica de aromáticos e alcenos conjugados.

As bandas entre 1500 e 1300 cm^{-1} devem-se as deformações do esqueleto hidrocarboneto e, no caso desta amostra complexa não é possível identificar cada uma das deformações ocorrentes.

No espectro IV do óleo da espécie *P. amazonicum* nota-se uma banda de forte intensidade em 1685 cm^{-1} , que não aparece nos demais espectros e, que pode ser atribuída à carbonila em conjugação com insaturação (C=C).

A banda em aproximadamente 3400 cm^{-1} referente à deformação axial de O-H é observada em todos os espectros, porém, mostrando-se de fraca intensidade nos espectros das espécies *P. divarictium* e *P. hebetatum*, enquanto que nos espectros das espécies *P. amazonicum* e *P. nitidifolium* esta banda tem maior intensidade.

Estes fatos associados podem levar a predição de compostos oxigenados, como álcoois e ácidos carboxílicos, como constituintes majoritários do óleo essencial extraído da resina de *P. amazonicum*. No entanto, por hora, trata-se de mera suposição, uma vez que, como já dito, a espectroscopia no infravermelho não é uma técnica indicada para fins quantitativos, principalmente em se tratando de uma mistura complexa de constituintes.

3.4.2 – Análises por Ultravioleta

Na região do ultravioleta as absorções ocorrem por meio de transições eletrônicas, características para cada tipo de grupo cromóforo. Assim como o infravermelho, o UV foi utilizado neste trabalho como uma ferramenta qualitativa na tentativa de se encontrar, através das absorções de cromóforos, a indicação da presença de insaturações ou carbonila, por exemplo.

A **Figura 12** apresenta os espectros de absorção no UV para os óleos essenciais em etanol.

Nota-se somente no espectro UV do óleo da espécie *P. amazonicum* a presença de uma banda de absorção em aproximadamente 230 nm, uma transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$, que pode estar associada a uma carbonila (C=O), deslocada pela conjugação com insaturação. Isto está em concordância com os espectros IV obtidos para este óleo.

Nos demais espectros nota-se discreta absorção em aproximadamente 217 nm, uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, associada às insaturações (C=C).

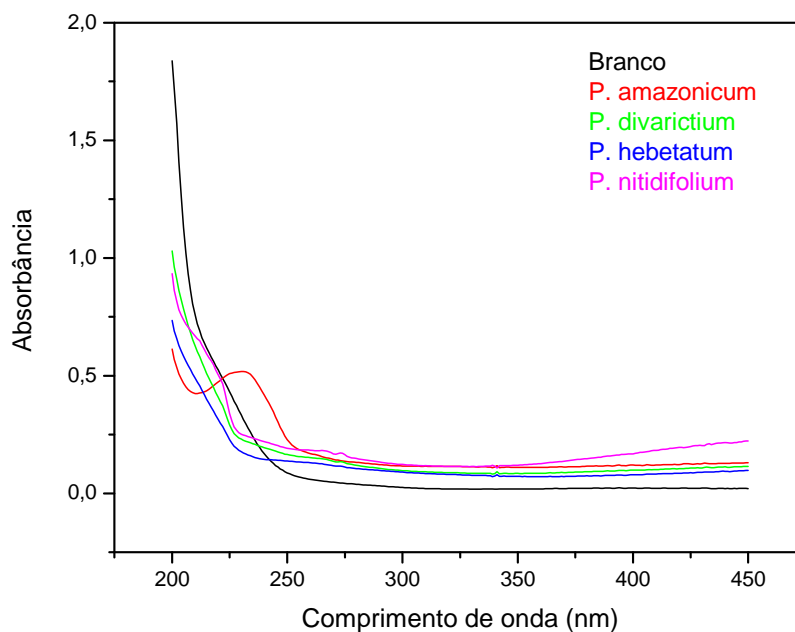


Figura 12 – Espectros de absorção no UV dos óleos essenciais extraídos das espécies *Protium* spp.

3.5 – Análises Cromatográficas dos Óleos Essenciais

No presente estudo analítico dos óleos essenciais extraídos das resinas das espécies *Protium* spp., Os óleos essenciais extraídos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Estes óleos foram ainda submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) para o isolamento de frações contendo os componentes a serem identificados.

Os resultados das análises de CG/EM dos óleos serão apresentados a seguir. A fim de se comparar os resultados obtidos, os fragmentogramas dos compostos

identificados serão apresentados de forma conjunta para as quatro espécies estudadas.

Para melhor compreensão, na análise por CCD, os resultados serão apresentados separadamente para cada fase móvel utilizada. Na etapa de quantificação serão apresentados os resultados comparativos das quatro espécies *Protium spp.*

3.5.1 – Análises por CG/EM

As **Figuras 12 a 15** apresentam os cromatogramas de CG/EM dos óleos essenciais das resinas de *Protium spp.* nas condições experimentais apresentadas no **item 2.4.3**.

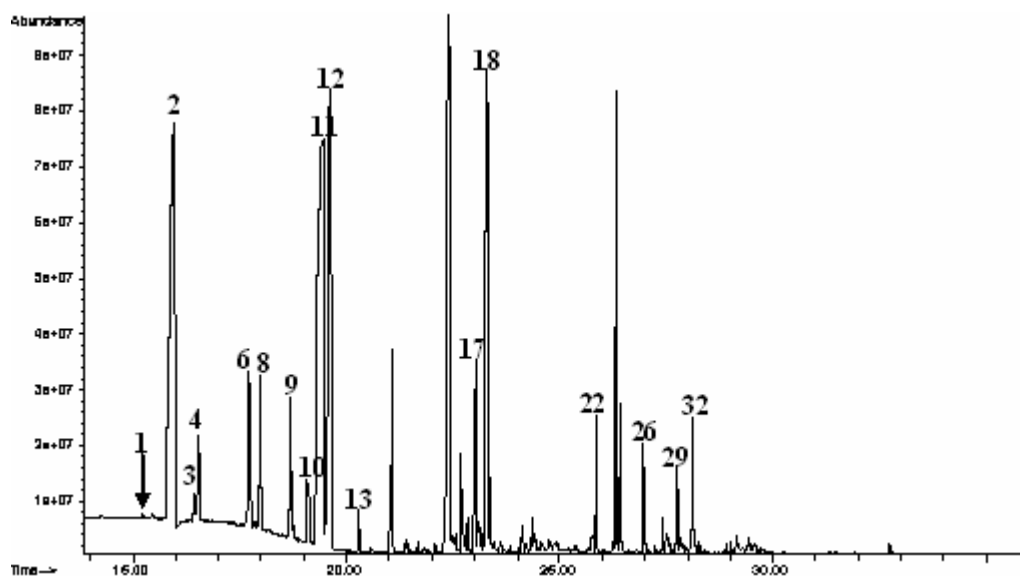


Figura 13 – Cromatograma CG/EM do óleo essencial extraído da resina de *Protium hebetatum*.

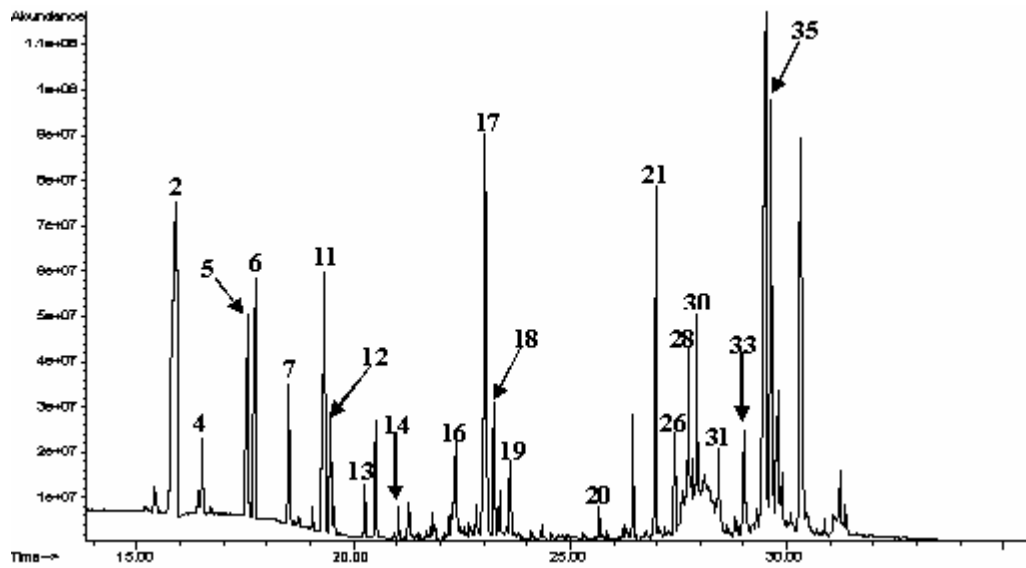


Figura 14 – Cromatograma CG/EM do óleo essencial extraído da resina de *Protium nitidifolium*.

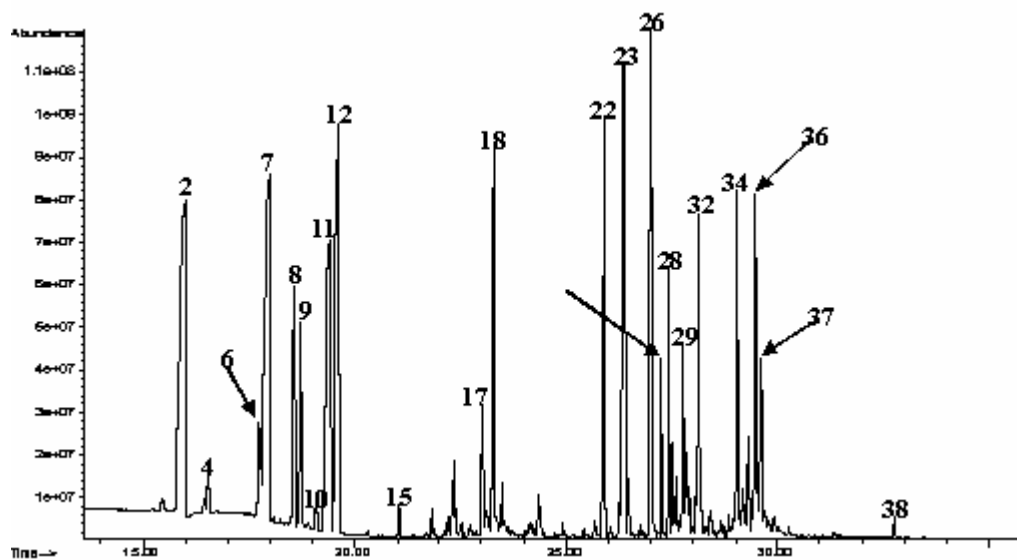


Figura 15 – Cromatograma CG/EM do óleo essencial extraído da resina de *Protium divarictium*.

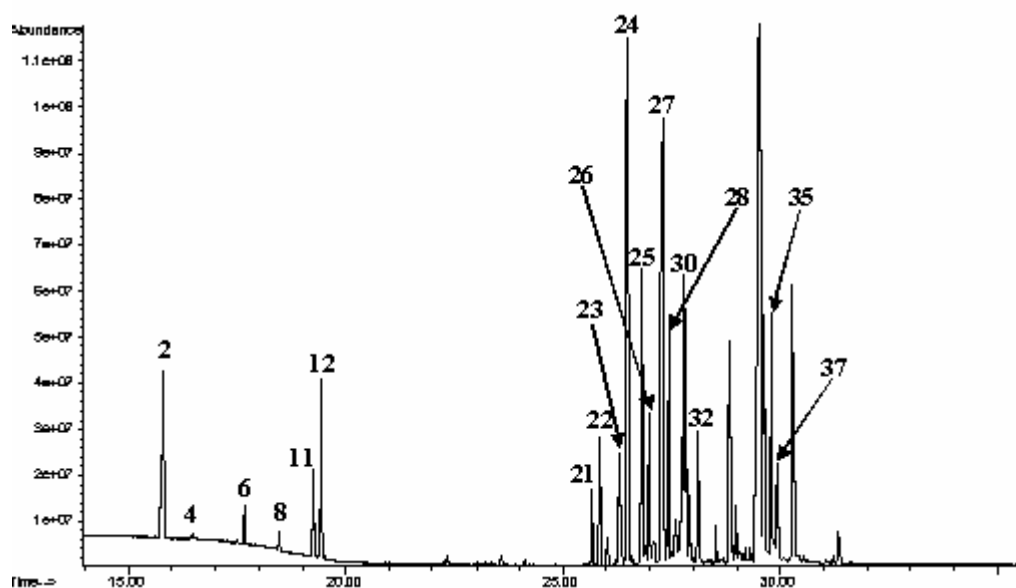


Figura 16 – Cromatograma CG/EM do óleo essencial extraído da resina de *Protium amazonicum*.

A identificação de alguns constituintes do óleo foi possível pela comparação de espectros de massas encontrados na literatura [52]. É importante salientar, ainda, que esta identificação por comparação só foi possível porque as condições experimentais utilizadas foram similares às dos espectros da literatura.

A **Tabela 5** mostra os compostos identificados nas amostras de óleos essenciais extraídos das quatro espécies *Protium*, com seus respectivos tempos de retenção e números de identificação utilizados nos cromatogramas.

Tabela 5 – Possível identificação dos constituintes nos óleos essenciais de *Protium spp.*

Identificação (número)	Composto	Tempo de retenção (min.)			
		<i>hebetatum</i>	<i>nitidifolium</i>	<i>divarictium</i>	<i>amazonicum</i>
1	Triciclano	15,22	-	-	-
2	α -Pinoeno	15,96	15,93	16,00	15,91
3	α -Fencheno	16,44	-	-	-
4	Canfeno	16,53	16,51	16,54	16,47
5	Sabineno	-	17,58	-	-
6	β -Pinoeno	17,73	17,75	17,75	17,78
7	cis-Pinano	-	18,52	17,97	-
8	3-p-Menteno	17,98	-	18,57	18,48
9	α -Felandreno	18,69	-	18,73	-
10	δ -2-Careno	19,09	-	19,09	-
11	o-Cimeno	19,30	19,28	19,30	19,27
12	Limoneno	19,47	19,46	19,48	19,45
13	γ -Terpineno	20,30	20,27	-	-
14	Terpinoleno	-	21,82	-	-
15	p-Cimeno	-	-	21,06	-
16	trans-Sabinol	-	22,36	-	-
17	Terpin-4-ol	23,02	23,05	23,02	-
18	α -Terpineol	23,29	23,24	23,29	-
19	Tuj-3-en-10-al	-	23,37	-	-
20	Verbenona	-	23,61	-	-
21	δ -Elemeno	-	25,67	-	25,67

22	α -Cubebeno	25,87	-	25,90	25,86
23	Ciclosativeno	-	-	26,38	26,30
24	β -Elemeno	-	-	-	26,48
25	Z-Cariofileno	-	-	-	26,83
26	E-Cariofileno	26,98	26,98	27,02	26,98
27	Cedrano	-	-	27,26	27,30
28	α -Humuleno	-	27,41	27,44	27,43
29	Seicheleno	27,77	-	27,79	-
30	γ -Muuroleno	-	27,73	-	27,79
31	α Selileno	-	27,92	-	-
31	δ -Cadideno	28,12	-	28,14	28,11
33	Elemol	-	28,43	-	-
34	Óxido de Cariofileno	-	-	29,05	-
34	cis-diidro-Acetato de Ocidentalol	-	29,64	-	29,62
36	Drimenol	-	-	29,49	-
37	trans-diidro-Acetato de Ocidentalol	-	-	29,91	29,93
38	Acetato de 2-Difenil Etil	-	-	32,78	-

As **Figuras 17 à 54** apresentam os fragmentogramas obtidos para cada componente experimentalmente possivelmente identificado nos óleos.

Encontram-se no **Apêndice: Fragmentogramas Teóricos** (Capítulo 5) os respectivos fragmentogramas destes compostos publicados na literatura [52], e utilizados para identificação dos mesmos por comparação com os resultados obtidos.

As estruturas propostas pela literatura para os compostos identificados neste trabalho encontram-se no **Apêndice: Fórmulas Estruturais** (Capítulo 6)

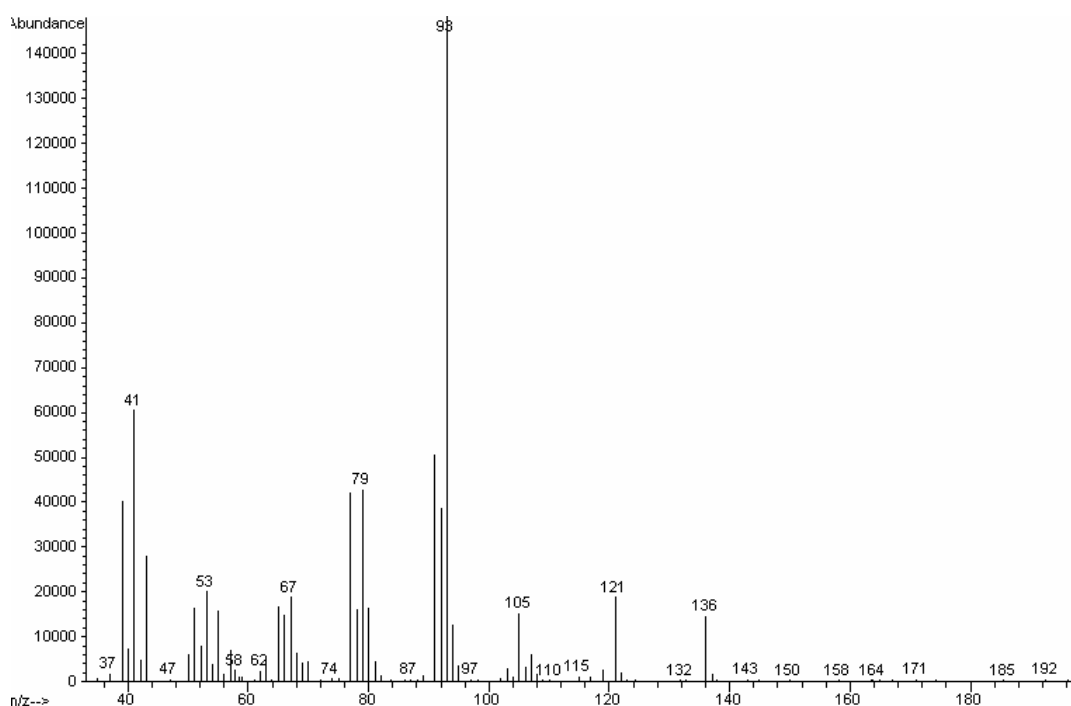
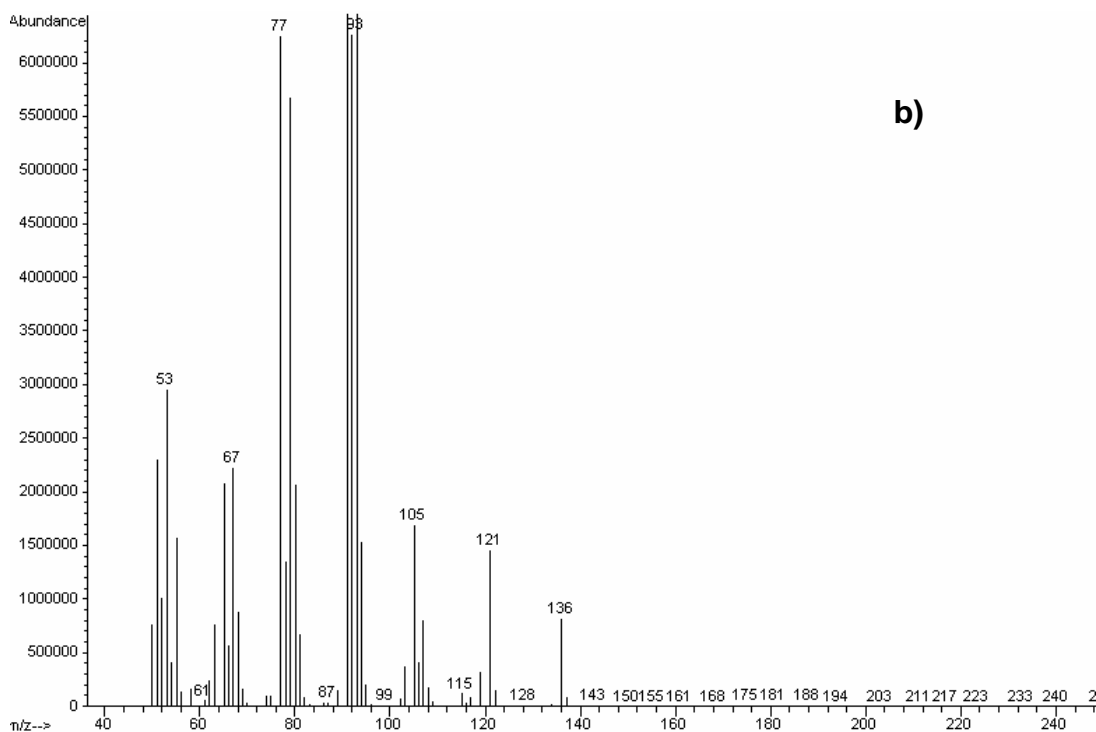
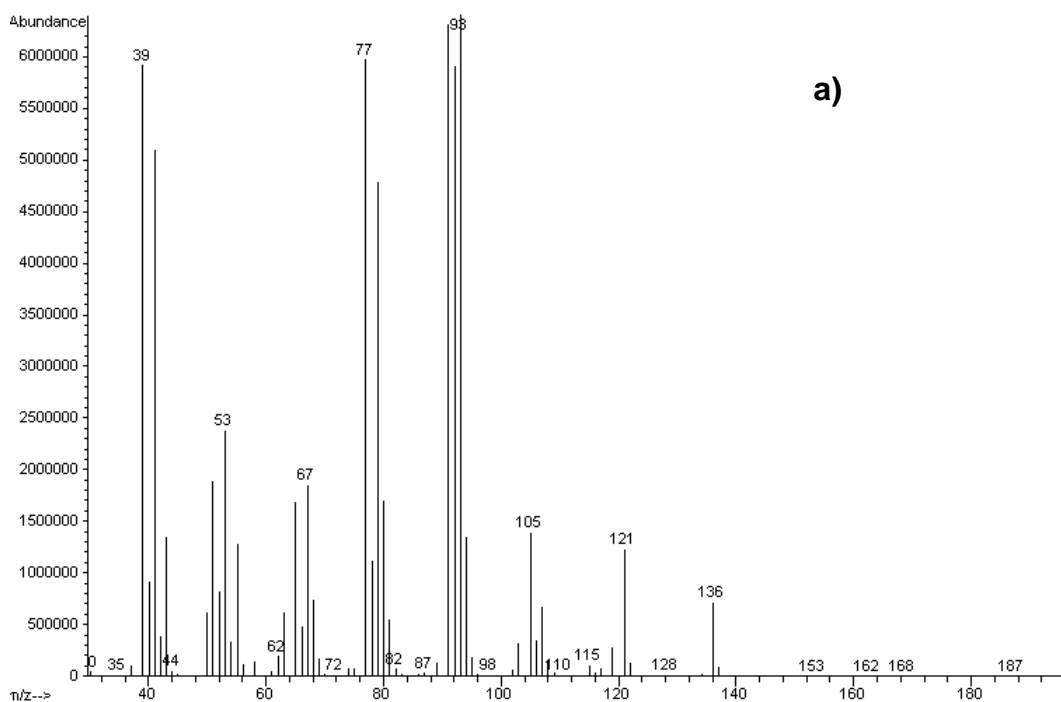


Figura 17 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Tricicleno (pico 1) na amostra *P. hebetatum*.



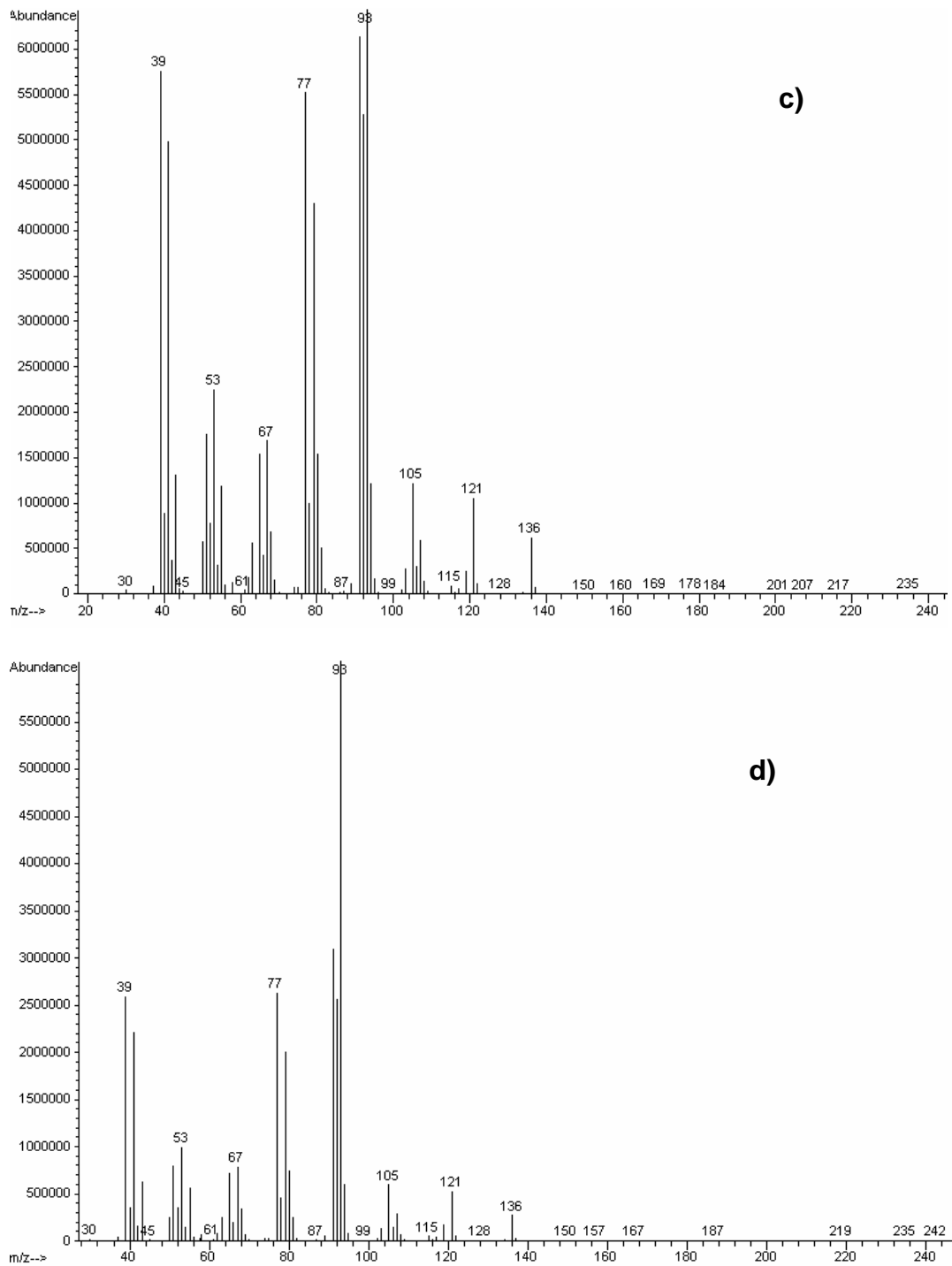


Figura 18 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Pineno (pico 2): a) *P. hebetaum*; b) *P. nitidifolium*; c) *P. divarictium*; d) *P. amazonicum*.

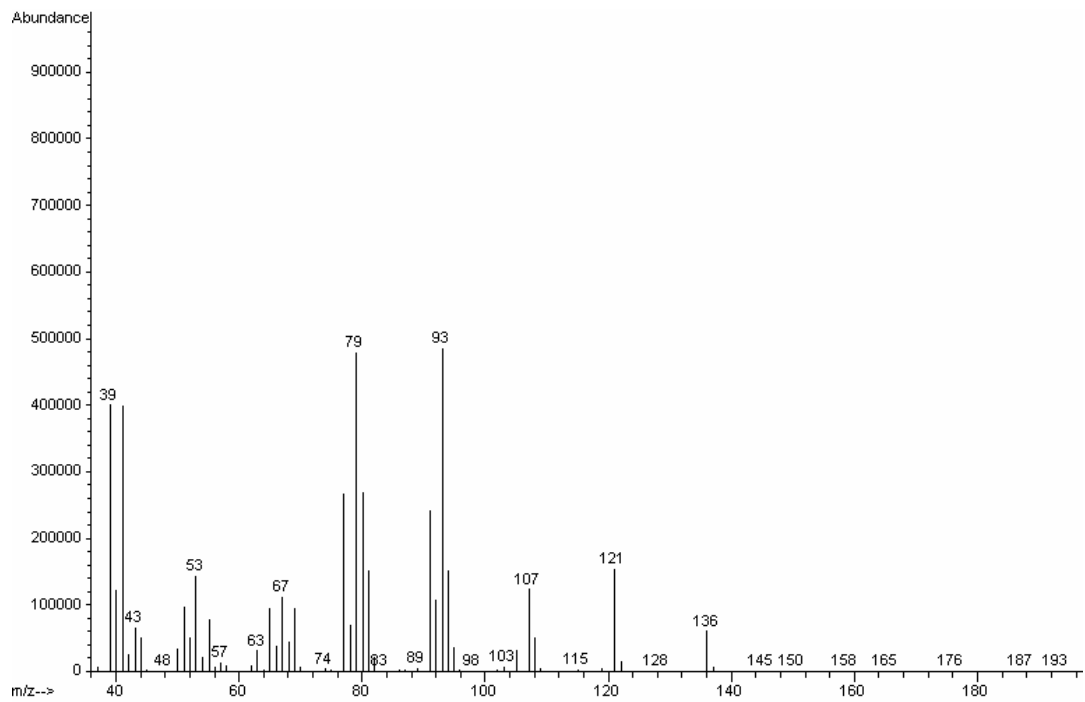
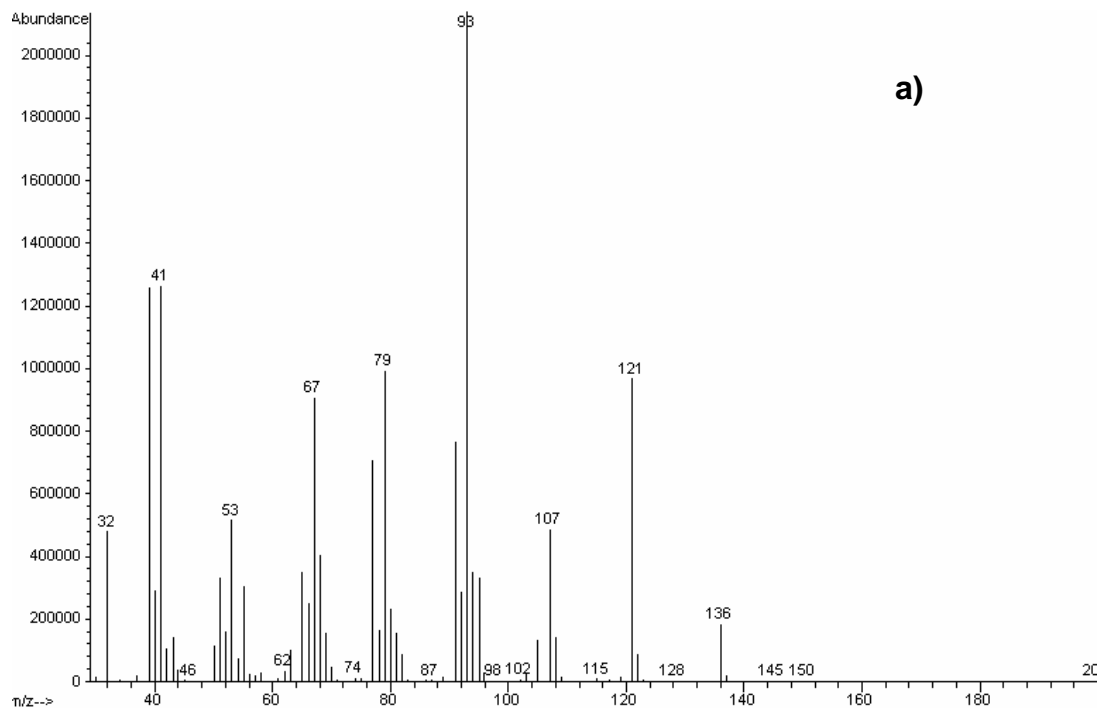
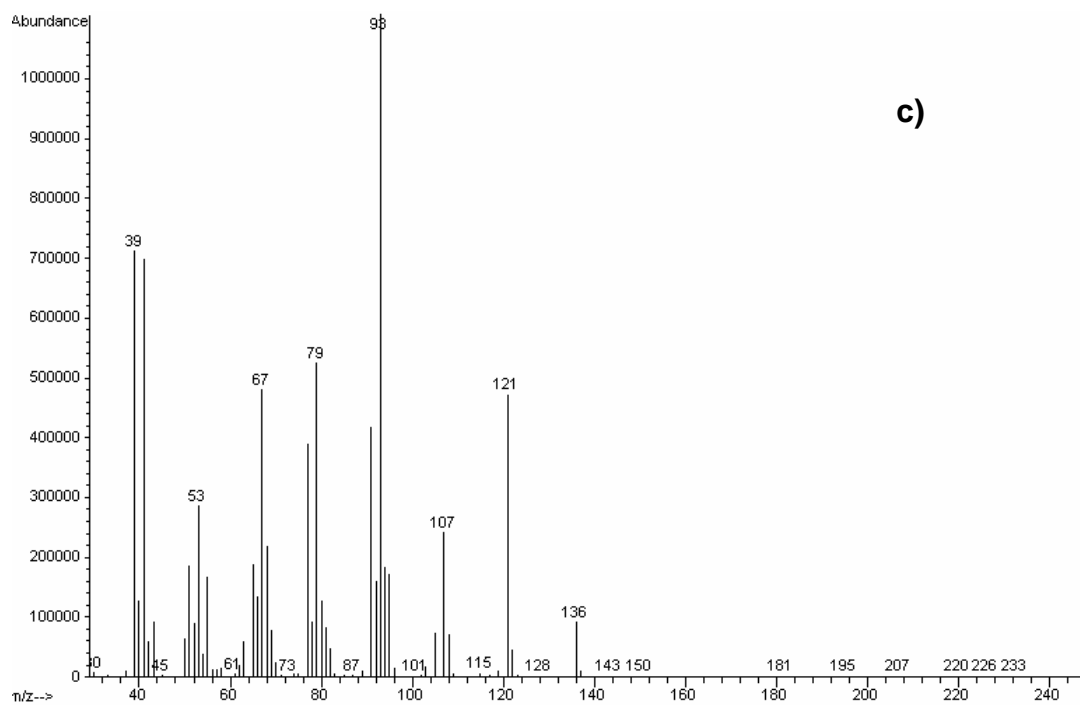
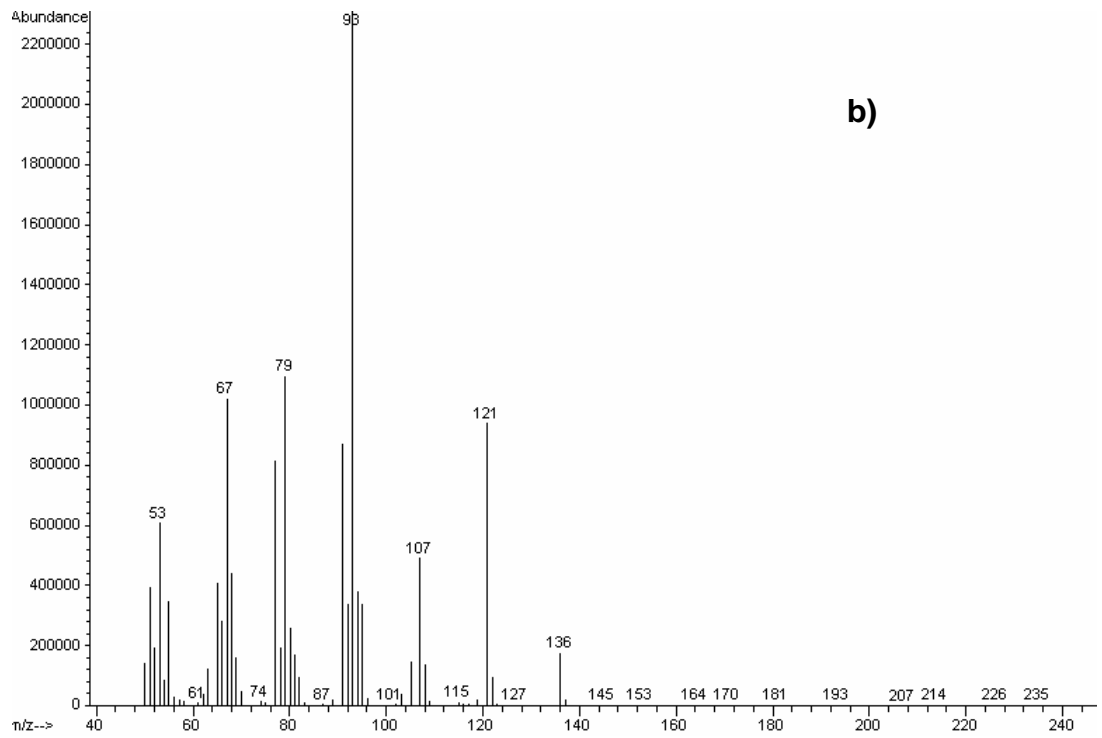


Figura 19 – Fragmentograma experimental do componente identificado como α -Fencheno (pico 3) na amostra *P. hebetatum*.





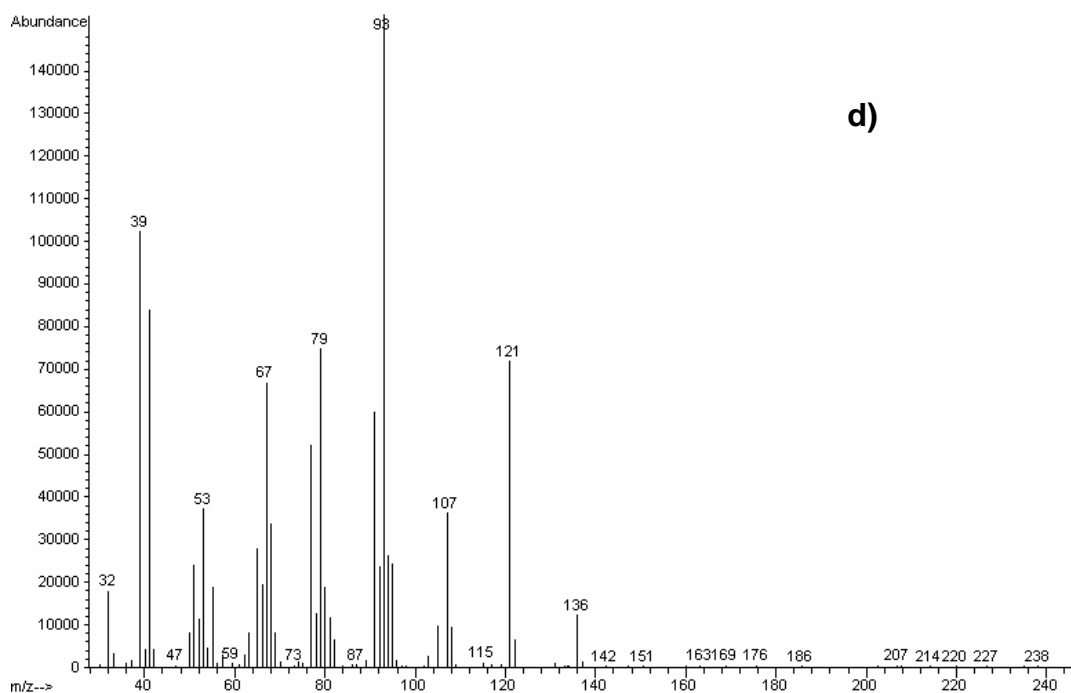


Figura 20 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Canfeno (pico 4): a) *P. hebetaum*; b) *P. nitidifolium*; c) *P. divarictium*; d) *P. amazonicum*

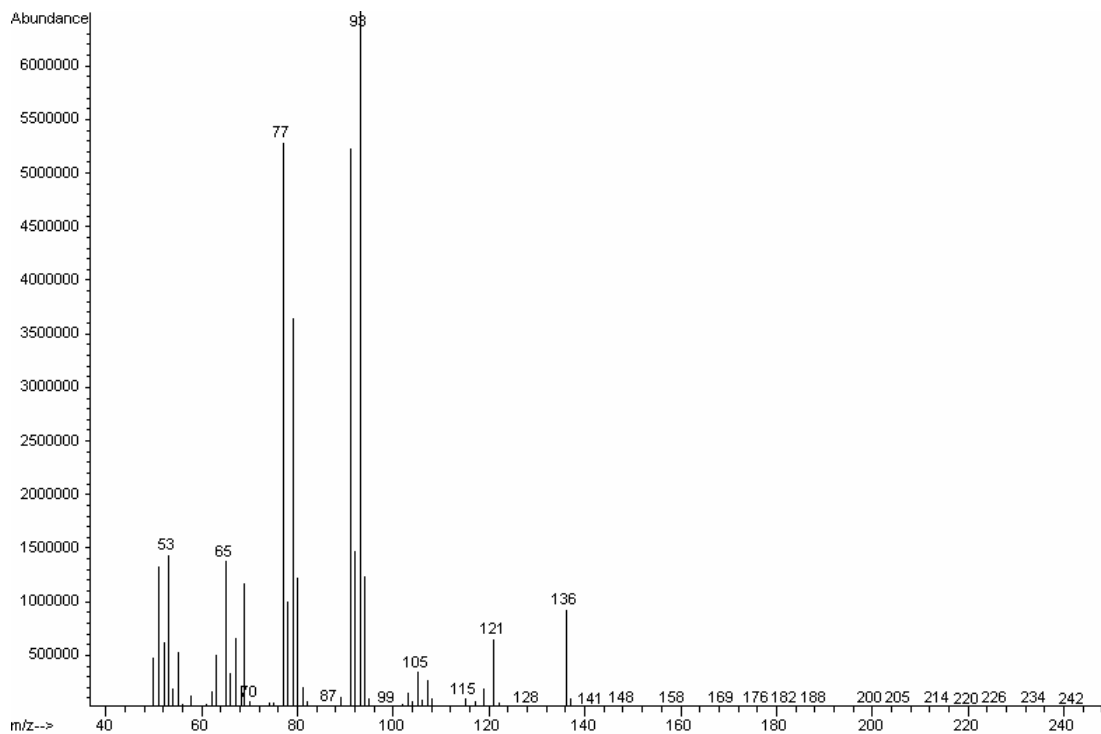
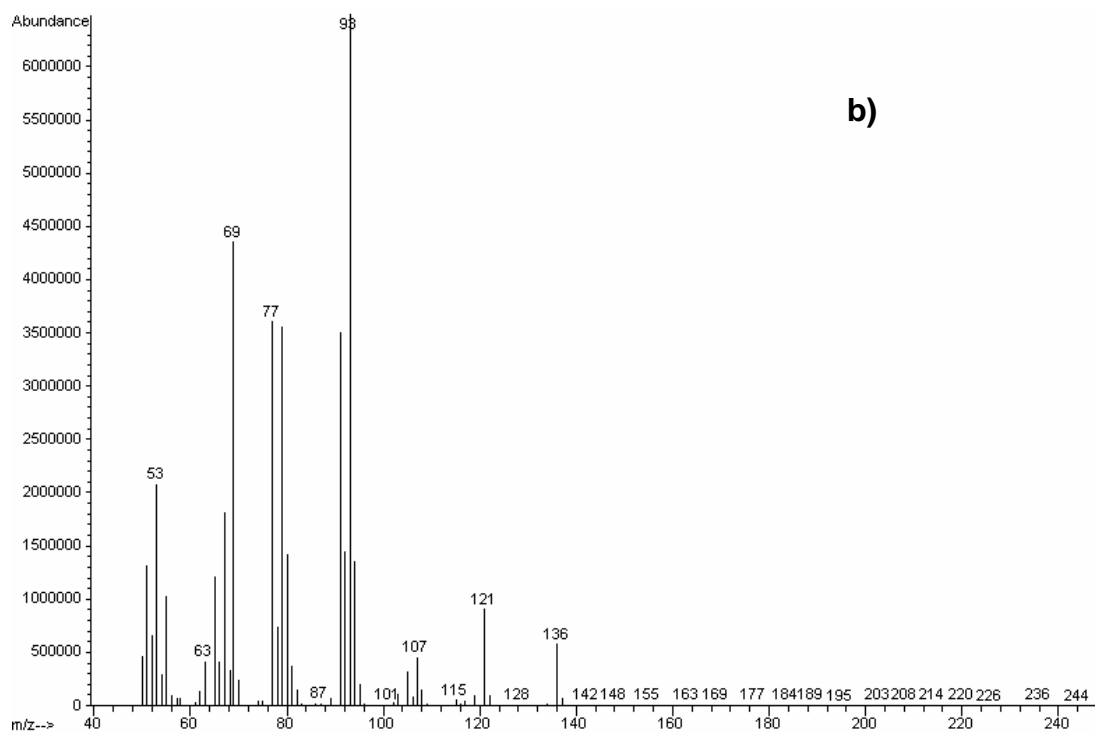
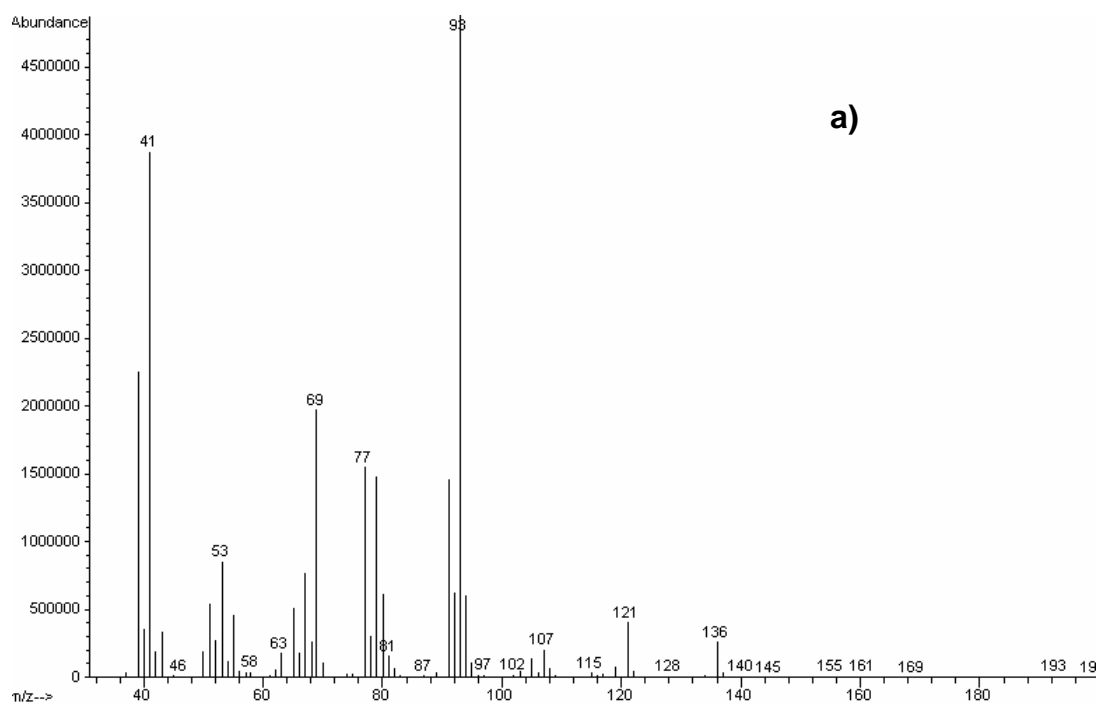


Figura 21 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Sabineno (pico 5) na amostra *P. nitidifolium*.



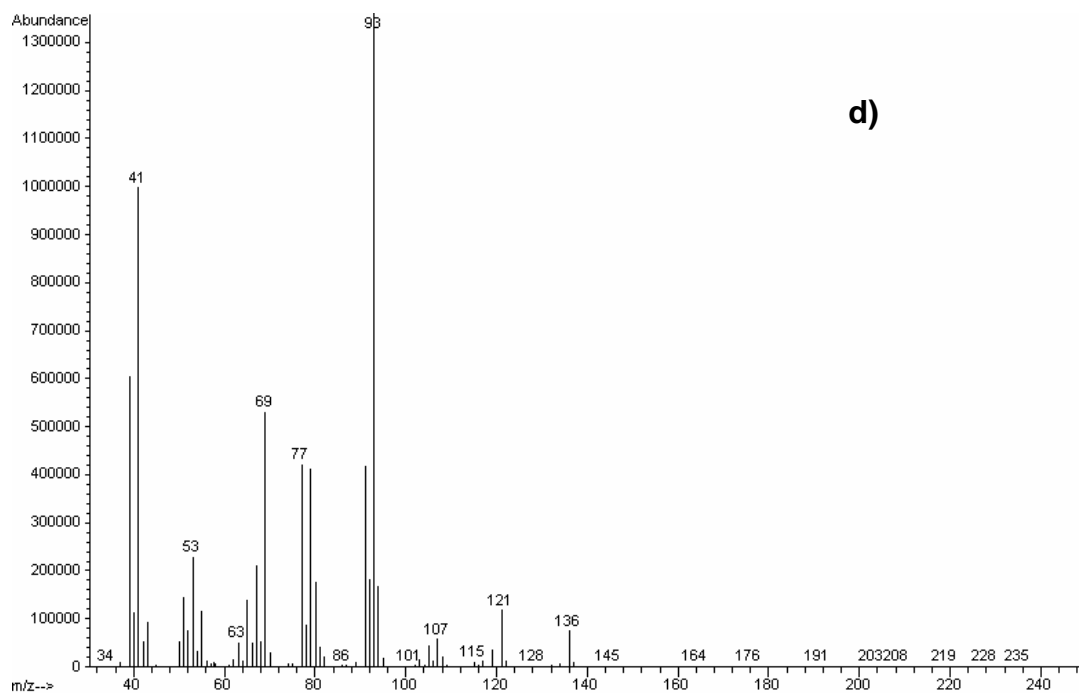
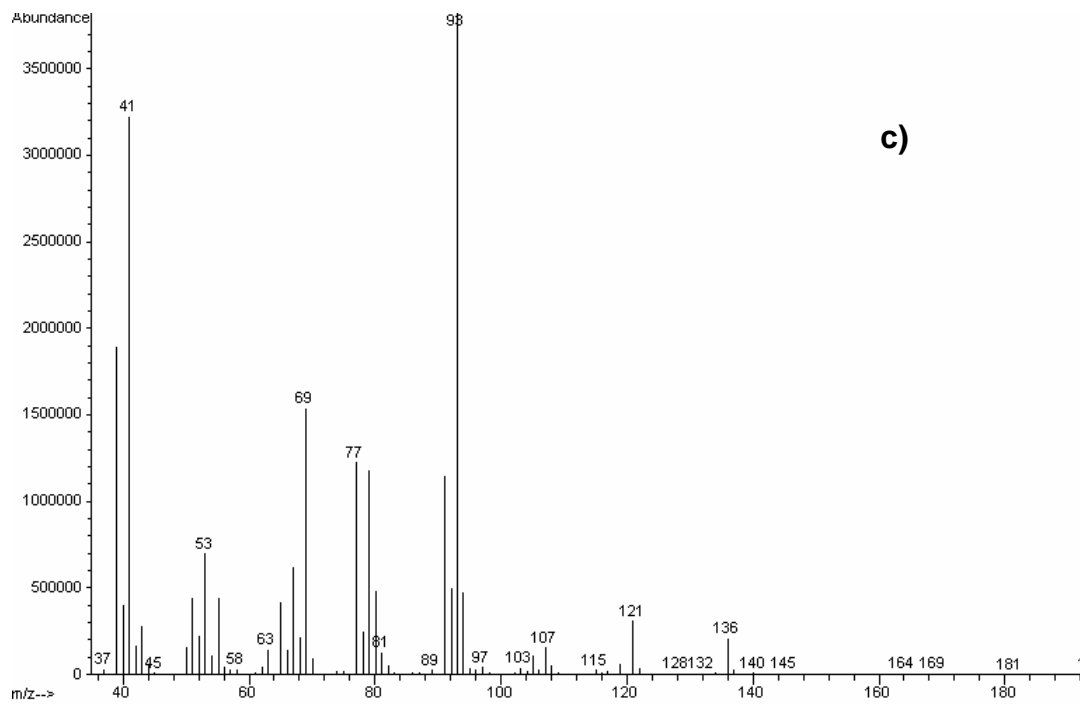


Figura 22 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como β -Pineno (pico 6): a) *P. hebetaum*; b) *P. nitidifolium*; c) *P. divarictium*; d) *P. amazonicum*.

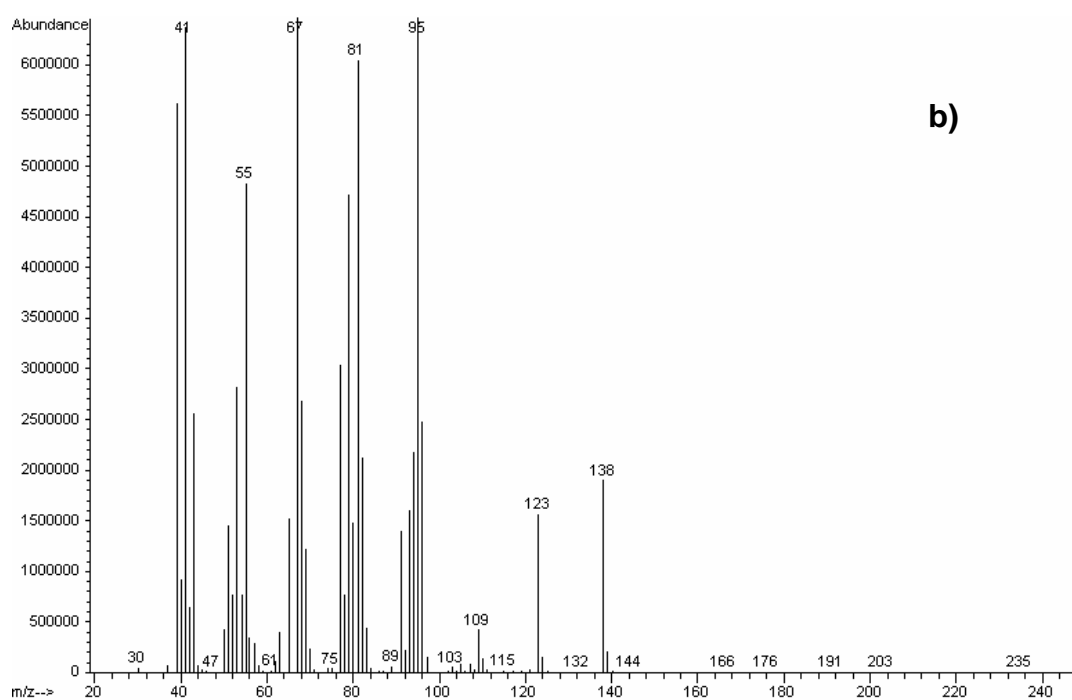
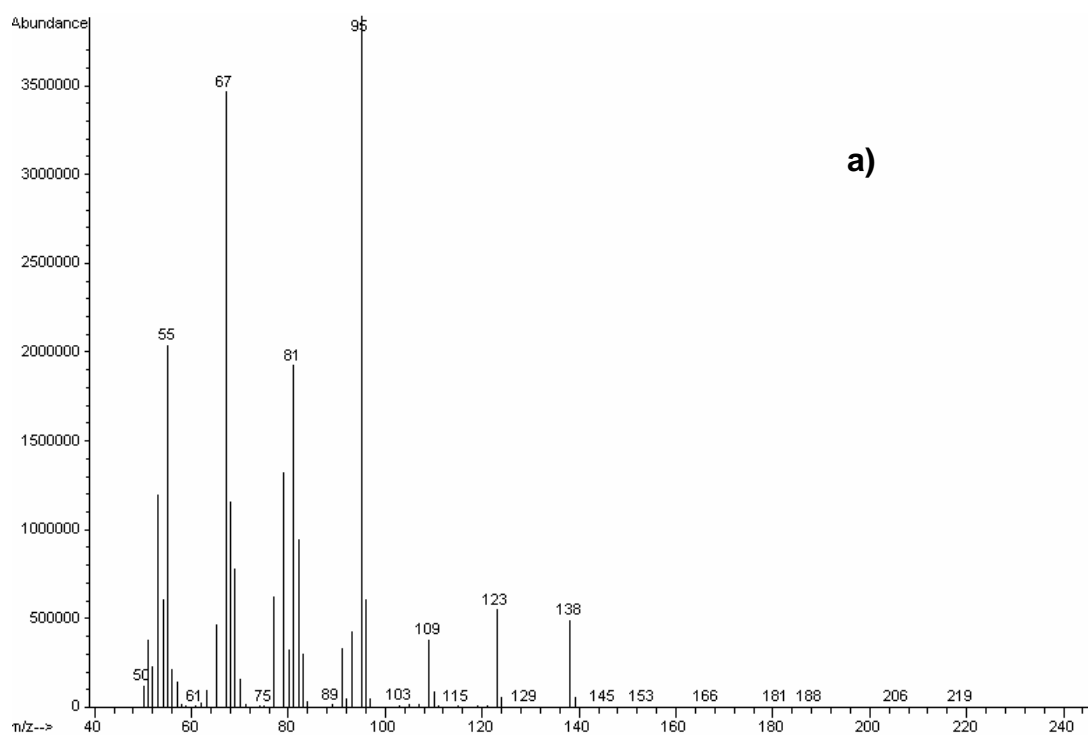
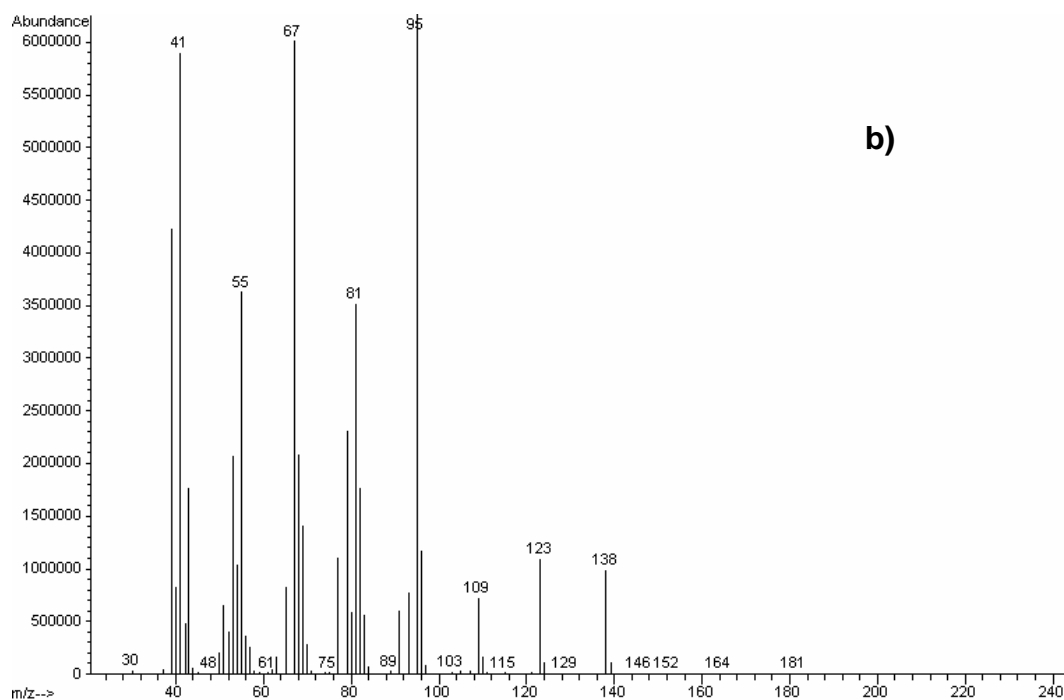
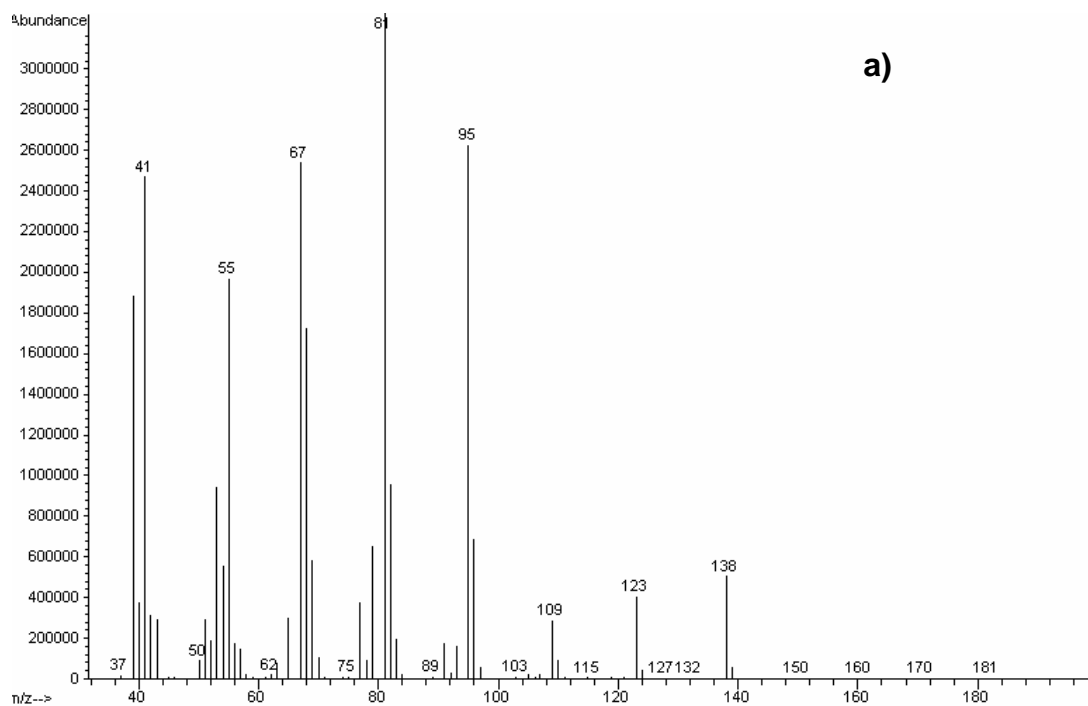


Figura 23 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como cis-Pinano (pico 7): a) *P. nitidifolium*; b) *P. divarictium*;



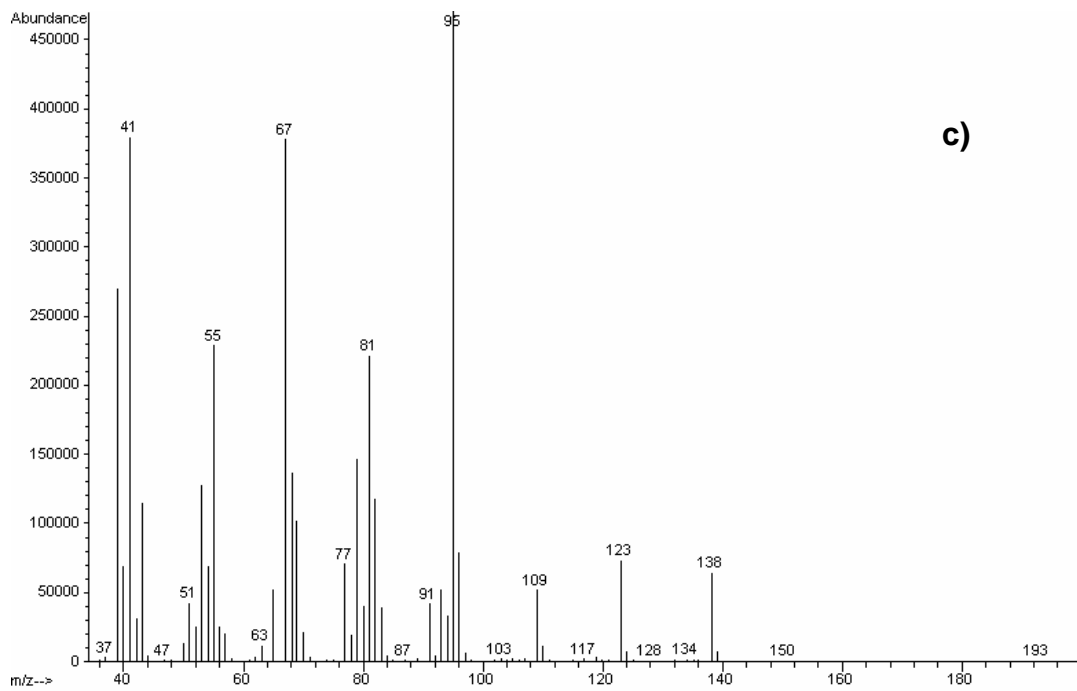
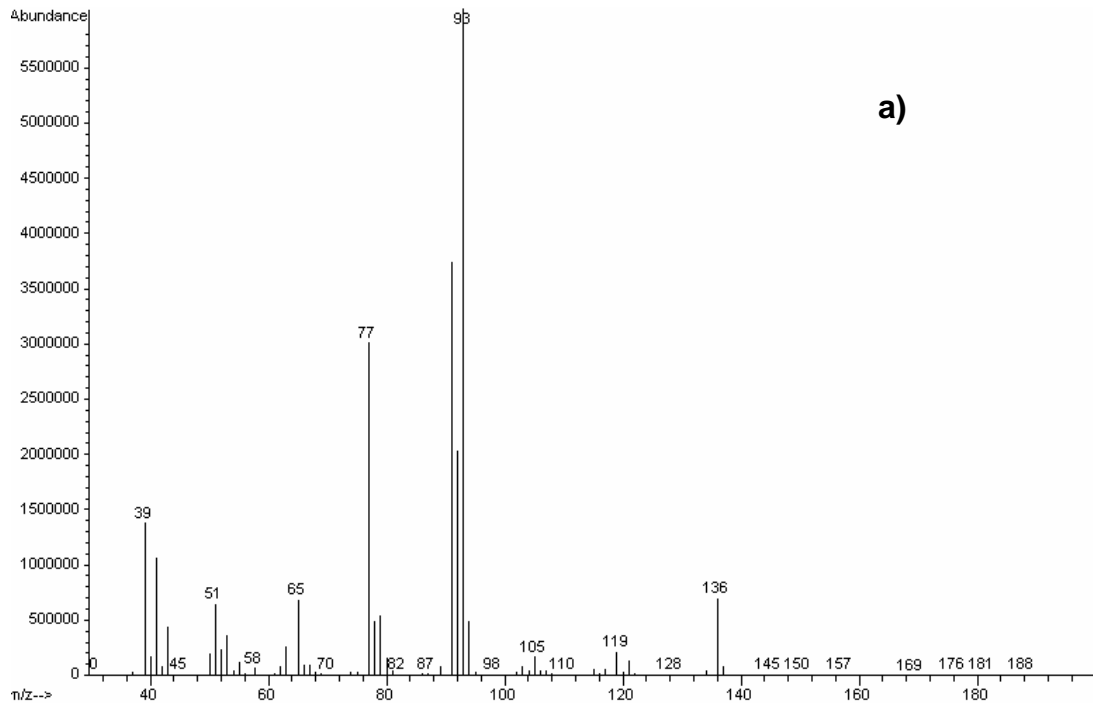


Figura 24 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como 3-p-Menteno (pico 8): a) *P. hebetatum*; b) *P. divarictium*; c) *P. amazonicum*.



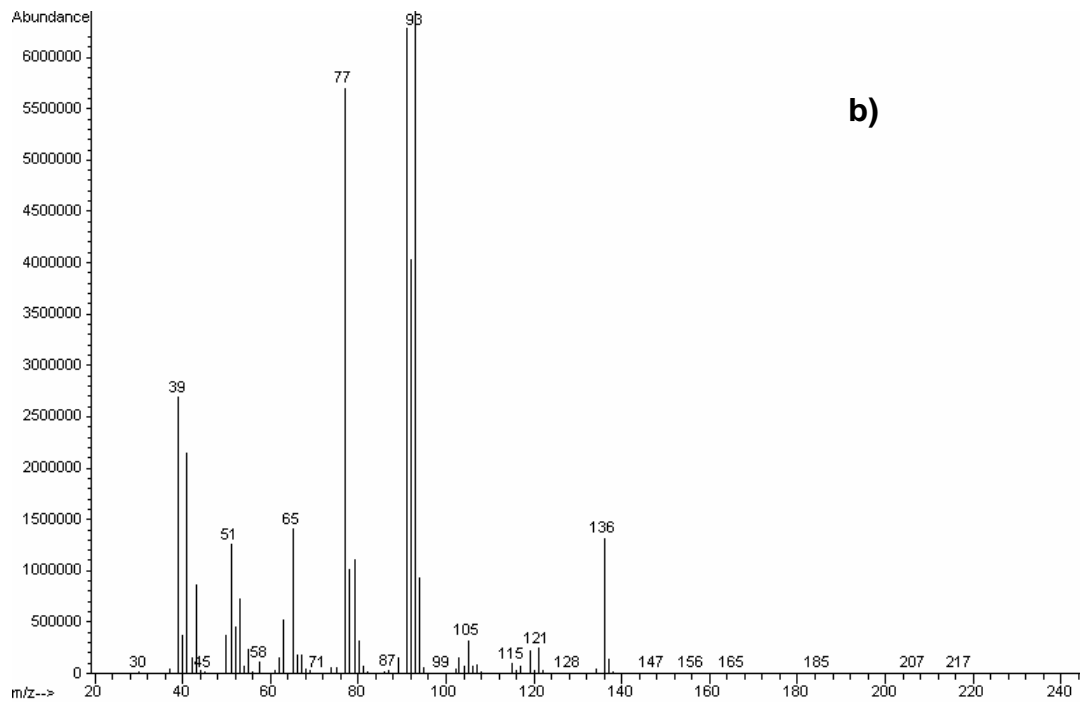
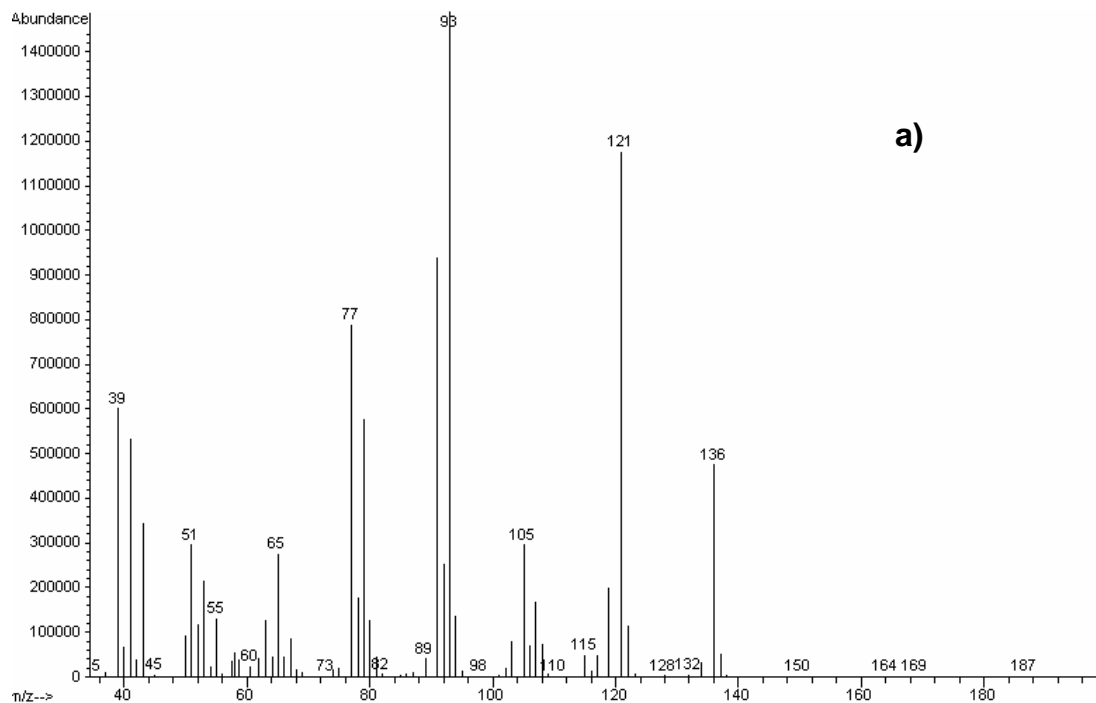


Figura 25 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Felandreno (pico 9): a) *P. hebetatum*; b) *P. divarictum*.



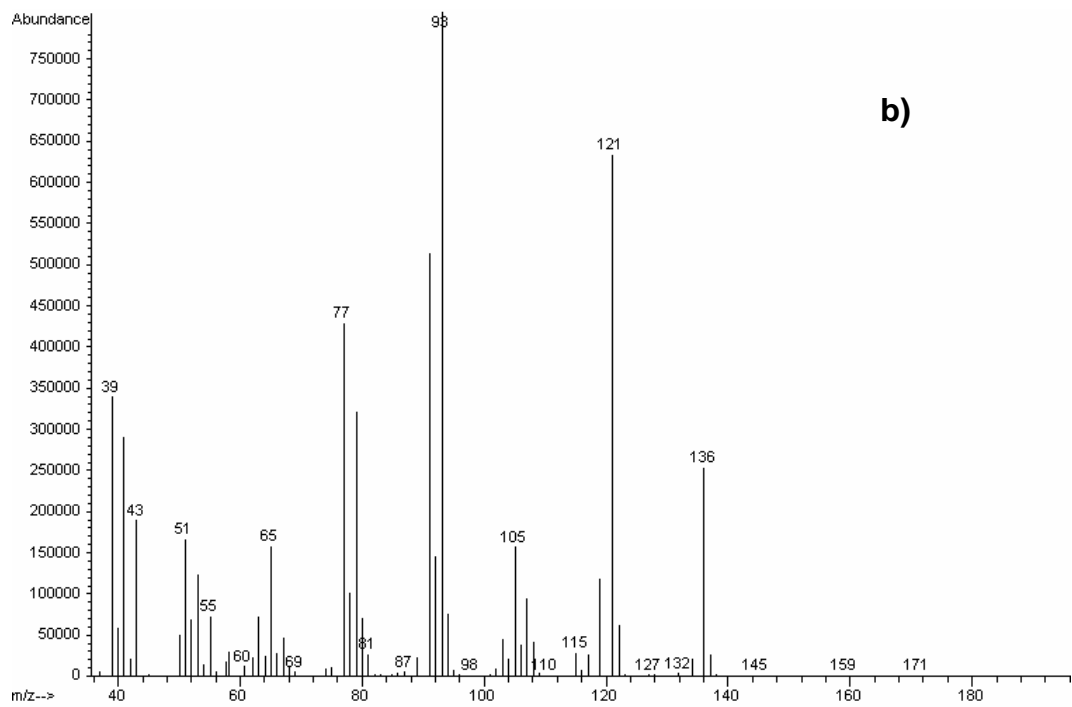
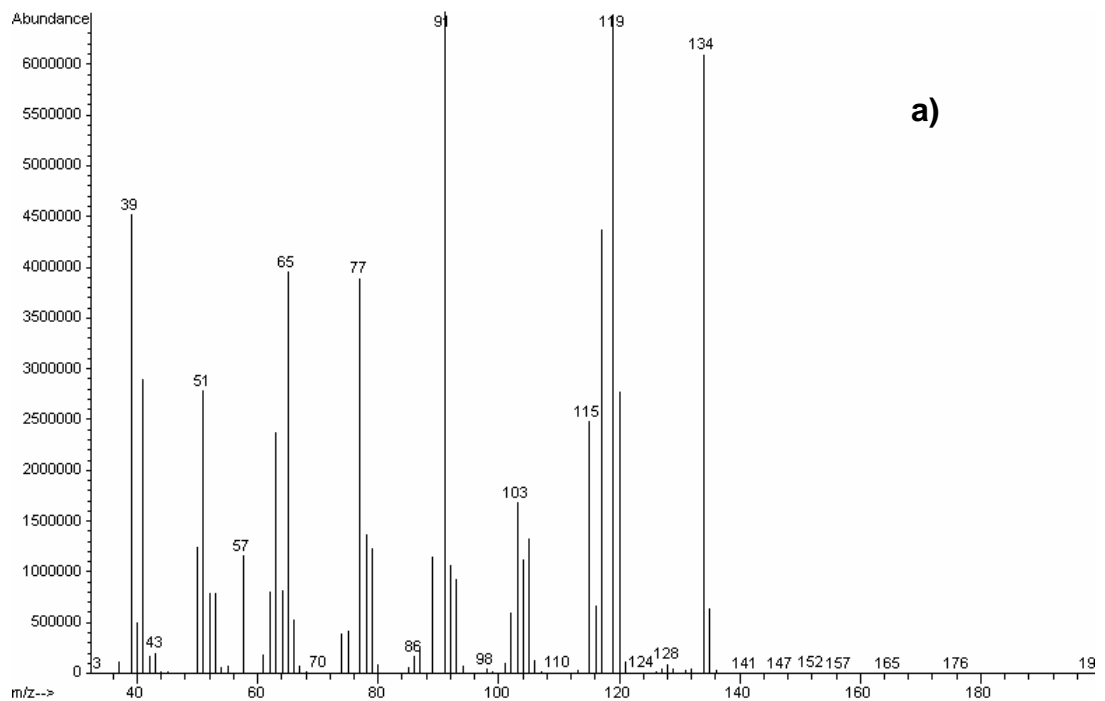
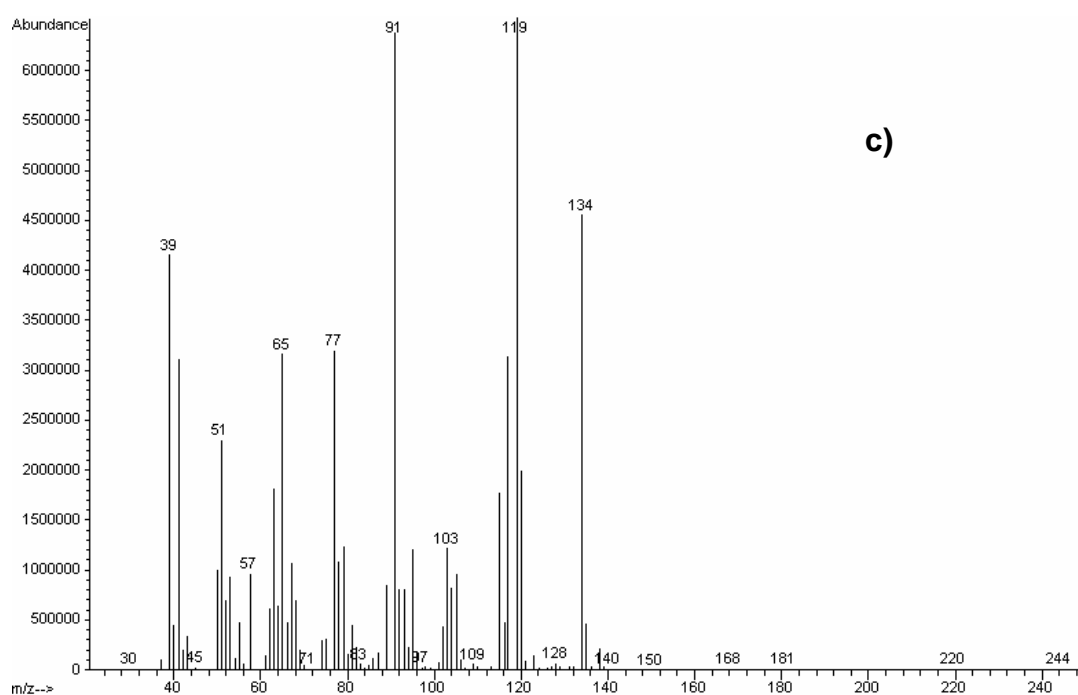
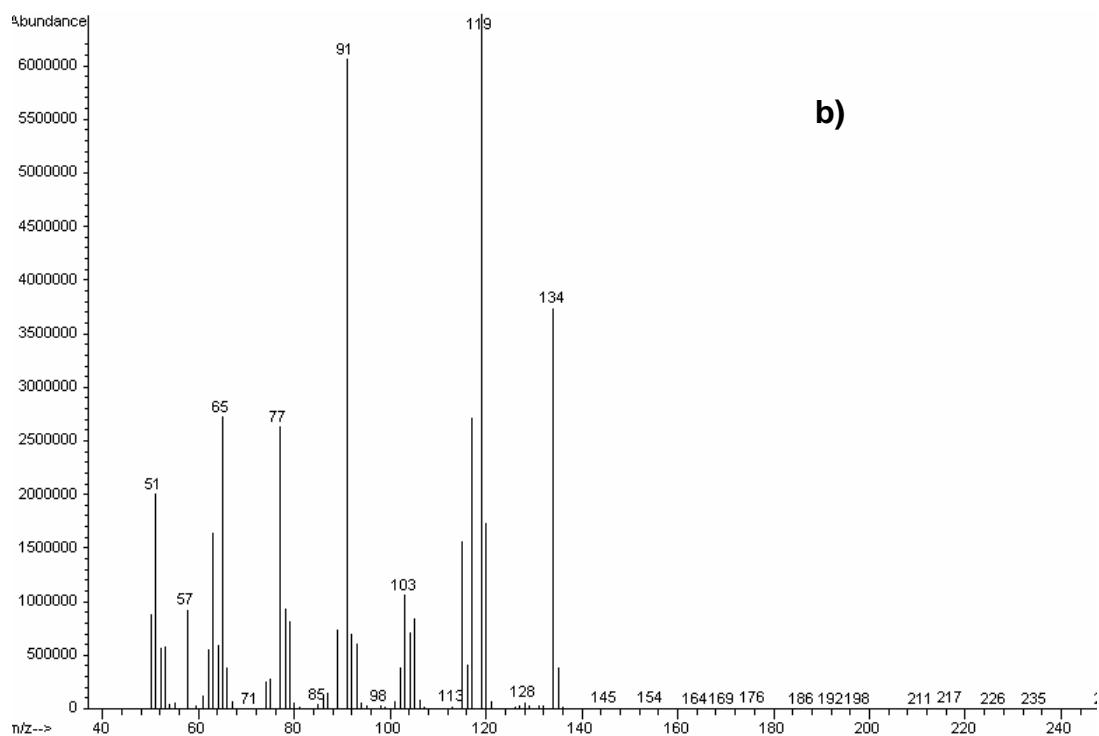


Figura 26 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como δ -2-Careno (pico 10): a) *P. hebetaum*; b) *P. divarictium*.





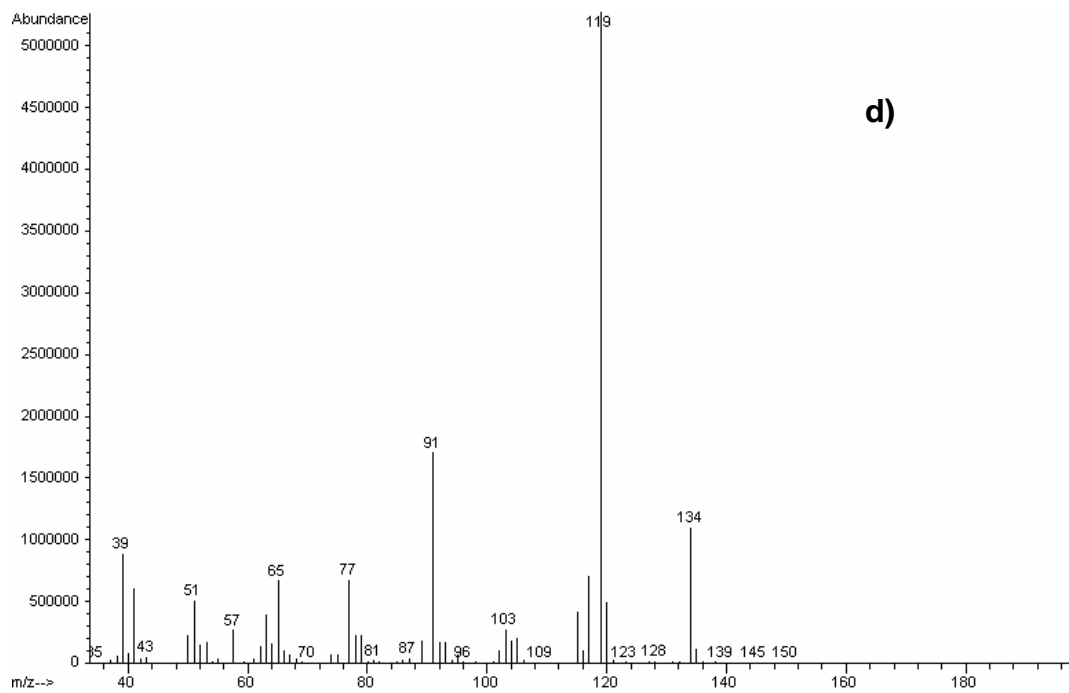
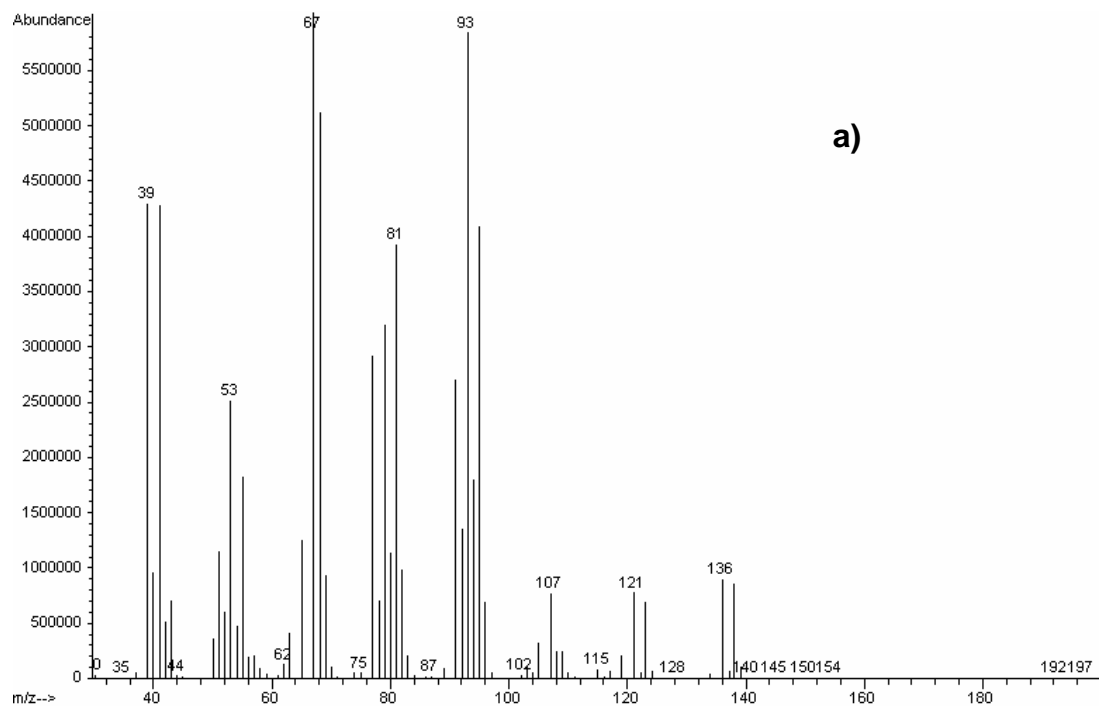
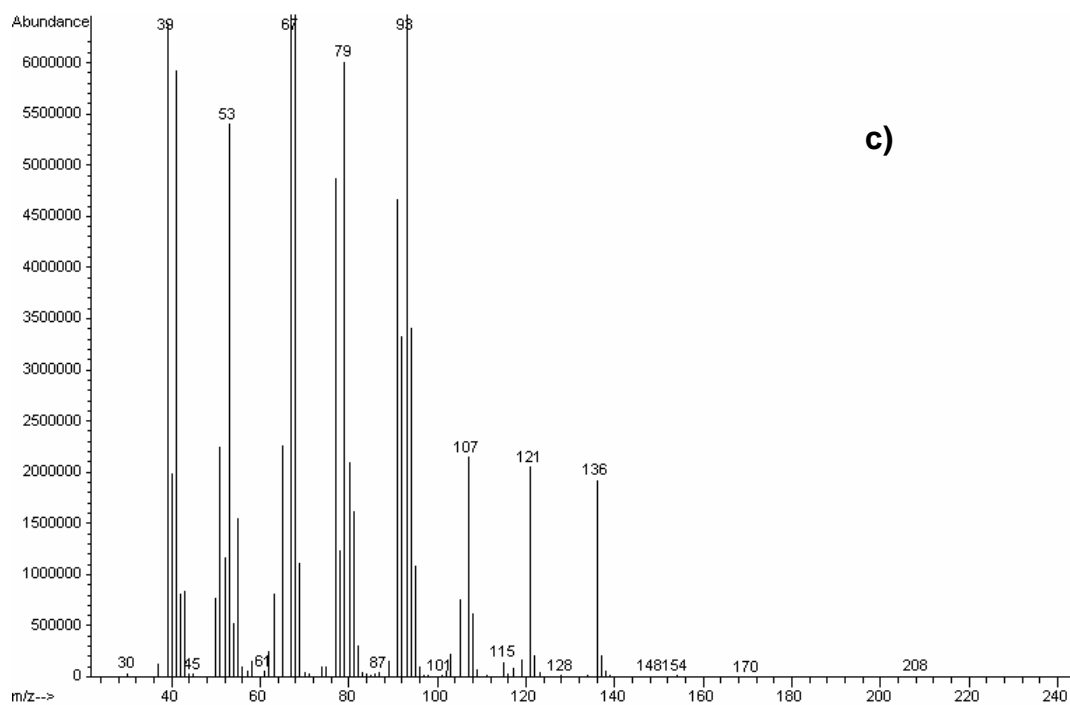
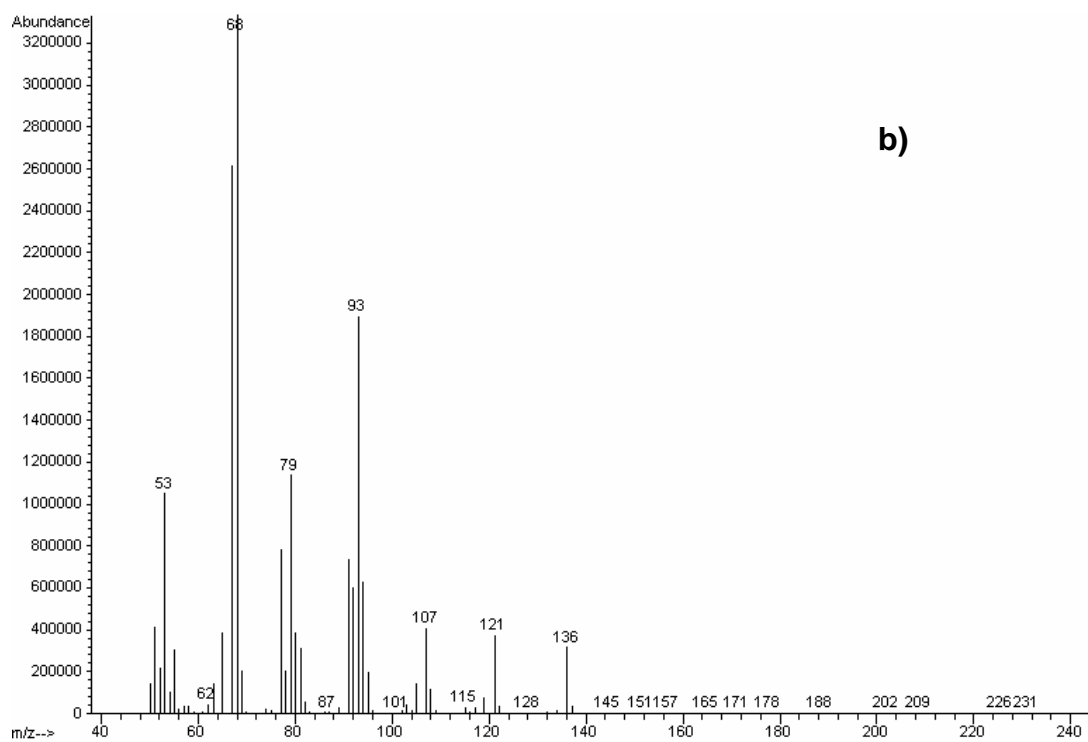


Figura 27 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como o-Cimeno (pico 11): a) *P. hebetaum*; b) *P. nitidifolium*; c) *P. divarictium*; d) *P. amazonicum*.





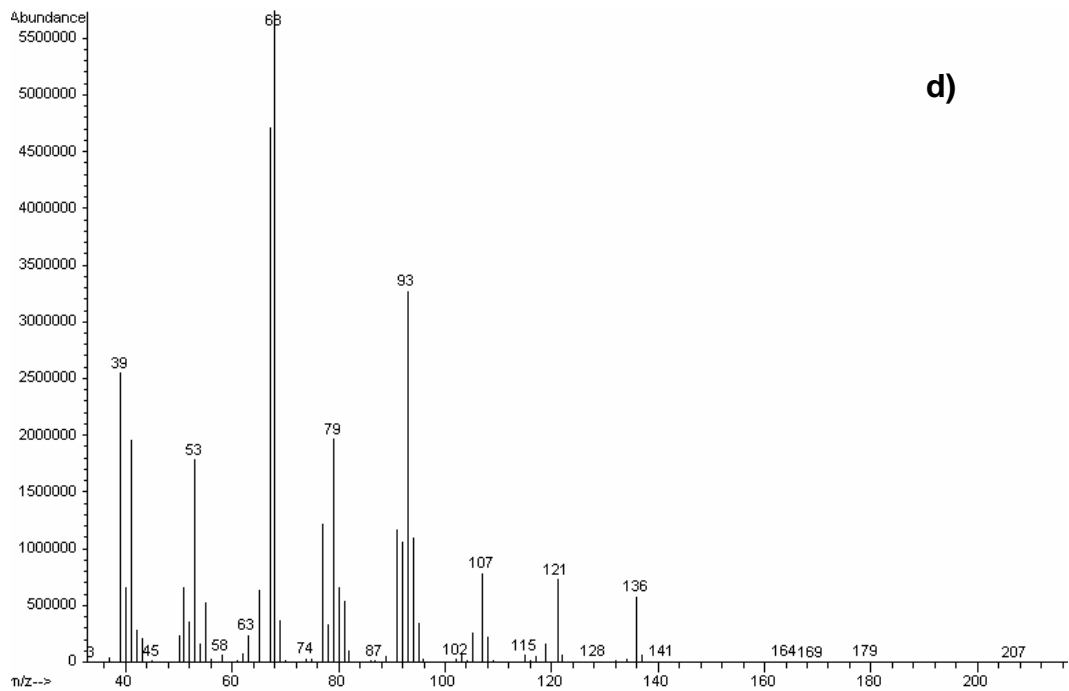
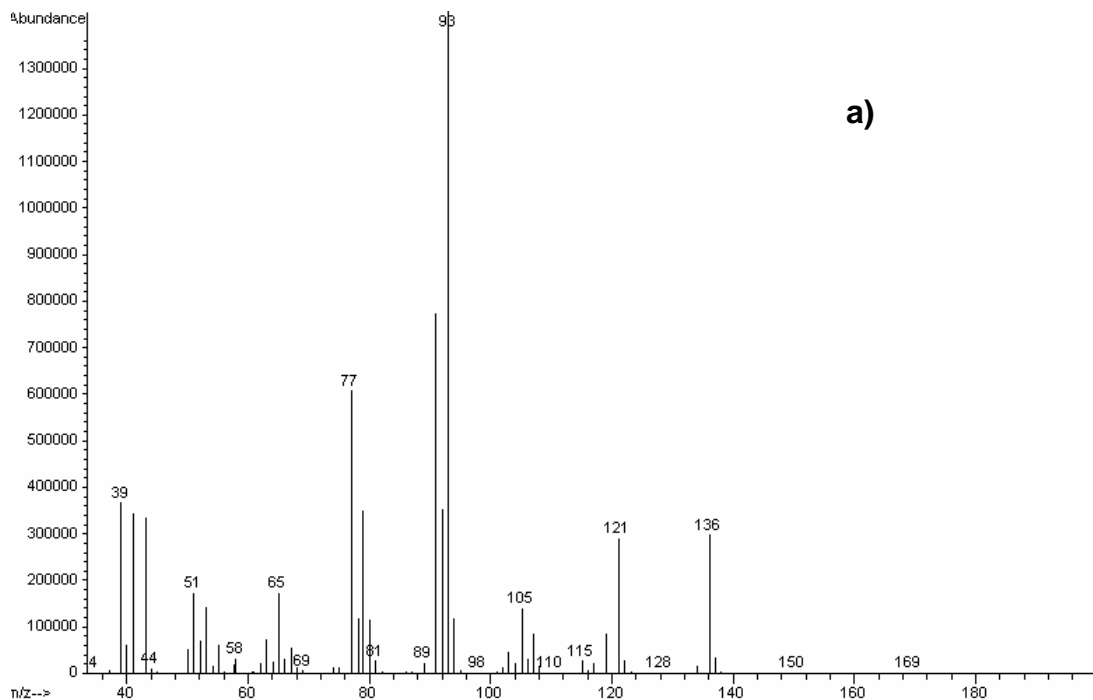


Figura 28 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Limoneno (pico 12): a) *P. hebetaum*; b) *P. nitidifolium*; c) *P. divarictium*; d) *P. amazonicum*.



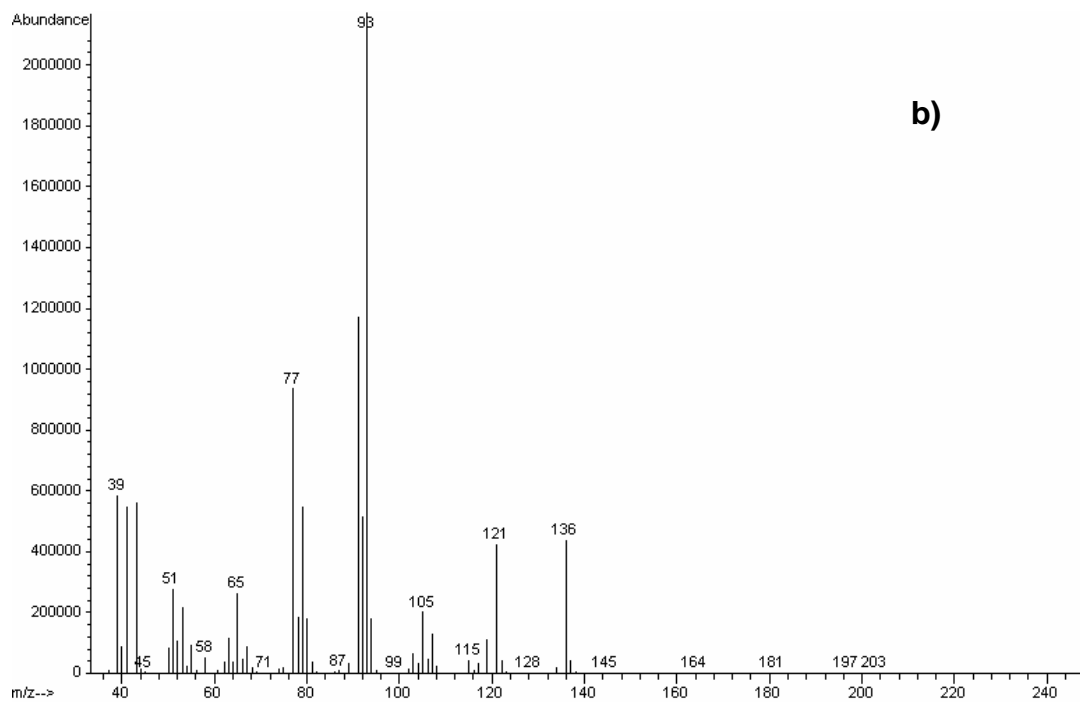


Figura 29 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como γ -Terpineno (pico 13): a) *P. hebetaum*; b) *P. nitidifolium*.

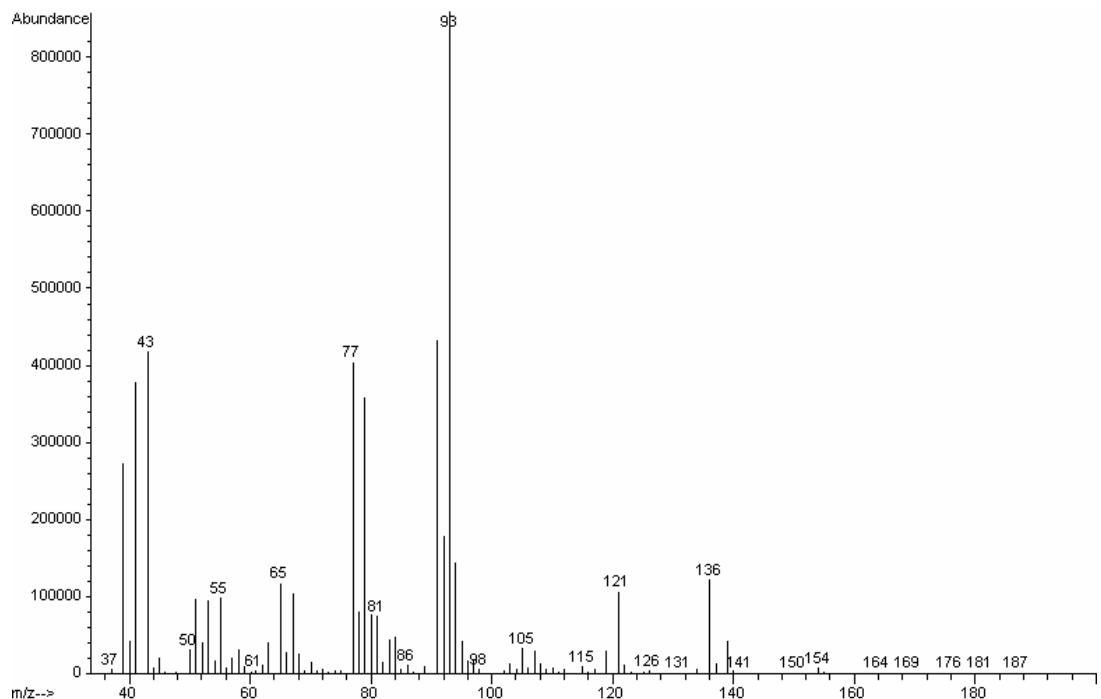


Figura 30 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Terpinoleno (pico 14) na amostra *P. nitidifolium*.

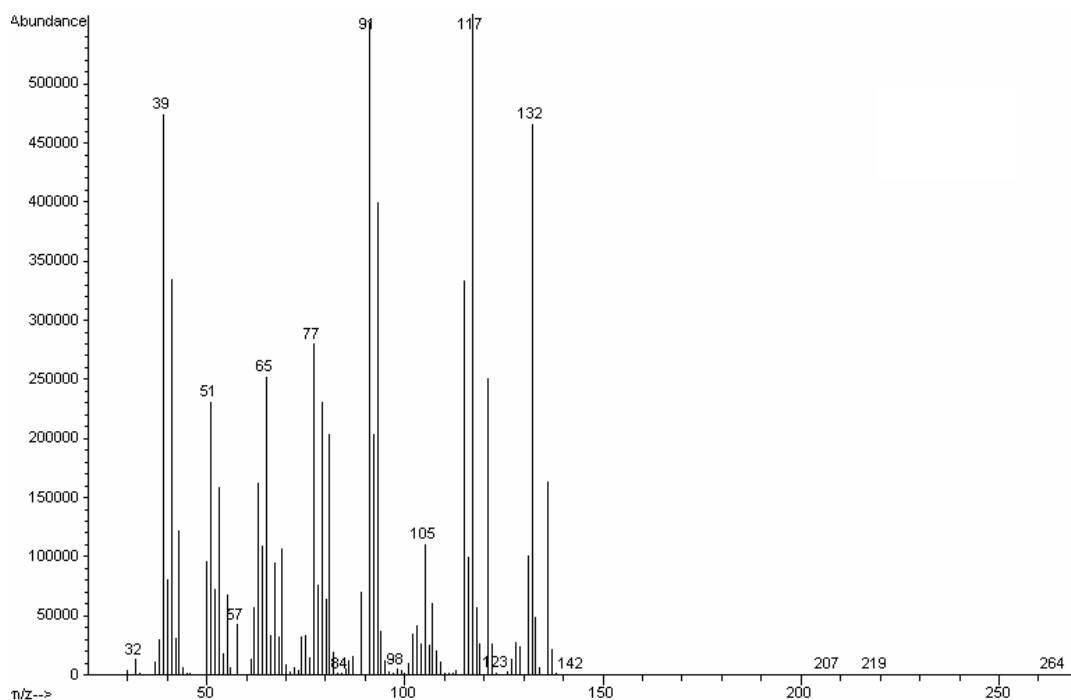


Figura 31 – Fragmentograma experimental do componente identificado como p-Cimeno (pico 15) na amostra *P. divarictium*.

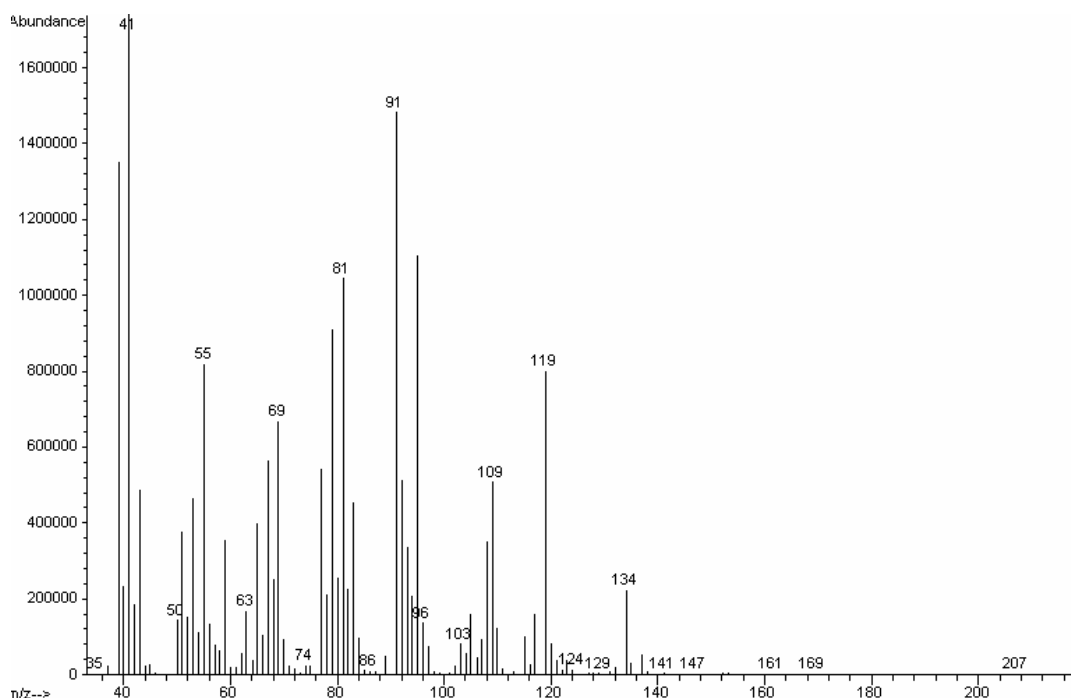
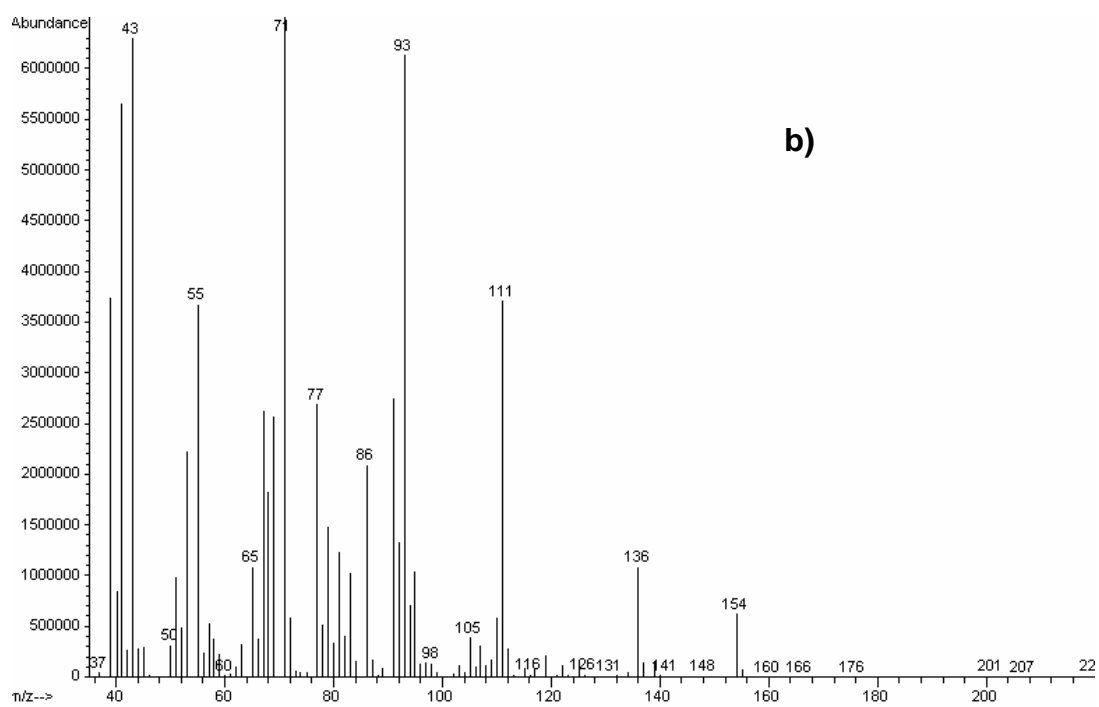
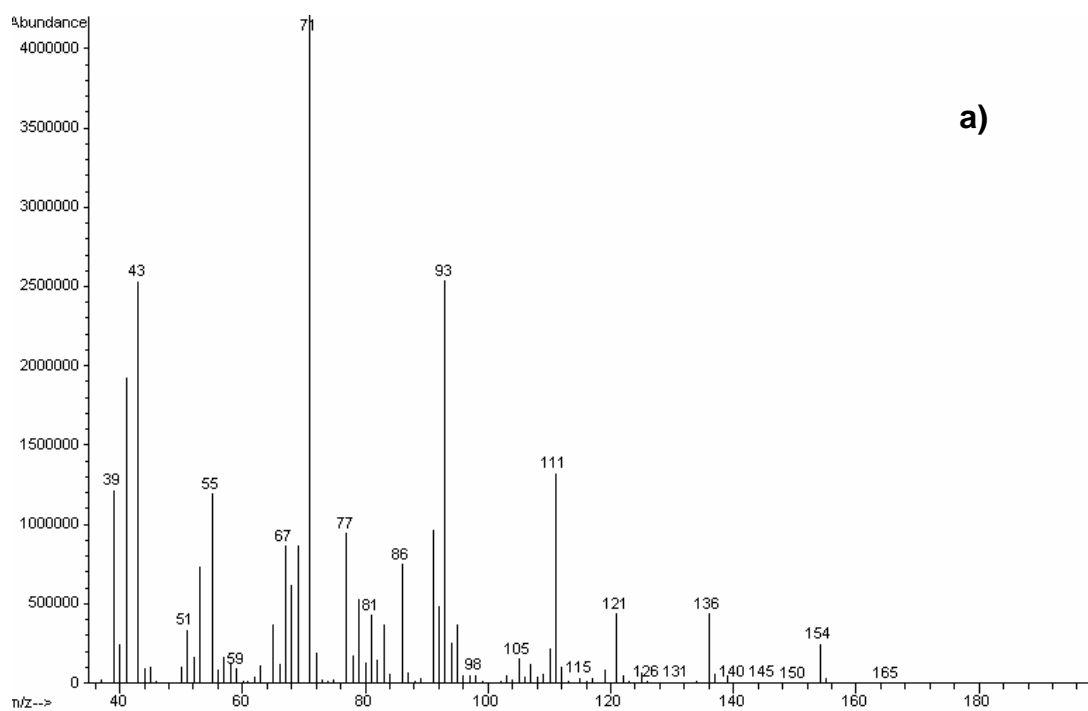


Figura 32 – Fragmentograma experimental do componente identificado como trans-Sabinol (pico 16) na amostra *P. nitidifolium*.



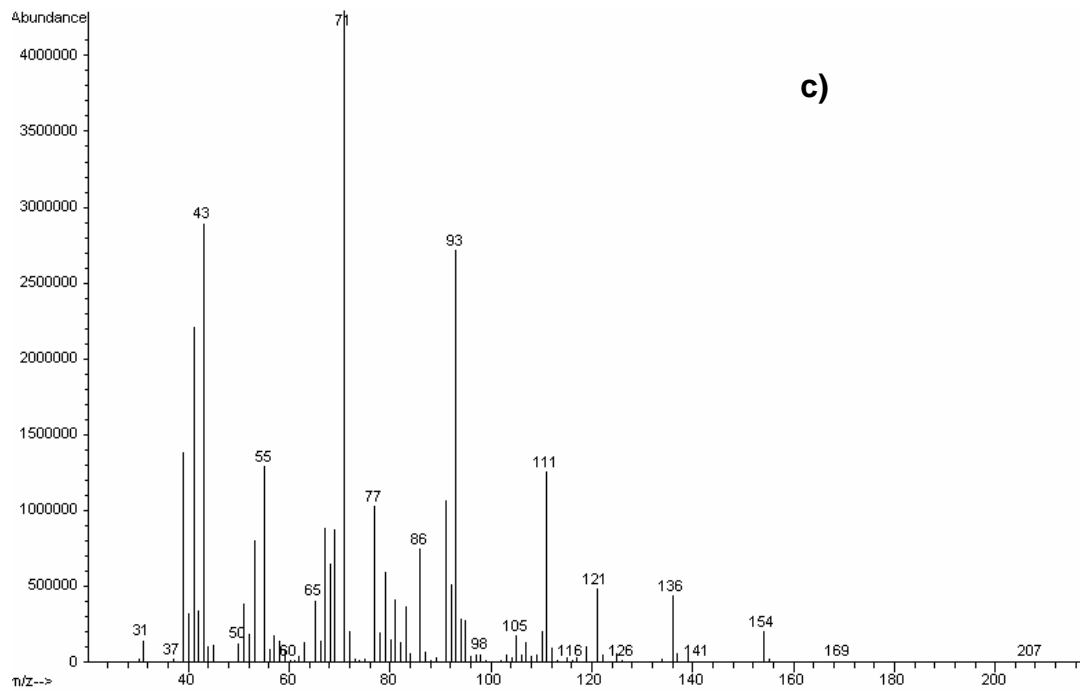
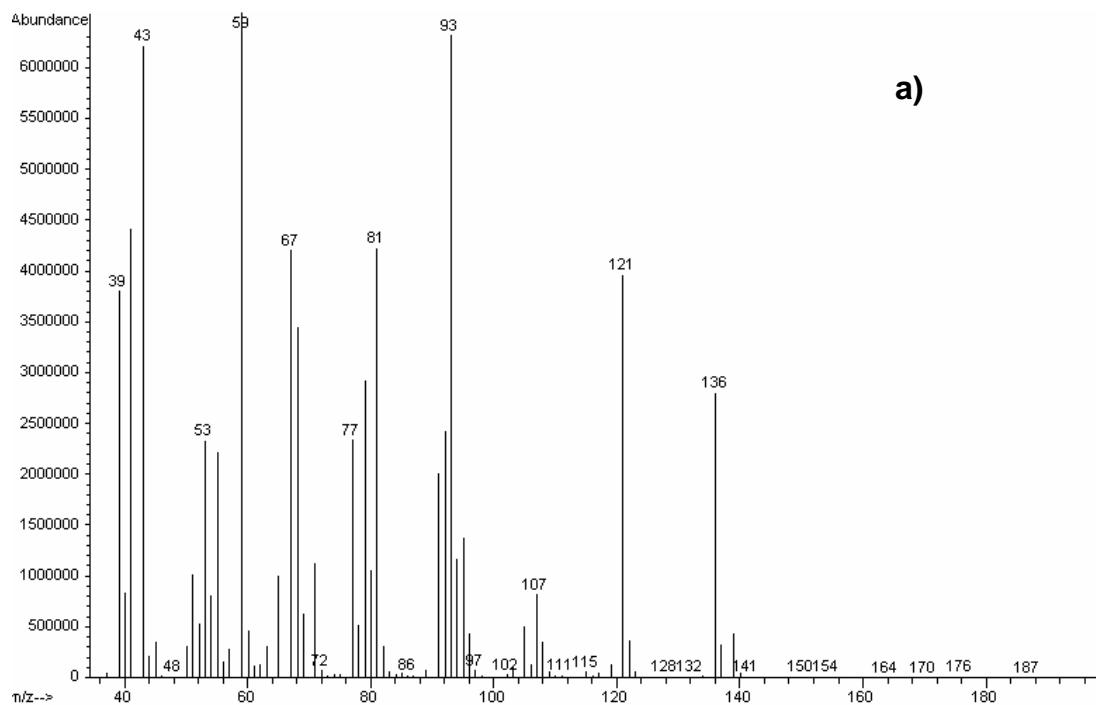


Figura 33 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Terpin-4-ol (pico 17): a) *P. hebetaum*; b) *P. nitidifolium*; c) *P. divarictium*.



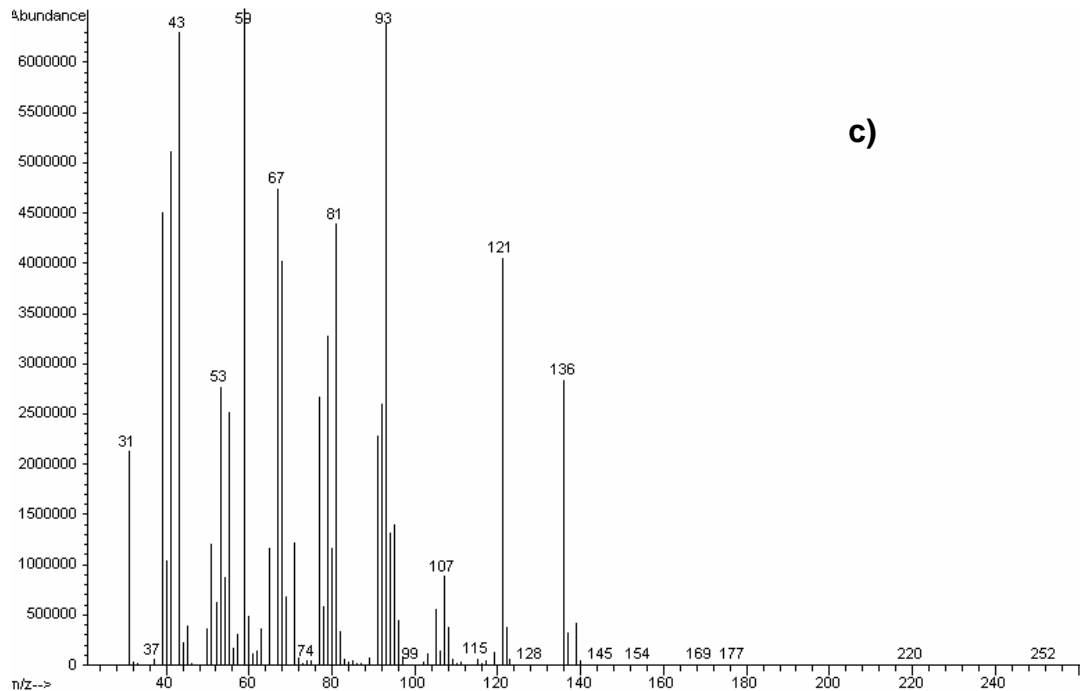
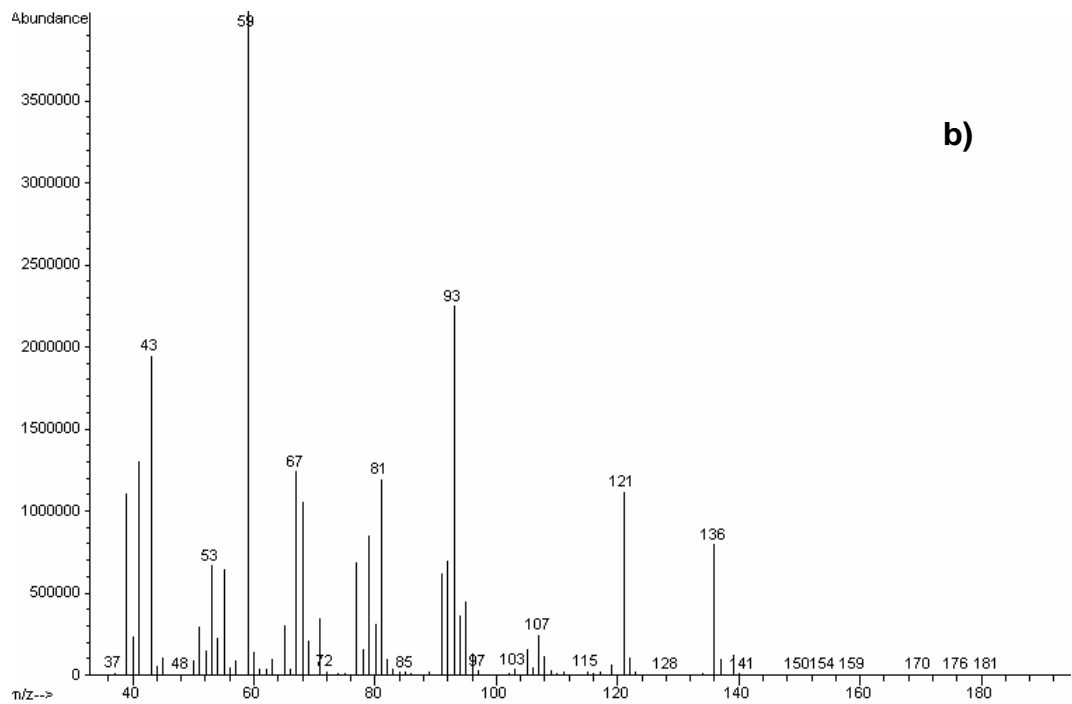


Figura 34 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Terpineol (pico 18): a) *P. hebetatum*; b) *P. nitidifolium*; c) *P. divarictium*.

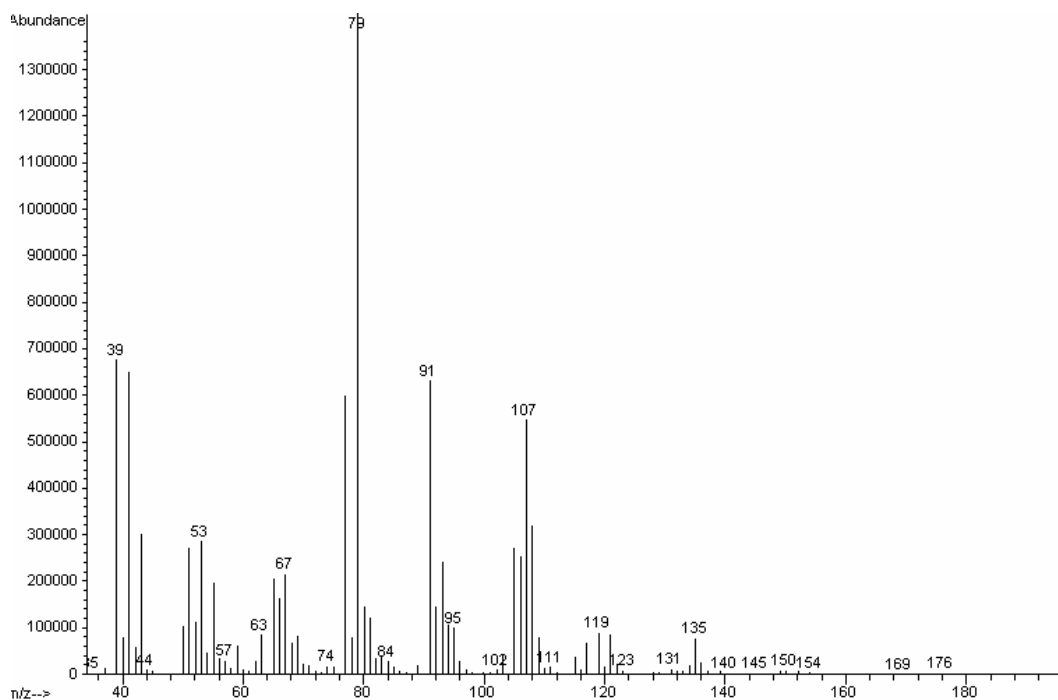


Figura 35 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Tuj-3-em-10-al (pico 19) na amostra *P. nitidifolium*.

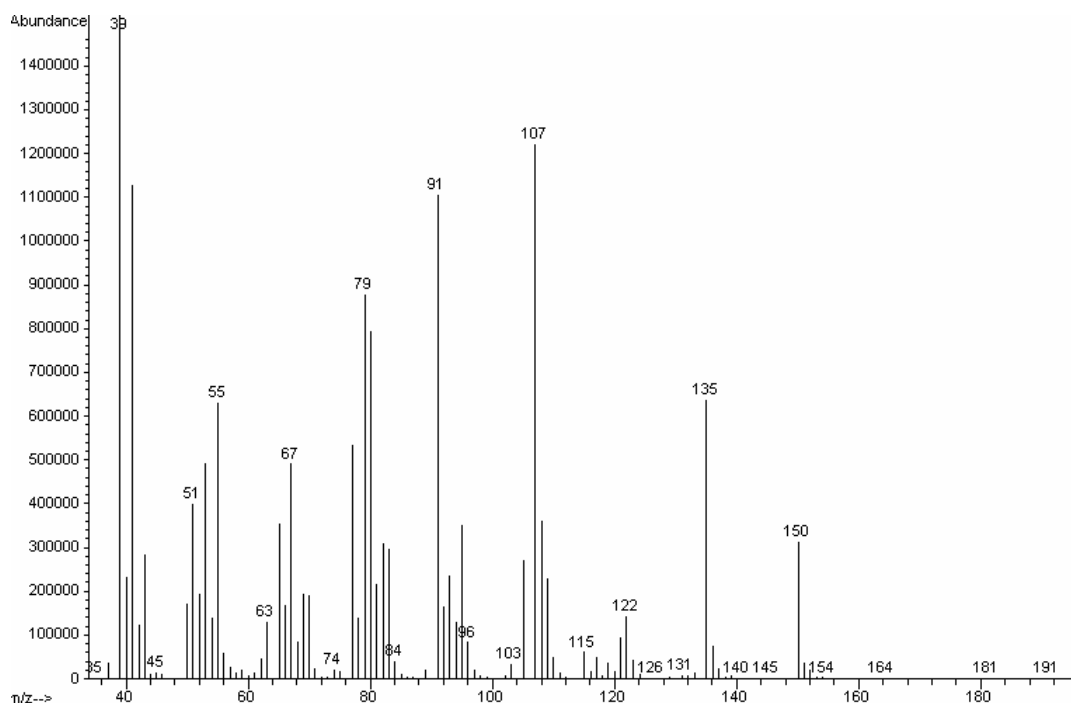


Figura 36 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Verbenona (pico 20) na amostra *P. nitidifolium*.

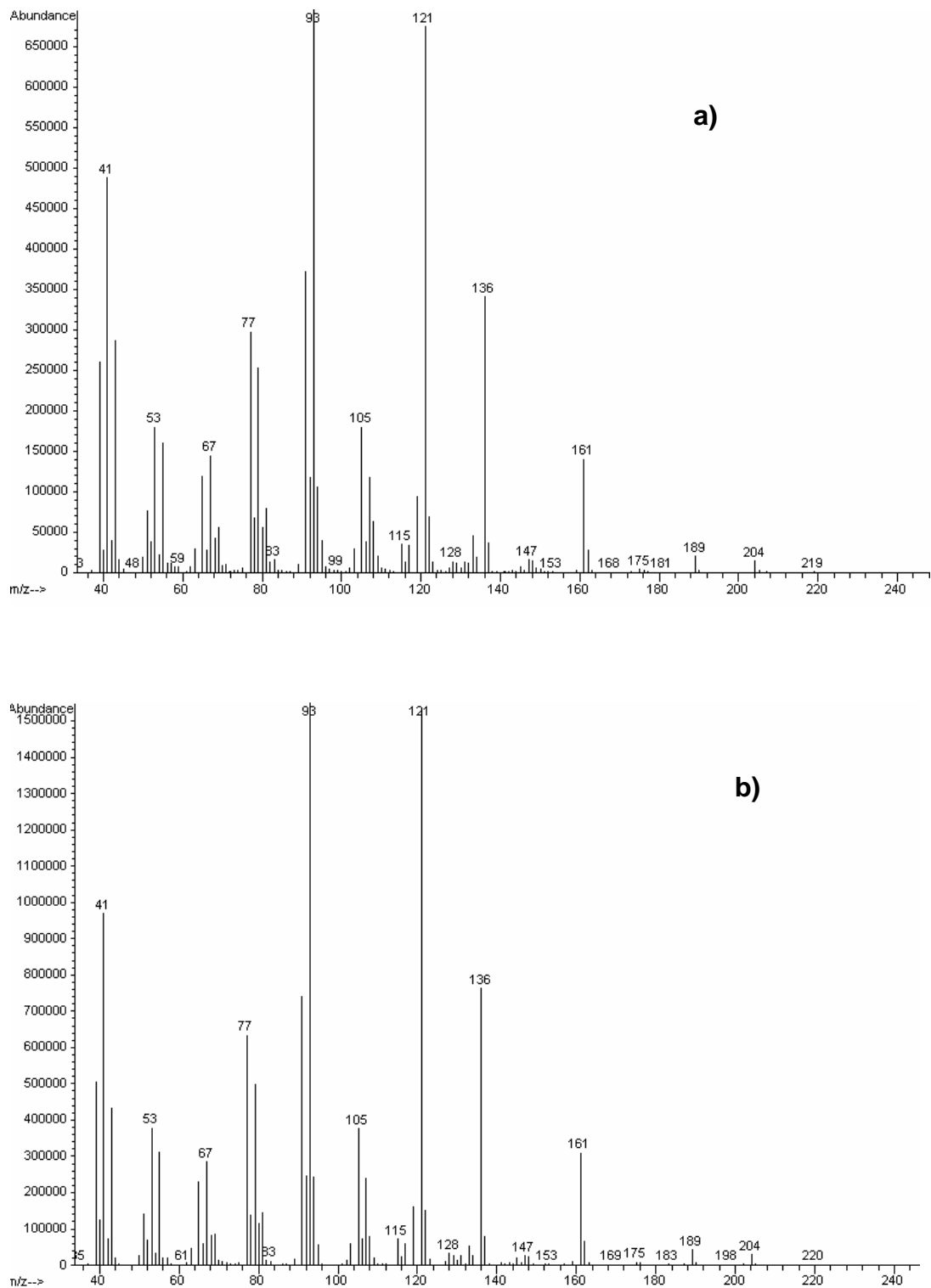
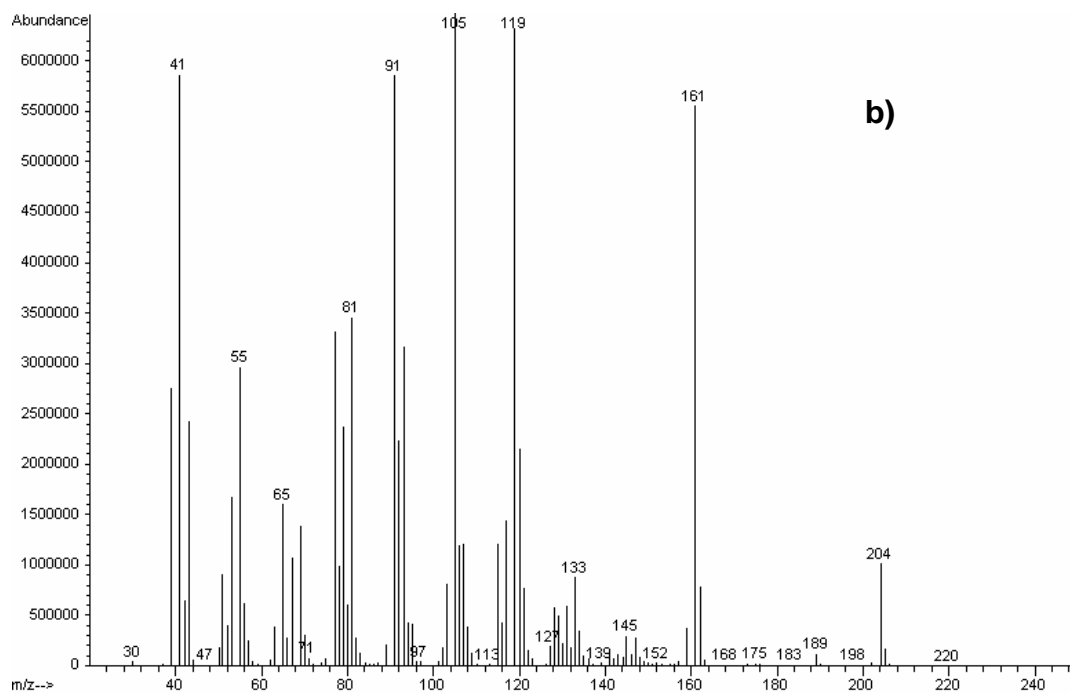
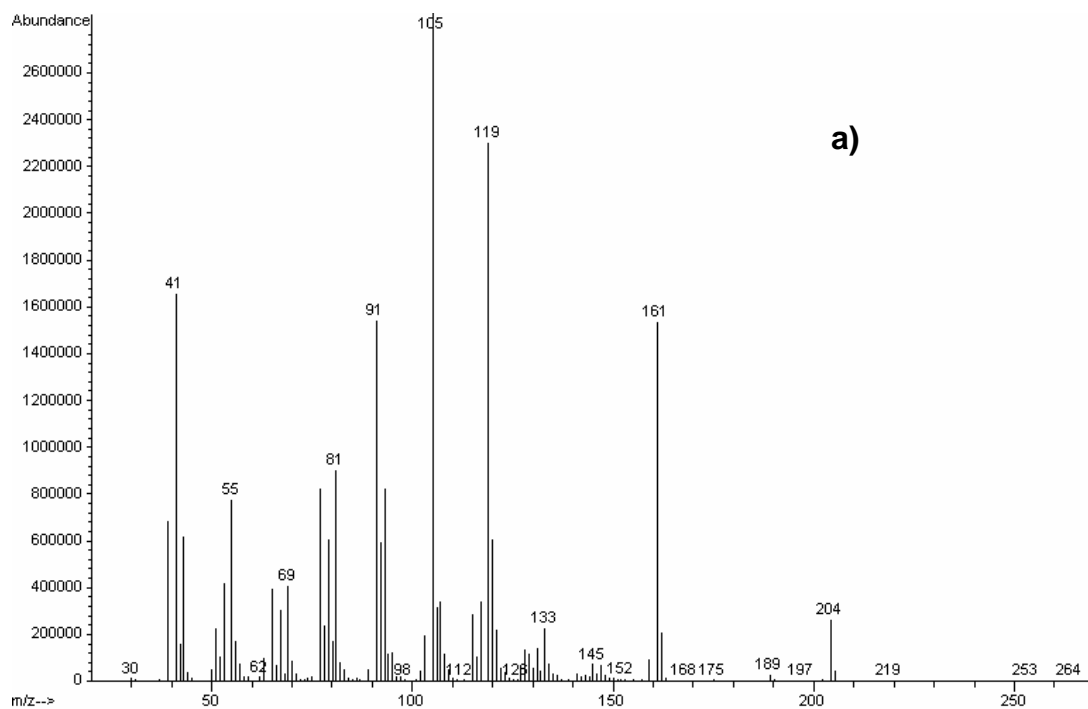


Figura 37 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como δ -Elemeno (pico 21): a) *P. nitidifolium*; b) *P. a amazonicum*.



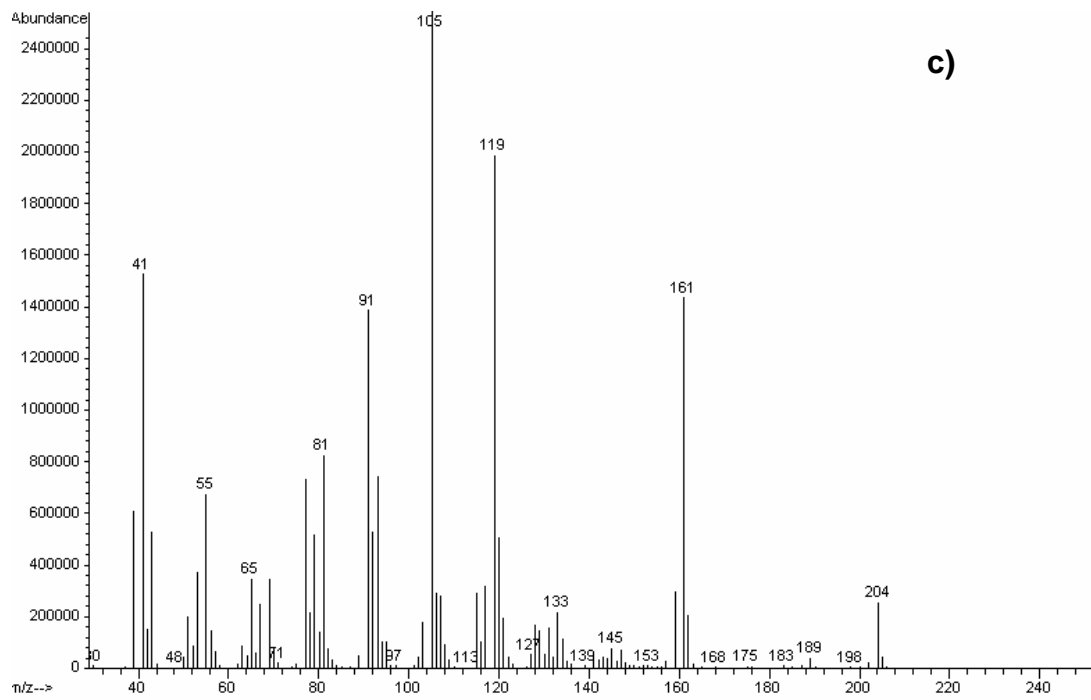
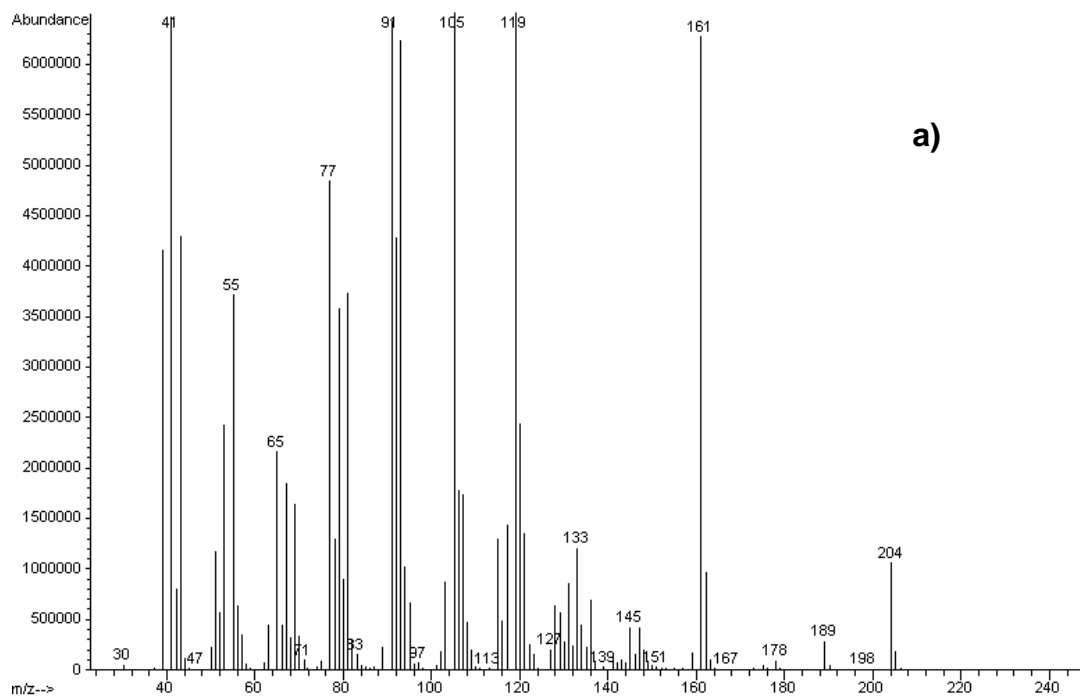


Figura 38 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Cubebeno (pico 22): a) *P. hebetatum*; b) *P. divarictium*; c) *P. amazonicum*.



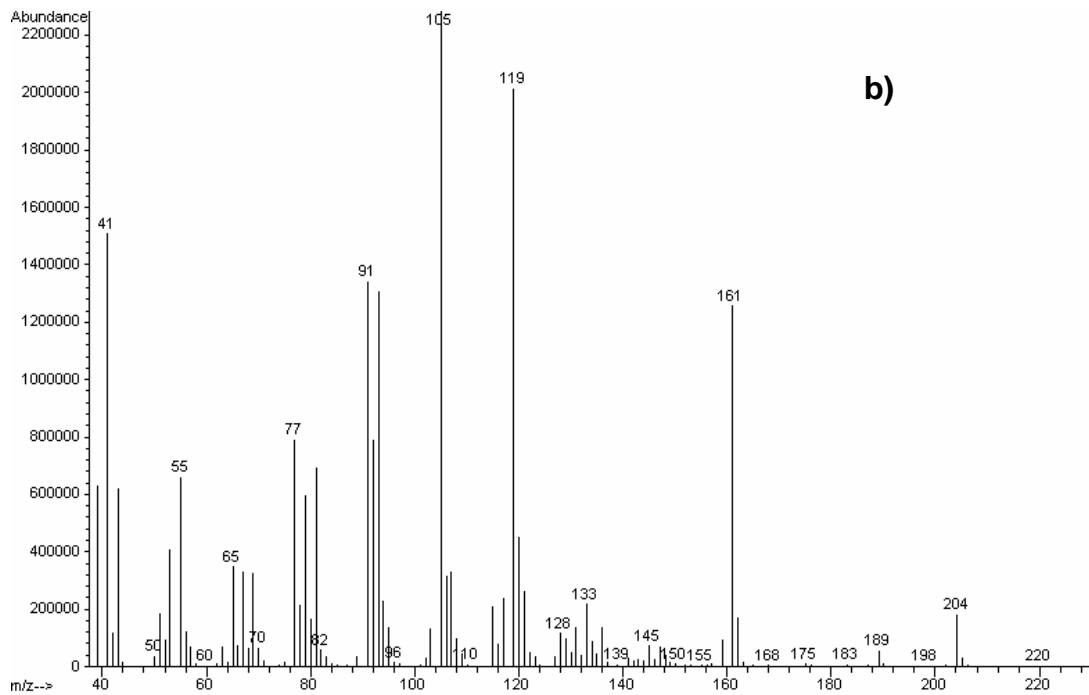


Figura 39 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Ciclosativeno (pico 23): a) *P. divarictium*; b) *P. amazonicum*.

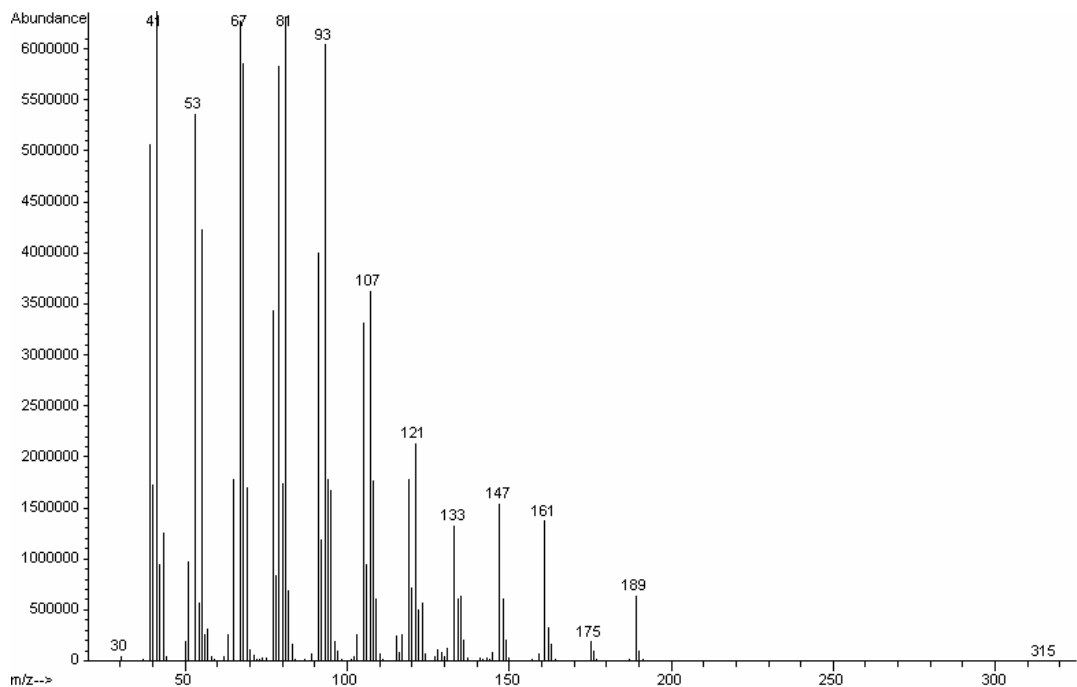


Figura 40 – Fragmentograma experimental do componente identificado como β -Elemeno (pico 24) na amostra *P. amazonicum*

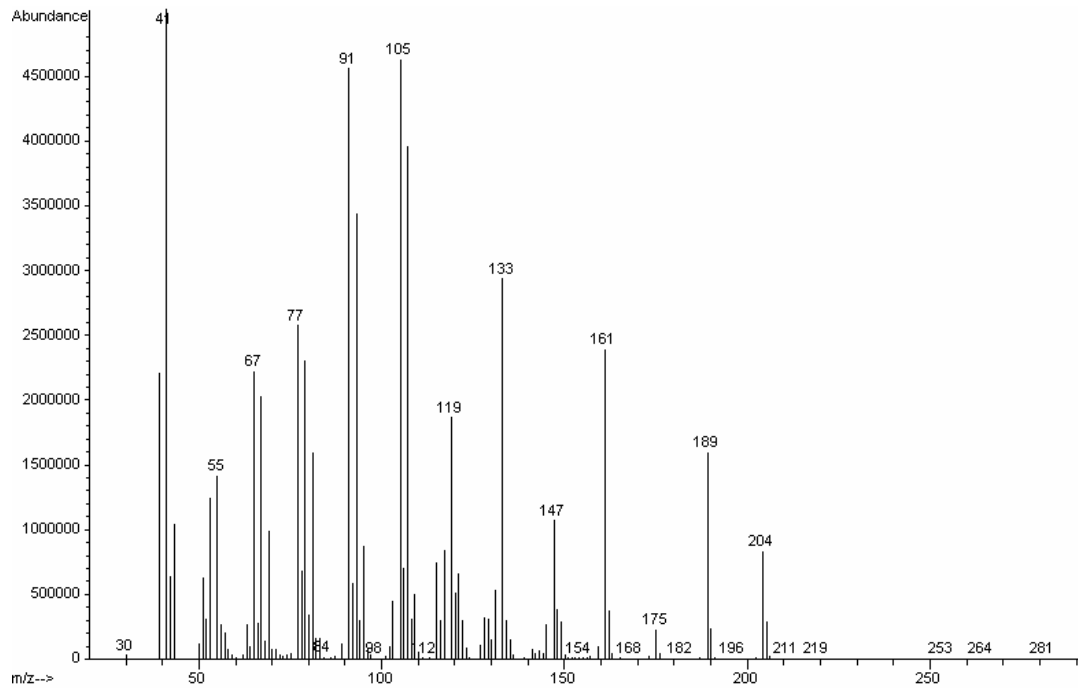
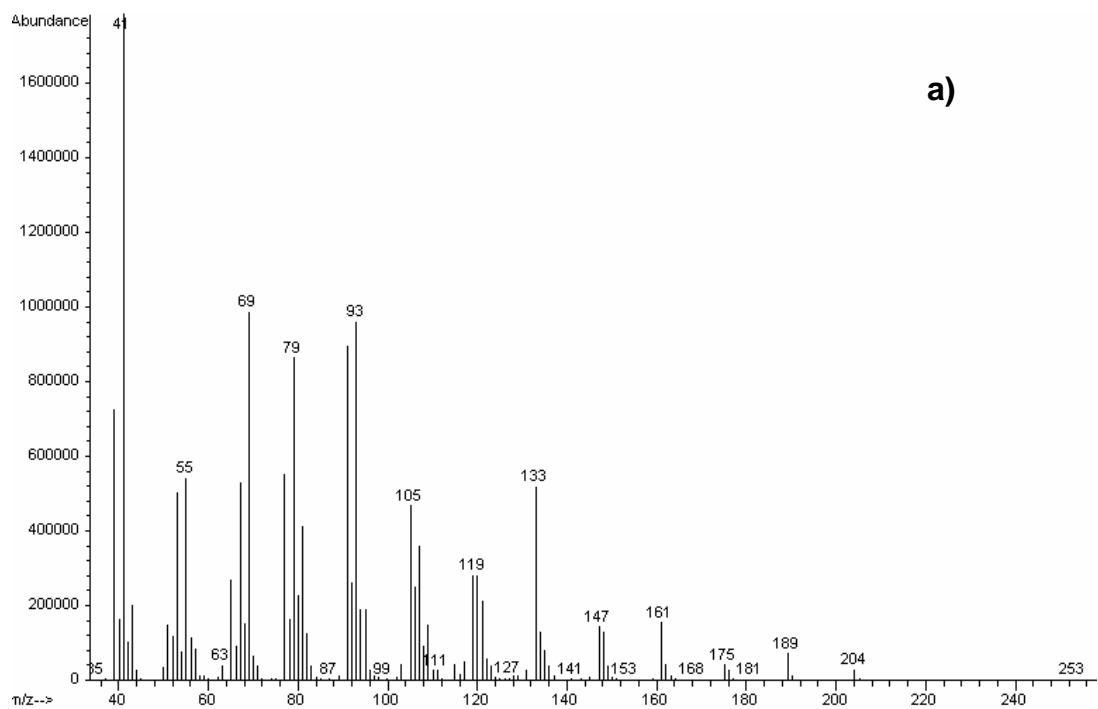
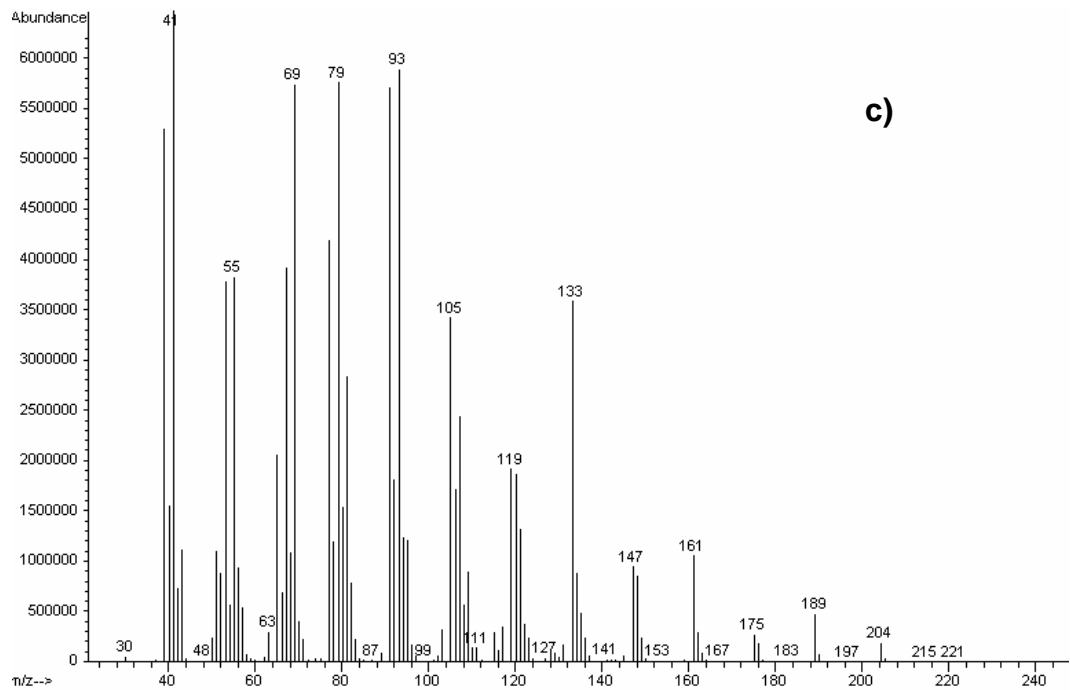
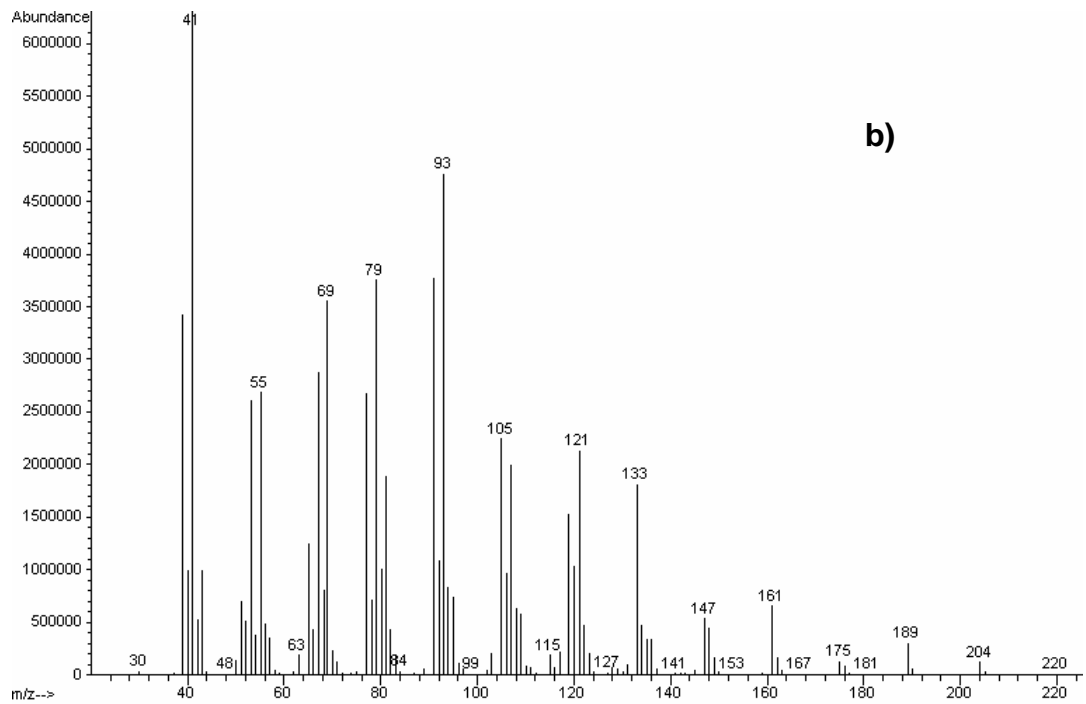


Figura 41 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Z-carifileno (pico 25) na amostra *P. amazonicum*.





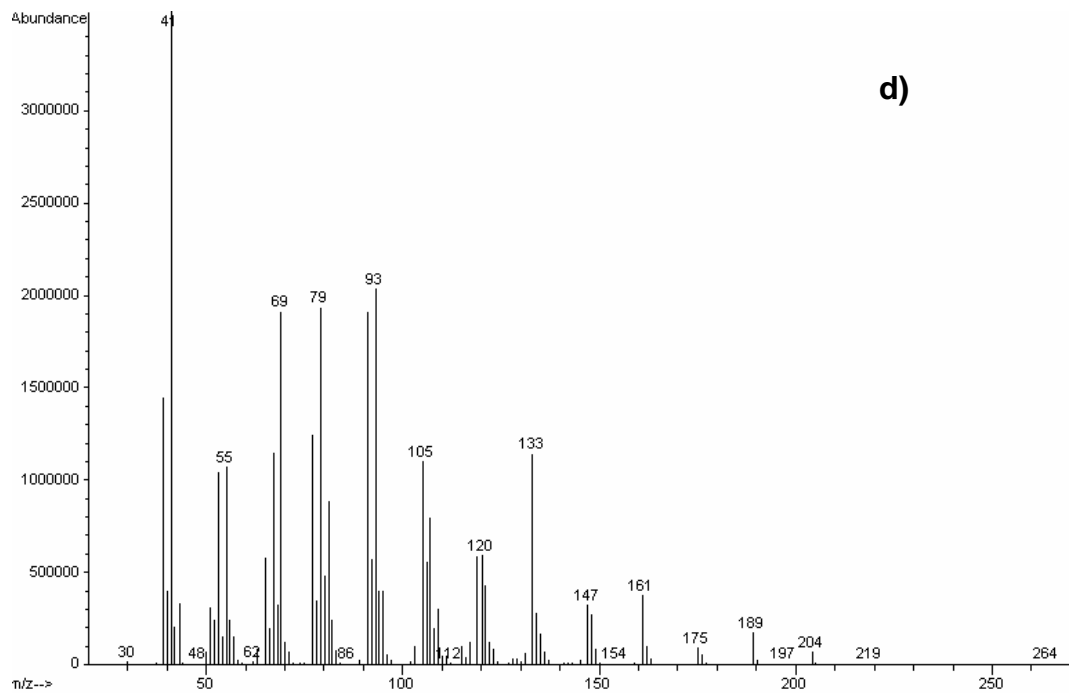
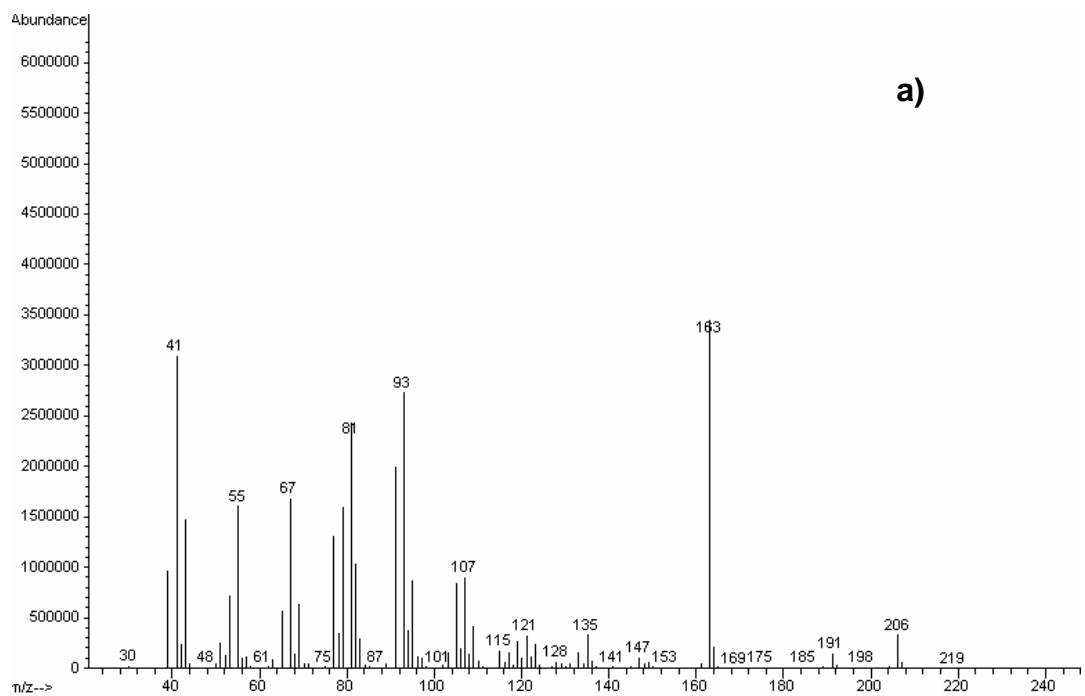


Figura 42 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como E-Cariofileno (pico 26): a) *P. hebetatum*; b) *P. nitidifolium*; c) *P. divarictium*; d) *P. amazonicum*.



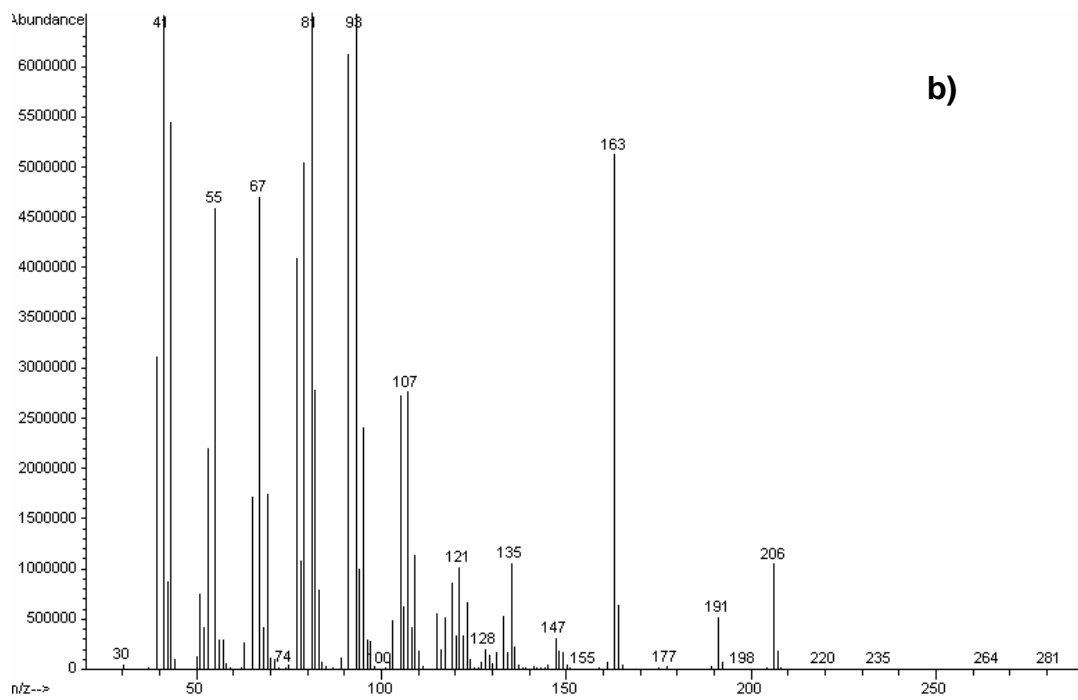
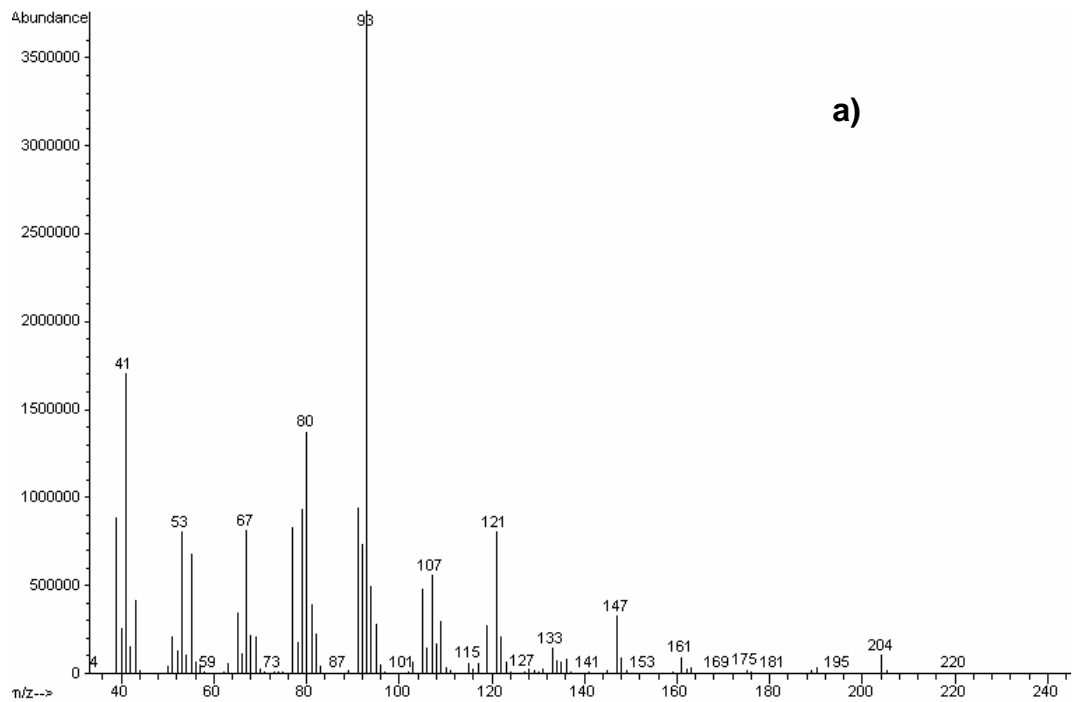


Figura 43 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Cedranol (pico 27): a) *P. divarictium*; b) *P. amazonicum*;



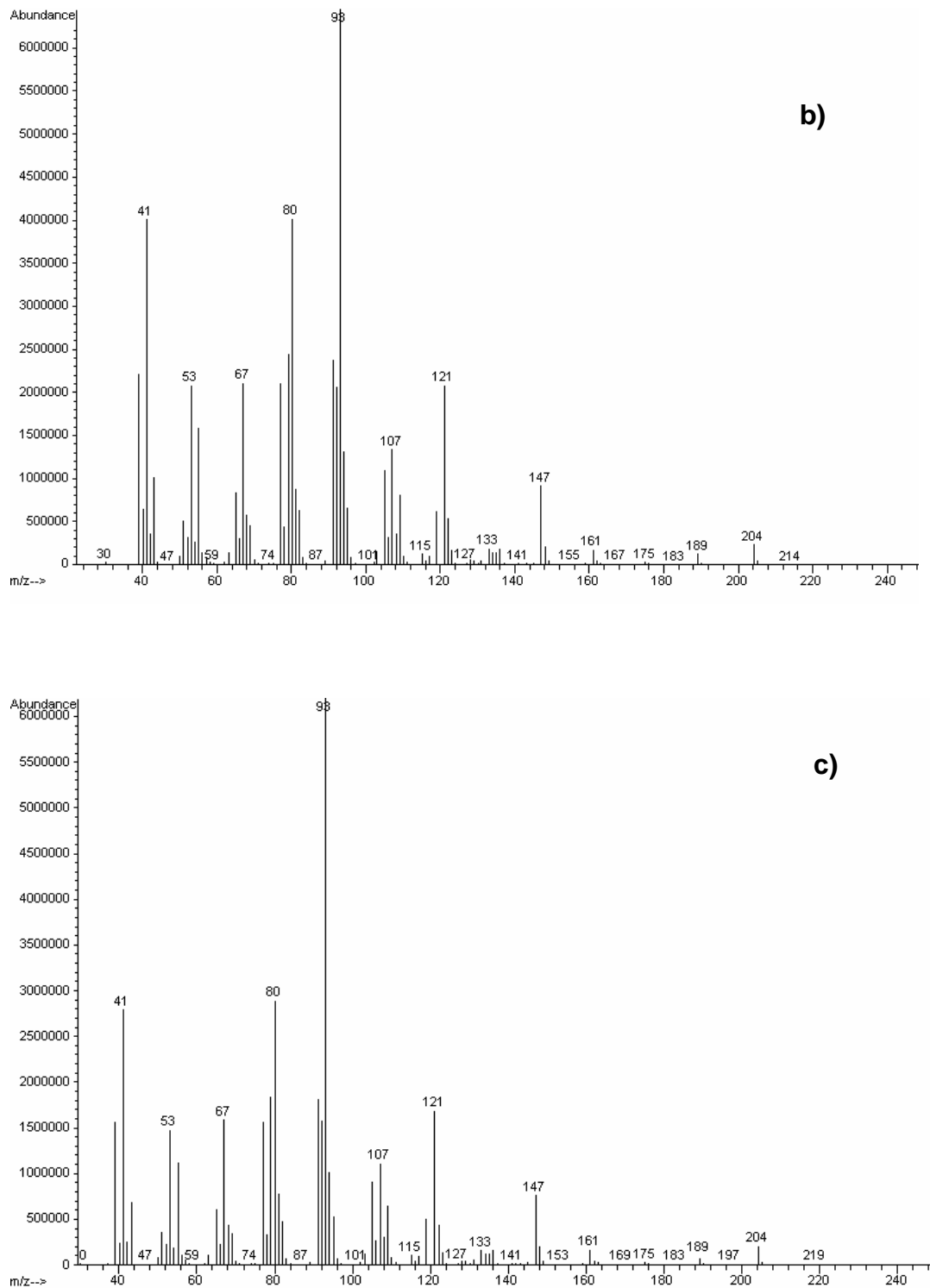


Figura 44 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como α -Humuleno (pico 28): a) *P. nitidifolium*; b) *P. divarictium*; c) *P. amazonicum*.

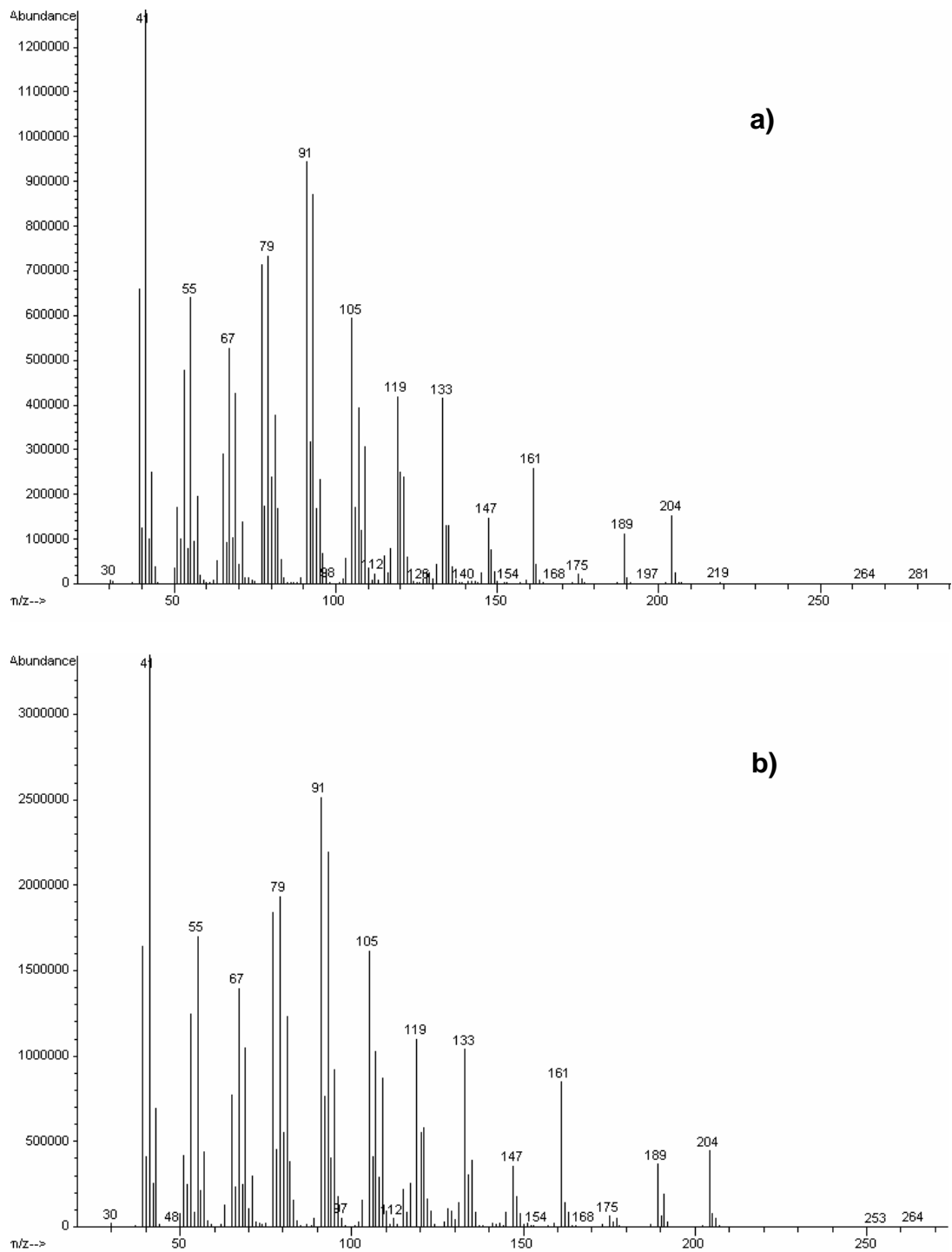


Figura 45 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como Seicheleno (pico 29): a) *P. hebetatum*; b) *P. divarictium*.

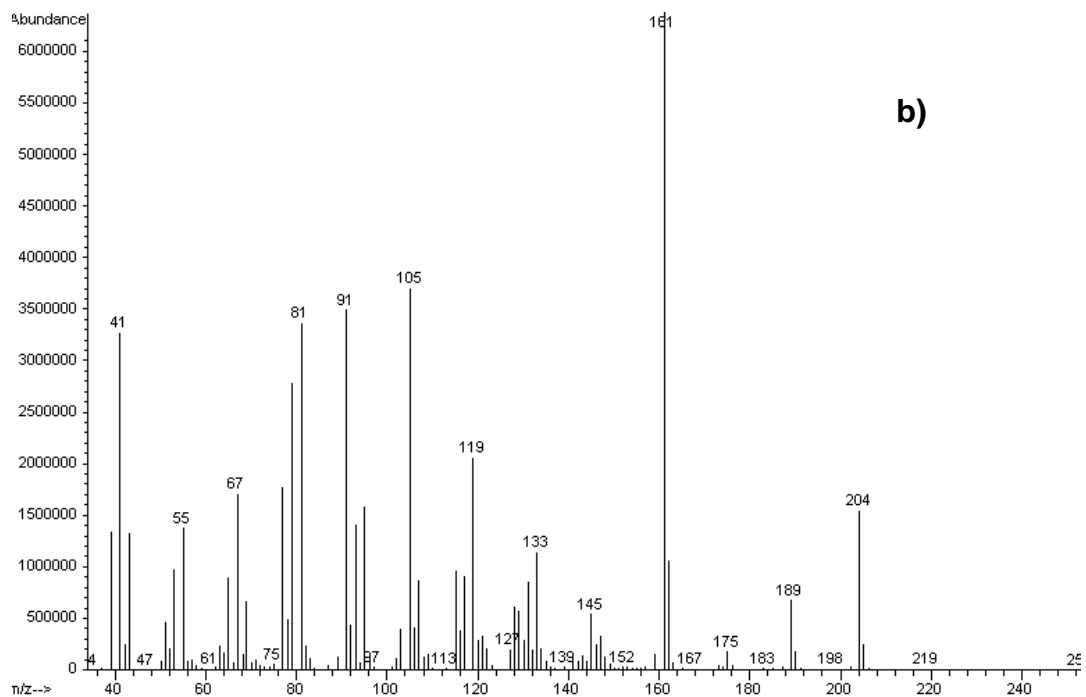
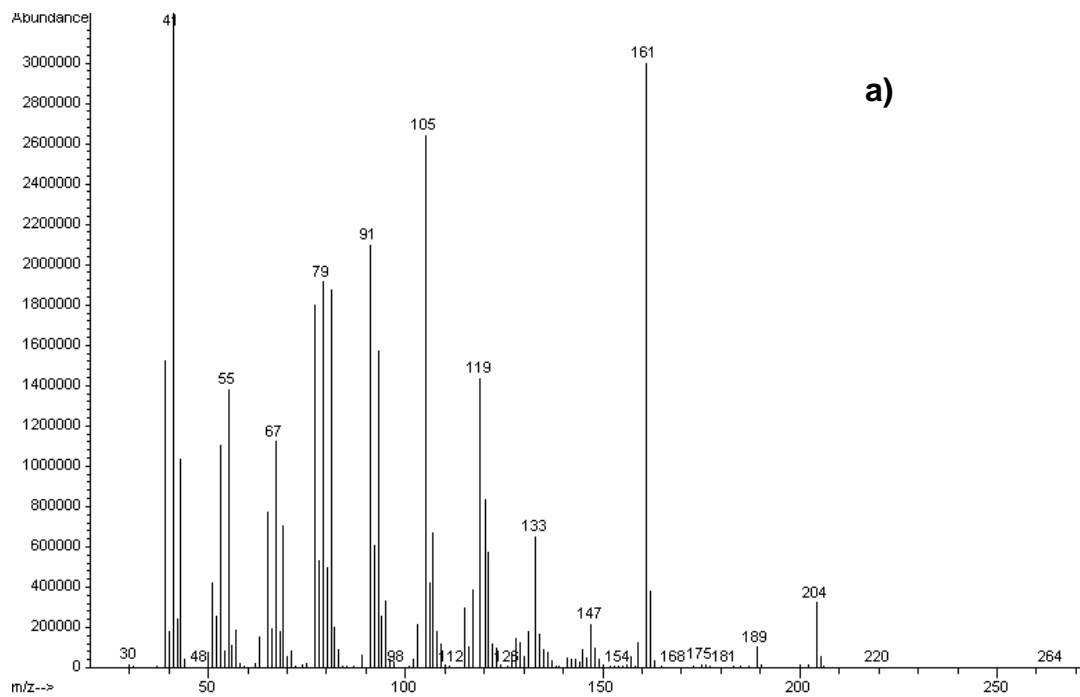


Figura 46 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como γ -Muuroleno (pico 30): a) *P. nitidifolium*; b) *P. amazonicum*.

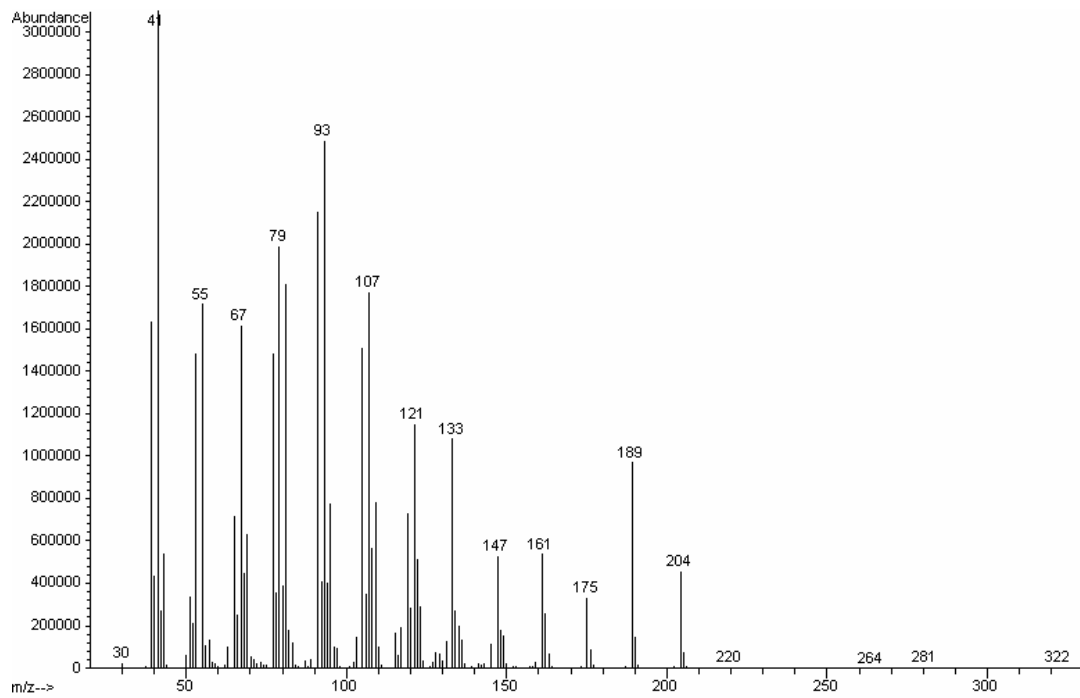
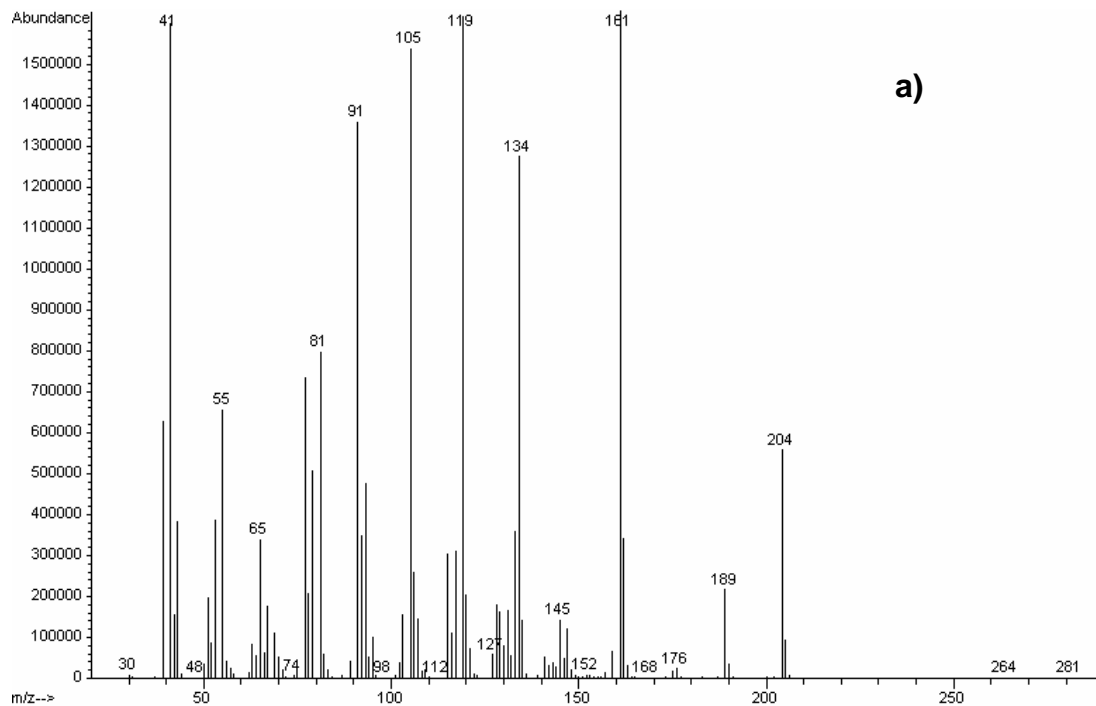


Figura 47 – Fragmentograma experimental do componente identificado como α -Selineno (pico 31) na amostra *P. nitidifolium*.



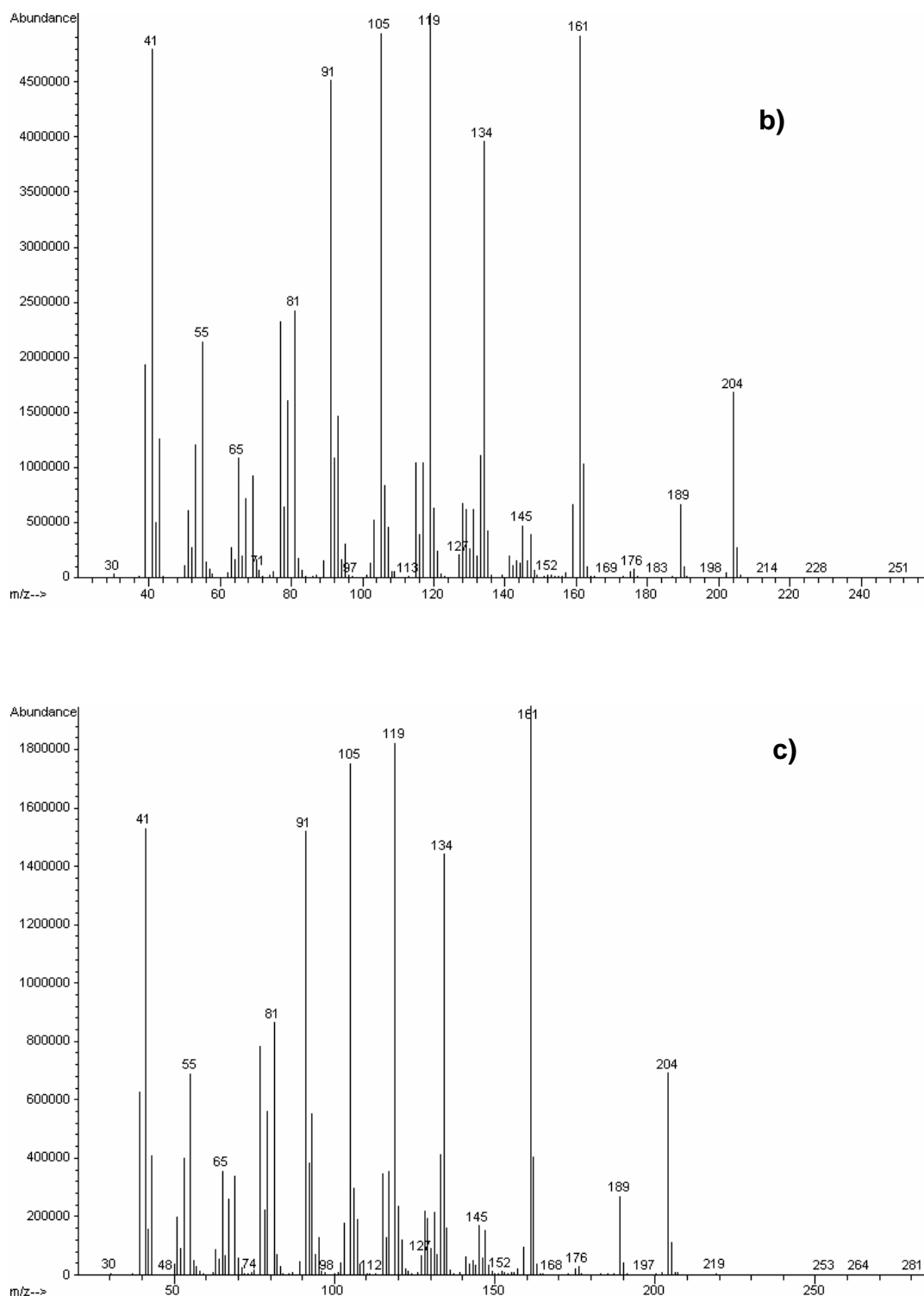


Figura 48 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como δ -Cadideno (pico 32): a) *P. hebetatum*; b) *P. divarictium*; c) *P. amazonicum*.

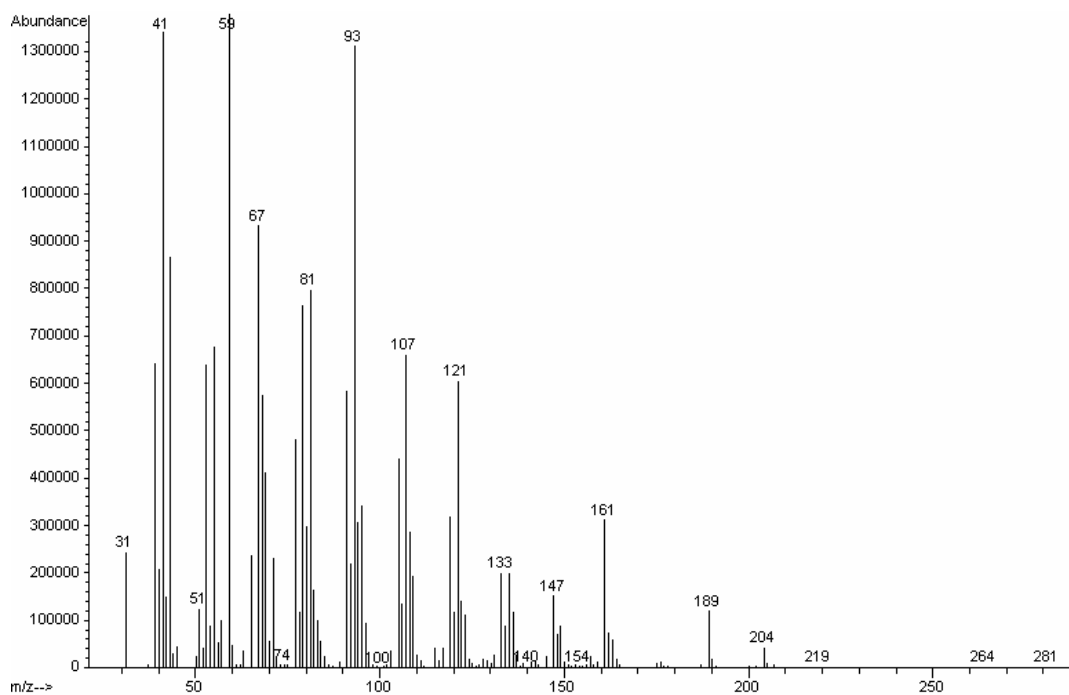


Figura 49 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Elemol (pico 33) na amostra *P. nitidifolium*.

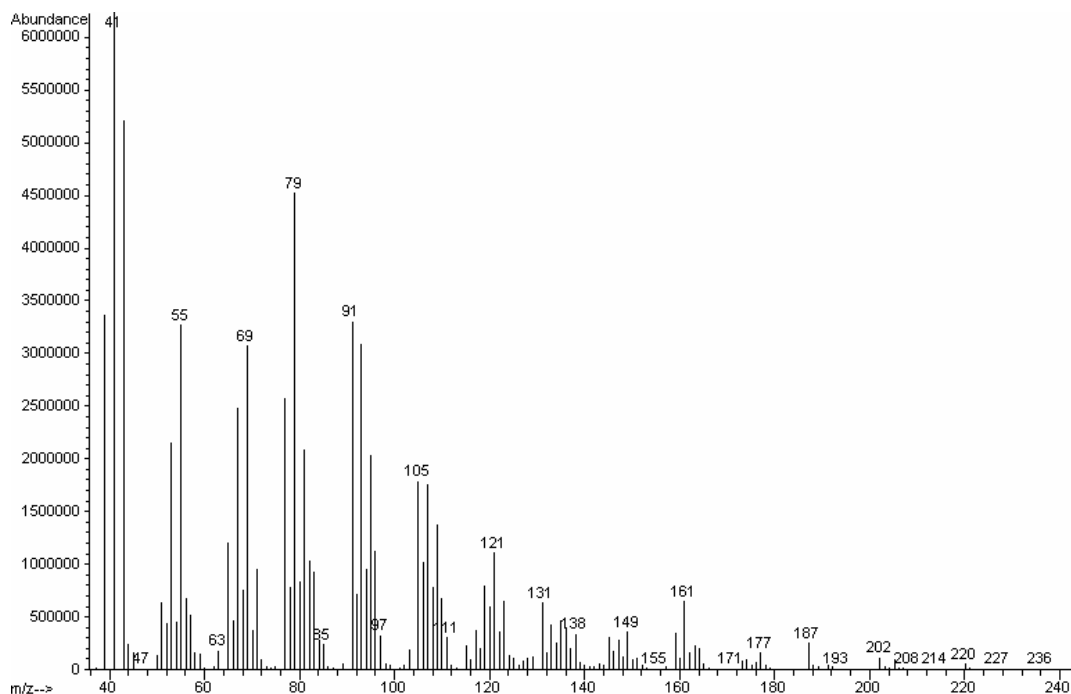


Figura 50 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Óxido de Cariofileno (pico 34) na amostra *P. divarictium*.

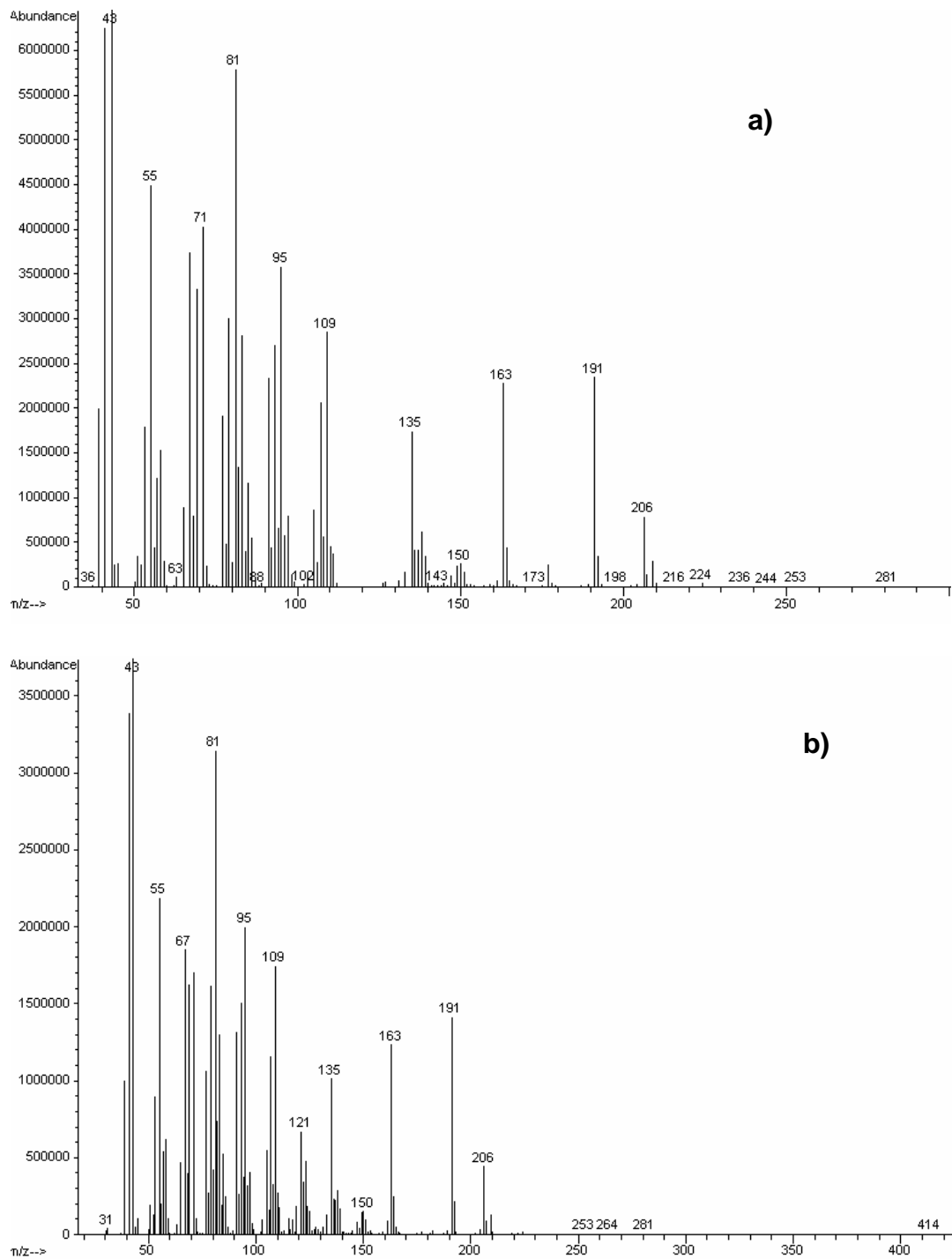


Figura 51 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como cis-diidro-Aceto de Ocidentalol (pico 35): a) *P. nitidifolium*; b) *P. amazonicum*.

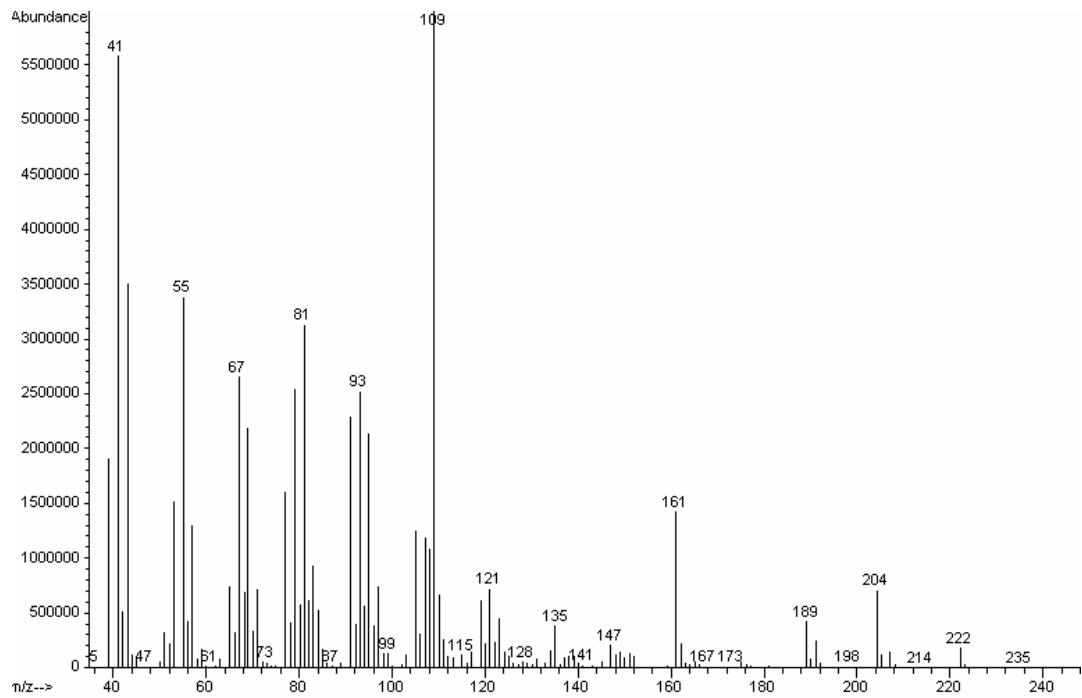
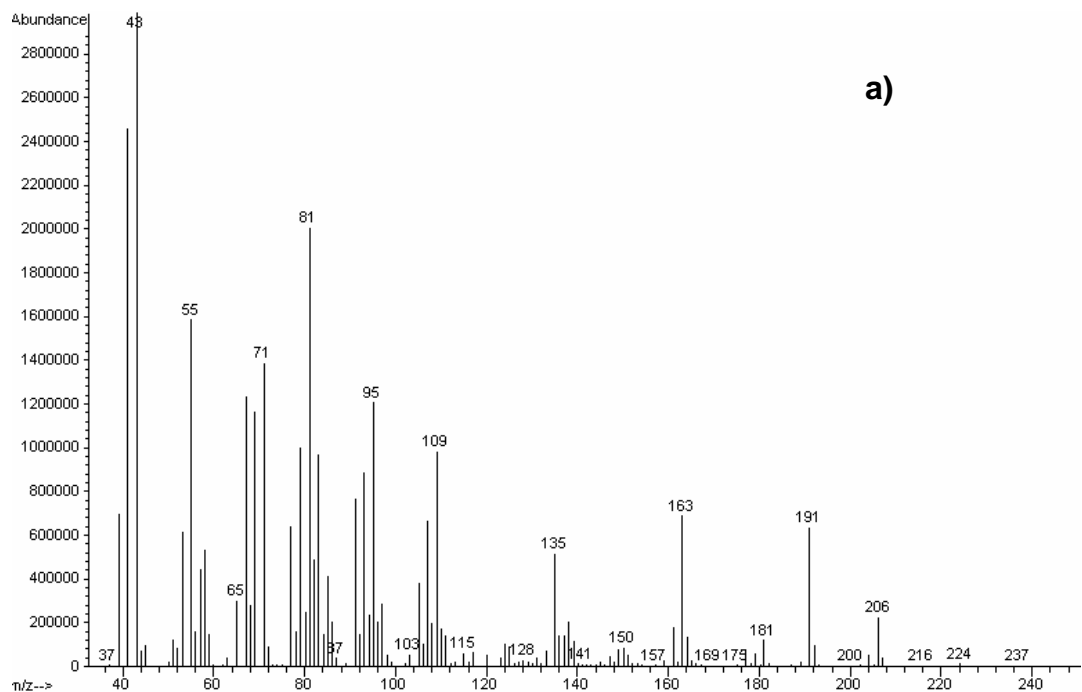


Figura 52 – Fragmentograma experimental do componente identificado como Drimenol (pico 36) na amostra *P. divarictium*.



a)

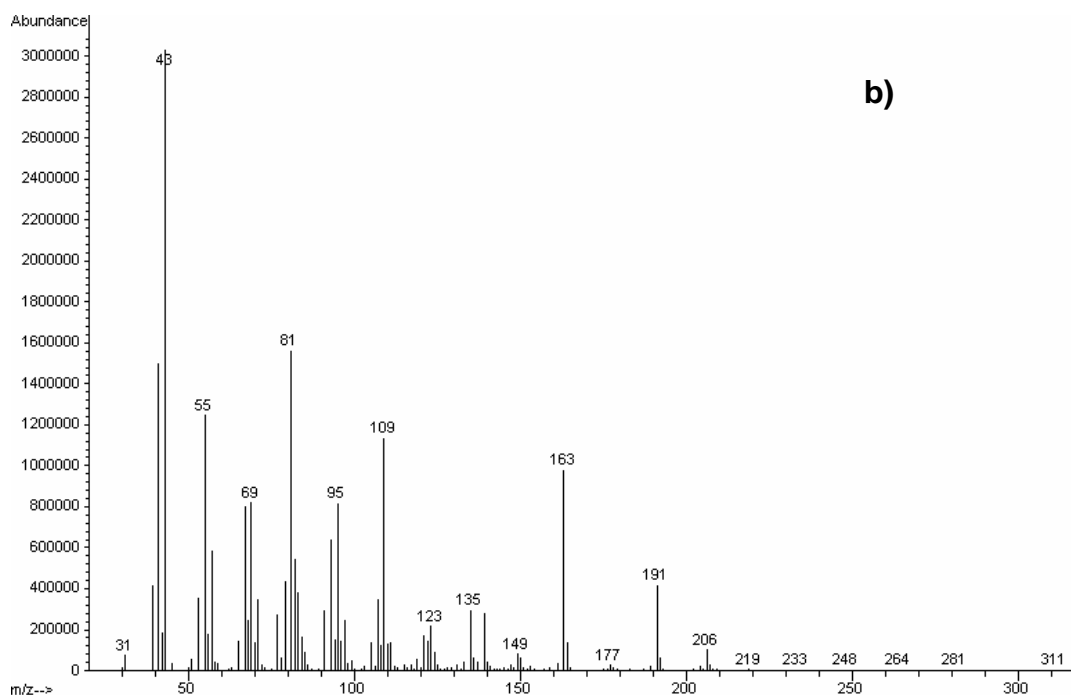


Figura 53 – Fragmentogramas experimentais do componente identificado como trans-diidro-Acetato de Ocidentalol (pico 37): a) *P. divarictium*; b) *P. amazonicum*.

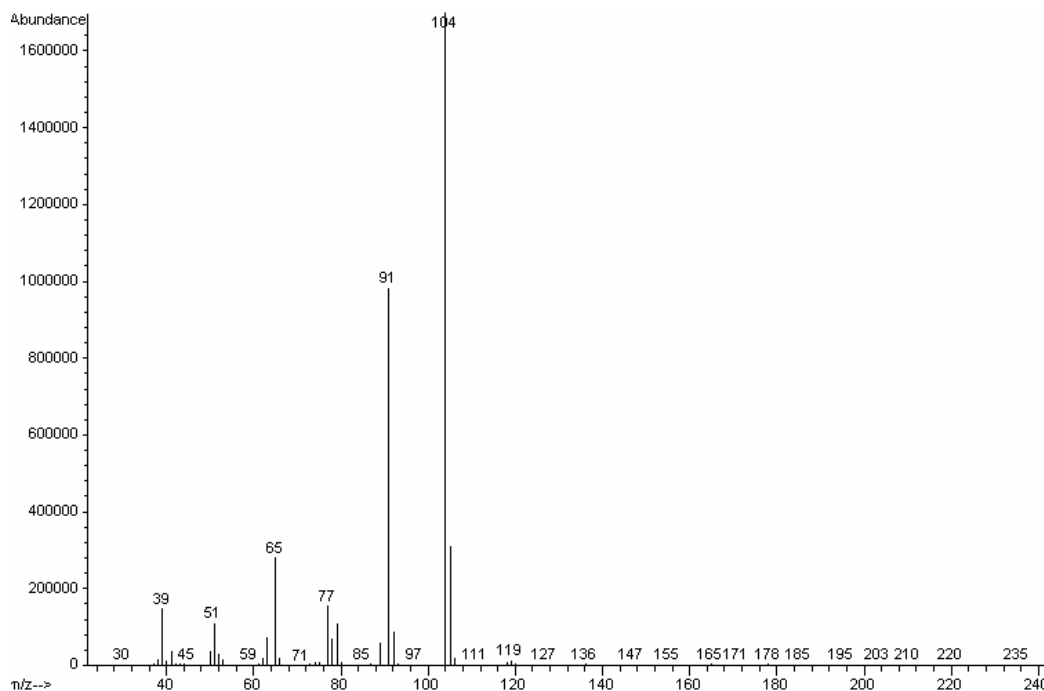


Figura 54 – Fragmentograma experimental do componente identificado como 2-Acetato de Fenil-Etil-Fenila (pico 38) na amostra *P. divarictium*.

Os óleos essenciais extraídos das amostras *P. hebetaum* e *P. nitidifolium* mostraram um perfil composto predominantemente por monoterpenos, mostrando-se de acordo com os relatos publicados na literatura acerca dos óleos extraídos destas resinas [30,40]. Entretanto estes mesmos relatam o monoterpeno p-cimeno como constituinte majoritário nestas amostras, sendo, que este composto não foi identificado no presente trabalho.

Contrario ao que normalmente ocorre com os constituintes não voláteis, há uma considerável inconsistência nos dados reportados na literatura sobre a composição de óleos essenciais. Este fato deve-se principalmente a variedade na composição dos óleos essenciais, que diz respeito a diferentes quimiotipos de espécies, uma vez que os fatores genéticos e ambientais influenciam sobre os metabólitos terpenóides. Esta inconsistência de dados é especialmente notada quando estes óleos são constituídos majoritariamente por compostos voláteis, como ocorrem em com amostras onde há a predominância de monoterpenos e compostos mais leves [18].

No óleo extraído de *P. divarictium* houve um contrabalanço entre os conteúdos de mono e sesquiterpenos e, no óleo extraído de *P. amazonicum* houve um prevaecimento do conteúdo sesquiterpênico. Não há relatos na literatura sobre óleos essenciais destas duas ultimas espécies.

A predominância de sesquiterpenos no óleo essencial extraído da resina de *P. amazonicum* é, sem dúvida, uma característica muito interessante a ser explorada desta espécie. Esta classe de compostos é característica de óleos extraídos de

folhas de espécies *Protium*, sendo o perfil monoterpênico associado aos óleos extraídos de resinas [18, 30, 33, 38, 40].

3.5.2 – Separação por CCD

Nas separações das frações dos óleos essenciais por CCD, foram escolhidas como fases móvel as misturas de solventes Acetato de Etila : Hexano, 1:60 (fase móvel 1, $\epsilon^0 = 1,96$), e Diclorometano : Hexano, 1,5:1 (fase móvel 2, $\epsilon^0 = 6,20$).

A fase móvel 1 (AcOEt : Hexano) resultou em duas, e a fase móvel 2 (CH_2Cl_2 : Hexano) em três manchas bem distintas.

As separações utilizando como fase móvel Acetona : Hexano (1:30), também resultaram em três manchas bem definidas, porém os resultados de CG/EM destas frações não foi satisfatório, sendo esta, então, descartada deste trabalho.

A **Figura 55** representa a metodologia geral empregada na separação dos constituintes dos óleos essenciais por CCD.

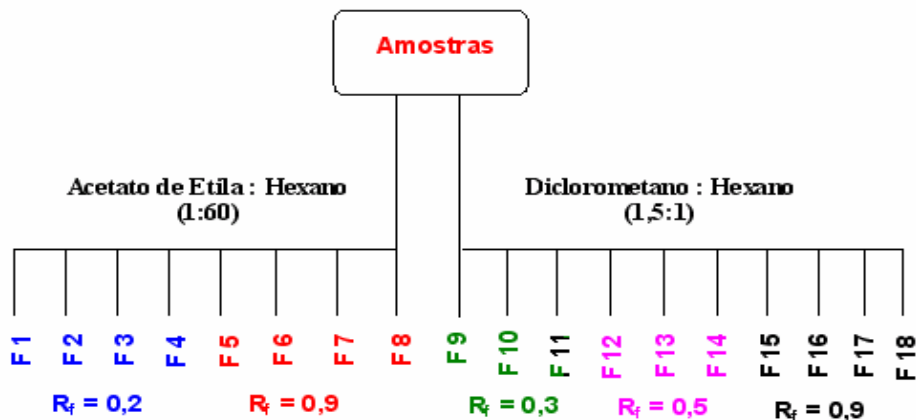


Figura 55 – Metodologia empregada na análise por CCD.

As Figuras 56 e 57 mostram as visualizações obtidas sob luz UV, em comprimento de onda de 254 nm, nas separações dos constituintes dos óleos essenciais das quatro espécies *Protium* por CCD.

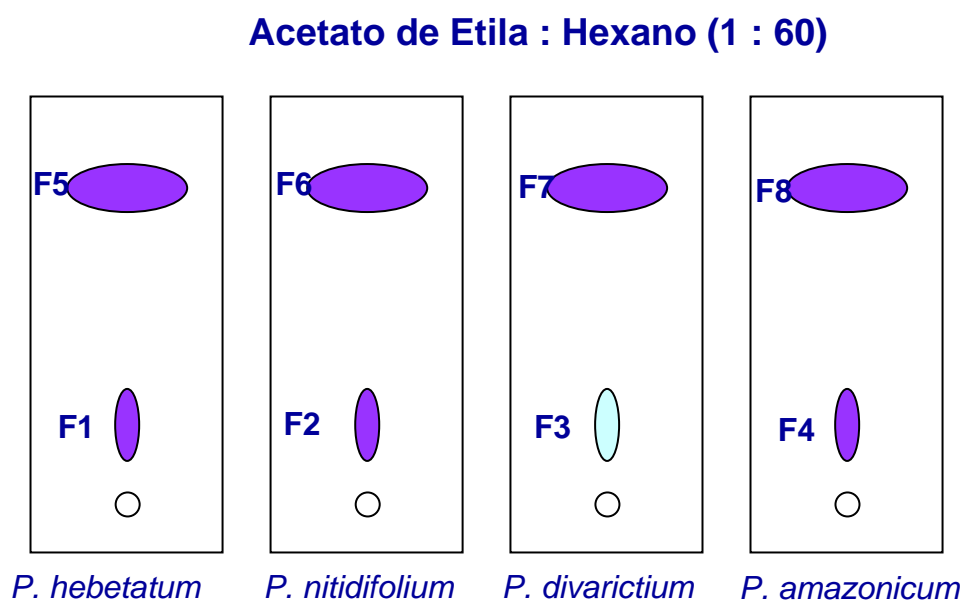


Figura 56 – Visualização sob luz $UV_{254\text{ nm}}$ da separação dos constituintes dos óleos essenciais de *Protium spp.* por CCD (fase móvel 1).

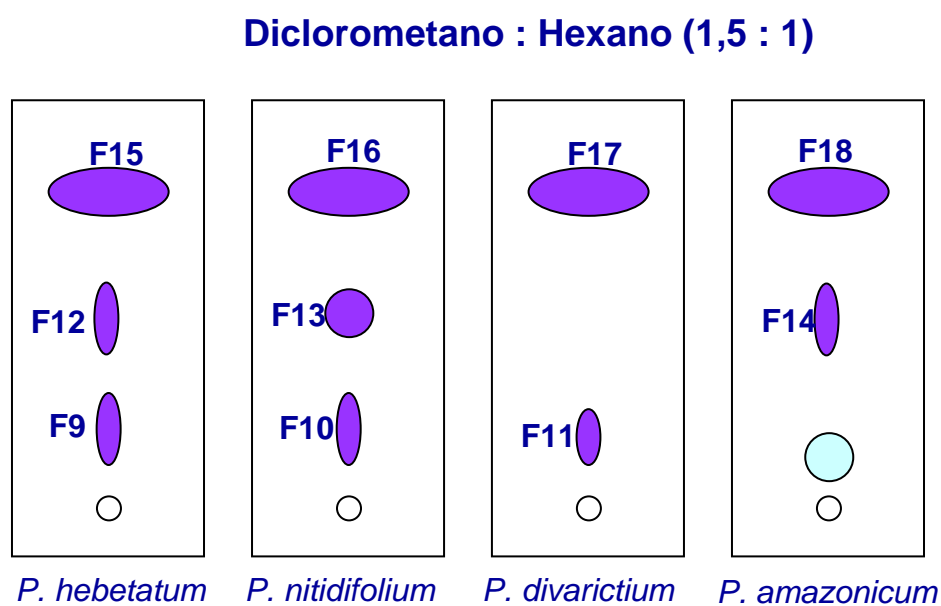


Figura 57 – Visualização sob luz $UV_{254\text{ nm}}$ da separação dos constituintes dos óleos essenciais de *Protium spp.* por CCD (fase móvel 2).

São apresentados a seguir os resultados obtidos na análise CG/EM das frações separadas por CCD.

Nas separações por CCD utilizando a fase móvel 1, apenas a fração F1 (*P. hebetatum*), dentre as frações de $R_f = 0,2$, resultou na identificação dos constituintes separados.

Na fração F1 foram identificados os monoterpenos o-cimeno, terpin-4-ol e α -terpineol. A **Figura 58** apresenta o cromatograma referente a esta fração F1.

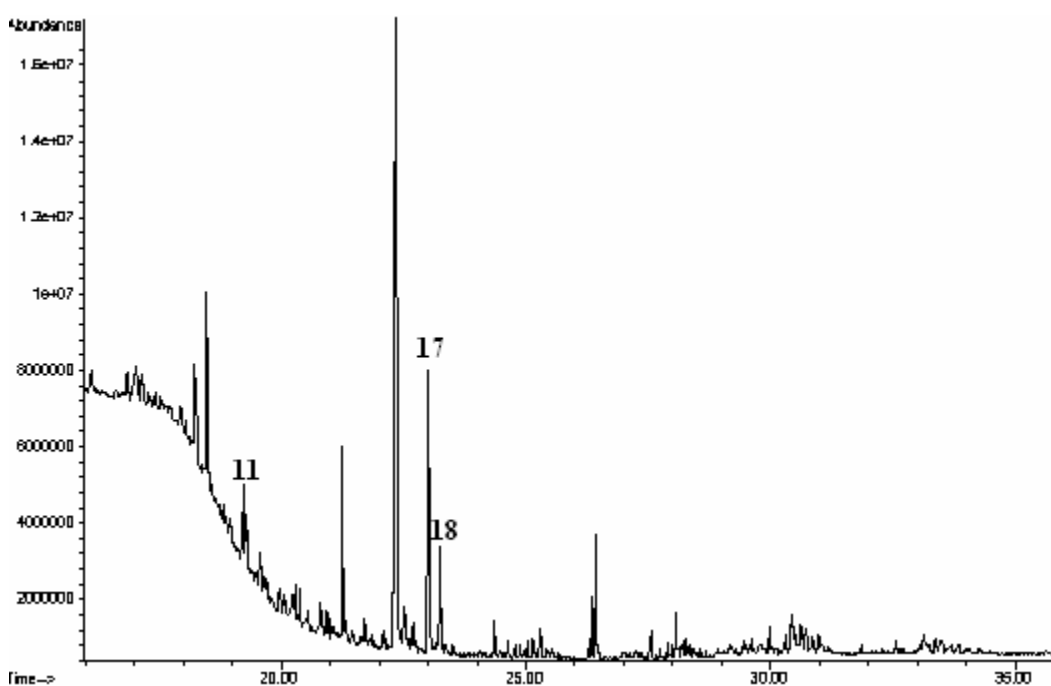


Figura 58 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F1 (*P. hebetatum*).

As frações F2 (*P. nitidifolium*) e F4 (*P. amazonicum*) apresentaram manchas bem definidas, porém, na análise por CG/EM não foi possível a identificação, por comparação de fragmentogramas com a literatura, de nenhum destes constituintes separados.

A fração F3 (*P. divarictium*), onde se obteve uma mancha de pouca resolução, não apresentou nenhum constituinte na análise por CG/EM.

A identificação por CG/EM nas frações F5 a F8 (fase móvel 1; $R_f = 0,9$) foi satisfatória, resultando na identificação dos seguintes terpenóides :

Na fração F5 (*P. hebetatum*) identificou-se o monoterpene o-cimeno (11) e o sesquiterpene ciclosativeno (23).

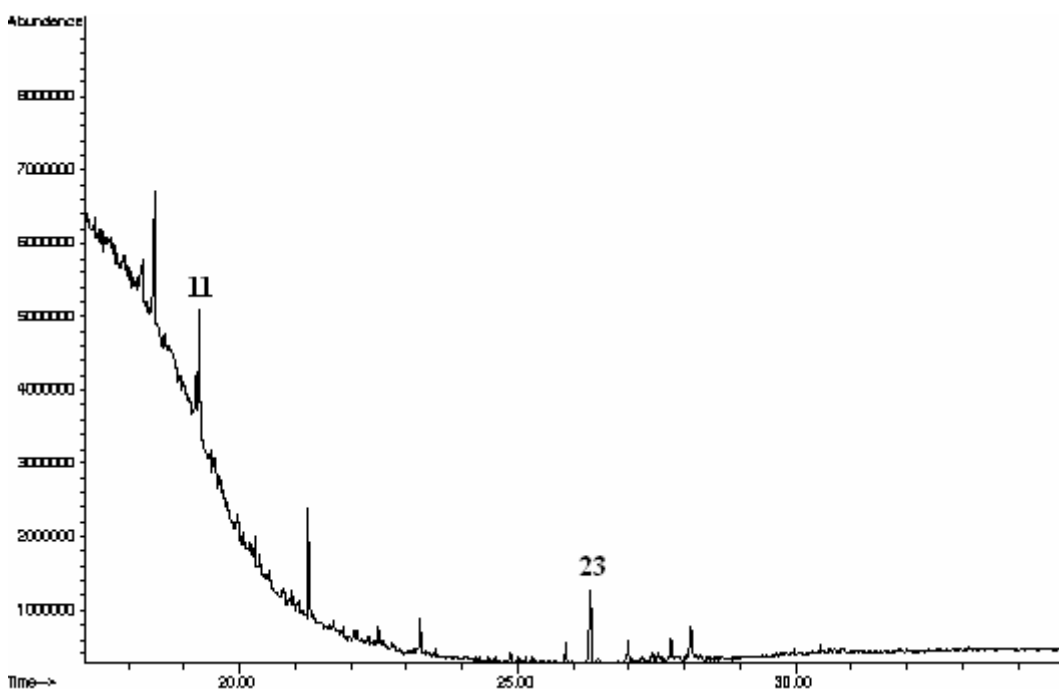


Figura 59 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F5 (*P. hebetatum*).

Na fração F6 (*P. nitidifolium*) foram identificados os sesquiterpenos e-cariofileno (26), α -humuleno (28), γ -muuroleno (30) e α -selineno (31).

Na fração F7 (*P. divarictium*) foram identificados os monoterpenos o-cimeno (11) e limoneno (12), e os sesquiterpenos α -cubebeno (22), ciclosativeno (23) e e-cariofileno (26).

Na fração F8 (*P. amazonicum*) foram identificados o-cimeno (11), e os sesquiterpenos β -elemeno (24), z-cariofileno (25), cedrano (27) e γ -muuroleno (30).

Estes resultados são apresentados a seguir, nas Figuras 60 a 62.

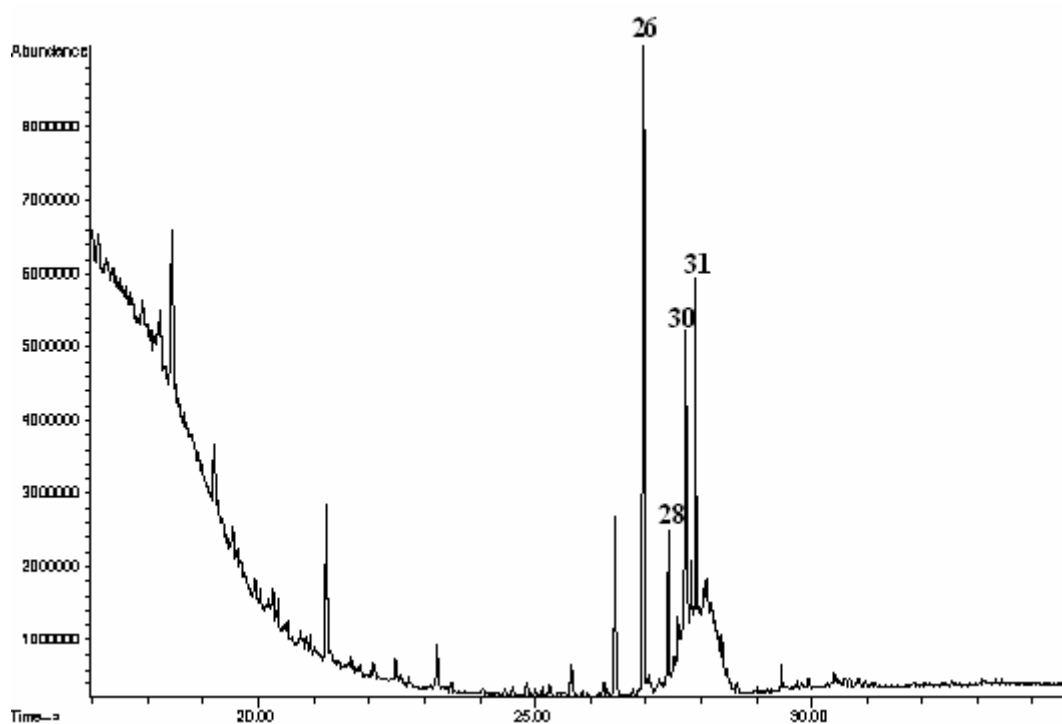


Figura 60 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F6 (*P. nitidifolium*).

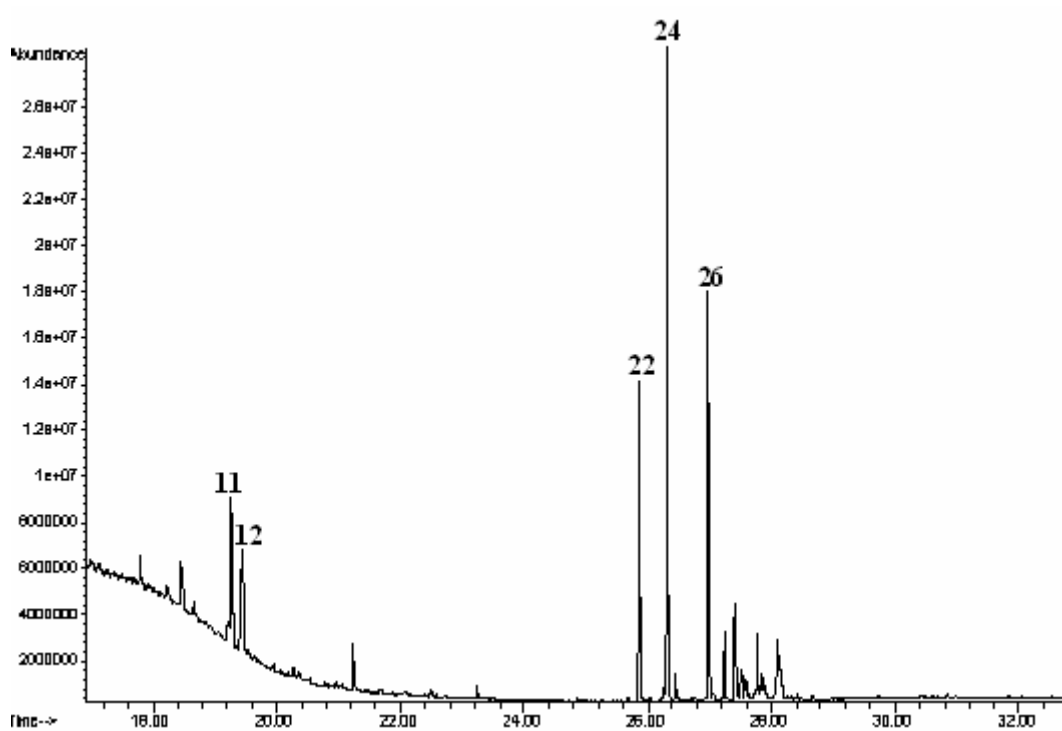


Figura 61 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F7 (*P. divarictium*).

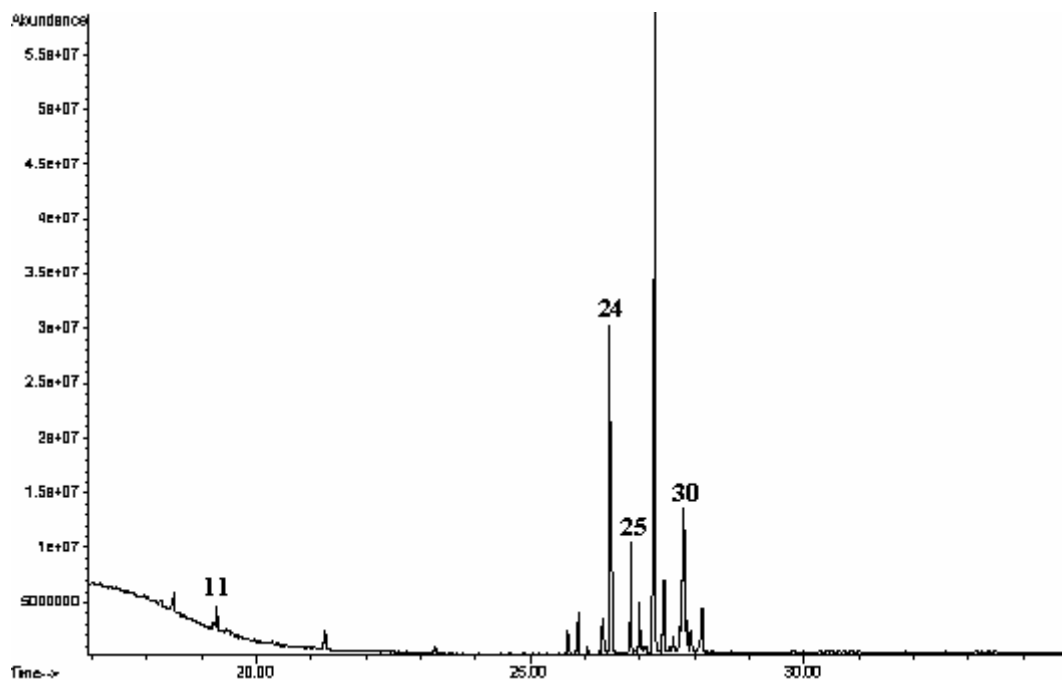


Figura 62 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F8 (*P. amazonicum*).

Para as frações separadas utilizando a fase móvel 2, não foi possível a identificação na amostra de *P. amazonicum*, onde não houve visualização de mancha definida na cromatoplaça.

Na fração F9 (*P. hebetatum*) (**Figura 63**) identificou-se os monoterpenos o-cimeno (11) e terpin-4-ol(17).

Na fração F10 (*P. nitidifolium*) (**Figura 64**) foi possível a identificação do monoterpeno terpin-4-ol (11).

Na fração F11 (*P. divarictium*) (**Figura 65**) também foram identificados os monoterpenos o-cimeno (11) e terpin-4-ol(17).

Os respectivos cromatogramas referentes as frações de $R_f = 0,3$ (fase móvel 2) encontram-se a seguir.

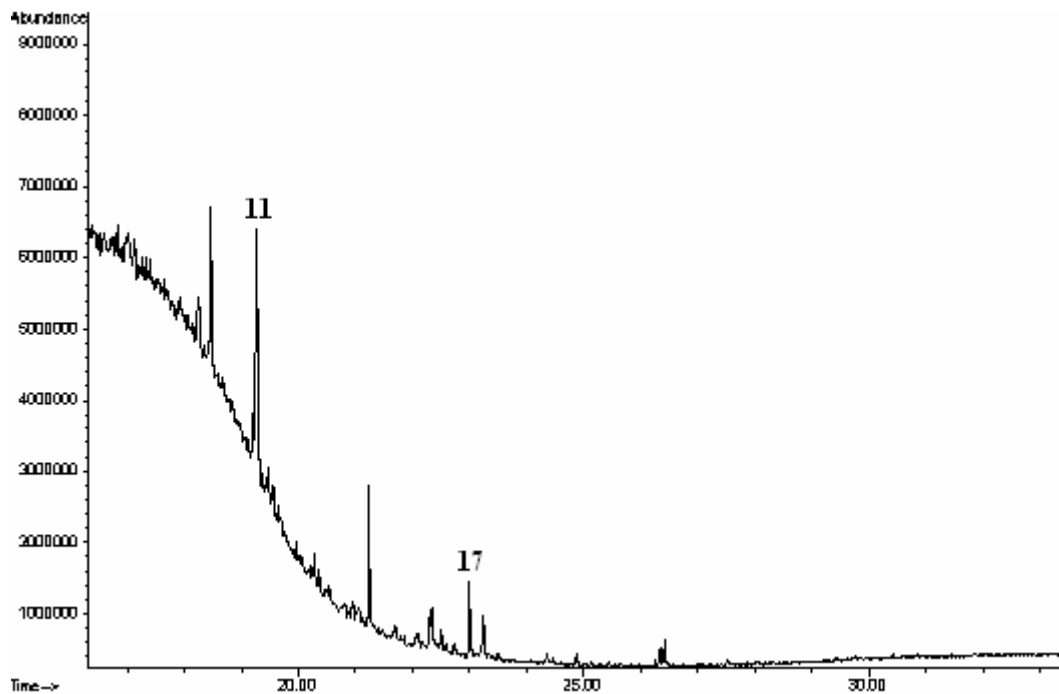


Figura 63 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F9 (*P. hebetatum*).

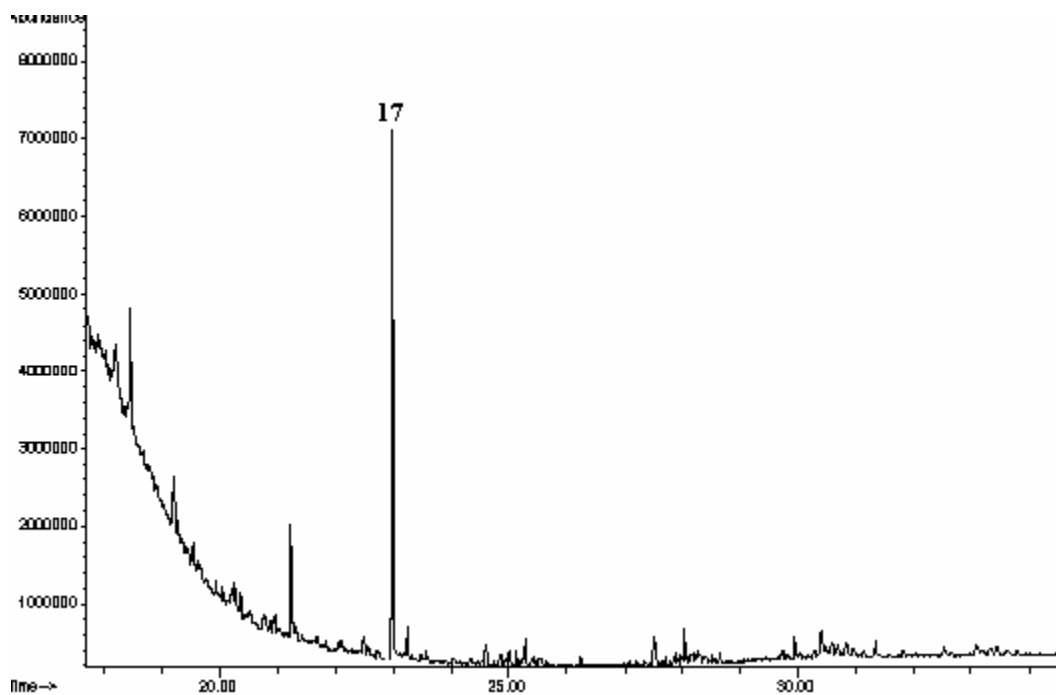


Figura 64 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F10 (*P. nitidifolium*).

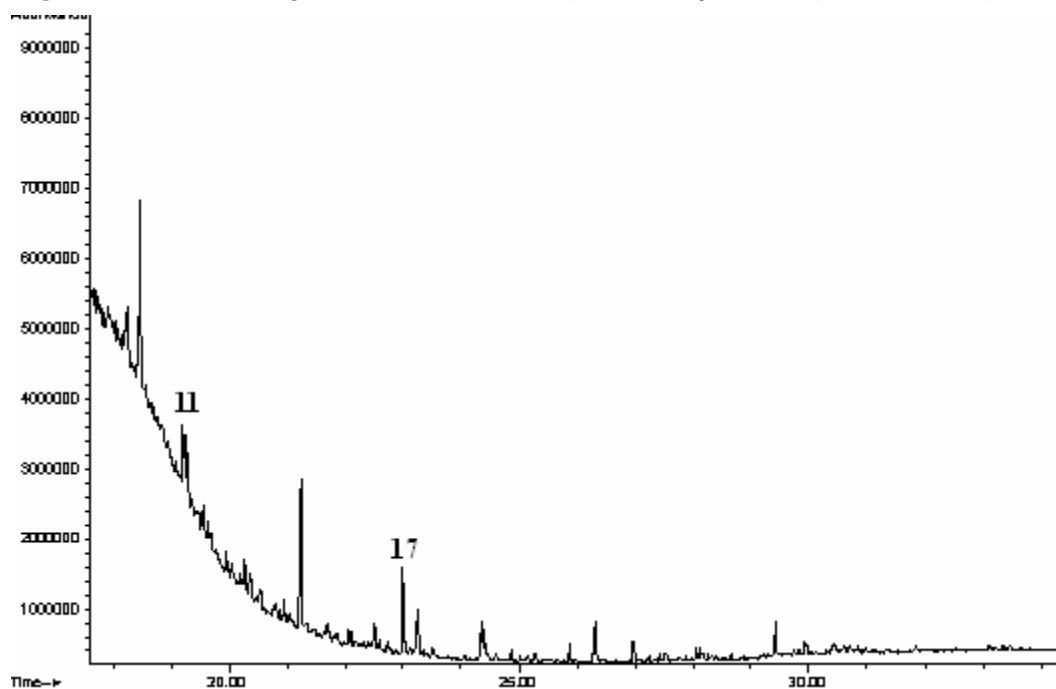


Figura 65 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F10 (*P. divarictium*).

Obteve-se ainda, para este mesmo sistema de solvente (fase móvel 2) manchas de $R_f = 0,5$ para as cromatoplas das amostras de *P.hebetatum* (F12), *P. nitidifolium* (F13) e *P. amazonicum* (F14). No entanto, na fração F13 não foi possível a identificação dos constituintes separados.

Na fração F12 observa-se a presença de dois picos majoritários referentes a monoterpenos não identificados, nesta fração foi identificado somente o monoterpeno o-cimeno (11).

Na fração F14 foram identificados os monoterpeno o-cimeno (11) e o sesquiterpeno γ -Muuroleno (30), também foi observado nesta fração a presença de um pico majoritário, possivelmente referente a um sesquiterpeno não identificado.

Os respectivos cromatogramas são apresentados a seguir.

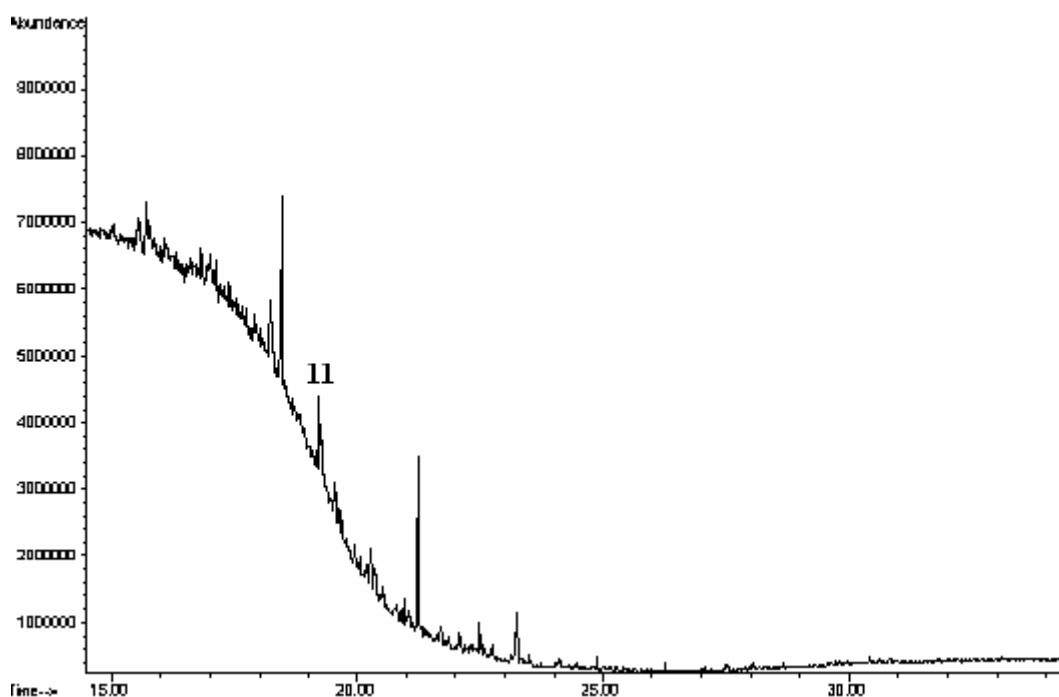


Figura 66 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F12 (*P.hebetatum*).

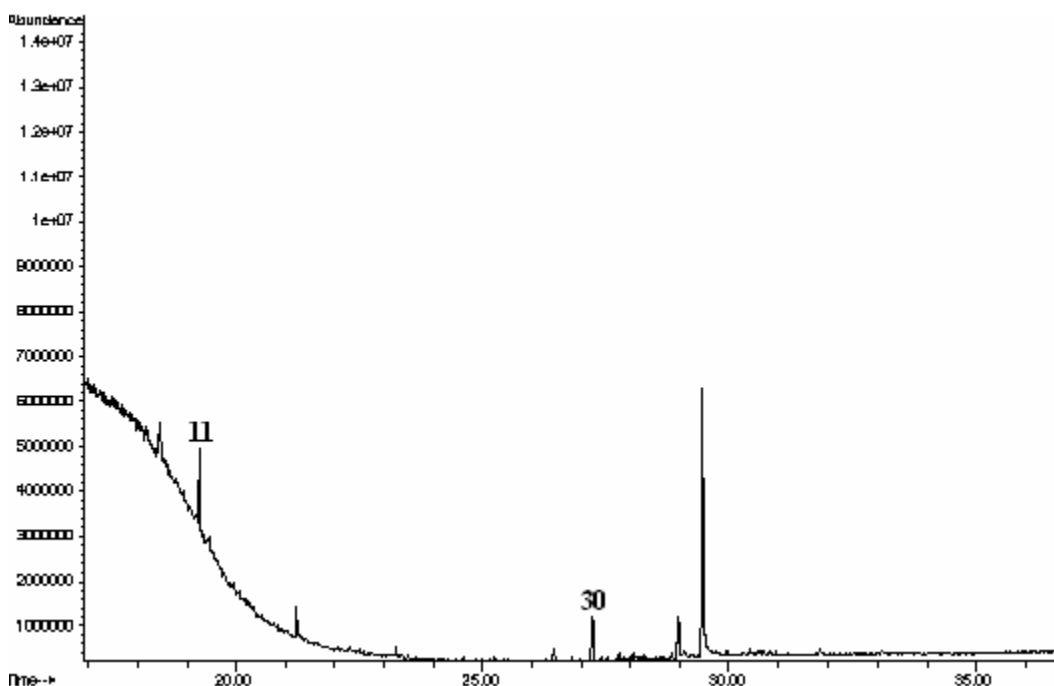


Figura 67 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F14 (*P. amazonicum*).

Na etapa subsequente, foram analisadas as frações de $R_f = 0,9$ resultantes das separações com este sistema de solventes (fase móvel 2).

Na fração F15 (*P. hebetatum*) (**Figura 68**) foram identificados o monoterpene o-cimeno (11) e os sesquiterpenos α -cubebeno, ciclosativeno, e-cariofileno, seicheleno e δ -cadideno. Ainda, outros dois picos majoritários não puderam ser identificados nesta fração.

Na fração F16 (*P. nitidifolium*) (**Figura 69**) apesar da presença de picos menores, que podem ser atribuídos a monoterpenos não identificados, houve uma separação satisfatória de sesquiterpenos. Observa-se a presença de um pico majoritário identificado como sendo o sesquiterpene e-cariofileno (26). Foram identificados ainda α -humuleno (28), γ -muuroleno (30) e selineno (31).

Na fração F17 (*P. divarictium*) (**Figura 70**) foram identificados os monoterpenos o-cimeno (11) e limoneno(12) e, os sesquiterpenos α -cubebeno (22), ciclosativeno (23), e-cariofileno (26), α -humuleno (28), γ -muuroleno (30) e δ -cadideno (32).

Na fração F18 (*P. amazonicum*) (**Figura 71**) observa-se somente a presença de sesquiterpenos. Demonstrando a eficiência desta metodologia de CCD na separação entre mono e sesquiterpenos nesta amostra. Foram identificados nesta amostra δ -elemeno (21), α -cubebeno (22), ciclosativeno (23), z-cariofileno (25), e-cariofileno (26), α -humuleno (28), γ -muuroleno (30), δ -cadideno (32), cedrano (27) e β -elemeno (24), sendo estes dois últimos picos majoritários.

As Figuras 68 a 71 apresentam estes resultados.

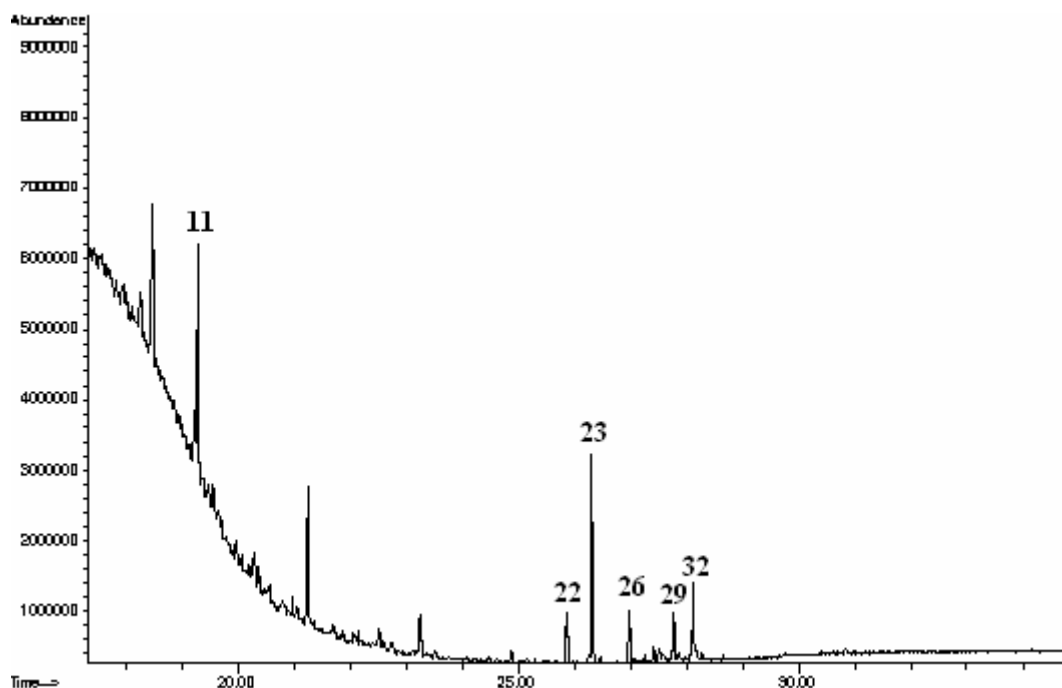


Figura 68 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F15 (*P. hebetatum*).

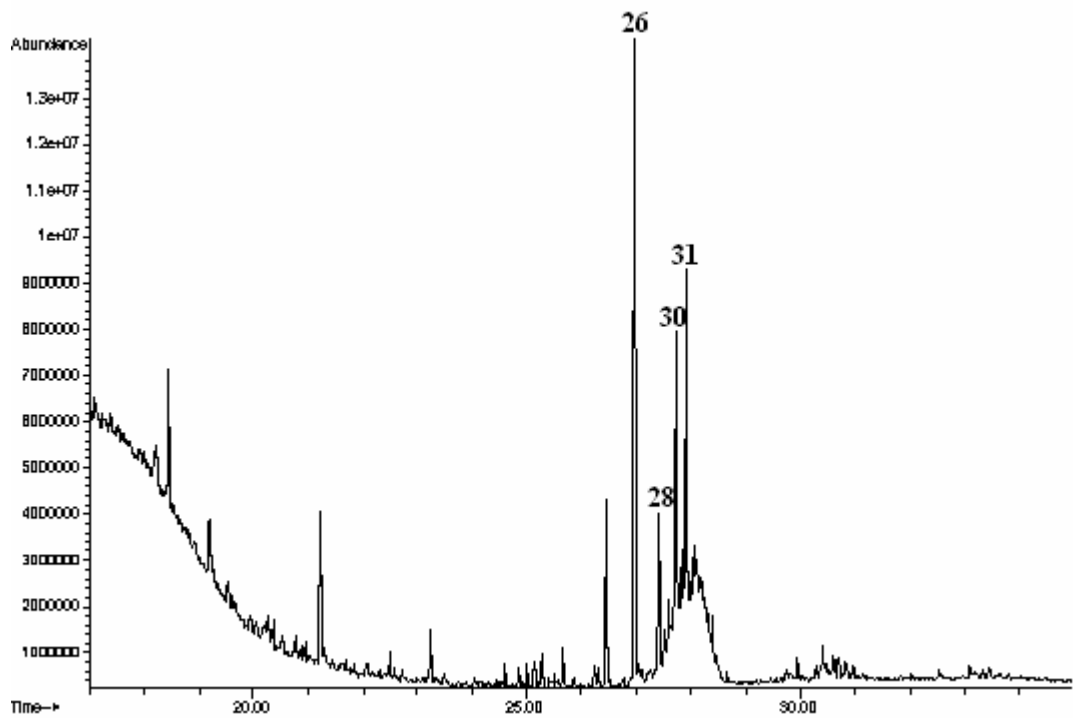


Figura 69 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F16 (*P.nitidifolium*).

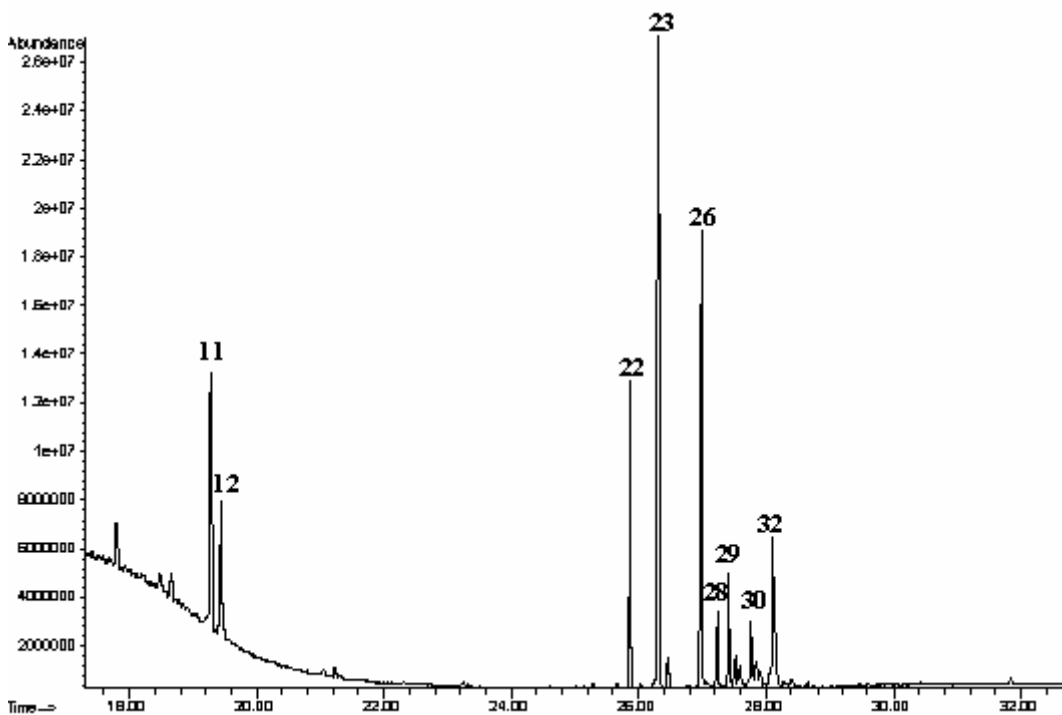


Figura 70 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F17 (*P.divarictium*).

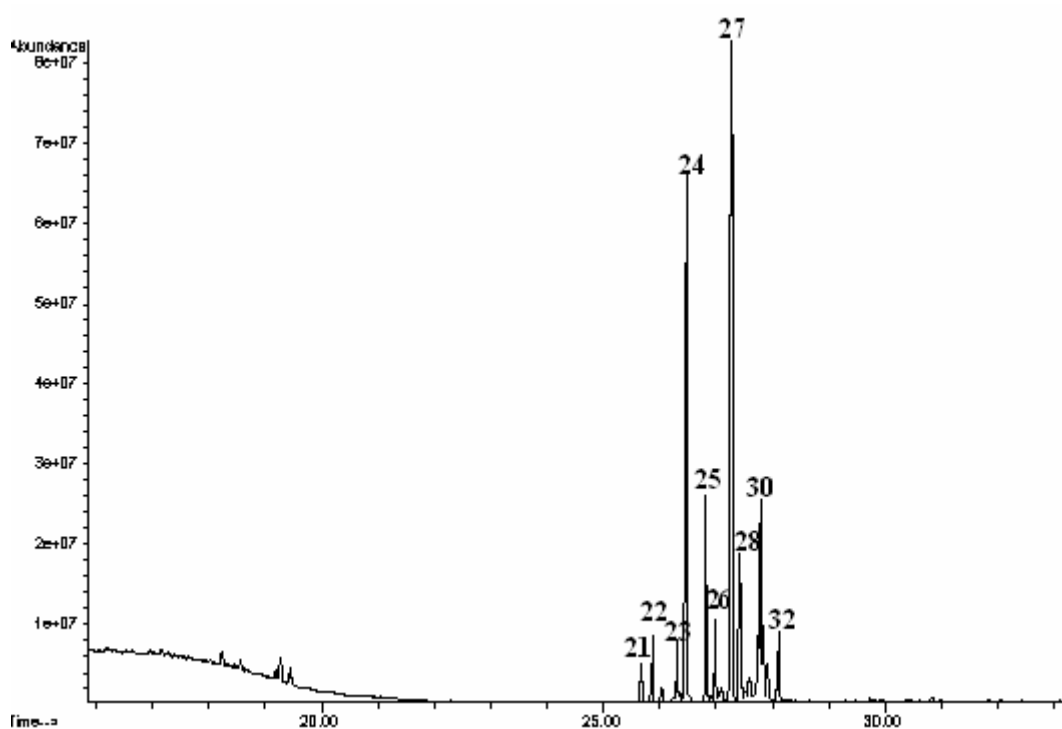


Figura 71 – Cromatograma CG/EM obtido para a fração F18 (*P.amazonicum*).

Com a utilização da fase móvel 1 (frações F1 a F8), foram obtidos os constituintes pertencentes a faixa intermediária, ou seja, monoterpenos de maior, e sesquiterpenos de menor t_r em CG (relativo a suas respectivas classes). Desta forma, não foi observado um efetivo isolamento de determinados grupos de constituintes destes óleos. Nas frações F1 e F6 foram identificados mono e sesquiterpenos, respectivamente. Nas demais frações obtidas neste sistema de fase móvel observaram-se a coexistência de sesqui e monoterpenos. Apesar desta coexistência, o perfil obtido na fração F6, mono e sesquiterpenos bem resolvidos no cromatograma, sugere que, talvez a realização de uma nova cromatografia (CCD) desta fração resulte em melhor separação, ou isolamento de algum(ns) constituinte(s) desta amostra.

Nas frações separadas utilizando-se a fase móvel 2 observou-se na fração F10 o isolamento do monoterpeneo terpin-4-ol e, nas demais frações de mesmo R_f foi identificado além deste o monoterpeneo o-cimeno. Nas frações de R_f intermediário observou-se o isolamento de alguns compostos que não puderam ser identificados e, nota-se nestas frações um comportamento similar ao citado anteriormente para o sistema de fase móvel 1, a coexistência de monos e sesquiterpenos na mesma fração. Dentre as frações de maior R_f (frações 15 a 18), a fração F18 apresentou um satisfatório isolamento de somente sesquiterpenos. As frações F15 e F17 apresentaram sesqui e monoterpeneos bem separados, o que sugere, como já foi dito anteriormente, a recromatografia destas frações a fim de se isolar estes constituintes.

De acordo com os resultados apresentados anteriormente, observa-se que o sistema cromatográfico onde foi empregada a fase móvel 2 (CH_2Cl_2 :Hex, 1,5:1) mostrou-se mais eficiente para prover a separações dos constituintes destes óleos essenciais.

Neste sistema onde a fase móvel tem uma maior constante dielétrica, os compostos mais leves e, portanto de maior afinidade pelo adsorvente do que pela fase móvel, deslocam-se mais lentamente, desta forma é feita a separação entre os monoterpeneos e os sesquiterpenos. São necessários ainda, alguns estudos mais detalhados sobre estes sistemas de solventes a serem utilizados, para que seja possível uma satisfatória separação dos compostos da faixa intermediária. Também deve ser testada a recromatografia destas frações em outros sistemas de solventes,

para que assim, sejam isolados os constituintes previamente separados nestas frações.

3.5.3 – Quantificação dos Constituintes por Normalização Simples de Área

O principal objetivo da análise quantitativa é determinar a quantidade de uma espécie presente na amostra analisada. Neste trabalho, utilizou-se o método de normalização simples a área a fim de obter-se informações sobre os constituintes majoritários nestes óleos essenciais extraídos.

Utilizaram-se os cromatogramas já apresentados nas **Figuras 13 a 16**, para a quantificação destes constituintes.

A Tabela apresenta os resultados obtidos no estudo de quantificação dos constituintes identificados nas quatro espécies. Encontram-se destacados os constituintes majoritários na composição destes óleos essenciais.

Tabela 6 – Concentração relativa dos componentes possivelmente identificados nos óleos essenciais de *Protium spp.*

Identificação (número)	Composto	Quantificação (%)			
		<i>hebetatum</i>	<i>nitidifolium</i>	<i>divarictium</i>	<i>amazonicum</i>
1	Triciclano	0,12	-	-	-
2	α -Pino	15,74	10,96	11,22	4,02
3	α -Fencheno	0,68	-	-	-
4	Canfeno	1,32	0,95	0,41	0,32
5	Sabineno	-	3,37	-	-
6	β -Pino	2,52	3,62	1,40	0,79
7	cis-Pinano	-	1,53	9,42	-
8	3-p-Menteno	2,24	-	2,58	0,27
9	α -Felandreno	1,90	-	2,35	-
10	δ -2-Careno	1,32	-	0,29	-
11	o-Cimeno	19,60	4,75	8,21	1,25
12	Limoneno	10,20	1,05	8,66	2,49
13	γ -Terpineno	0,36	0,43	-	-
14	Terpinoleno	-	0,23	-	-
15	p-Cimeno	-	-	0,31	-
16	trans-Sabinol	-	1,66	-	-
17	Terpin-4-ol	1,76	6,89	0,97	-
18	α -Terpineol	7,64	1,30	5,38	-
19	Tuj-3-en-10-al	-	0,64	-	-
20	Verbenona	-	0,80	-	-

21	δ -Elemeno	-	0,25	-	0,89
22	α -Cubebeno	0,19	-	4,48	1,38
23	Ciclosativeno	-	-	7,52	1,27
24	β -Elemeno	-	-	-	10,08
25	Z-Cariofileno	-	-	-	4,15
26	E-Cariofileno	0,92	3,01	6,02	1,82
27	Cedrano	-	-	1,29	14,09
28	α -Humuleno	-	0,99	1,89	2,84
29	Seicheleno	0,91	-	1,67	-
30	γ -Muuroleno	-	3,01	-	4,90
31	α Selileno	-	3,07	-	-
31	δ -Cadideno	1,33	-	3,14	1,80
33	Elemol	-	1,64	-	-
34	Óxido de Cariofileno	-	-	3,22	-
34	cis- Diidro Acetato de Ocidentalol	-	6,60	-	3,84
36	Drimenol	-	-	3,35	-
37	trans-Diidro Acetato de Ocidentalol	-	-	1,90	1,67
38	Acetato de 2-Difenil Etil	-	-	0,20	-

Os constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais das espécies *Protium spp.* foram:

P. hebetatum: os monoterpenos o-cimeno (19,60%), α -pineno (15,74%), limoneno (10,20%), e α -terpineol (7,64%);

P. nitidifolium: os monoterpenos α -pineno (10,96%), o-cimeno (4,75%), terpin-4-ol (6,89%), e o sesquiterpeno cis – diidro acetato de ocidentalol (6,60%);

P. divarictium: os monoterpenos α -pineno (11,22%), o-cimeno (8,21%), limoneno (8,66%) e cis – pinano (9,42%);

P. amazonicum: os sesquiterpenos cedrano (14,09%) e β -elemeno (10,08%).

Observa-se, que as três primeiras amostras apresentam resultados compatíveis com os relatos da literatura. Ou seja, a predominância de monoterpenos entre os constituintes majoritários, sendo ainda, o α -pineno e monoterpenos de tipo mentano (o-cimeno, limoneno, terpin-4-ol e α -terpineol) representativos nestas espécies [18,30].

Os resultados acima provêm ainda, uma explicação a respeito dos diferentes pontos de ebulição encontrados nas análises por DSC (**Figura 7**). O óleo de *P. hebetatum* resultou no ponto de ebulição mais baixo (172,35 °C) em razão de serem seus constituintes monoterpênicos são mais voláteis, por exemplo, que os sesquiterpenos presentes majoritariamente no óleo de *P. amazonicum*, conferindo a este ponto de ebulição 260,90 °C. Apesar da identificação dos constituintes majoritários na amostra de *P. divarictium* como sendo monoterpenos, observa-se no perfil geral deste óleo um contrabalanço na quantidade de constituintes mono e sesquiterpênicos, respondendo ao ponto de ebulição 250,07 °C.

4 – Conclusões

As técnicas empregadas neste trabalho aliadas às informações populares e à química analítica formam um conjunto de ferramentas imprescindíveis para o estudo analítico destes óleos essenciais. Os resultados obtidos demonstram a eficiência das técnicas e metodologia utilizadas.

O estudo do tempo de extração possibilitou uma extração quantitativa destes óleos, evitando perdas (de massa e constituintes) e, otimizando esta etapa do trabalho.

Concluiu-se que a análise por CCD é uma técnica muito útil na análise dos constituintes dos óleos essenciais. As separações por CCD mostraram-se eficientes, desenhando novos caminhos para o isolamento destes compostos. Por exemplo, o composto terpin-4-ol, separado por CCD é um monoterpene cujas atividades antialérgica e vasodilatadora foram descritas, sendo também um dos mais importantes compostos usados na indústria de cosméticos e perfumaria.

Nas análises por CG/EM os dados qualitativos e quantitativos obtidos apresentaram dados inéditos para este gênero. A espectrometria de massas se mostrou de extrema importância na possível identificação destes constituintes.

Estas informações associadas à caracterização físico-química deste óleo representam um novo perfil para os óleos essenciais extraídos de resinas do gênero *Protium*, como por exemplo, os resultados obtidos para as espécies *P. divarictium* e *P. amazonicum*.

Foram identificados um total de 38 constituintes, entre monos e sesquiterpenos. Sendo 17 constituintes para a espécie *P. hebetatum*; 21 para a espécie *P. nitidifolium*; 23 para a espécie *P. divarictium*; e 18 para a espécie *P. amazonicum*.

Dentre os constituintes majoritários encontram-se os monoterpenos α -pineno, limoneno, o-cimeno, terpin-4-ol, α -terpineol, cis-pinano e, os sesquiterpenos β -elemeno, z- e e-cariofileno, cedrano, γ -muuroleno e cis-diidro acetato de ocidentalol.

Há muitos relatos na literatura sobre as propriedades anti-sépticas, antibactericida e antifúngica de óleos essenciais contendo grande porcentagem de constituintes monoterpênicos, dentro deste contexto este trabalho apresenta um grande potencial para utilização biológica destes óleos essenciais, entre outras aplicações.

4.1 – Perspectiva de Trabalhos Futuros

- Extração do óleo essencial por outras técnicas como fluido supercrítico e/ou SPME-HS;
- Estudo dos parâmetros como força iônica e adição de solvente no meio de extração;
- Estudo detalhado da metodologia de separação e isolamento por CCD e CLC dos constituintes que possam vir a apresentar atividade biológica;
- Testes biológicos em cobaia;
- Identificação dos constituintes utilizando índice de Kováts.

5 – Apêndice: Fragmentogramas Teóricos

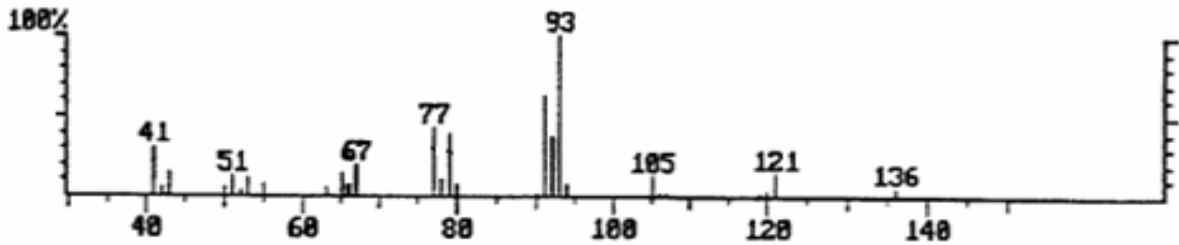
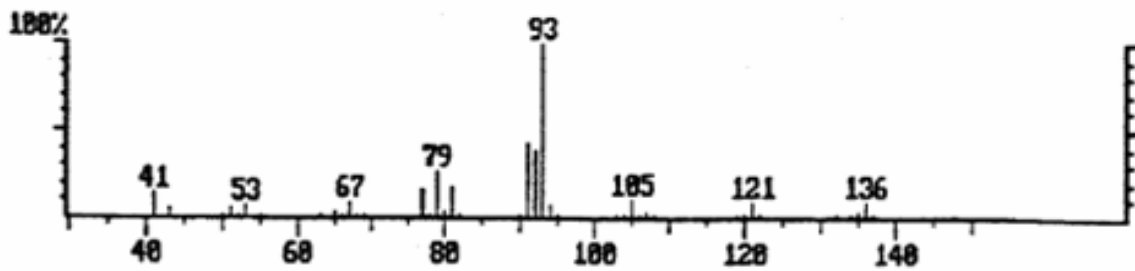
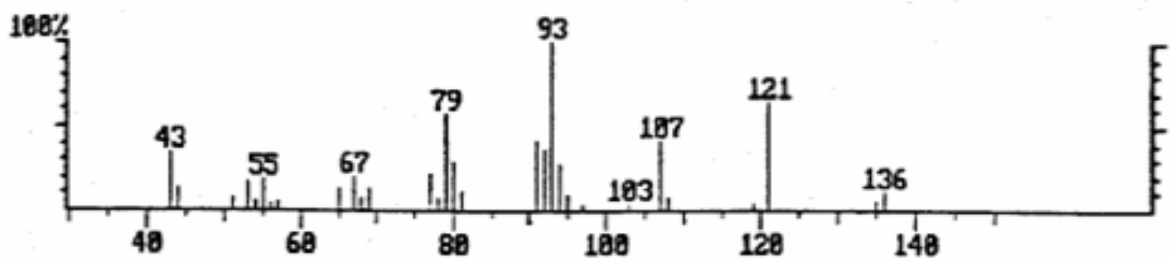


Figura 72 – Fragmentograma teórico do composto Tricicleno (1).

Figura 73 – Fragmentograma teórico do composto α -Pineno (2).Figura 74 – Fragmentograma teórico do composto α -Fencheno (3).

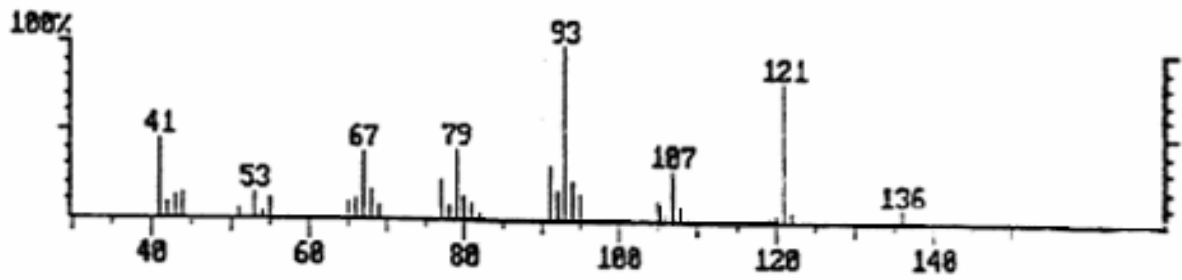


Figura 75 – Fragmentograma teórico do composto Canfeno (4).

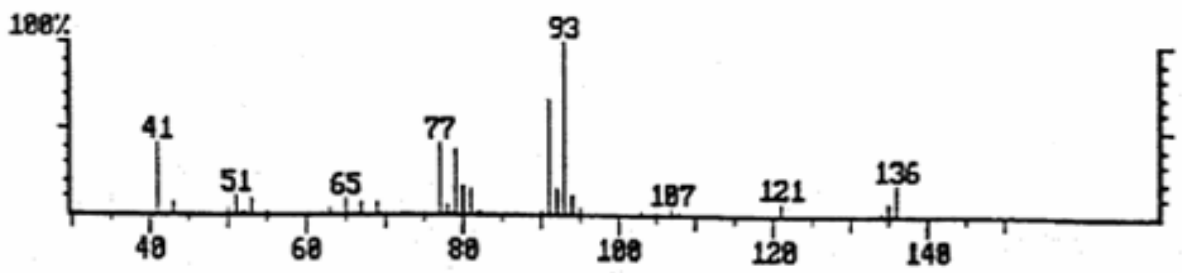


Figura 76 – Fragmentograma teórico do composto Sabineno (5).

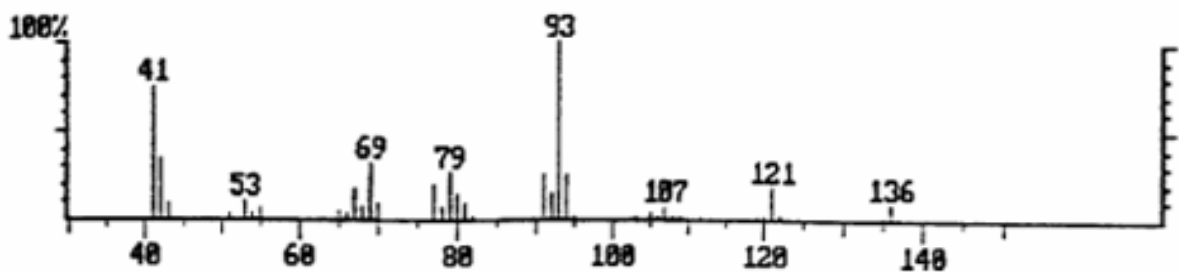


Figura 77 – Fragmentograma teórico do composto β -Pineno (6).

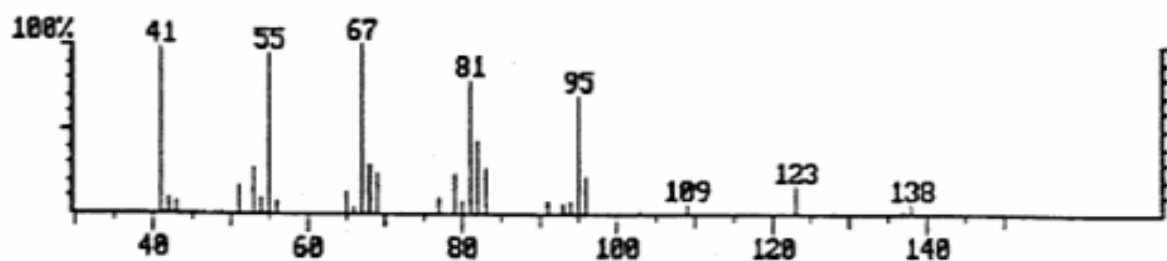


Figura 78 – Fragmentograma teórico do composto cis-Pinano (7).

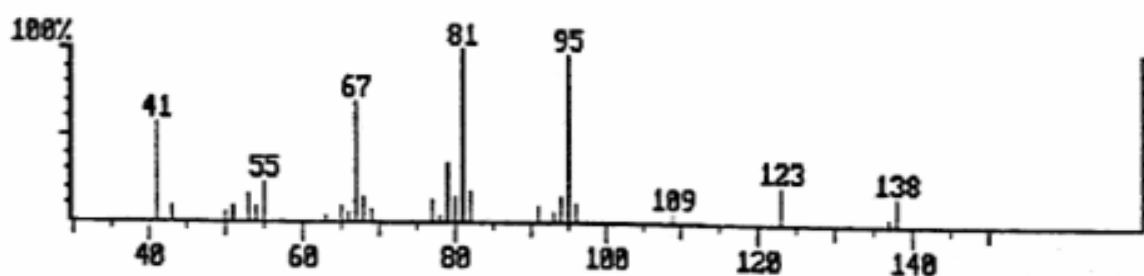


Figura 79 – Fragmentograma teórico do composto 3-p-Menteno (8).

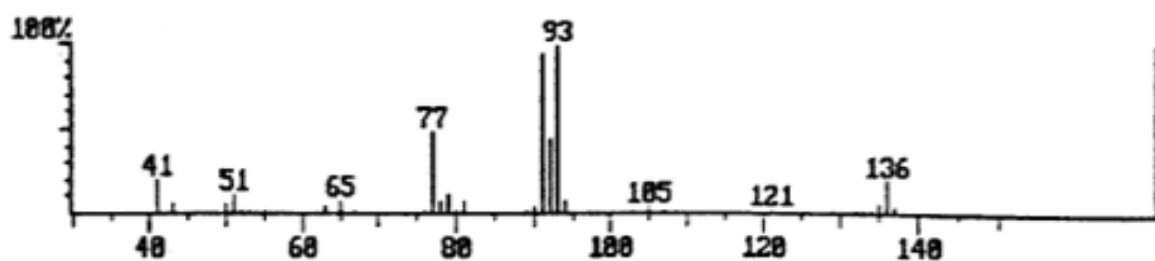


Figura 80 – Fragmentograma teórico do composto α -Felandreno (9).

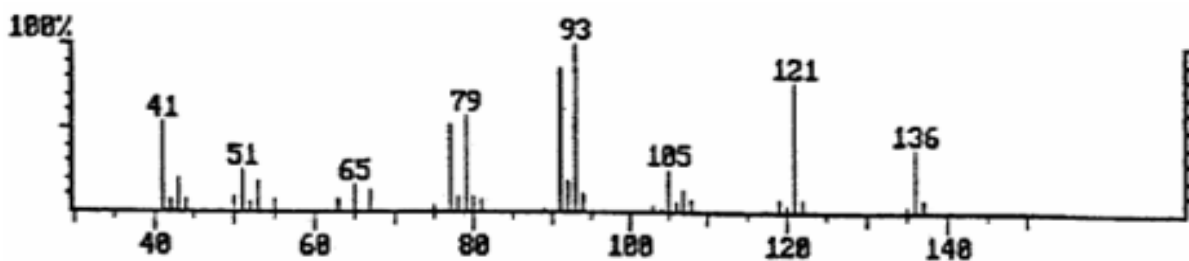


Figura 81 – Fragmentograma teórico do composto 2-δ-Careno (10).

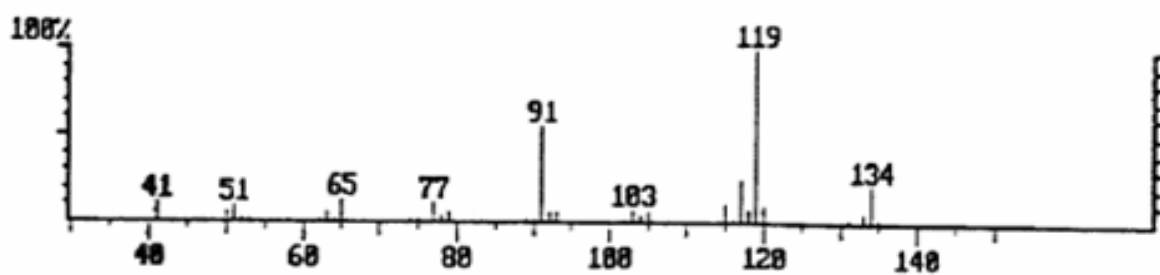


Figura 82 – Fragmentograma teórico do composto o-Cimeno (11).

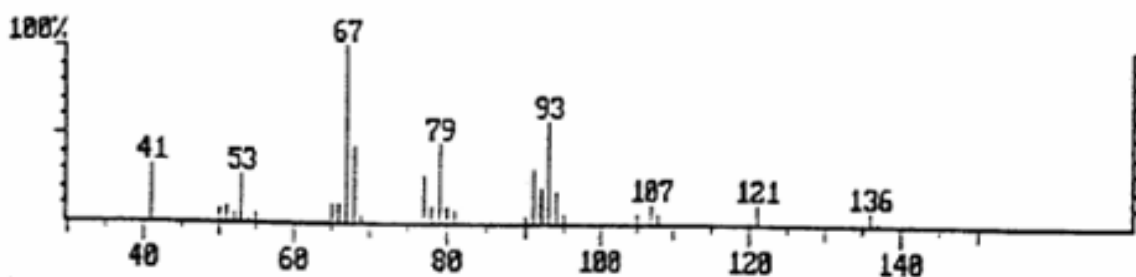


Figura 83 – Fragmentograma teórico do composto Limoneno (12).

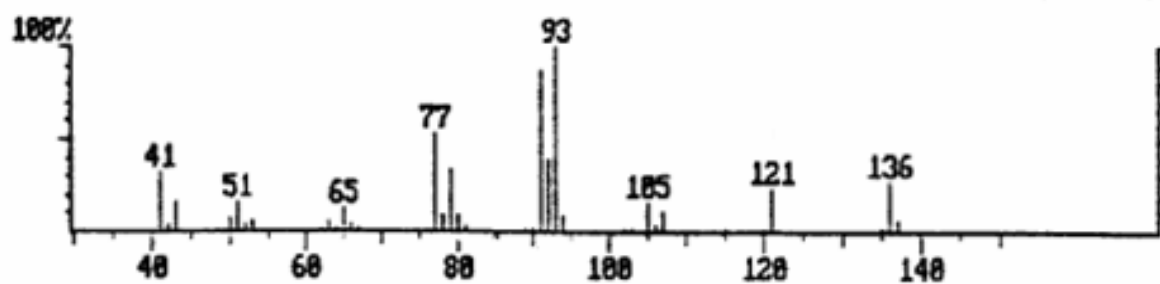


Figura 84 – Fragmentograma teórico do composto γ -Terpineno (13).

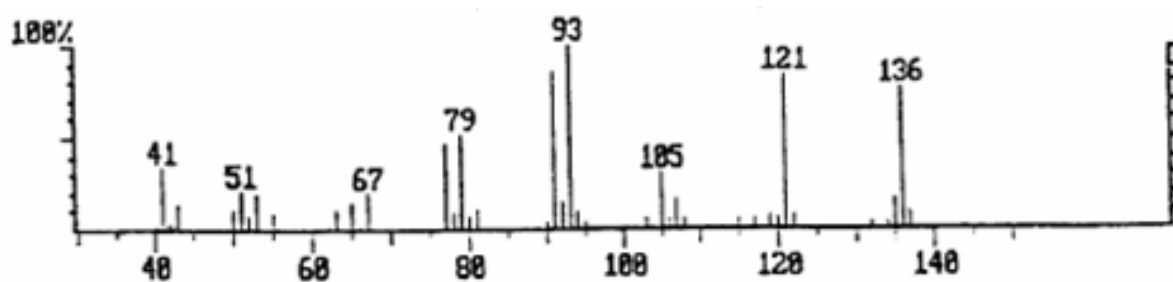


Figura 85 – Fragmentograma teórico do composto γ -Terpinoleno (14).

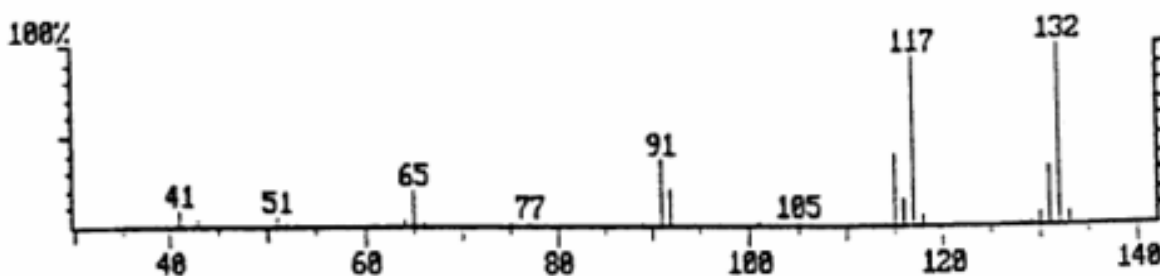


Figura 86 – Fragmentograma teórico do composto p-Cimeno (15).

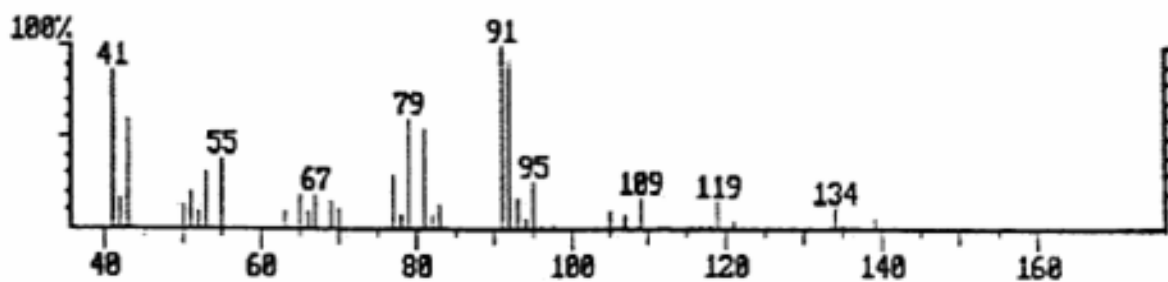


Figura 87 – Fragmentograma teórico do composto trans-Sabinol(16).

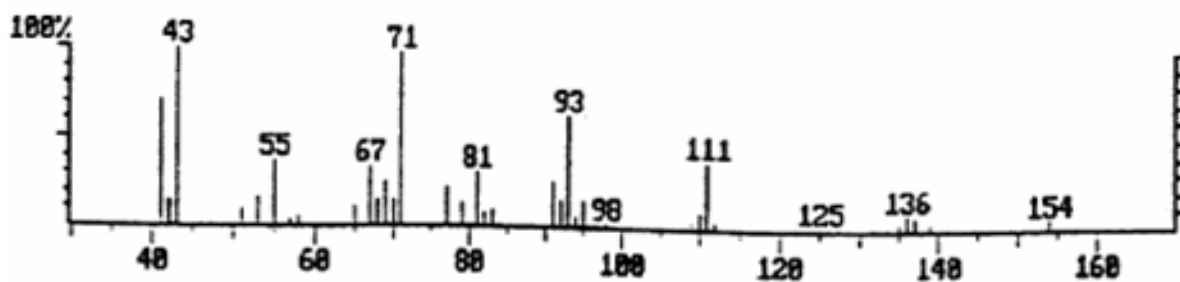


Figura 88 – Fragmentograma teórico do composto Terpin-4-ol (17).

Figura 89 – Fragmentograma teórico do composto α -Terpineol (18).

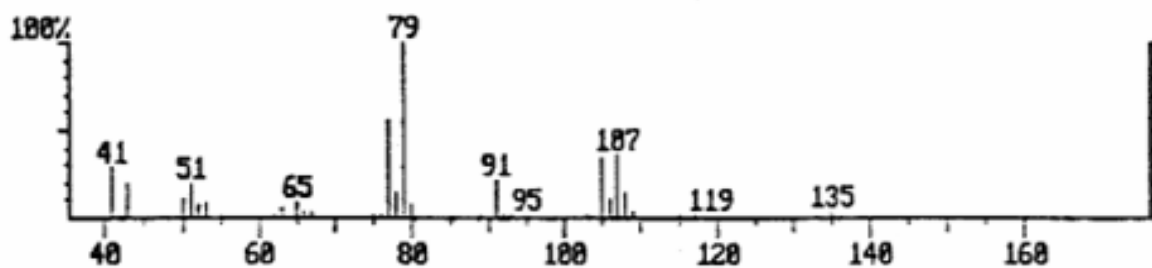


Figura 90 – Fragmentograma teórico do composto Tuj-3-en-10-al (19).

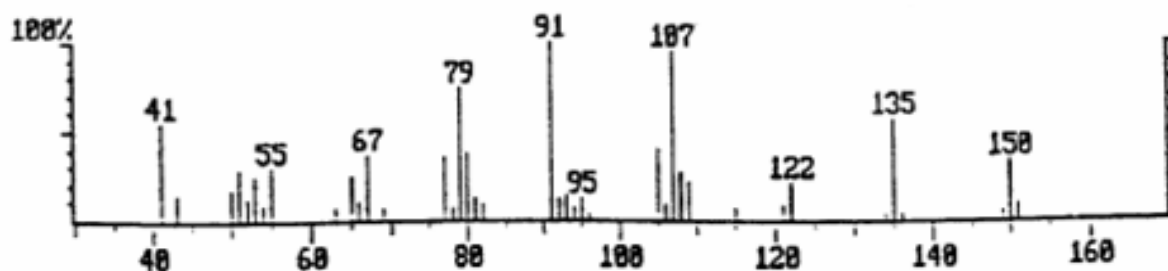
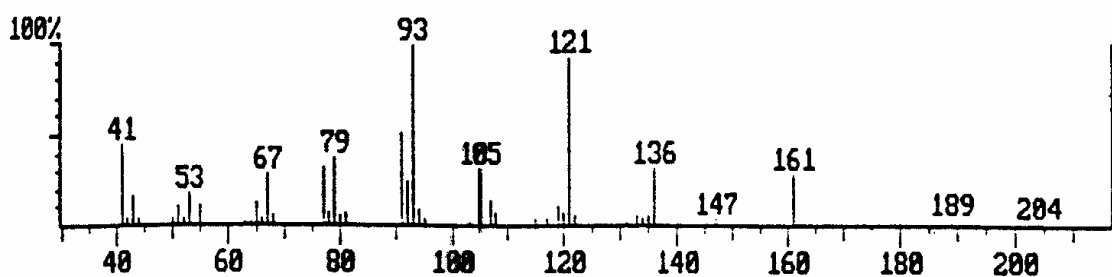


Figura 91 – Fragmentograma teórico do composto Verbenona (20).

Figura 92 – Fragmentograma teórico do composto δ -Elemeno (21).

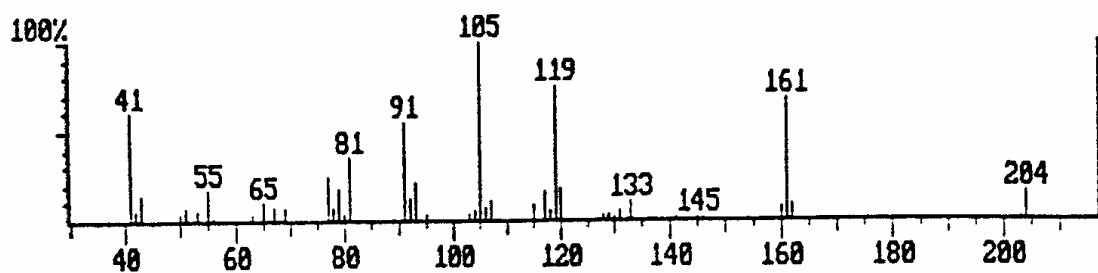
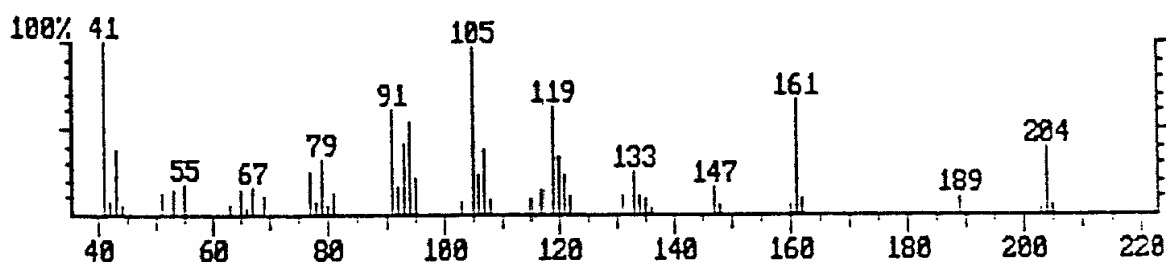
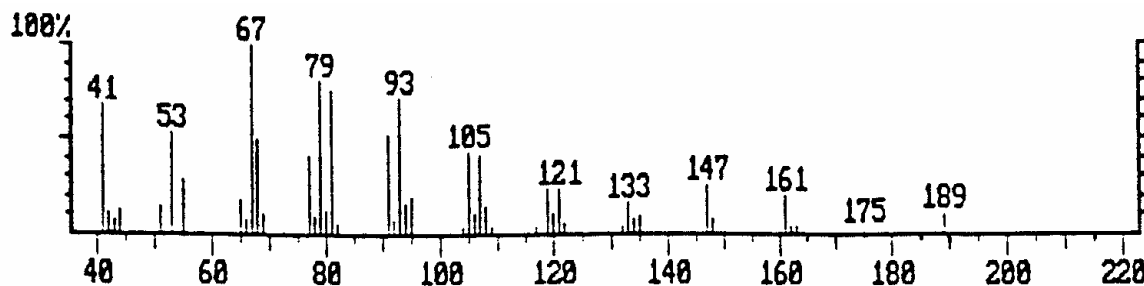
Figura 93 – Fragmentograma teórico do composto α -Cubebeno (22).

Figura 94 – Fragmentograma teórico do composto Ciclosativeno (23).

Figura 95 – Fragmentograma teórico do composto β -Elemeno (24).

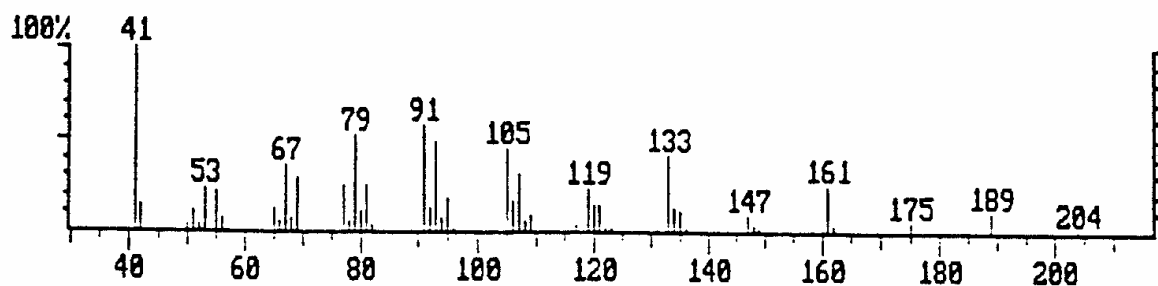


Figura 96 – Fragmentograma teórico do composto Z-Cariofileono (25).



Figura 97 – Fragmentograma teórico do composto E-Cariofileono (26).

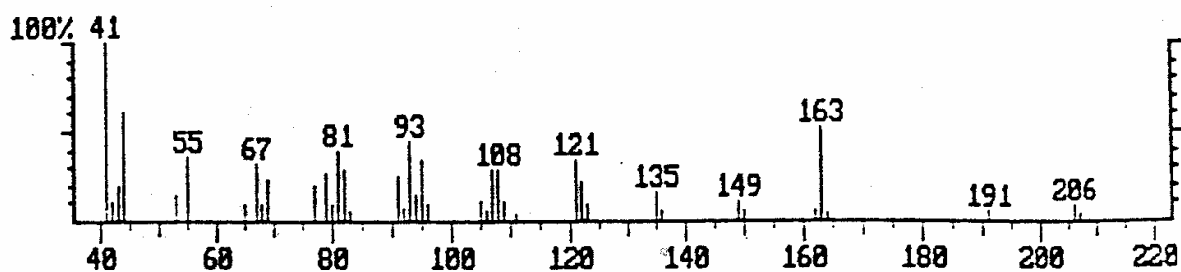


Figura 98 – Fragmentograma teórico do composto Cedrano (27).

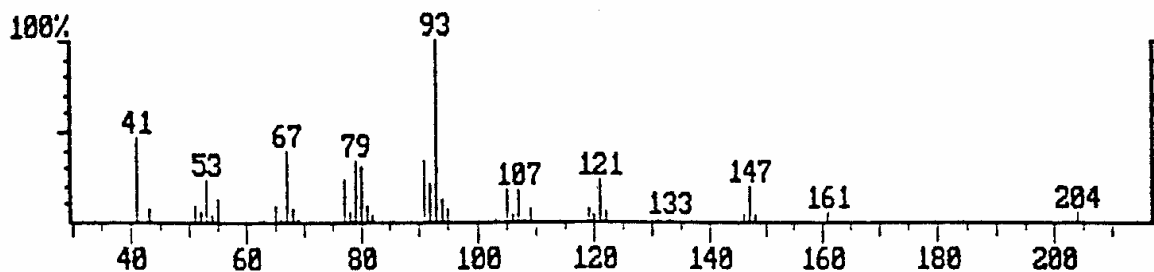
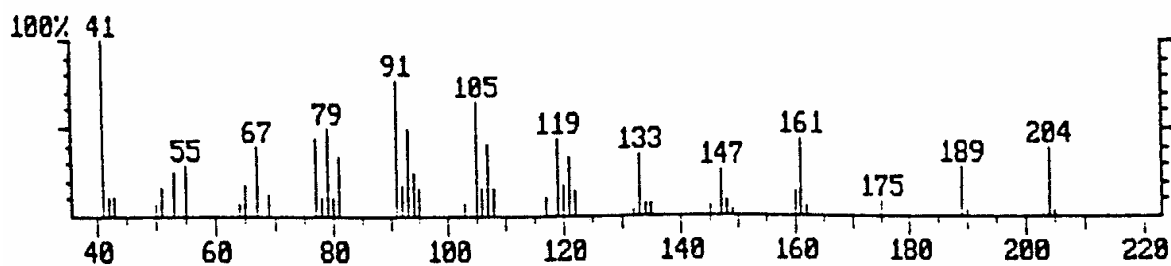
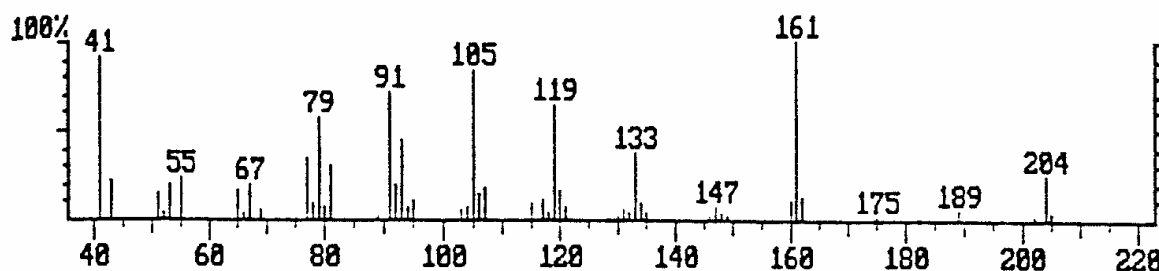
Figura 99 – Fragmentograma teórico do composto α -Humuleno (28).

Figura 100 – Fragmentograma teórico do composto Seicheleno (29).

Figura 101 – Fragmentograma teórico do composto γ -Muuroleno (30).

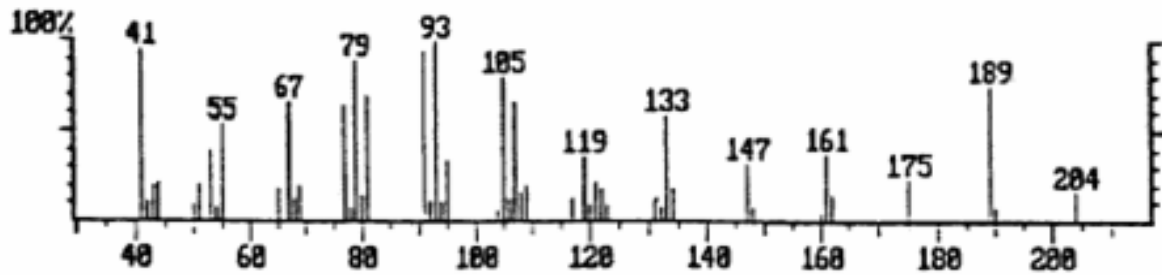


Figura 102 – Fragmentograma teórico do composto α -Selineno (31).

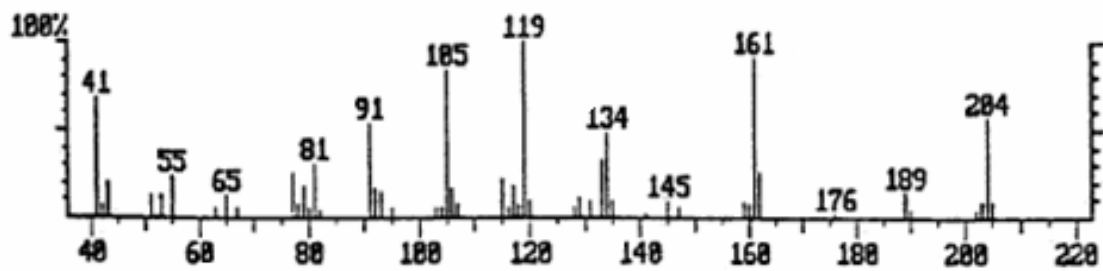


Figura 103 – Fragmentograma teórico do composto δ -Cadideno (32).

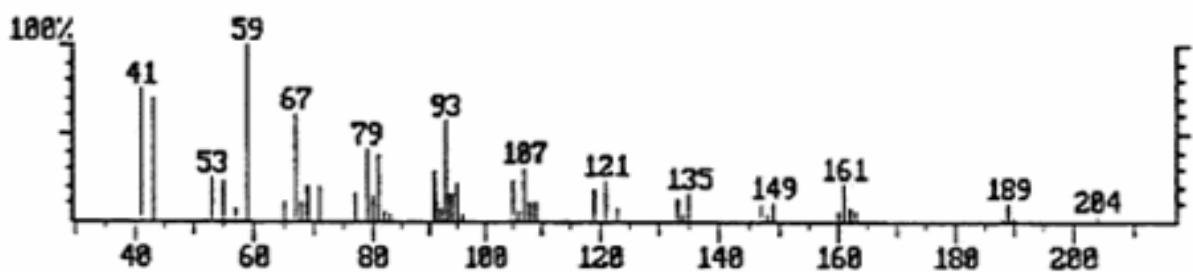


Figura 104 – Fragmentograma teórico do composto Elemol (33).

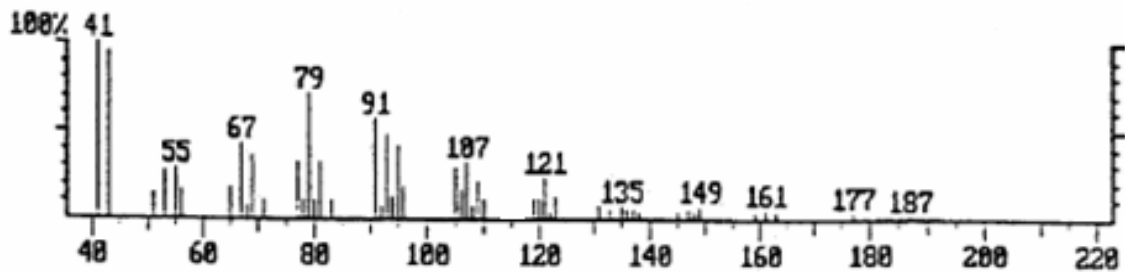


Figura 105 – Fragmentograma teórico do composto Óxido de Cariofileno (34).

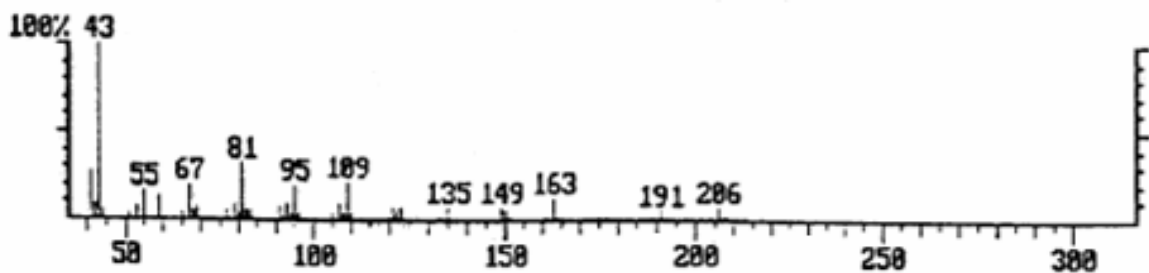


Figura 106 – Fragmentograma teórico do composto cis-Diidro Acetato de Ocidentalol (35).

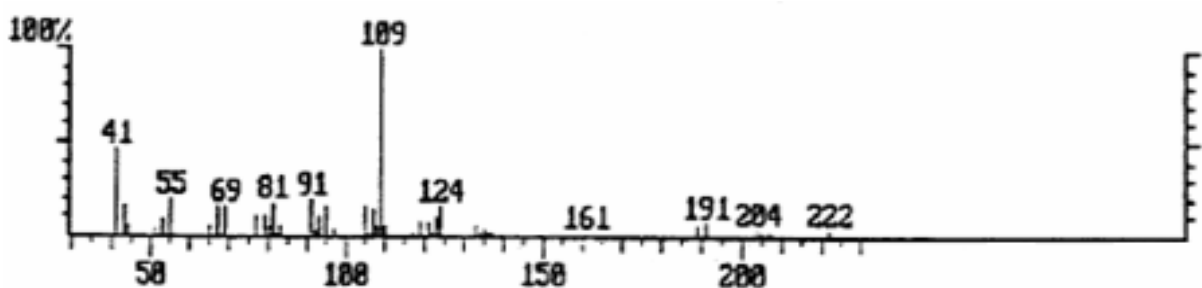


Figura 107 – Fragmentograma teórico do composto Drimenol (36).

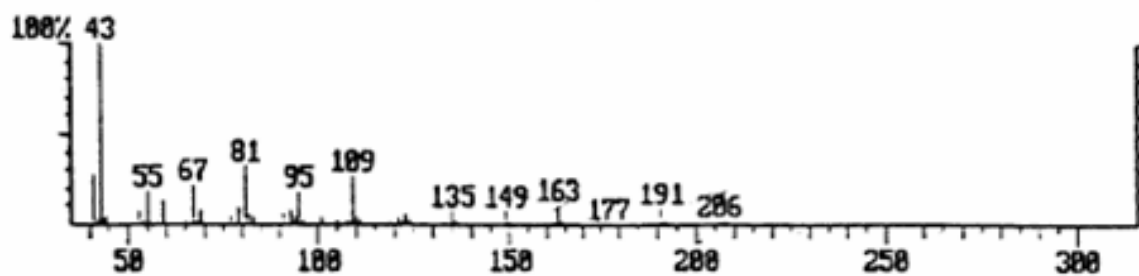


Figura 108 – Fragmentograma teórico do composto trans-Diidro Acetato de Ocidentalol (37).

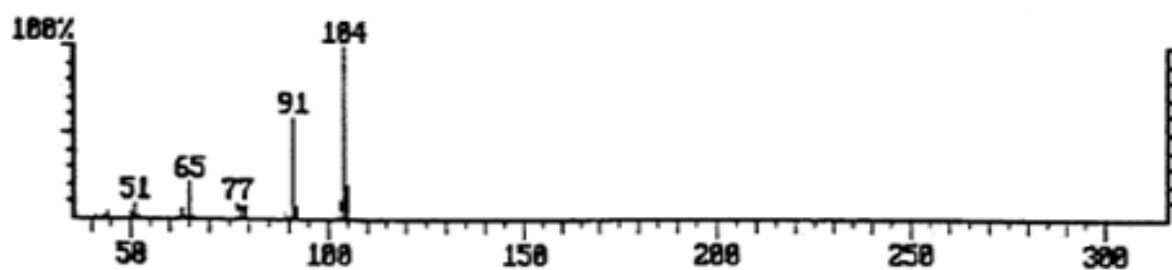
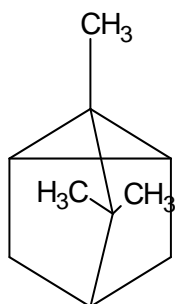
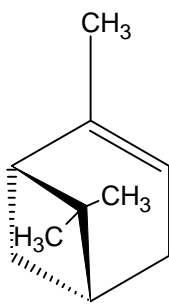
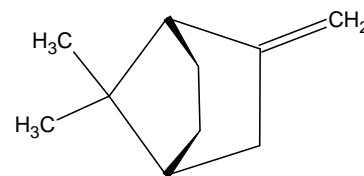
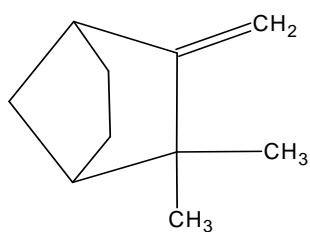


Figura 109 – Fragmentograma teórico do composto 2-Acetato de di-Fenil Etila (38).

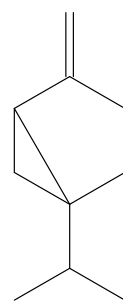
6 – Apêndice: Fórmulas Estruturais



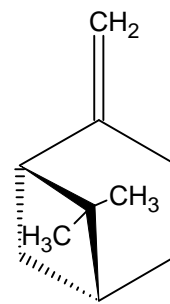
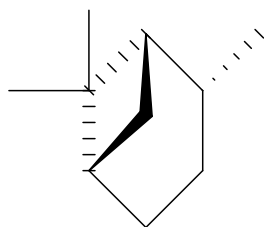
Tricicleno

 α -Pineno α -Fencheno

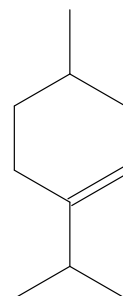
Canfeno



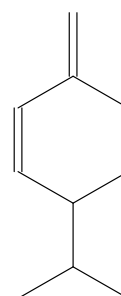
Sabineno

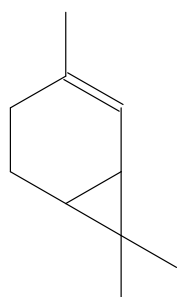
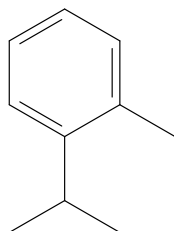
 β -Pineno

cis-Pinano

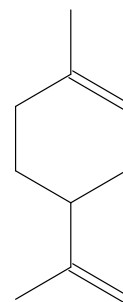


3-p-Menteno

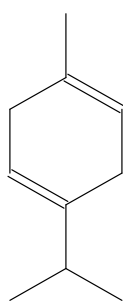
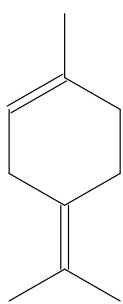
 α -Felandreno

2- δ -Careno

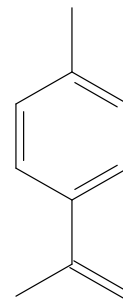
o-Cimeno



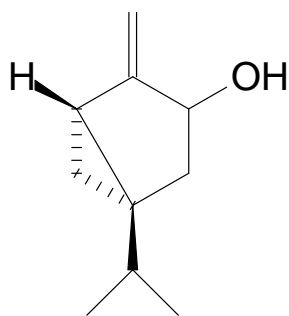
Limoneno

 γ -Terpineno

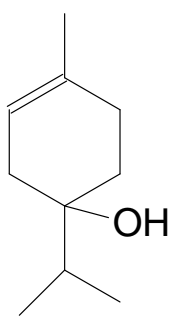
Terpinoleno



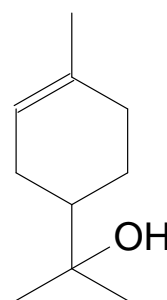
p-Cimeno

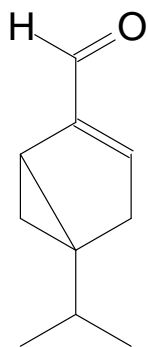


Trans-Sabinol

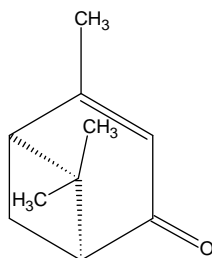


Terpin-4-ol

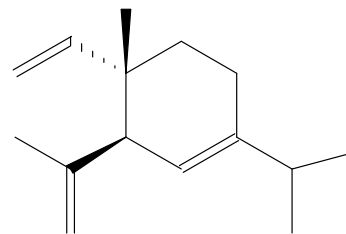
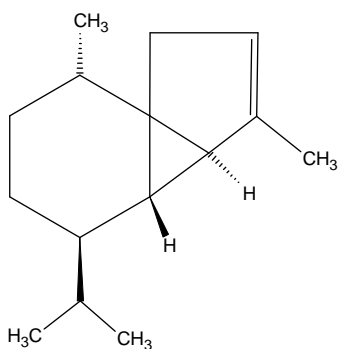
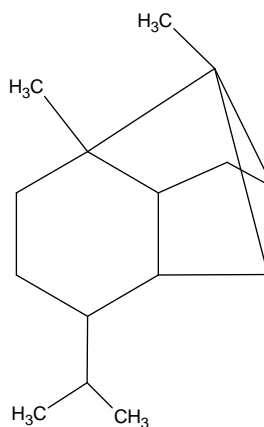
 α -Terpineol



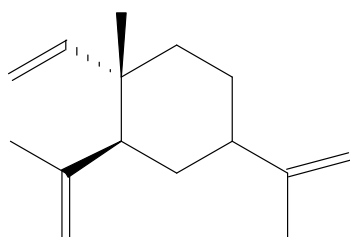
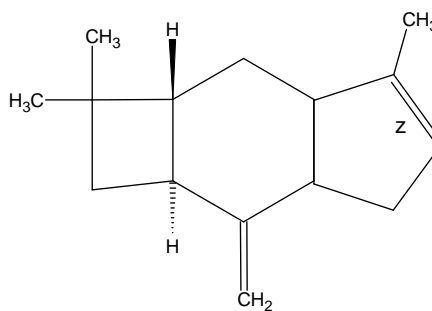
Tuj-3-en-10-al



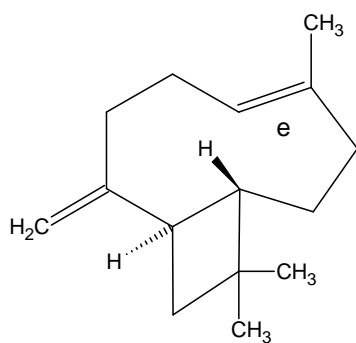
Verbenona

 δ -Elemeno α -Cubebeno

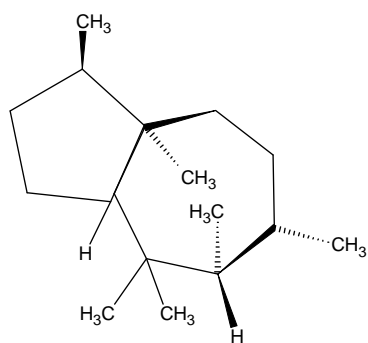
Ciclosativeno

 β -Elemeno

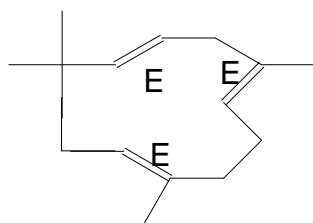
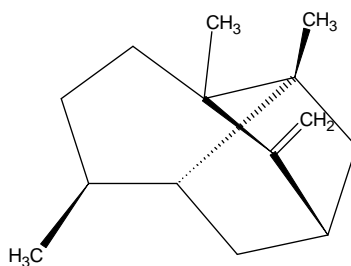
z-Cariofileno



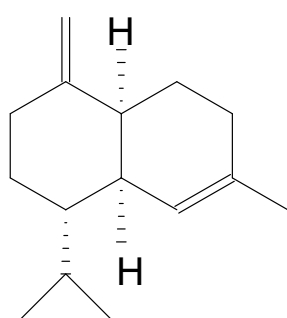
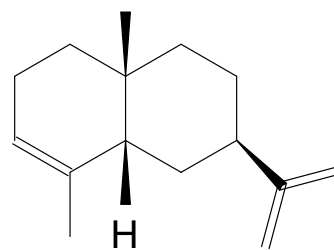
e-Cariofileno

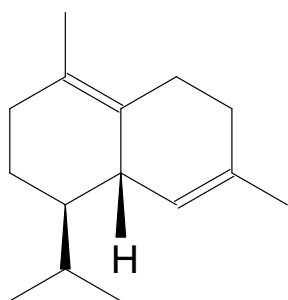
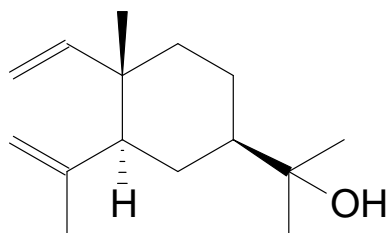


Cedrano

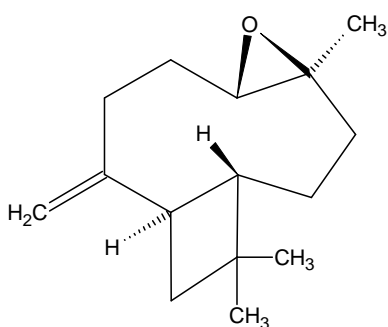
 α -Humuleno

Seicheleno

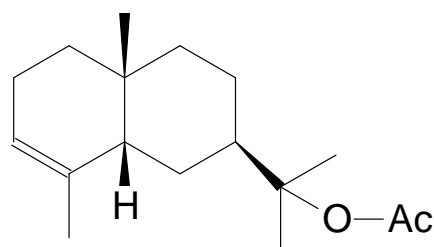
 γ -Muuroleno α -Selineno

 δ -Cadideno

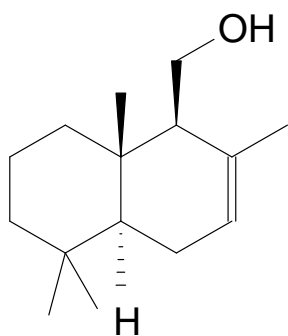
Elemol



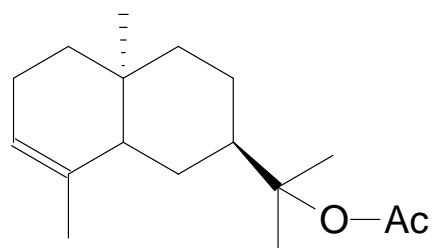
Óxido de Cariofileno



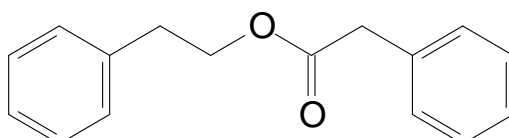
cis – Diidro Acetato de Ocidentalol



Drimenol



trans – Diidro Acetato de Ocidentalol



2-Acetato de di-Fenil Etila

7 – Bibliografia

[1] – YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 501 p.

[2] – INNOCENTINI, A. P. **Extração e caracterização analítica do óleo essencial da espécie *Aniba canelilla*, visando o isolamento do composto majoritário, 1-nitro-2-feniletano, e seu uso toxicológico**. 2000. 125f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

[3] NATURA e o Meio Ambiente – O que é biodiversidade? Disponível em: <http://www.natura.net/portal_ri/port/> - Acesso em: 29 jan. 2006.

[4] – SIANI, A. C.; SAMPAIO, F. L. A.; SOUSA, C. M.; HENRIQUE, O. M. G. M.; RAMOS, S. F. M. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 37-43, 2000.

[5] – TROVATI, G. **Estudo Analítico da composição química do óleo essencial da espécie *Aloysia gratissima***. 2003. 87f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

[6] – SIMÕES C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN C.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2000. p. 387-415.

[7] – BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Acribia , 1991. 594p.

[8] – HARBONE, J.B. **Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2.ed. New York: Chapman and Hall, 1984. 288 p.

[9] – CAPPELARO, E. A. **Desenvolvimento de metodologia para extração e determinação de compostos voláteis e semi-voláteis, aplicáveis ao controle de qualidade do *guaco***. 2005. 187f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

[10] – ROQUE, N. F. **Identificação e determinação estrutural de terpenos**. 1990. 160 f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

-
- [11] – COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. v. 1.
- [12] – BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 235-244, 1998.
- [13] – KRAUSE-BARANOWSKA, M.; MARDAROWICZ, M.; WIWART, M.; POBLOCKA, L.; DYNOWSKA, M. Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, p. 478-482, 2002.
- [14] – DE FEO, V.; BRUNO, M.; TAHIRI, B.; NAPOLITANO, F., SENATORE, F. Chemical composition and antibacterial activity os essential oils from *Thymus spinulosos* Tem. (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 13, p. 3849-3853, 2003.
- [15] – MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; SIMIN, N. Antimicrobial ans antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2485-2489, 2004.
- [16] – TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial ans antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, v. 90, p. 333-340, 2005.
- [17] – CITÓ, A. M. G. L.; SOUZA, A. A.; LOPES, J. A. D.; CHAVES, M. H.; COSTA, F. B.; SOUSA, S. A. A.; AMARAL, M. P. M. Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): Composição química do óleo essencial e avaliação citotóxica frente a *Artemia salina* Leach. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 52, n. 2, p. 74-76, 2003.
- [18] – SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; LIMA JUNIOR, O. M.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, E. F.; SOARES, R. O. A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G. B.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 57-69, 1999.
- [19] – BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 73-82, 2005.

-
- [20] – ARAÚJO, E. C. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ANDRADE NETO, M.; ANDRADE, I. L.; LIMA, M. A. A. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 13, p. 3760-3762, 2003.
- [21] – FOURNET, A., DE ARIAS, R.; CHARLES, B., BRUNETON, J. Chemical constituent of essential oils of *Muña*, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 145-149, 1996.
- [22] – DON-PEDRO, K. N. Fumigant toxicity is the major route of insecticidal activity of citrus peel essential oil. **Pesticide Science**, v. 46, p. 71-78, 1996.
- [23] – MATSUDA, B. M.; SURGEONER, G. A.; HEAL, J. D.; TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J. Essential oil analysis and field evaluation of the citrus plant *Pelargonium citrosum* as repellent against populations of *Aedes* mosquitoes. **Journal of American Mosquitoes Control Association**, v. 12, p. 69-74, 1996.
- [24] – MILHAU, G.; VALENTIN, A.; BENOIT, F.; MALLIÉ, M.; BASTIDE, J. M. In vitro antimalarial activity of eight essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 329-333, 1997.
- [25] – SIDDIQUI, Y. M.; ETTAYEBI, M.; HADDAD, A. M.; AL-AHDAL, M. N. Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on *Herpes simplex* virus type 1 and New-castle disease virus. **Medical Science Research**, v. 24, p. 185-186, 1996.
- [26] – HAYASHI, K.; KAMIYA, M.; HAYASHI, T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, Influenza virus and HIV. **Planta Medica**, v. 61, p. 237-241, 1994.
- [27] – CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. 2000. 125f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
- [28] – CLEVINGER, J. F. Apparatus for volatile oil determination. **American Perfumer and Essential Oil Review**, p.467-468, 1928.
- [29] – SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; MONTEIRO, S. S.; CARVALHO, E. S.; RAMOS, M. F. S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 477-489, 2004.
- [30] – RAMOS, M. F. S.; SIANI, A. C.; TAPPIN, M. R. R.; GUIMARÃES, A. C.; RIBEIRO, J. E. L. S. Essential oils from oleoresins of *Protium* spp. of the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 150, p. 383-387, 2000.
-

- [31] – BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. Metabólitos secundários de *protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1078-1080, 2002.
- [32] – MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): Caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 623-626, 2000.
- [33] – ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Composition of the essential oils from leaves, woods, fruits and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p. 169-171, 2002.
- [34] – ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S. Volatile constituents of the *Protium subseratum* (Engl.) Engl. And *tetragastris panamensis* (Engl.) Kuntz. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 325-326, 1998.
- [35] – OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extracts from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.
- [36] – SOBRE a Amazônia – Breu. Disponível em: <<http://portalamazonia.globo.com/>> . Acesso em: 24 abr. 2005.
- [37] – CAÑIZARES, J.C.; CARBÓ, M. T. D.; ADELANTADO, J. V. G.; CASTRO, R. M.; REIG, F. B. Study of *Burseraceae* resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1093, p. 177-194, 2005.
- [38] – ZOGHBI, M. G. B.; CUNHA, E. V. L., WOLTER FILHO, W. Essential oil of *Protium unifoliolatum* (Burseraceae). **Acta Amazônica**, v. 23, n. 1, p. 15-16, 1993.
- [39] – BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R. Estudo dos constituintes fixos e voláteis da resina de *Protium heptaphyllum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2000. ref. PN 1447/2.
- [40] – LIMA, M. P.; PINTO, D. S.; LIMA, T. A. A. C.; RIBEIRO, J. E. L. S.; MARQUES, M. O. M.; FACANAL, R. Óleos essenciais de espécies de *Protium* da reserva Ducke-AM: *P. hebetatum*, *P. paniculatum* var. *riedelianum* e *P aracouchini*. **Documentos IAC**, v.77, p. 50, 2005.

-
- [41] – LIMA, M. P.; CARVALHO, L. E.; ZOGHBI, M. G.; MARQUES, M. O. M.; FACANAL, R. Constituintes voláteis de *Crespidospermum rhoifolium*, *Trattinnickia rhoifolia* e *Protium altsoni*. **Documentos IAC**, v.77, p. 51, 2005.
- [42] – SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.
- [43] – CORDEIRO, P. J. M. **Detecção e caracterização dos constituintes químicos (xantinas, alcalóides e terpenóides) em extratos aquosos de “espinheira santa” por técnicas cromatográficas acopladas a métodos espectrométricos (HPLC-DAD e HRGC-MS)**. 1996. 135f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.
- [44] – MC NAIR, H. M. **Basic gas chromatography**. New York: John Wiley , 1997. 200 p.
- [45] – COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução à métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1997. 279p.
- [46] – CIOLA, R. **Fundamentos de cromatografia a gás**. São Paulo: Edgar Blucher, 1985. 266 p.
- [47] – LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254 p.
- [48] – WASICKY, R. **Curso de análise cromatográfica em camada delgada**. 1987. 104 f. Monografia (Didática) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.
- [49] – VILEGAS, J. H. Y. **Técnicas modernas de extração e de análise cromatográfica aplicadas ao controle de qualidade de plantas medicinais brasileiras**. 1997. 150f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
- [50] – LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62p.
- [51] – GUICHON, G.; GUILLEMIN, C. L. **Quantitative gas chromatography for laboratory analyses and on-line process control**. New York: Elsevier, 1988. p.653-655.
- [52] – ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography-mass spectrometry**. Illinois: Allured Publishing, 1995. 469 p.

[53] – BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D. H. **Structure elucidation of natural products by mass spectrometry**. San Francisco: Holden-Day, 1964. v. 2.

[54] – SUKH, D.; NARULA, A. P.; YADAV, J. S. **CRC handbook of terpenoids**. Florida: CRC, 1982. v. 1.

[55] - SUKH, D.; NARULA, A. P.; YADAV, J. S. **CRC handbook of terpenoids**. Florida: CRC, 1982. v. 2.

[56] – SWIGAR, A. A.; SILVERSTEIN, R. M. **Monoterpenes: Infrared, Mass, ¹H NMR, and ¹³C NMR Spectra, and Kováts Indices**. Winsconsin: Aldrich Chemical Company, 1981. 130 p.o