

ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia speciosa* Camb.
(Myrtaceae)



Eugenia speciosa Camb.

LUCIANA VIGNÓLIO ALVES

1998

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Eugenia speciosa* Camb. (Myrtaceae)

LUCIANA VIGNÓLIO ALVES

SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA:

DRA. LEILA VILELA ALEGRIO (DEQUIM - UFRRJ)

Co-Orientação do Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (EMBRAPA-CTAA)

e Dra. Rosane Nora Castro (DEQUIM-UFRRJ).

Tese submetida como
requisito parcial para a
obtenção do grau de
Magister Scientiae em
Química Orgânica.

SEROPÉDICA-RJ

JUNHO DE 1998

TÍTULO DA TESE

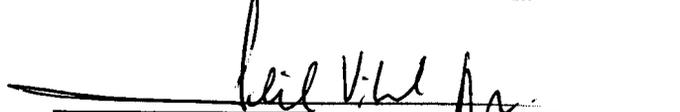
**ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Eugenia speciosa* Camb. (Myrtaceae)**

AUTORA

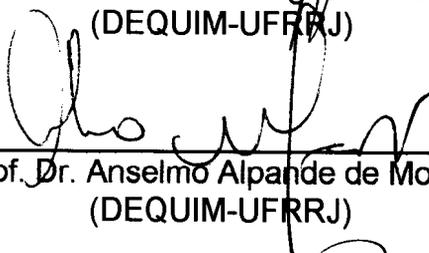
LUCIANA VIGNÓLIO ALVES

APROVADA EM: 18 / 06 / 1998

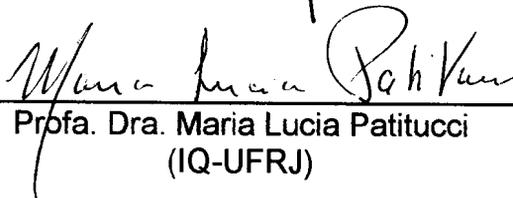
Banca Examinadora:



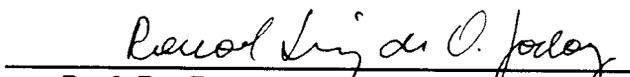
Profa. Dra. Leila Vilela Alegrino – Presidente
(DEQUIM-UFRJ)



Prof. Dr. Anselmo Alpande de Moraes
(DEQUIM-UFRJ)



Profa. Dra. Maria Lucia Patitucci
(IQ-UFRJ)



Prof. Dr. Ronoel L. de Oliveira Godoy
(EMBRAPA-CTAA)

Dedico este trabalho aos meus pais Carlos José e Terezinha, pelo amor, incentivo e apoio. Ao meu namorado Maurício, grande amigo de todas as horas. E aos amigos e parentes que entenderam os momentos de ausência exigidos pelo trabalho.

*Quem vive para altos ideais
deve esquecer-se de si próprio.*

Feurbach

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dra. Leila Vilela Alegrio pela amizade, apoio, profissionalismo, e excelente orientação, mesmo nos momentos mais difíceis de sua vida,

Ao Ronoel Luiz de Oliveira Godoy e Rosane Nora Castro, por terem se revelado excelentes co-orientadores e bons amigos.

À prof^a. Dra. Aurea Echevarria Aznar, por ser uma coordenadora maravilhosa e uma grande amiga.

Aos membros da Banca Examinadora, pela aceitação do convite para o julgamento deste trabalho.

À todos do corpo docente do CPGQO.

Aos meus queridos colegas de curso, especialmente da turma de 1996 Andréia, João e Roberto pelo companheirismo e amizade.

À todos os funcionários do PQ, em especial ao Rubens, Osmar, Reginaldo, Fábio, Eli, Carlão, Rui, Celinho, por toda a ajuda no decorrer do curso e pela amizade.

À Central Analítica do NPPN-UFRJ, especialmente à funcionária Cris pelas análises de CGAR-EM.

Ao prof. Dr. Gerson Luiz Coelho (IT-UFRRJ) pela análise por CGAR.

À EMBRAPA/CTAA/ATOL pelo suporte técnico.

Às queridas amigas: Áurea Tatagiba, Denise, Frances, Daniela e Kátia pelo carinho, amizade, sinceridade e força.

À Capes, pela bolsa concedida.

ÍNDICE	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xiv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
ABREVIATURAS	xix
1. INTRODUÇÃO	02
1.1. Componentes Químicos presentes em óleos essenciais.	04
1.2. Funções dos óleos essenciais e alguns de seus constituintes.	11
1.3. Alguns óleos essenciais produzidos no Brasil.	20
1.4. A família Myrtaceae e os óleos essenciais das espécies do gênero <i>Eugenia</i> .	32
1.5. Características botânicas da espécie <i>Eugenia</i> <i>speciosa</i> Camb.	36
1.6. Identificação dos constituintes de óleos essenciais	39
2. OBJETIVOS	45

3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Identificação do espécimen e local da coleta	47
3.2. Análise cromatográfica do óleo essencial	48
3.3. Análise do óleo essencial por CGAR-EM	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1. Análise do óleo essencial por CGAR e CGAR-EM	53
4.2. Análise dos espectros de massas dos principais íons de fragmentações de massas dos componentes identificados no óleo essencial de <i>E. speciosa</i> Camb.	65
5. BIOSÍNTESE PARA OS MONOTERPENOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. speciosa</i> CAMB.	94
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1: Linalol, monoterpênos majoritário do óleo de pau-rosa	04
Figura 2: Isopreno, unidade precursora dos terpenóides	05
Figura 3: Origem dos fenilpropanóides	09
Figura 4: Compostos com estrutura benzenóide encontrados em alguns óleos essenciais.	10
Figura 5: Indol e antranilato de metila presentes em alguns óleos essenciais florais.	10
Figura 6: Fitoalexinas do olmo.	12
Figura 7: Substâncias alelopáticas de <i>E. citriodora</i> .	12
Figura 8: Terpenos bioativos isolados de algas pardas.	13
Figura 9: Feromônios de <i>Fagraea berteriana</i> .	14
Figura 10: Alguns terpenóides bioativos.	17
Figura 11: Citral, mistura dos isômeros neral e geranial	24
Figura 12: Compostos importantes obtidos de <i>E. uniflora</i> L..	33
Figura 13: Sesquiterpenos tricíclicos presentes em algumas espécies do gênero <i>Eugenia</i> .	34
Figura 14: Sesquiterpenos de <i>E. ovalifolia</i> Camb., <i>E. nítida</i> Camb. e <i>E. banderensis</i> Urb.	35

Figura 15: Monoterpenos relatados na literatura para espécies do gênero <i>Eugenia</i>	36
Figura 16: Fórmula para o cálculo do índice de retenção de Kováts.	42
Figura 17: Cromatograma do óleo essencial de <i>E. speciosa</i> Camb. em coluna pouco polar SE-54.	54
Figura 18: Cromatograma do óleo essencial de <i>E. speciosa</i> Camb. em coluna polar INNOWax	55
Figura 19 : Cromatograma de íons totais (CIT)	56
Figura 20: Estruturas dos principais constituintes identificados no óleo essencial de <i>E. speciosa</i> Camb.	62
Figura 21: Espectro de massas do α -tujeno.	76
Figura 22: Espectro de massas do α -pineno.	77
Figura 23: Espectro de massas do sabineno.	78
Figura 24: Espectro de massas do β -pineno	79
Figura 25: Espectro de massas do mirceno.	80
Figura 26: Espectro de massas do α -felandreno.	81
Figura 27: Espectro de massas do α -terpineno.	82
Figura 28: Espectro de massas do <i>p</i> -cimeno	83
Figura 29: Espectro de massas do β -felandreno	84
Figura 30: Espectro de massas do limoneno	85

Figura 31: Espectro de massas do γ -terpineno	86
Figura 32: Espectro de massas do terpinoleno	87
Figura 33: Espectro de massas do linalol	88
Figura 34: Espectro de massas do <i>trans-p</i> -menta-2-en-1-ol	89
Figura 35: Espectro de massas do <i>cis-p</i> -menta-2-en-1-ol	90
Figura 36: Espectro de massas do terpin-4-ol	91
Figura 37: Espectro de massas do α -terpineol	92

ÍNDICE DE TABELAS	PÁGINA
Tabela 1: Tipos de esqueletos carbônicos encontrados para monoterpenos hidrocarbonetos.	06
Tabela 2: Tipos de esqueletos carbônicos encontrados para sesquiterpenos hidrocarbonetos.	06
Tabela 3: Esqueletos carbônicos encontrados para monoterpenos oxigenados.	07
Tabela 4: Esqueletos carbônicos encontrados para sesquiterpenos oxigenados.	08
Tabela 5 : Conteúdo máximo permitido em alimentos para determinados saborizantes/aromatizantes/aroma naturais.	16
Tabela 6: Espécies do gênero <i>Eugenia</i> que apresentam monoterpenos.	35
Tabela 7: Classificação sistemática da espécie <i>E. speciosa</i> Camb.	38
Tabela 8: Resumos dos dados experimentais obtidos de <i>E. speciosa</i> Camb.	48
Tabela 9: Valores dos IK para coluna de fase 100% polietilenoglicol (polar)	59
Tabela 10: Composição do Óleo essencial de <i>E. speciosa</i>	60

Tabela 11: Tempo de retenção dos constituintes do óleo essencial obtidos no CIT	61
Tabela 12: Monoterpenos comuns às espécies <i>E. speciosa</i> Camb., <i>E. javanica</i> Lamk. e <i>E. brasiliensis</i> Lam.	64
Tabela 13: Principais íons encontrados nos monoterpenos.	66
Tabela 14: Comparação entre os principais íons de fragmentações do α - e β -felandreno e do limoneno em relação as suas abundâncias relativas.	67
Tabela 15: Comparação entre os principais íons de fragmentações do γ -terpineno, terpinoleno, α -tujeno e sabineno em relação às suas abundâncias relativas	71
Tabela 16: Principais íons de fragmentações freqüentemente observados nos espectros de massas dos monoterpenos.	75

ÍNDICE DE ESQUEMAS	PÁGINA
Esquema 1: Aproveitamento sintético do limoneno na obtenção de estruturas eudesmânicas.	19
Esquema 2: Exemplos de reações não-radicalares que ocorrem no limoneno.	20
Esquema 3: Principais derivados do eugenol.	22
Esquema 4: Utilização da vanilina em sínteses.	23
Esquema 5: Produtos de condensação do citral com cetonas de interesse para a indústria.	25
Esquema 6: Produtos da reação do citral com álcoois.	26
Esquema 7: Derivados do citral importantes nas indústrias de fragrâncias.	27
Esquema 8: Alguns produtos derivados do citronelal.	28
Esquema 9: Obtenção do mentol sintético processo Haarmann & Reimer.	29
Esquema 10: Obtenção do mentol sintético a partir da l - piperitona.	29
Esquema 11: Isômeros do mentol obtidos à partir do citronelal.	30
Esquema 12: Produtos derivados da mistura l-mentol e (+)-neomentol.	31
Esquema 13: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do α -tujeno	76
Esquema 14: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do α -pineno.	77
Esquema 15: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do sabineno.	78

Esquema 16: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do β -pineno.	79
Esquema 17: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do mirceno.	80
Esquema 18: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do α -felandreno.	81
Esquema 19: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do α -terpineno.	82
Esquema 20: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do <i>p</i> -cimeno.	83
Esquema 21: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do β -felandreno.	84
Esquema 22: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do limoneno.	85
Esquema 23: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do γ -terpineno.	86
Esquema 24: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do terpinoleno.	87
Esquema 25: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do linalol.	88
Esquema 26: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do trans- <i>p</i> -menta-2-en-1-ol.	89
Esquema 27: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do cis- <i>p</i> -menta-2-em-1-ol.	90
Esquema 28: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do terpin-4-ol.	91
Esquema 29: Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do α -terpineol.	92
Esquema 30 : Biossíntese do MVA, IPP e DMAPP.	95

Esquema 31: Precursores e intermediários na biossíntese de monoterpenos.	96
Esquema 32: Modelos conformacionais do GPP que conduzem à formação de alguns monoterpenos hidrocarbonetos enantioméricos.	98
Esquema 33: Formação de estruturas da família dos pinanos e dos felandranos através de seus intermediários comuns e suas respectivas isomerases.	100
Esquema 34: Formação estruturas da família dos tujanos, sabinanos e dos mentanos γ - e α -terpinenos através de ação enzimática.	101
Esquema 35: Formação do α -terpinil pela solvólise de ésteres do 3R-LPP.	102
Esquema 36: Conversão enzimática do γ -terpineno a <i>p</i> -cimeno	103
Esquema 37: Produção de limoneno por atuação da limoneno síntase sobre o GPP.	104
Esquema 38: Rotas biossintéticas dos monoterpenos identificados em <i>E. speciosa</i> Camb.	105

RESUMO

A espécie *Eugenia speciosa* Camb. pertence ao gênero *Eugenia*, família Myrtaceae e é conhecida popularmente como laranjinha-do-mato ou araçazeiro. O óleo essencial das suas folhas foi extraído por hidrodestilação e analisado por CGAR e CGAR-EM, revelando uma composição química com predominância de compostos monoterpênicos. Foram identificados 28 componentes (96% da constituição química relativa do óleo essencial) por comparação de seus espectros de massas com os da literatura e com as bibliotecas de espectros de massas Willey e NIST e por seus índices de retenção calculados numa coluna capilar de sílica fundida com baixa polaridade e fase estacionária 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (SE-54). Os componentes majoritários do óleo essencial foram os monoterpenos: limoneno (33.7%), α -terpineol (18.9%), α -pineno (5.8%), terpin-4-ol (5.0%) e terpinoleno (4.5%).

Os índices de retenção calculados para determinadas substâncias usando-se coluna polar de fase estacionária 100% polietilenoglicol não foram conclusivos, pois existe grande diferença dos valores destes índices descritos na literatura. Esta discordância pode ser atribuída ao uso de diferentes equações para o cálculo dos índices de retenção, pelo tipo de fase estacionária de fabricantes diferentes e também pela programação de temperatura utilizada.

Propostas para os principais íons de fragmentação de massas e rotas biossintéticas são sugeridas para os compostos identificados neste trabalho.

ABSTRACT

The specie *Eugenia speciosa* Camb., belongs to genus *Eugenia*, Myrtaceae family, is popularly known as "laranjinha do mato" or "araçazeiro". The essential oil from its leaves, obtained by hydrodistillation, was analysed by HRGC and HRGC-MS and revealed a predominance monoterpenoid compounds in its chemical composition. Twenty eight compounds were identified (96% of our relative chemical composition) by comparison of their mass spectra with the ones in the literature and Wiley and NIST mass spectra library and by their Retention Indexes in a low-polarity fused silica capillary column, 5% diphenyl and 95% dimethylpolisiloxane stationary phase (SE-54). The monoterpenes limonene (33.7%), α -terpineol (18.9%), α -pinene (5.8%), terpinen-4-ol (5.0%) and terpinolene (4.5%) are the majors ones.

The retention indexes calculated for any substances in polar column, 100% poliethyleneglicol stationary phase were not conclusive because there is a great difference among the values of these indexes for a same substance in the literature. This discrepancy can be explained by the use of different equations to calculate these retention indexes, by the type of stationary phase of fabricate different and by temperature programming.

Mass fragmentation proposals for the principais íons and biosynthetic routes are suggested to the identified compounds in this work.

ABREVIATURAS

- IV: Infravermelho
- UV: Ultra Violeta
- RMN de ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
- RMN de ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
- EM: Espectrometria de Massas
- CGAR: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
- CGAR-EM: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massas
- IK: Índice de Retenção de Kováts
- CIT: Cromatograma de Íons Totais
- t'_R : Tempo de Retenção
- NIST: National Institute of Standard Technology
- m/z: Relação massa/carga
- M^+ : Pico do íon molecular
- HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
- HMGS: 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintase
- MVA: Ácido Mevalônico
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- ATP: Adenina Trifosfato
- IPP: Isopentenil Pirofosfato
- DMAPP: Dimetil Alil Pirofosfato
- GPP: Geranyl Pirofosfato
- NPP: Nerolidil Pirofosfato
- LPP: Linalil Pirofosfato
- FPP: Farnesil Pirofosfato
- μm : microns
- eV: Elétrons-volts

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

No passado, produtos naturais eram trabalhosamente isolados por meio da obtenção de derivados e suas estruturas eram estabelecidas através de reações de degradação. O aparecimento de técnicas modernas como IV., UV., E.M., RMN. de ^1H e ^{13}C contribuíram para simplificar e agilizar as análises estruturais.

O crescente desenvolvimento da cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e da cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM) foi fundamental principalmente para identificar e quantificar constituintes químicos de óleos essenciais sem a necessidade do isolamento, preparação de derivados ou síntese.

O estudo dos óleos essenciais têm despertado o interesse de muitos pesquisadores que buscam, dentre outras coisas, descobrir novos aromas, sabores naturais, fármacos e conservantes que podem estar presente nestes produtos naturais, o que demonstra não só sua importância científica, como também industrial, pois serve de matéria-prima na fabricação de perfumes, cosméticos, alimentos e preparações farmacêuticas¹.

Constam na literatura várias definições para os óleos essenciais²⁻⁶, por exemplo, a do Ministério da Saúde os define como "produtos voláteis de origem vegetal obtidos por um processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado)".

A constituição química dos óleos essenciais é complexa, em alguns casos chegam a conter mais de uma centena de componentes, distribuído em quantidades variáveis. Óleos essenciais podem ser extraídos por várias técnicas, como: hidrodestilação, extração utilizando gordura, fluido supercrítico, por microondas e por expressão ("cold pressed")⁷.

Nas plantas, os óleos essenciais localizam-se em órgãos especializados de excreção, que podem ser visualizados por uma lente, tais como estruturas celulares (organelas ou células especializadas), compartimentos ou canais esquizógenos (originados por desdobramento ou separação de tecido celular) e pêlos glandulares, podendo ainda ser depositados no cerne das árvores³. Nas frutas cítricas, o óleo essencial localiza-se em pequenas bolsas no flavedo, que é uma parte compreendida entre a camada epidérmica, e o albedo (parte branca constituída por células parenquimatosas)⁸, o óleo pode ser obtido pela compressão mecânica da casca.

Pode-se considerar que os constituintes sintetizados pela planta durante o seu desenvolvimento natural e conseqüentemente, a composição química qualitativa do óleo essencial é geralmente característica de uma dada espécie. A proporção dos constituintes químicos de um dado óleo essencial pode ser considerada permanente, dentro dos limites previsíveis, desde que a qualidade do óleo possa ser expressa em função de um ou mais componentes específicos, como por exemplo: o linalol (1) no óleo de *Aniba rosaeodora* Ducke (pau-rosa).

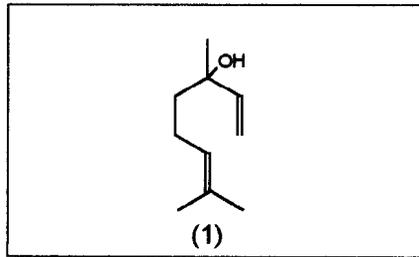


Figura 1 – Linalol, monoterpene majoritário no óleo de pau-rosa.

1.1- COMPONENTES QUÍMICOS PRESENTES EM ÓLEOS ESSENCIAIS

Os componentes químicos de óleos essenciais podem ser classificados como: terpenos hidrocarbonetos, terpenos oxigenados, fenilpropanóides e compostos contendo nitrogênio e/ou enxofre.

A natureza química dos inúmeros componentes de óleos essenciais é relativamente limitada, porém os rearranjos que podem assumir os esqueletos carbônicos e as posições variáveis de determinados grupamentos, proporciona uma grande variedade de substâncias odoríferas diferentes².

- TERPENOS

A estrutura química dos terpenos foi estabelecida inicialmente por Wallach em 1887, que propôs a "regra do isopreno". Esta considerou que os

terpenos eram produtos da união de duas ou mais unidades de isopreno (C_5H_8), figura 2.

Os monoterpenos hidrocarbonetos contém 10 átomos de carbono os sesquiterpenos hidrocarbonetos apresentam 15 átomos de carbono, etc. Os terpenóides com mais de 15 átomos de carbono, não são geralmente constituintes dos óleos essenciais².

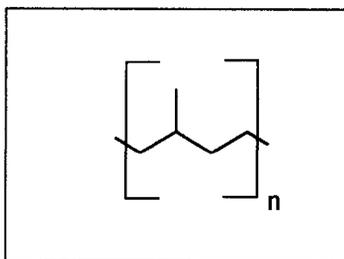


Figura 2 – Isopreno, unidade precursora dos terpenóides.

Em função do esqueleto carbônico, pode-se agrupar os mono- e sesquiterpenos em acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e tricíclicos, tabela 1 e 2, respectivamente.

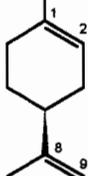
TIPOS DE ESQUELETOS	FONTE	EXEMPLO
Acíclico	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf. (capim-limão)	miraceno (2) 
Monocíclico	Óleos cítricos	limoneno (3) 
Bicíclico	Óleo essencial de <i>Eugenia jambolana</i> Lamk.	α-pineno (4) 

Tabela 1 – Tipos de esqueletos carbônicos encontrados para monoterpênos hidrocarbonetos.

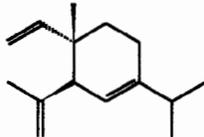
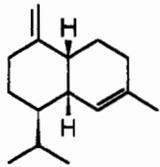
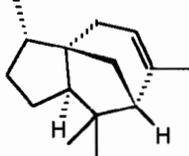
TIPOS DE ESQUELETOS	FONTE	EXEMPLO
Monocíclico	Óleo de <i>E. ovalifolia</i> Camb.	δ-elemeno (5) 
Bicíclico	Óleo de <i>E. nítida</i> Camb.	γ-cadineno (6) 
Tricíclico	Óleo de <i>Juniperus virginiana</i> L... (cedro)	α-cedreno (7) 

Tabela 2 – Tipos de esqueletos carbônicos encontrados para sesquiterpênos hidrocarbonetos.

- TERPENOS OXIGENADOS

Os derivados oxigenados dos terpenos hidrocarbonetos são geralmente ácidos, aldeídos, álcoois, cetonas, ésteres e também óxidos. Estes compostos oxigenados são os maiores contribuintes para os diferentes sabores e odores contidos nos óleos essenciais e formam um grande arsenal de aromatizantes para as indústrias alimentícia, de bebidas, farmacêutica, de cosméticos e para perfumaria².

Alguns exemplos dos tipos de mono- e sesquiterpenos oxigenados encontram nas tabela 3 e tabela 4, respectivamente.

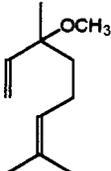
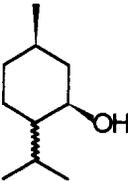
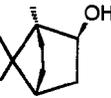
TIPOS DE ESQUELETOS	FONTE	EXEMPLO
Acíclico	Óleo de <i>Citrus auratum</i> var amara	acetato de linalila (8) 
Monocíclico	Óleo de <i>Mentha arvensis</i> Hook (Menta)	mentol (9) 
Bicíclico	Óleo de <i>E. javanica</i> Lamk.	borneol (10) 

Tabela 3 – Esqueletos carbônicos encontrado para monoterpenos oxigenados.

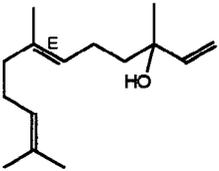
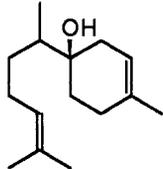
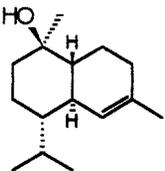
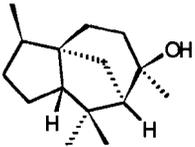
TIPOS DE ESQUELETO	FONTE	EXEMPLO
Acíclico	Óleo de <i>E. tinguyensis</i> Camb.	nerolidol (11) 
Monocíclico	Óleo de <i>E. ovalifolia</i> Camb. (Murta)	β-bisabolol (12) 
Bicíclico	Óleo <i>E. uniflora</i> L. (Pitanga)	α-cadinol (13) 
Tricíclico	Óleo de <i>J. virginiana</i> L.. (Cedro)	cedrol (14) 

Tabela 4 – Esqueletos carbônicos encontrados para sesquiterpenos oxigenados.

- FENILPROPANÓIDES

Estes compostos estão presentes em grande número nos óleos essenciais e apresentam funções oxigenadas variadas, como: fenóis, álcoois, cetonas, aldeídos, éteres, ésteres, ácidos e lactonas.

São originados pela via do ácido chiquímico (15) que conduz à duas unidades básicas: o ácido cinâmico (16) e o ác. *p*-cumárico (17). Estes, por meio de reduções biológicas produzem propenilbenzenos (18) e/ou alilbenzenos

(19) que por oxidações gradativas podem gerar aldeídos aromáticos (20) e as ciclizações podem gerar as cumarinas (21).

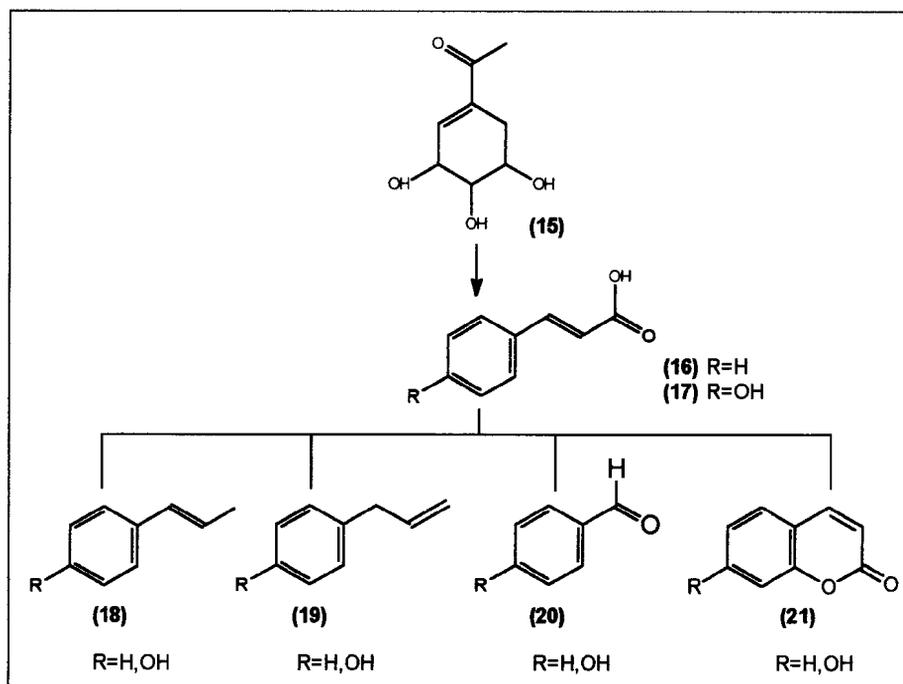


Figura 3 – Origem dos fenilpropanóides.

Alguns exemplos mais conhecidos são: o aldeído cinâmico (22), encontrado no óleo essencial de *Cinnamomum verum* Presl (canela); o anetol (23), um éter importante encontrado no óleo essencial de *Pimpinella anisum* L. (anis); bem como o safrol (24) extraído do óleo essencial de *Ocotea pretiosa* (Ness) Mez (sassafrás) e vários outros², figura 4

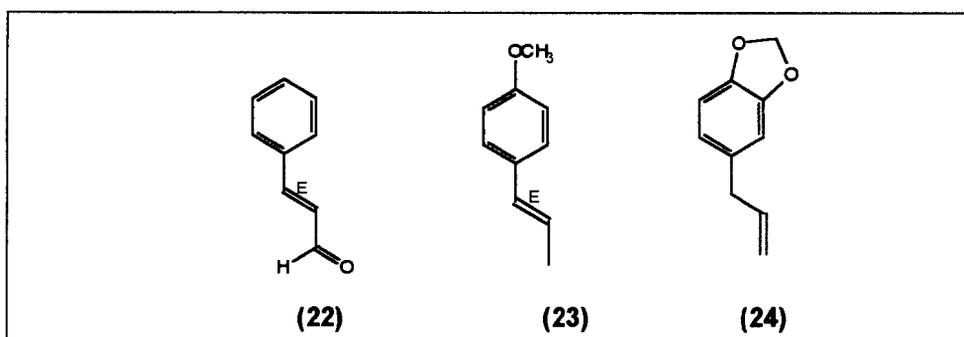


Figura 4 – Compostos com estrutura benzenóide encontrados em alguns óleos essenciais.

- COMPOSTOS CONTENDO NITROGÊNIO E/OU ENXOFRE

Compostos contendo nitrogênio e/ou enxofre não são muito abundantes nos óleos essenciais, porém materiais vegetais que contenham muita matéria albuminóide e fornecem freqüentemente por destilação, substâncias como a amônia, trimetilamina, ácido cianídrico, sulfeto de hidrogênio e sulfeto de dimetila².

Dentre estes compostos pode-se citar o indol (25), encontrado em óleos de *Jasminum officinalis* L. (jasmim) e o antranilato de metila (26), que é encontrado em óleos essenciais florais e cítricos².

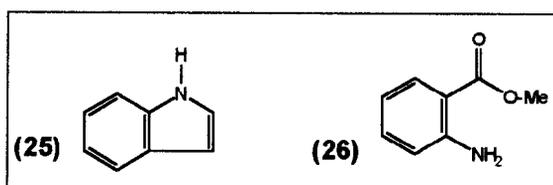


Figura 5 - Indol e antranilato de metila presentes em alguns óleos essenciais florais.

A maioria dos compostos sulfurados que estão presentes nos óleos essenciais encontram-se no material vegetal sob a forma glicosídica e são liberados através da ação enzimática. Como por exemplo, os sulfetos de metila, propila e alila encontrados nos óleos essenciais de *Allium cepa* L. (cebola) e *Allium sativum* L. (alho).

1.2- FUNÇÕES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E ALGUNS DE SEUS CONSTITUINTES

Para a natureza, óleos essenciais funcionam como sinais de comunicação química com o reino vegetal e como armas de defesa química contra o reino animal. Os constituintes dos óleos essenciais estão envolvidos em todos os aspectos de interação planta-microorganismo, planta-planta, e planta-animal^{3,4}.

A ação dos óleos essenciais se relaciona com a volatilidade de seus componentes, por exemplo, feridas abertas por agentes agressores nas folhas da árvore, possibilitam a liberação para o ar de pequenas quantidades de substâncias voláteis. Estas têm dois destinos: plantas⁹ e animais¹⁰. Ao penetrar em outras folhas pelas ceras cuticulares, constituem-se no arsenal químico que induz a intensificação da síntese de defensivos (fenóis, taninos, etc)³, estas substâncias voláteis podem também penetrar em insetos, alterando o seu equilíbrio hormonal, com o propósito de afastá-los ou atraí-los¹¹⁻¹³.

Existem exemplos interessantes de interação planta-microorganismo, um deles é a inoculação de *Ulmus glabra* (olmo) com o fungo *Ceratocystis ulmi* que induz a formação de sesquiterpenos do tipo cadinano¹⁴, figura 6.

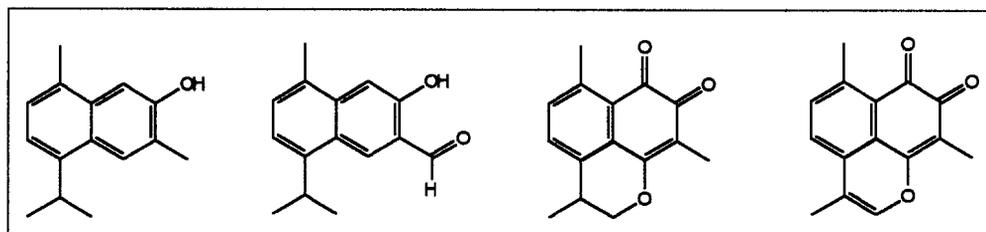


Figura 6 – Fitoalexinas do Olmo.

A interação planta-planta é bem representada pela ação aleloquímica⁹, por exemplo, os *p*-mentano-3,8-dióis de *Eucalyptus citriodora* Hook impedem o crescimento e a germinação de sementes de outras espécies de plantas ao seu redor³, figura 7.

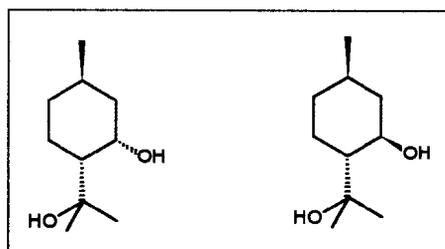


Figura 7 - Substâncias Alelopáticas de *E. citriodora*.

Estudos demonstraram que certos terpenóides oriundos de algas, possuem forte atividade antimicrobiana, antifúngica, ictiotóxicas, antialimentar de insetos e outros atuam ainda como feromônios^{3,15}. Alguns exemplos estão na figura 8.

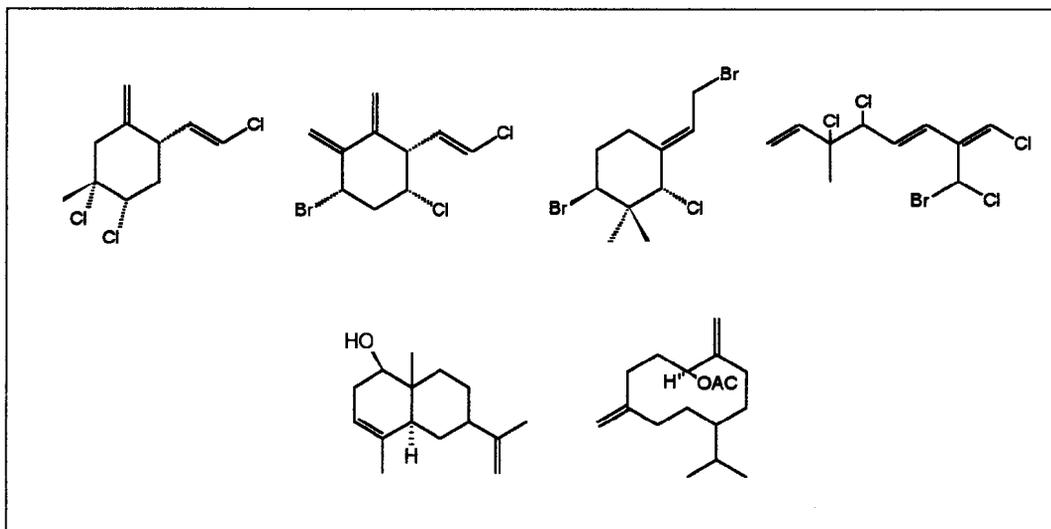


Figura 8 – Terpenos bioativos isolados de algas .

Uma interação planta-animal interessante acontece com a flor de *Fagraea berteriana*, da família Loganiaceae, que produz metil eugenol (27), álcool *trans*-3,4-dimetoxicinamila (28), acetato de *trans*-3,4-dimetoxicinamila (29), *trans*-3,4-dimetoxicinamaldeído (30) e álcool *trans*-coniferílico (31), para atrair machos de *Bactrocera dorsalis* (Tephritidae) à fim de que estes à polinizem enquanto se alimentam com os componentes da flor. Depois os machos convertem os componentes em álcool *trans*-coniferílico, que é armazenado em glândulas retais servindo de feromônio¹³, figura 9.

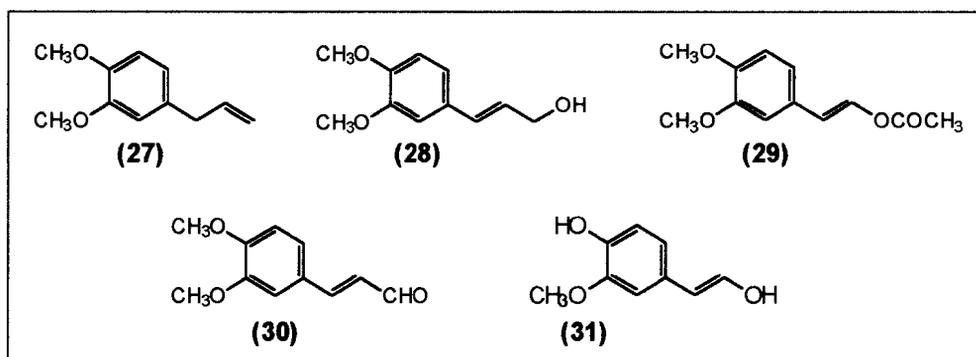


Figura 9 – Feromônios de *Fagraea berteriana* .

Para o homem, os óleos essenciais representam um dos mais importantes grupos de matéria-prima para diversas indústrias, principalmente a de perfumaria, alimentícia e a farmacêutica, além disso seus constituintes são utilizados como material de partida para química fina^{1,4,14,16}. Nos últimos anos, nota-se uma preferência mundial pelo uso de produtos, alimentos, cosméticos e medicamentos naturais. Os óleos essenciais, por exemplo, vêm sendo empregados pela aromaterapia que trata as doenças através da inalação e aplicação externa dos óleos¹⁷.

Na indústria alimentícia, vários aditivos são utilizados para aumentar a validade do produto e inibir ou retardar o crescimento de microorganismos patogênicos. Entretanto o limitado uso destes aditivos, promove o interesse por conservantes alternativos, especialmente de substâncias naturais com propriedade antimicrobiana. Existem estudos que comprovam atividades importantes em alguns óleos essenciais, como a ação inseticida, acaricida e contra crescimento larval, que são altamente relevantes para proteção de colheitas e estocagem de alimentos^{12,18-21}.

Algumas plantas aromáticas e seus respectivos óleos essenciais como por exemplo: *Laurus nobilis* (louro), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Eucalyptos citriodora* Hook (eucalipto), *Thymus zygis* (timo) dentre outras, inibem o crescimento de bactérias, leveduras e mofo, podendo com isso ser utilizadas como conservantes. Em Morocco, estas espécies e seus óleos essenciais são exportados ou empregados em preparações farmacêuticas, cosméticos e como conservantes alimentícios²¹. Muitos outros óleos essenciais estão sendo estudados e suas propriedades antifúngicas, antimicrobianas e até antimalarianas estão sendo constatadas²²⁻²⁷.

Óleos essenciais são classificados pelo Ministério da Saúde através da portaria N° 645 de 16 de dezembro de 1997 como substâncias saborizantes/aromatizantes/aromas naturais e são amplamente empregados nas indústrias de alimentos, bebidas e de remédios⁶. Existem porém, alguns saborizantes/aromatizantes/aromas naturais que contém componentes tóxicos quando empregados em doses elevadas. Um exemplo bastante conhecido é o safrol (pág. 10), principal componente do óleo de sassafrás que está presente também em vários óleos essenciais, como por exemplo o de *Cinnamomum verum* Presl (canela) e em concentrações acima de 5.000 ppm produz tumores hepáticos. O emprego do óleo de sassafrás e do safrol é proibido em alimentos, porém não há nenhuma medida contra os outros óleos que contenham pequenas quantidades de safrol. A cumarina é hepatotóxica e em estudos de

longa duração mostrou-se carcinogênica e a β -asarona é cardiotoxica e hepatotóxica^{6,28}.

Por este motivo, o Conselho da Europa e o JECFA ("Joint FAO/Who Expert Committee on Food Additives") estabeleceram normas para a Ingestão Média Diária (IDA) em mg/kg para a maioria das substâncias saborizantes/aromatizantes naturais, que limitam o conteúdo máximo seus princípios ativos em alimentos^{6,28}, tabela 5.

Substâncias	Produtos alimentares em mg/Kg	Bebidas em mg/Kg	Exceções e/ou restrições especiais
β -asarona	0,1	0,1	→ 1 mg/Kg nas bebidas alcoólicas e nos condimentos destinados a salgadinho
cumarina	2	2	→ 10 mg/Kg para determinados tipos de doces com caramelo → 50 mg/Kg nas gomas de mascar → 10 mg/Kg nas bebidas alcoólicas
pulegona	25	100	→ 250 mg/Kg nas bebidas aromatizadas com menta → 350 mg/Kg em confeitos com menta
safrol e isosafrol	1	1	→ 2 mg/Kg nas bebidas alcoólicas que contenham até 25% em volume → 5 mg/Kg nas bebidas alcoólicas que contenham mais de 25% em volume → 15 mg/Kg nos produtos alimentares que contenham noz-moscada

Tabela 5 – Conteúdo máximo permitido em alimentos para saborizantes/aromatizantes/aromas naturais.

Óleos essenciais despertam também o interesse da indústria farmacêutica. Recentemente, experimentos revelaram propriedades interessantes de alguns óleos e seus componentes, por exemplo: a ação analgésica periférica e anti-inflatória do óleo de *Salvia sclarea* L.²⁹ (Lamiaceae) ; a atividade antioxidante do sesquiterpeno guaiazuleno³⁰ (32) e o uso do l-mentol (33) como veículo de penetração transdérmica para o cloridrato de propanolol³¹, figura 10.

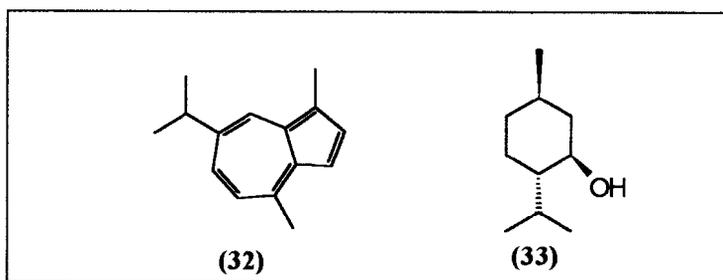


Figura 10 – Alguns terpenóides bioativos.

O monoterpeno hidrocarboneto limoneno (3) (pág. 6) é utilizado como material de partida para várias sínteses orgânicas é empregado na composição de cosméticos, alimentos e remédios. Além disto, é empregado na preparação de essências artificiais do tipo "citrus", como agente dispersante e como solvente industrial¹.

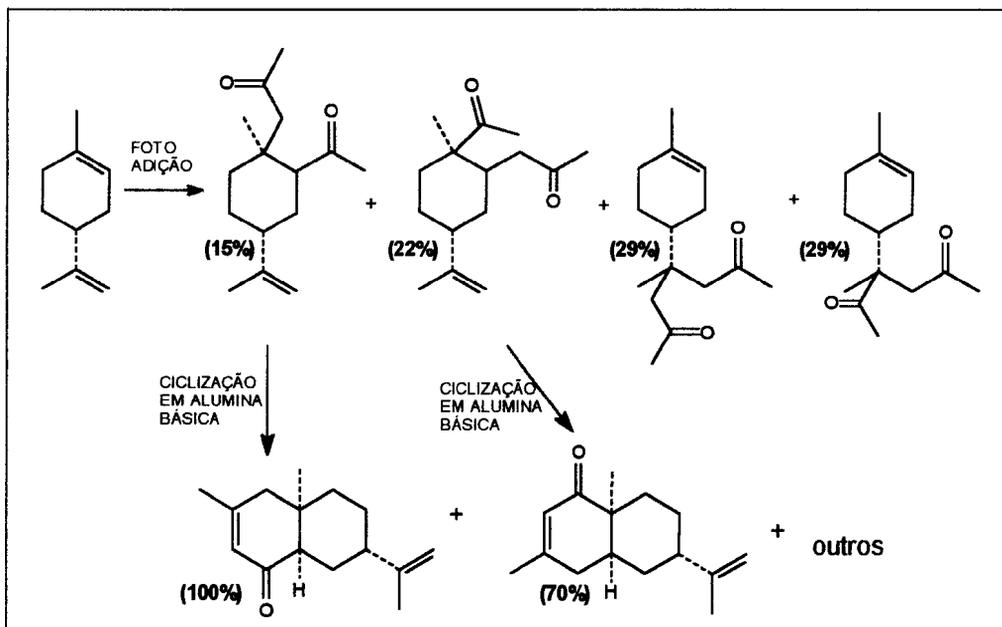
As características que tornam o limoneno tão atraente para o aproveitamento sintético, se devem ao fato deste ser uma das matérias-primas quirais mais baratas e abundantes existentes, sendo portanto adequado para tal

estudo químico³². Além disto, este possui duas duplas ligações quimicamente diferentes, uma endocíclica C1-C2 e outra exocíclica C8-C9.

O (+)-(4R)-limoneno é o enantiômero mais abundante encontrado nos óleos de limão, laranja e outras frutas cítricas. Por outro lado, a forma levógira é encontrada em *Mentha sativa* L. (hortelã-pimenta) e a mistura racêmica está presente no óleo de Terebentina³².

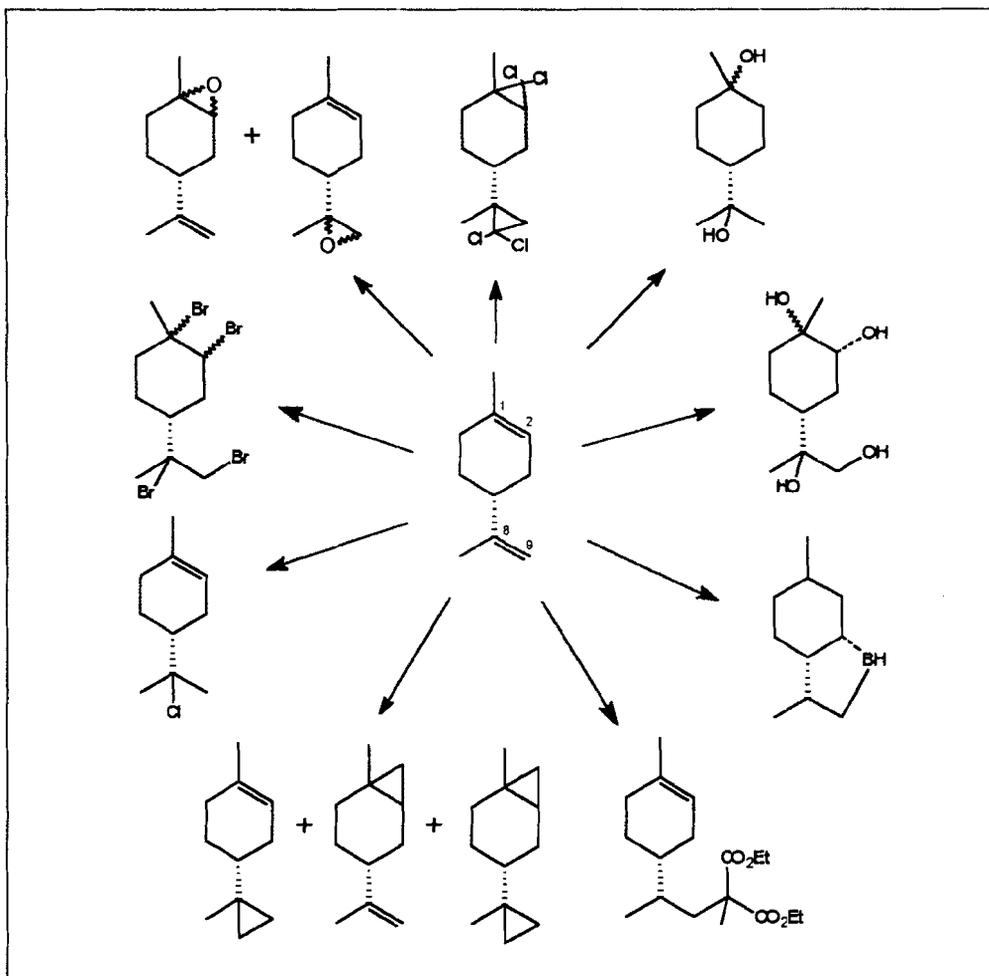
Muitas são as propostas de aproveitamento do limoneno como substrato em sínteses, pode-se citar seu uso na síntese de produtos com esqueletos sesquiterpênicos, pertencentes a família dos eudesmanos. Estes sesquiterpenos são de interesse farmacológico, pois muitos apresentam atividades biológicas e propriedades organolépticas (aroma e sabor)³².

Através da reação de foto-adição de acetilacetona (reação de De Mayo), que ocorre nas duas ligações duplas do limoneno, há produção de uma mistura de isômeros. Observa-se que há predominância de adição à dupla ligação exocíclica C8-C9 do substrato, porém, são os produtos obtidos da adição à dupla endocíclica C1-C2, que favorecem a produção dos esqueletos eudesmânicos que se dá após a ciclização em alumina básica, esquema 1.



Esquema 1 - Aproveitamento sintético do limoneno na obtenção de estruturas eudesmânicas.

Outro exemplo da utilização do limoneno como substrato, são os derivados que podem ser produzidos à partir de reações de adição nas duplas ligações, como hidratação, bromação, epoxidação, entre outras³², esquema 2.



Esquema 2 - Exemplos de reações não radiculares que ocorrem no limoneno.

1.3 - ALGUNS ÓLEOS ESSENCIAIS PRODUZIDOS NO BRASIL

A produção de óleos essenciais, geralmente é muito explorada em regiões pouco desenvolvidas, pois o cultivo é pouco exigente e feito através da agricultura primária e/ou extrativista. Pode-se citar alguns exemplos de países

exportadores de óleos essenciais como: Guatemala, Índia, China, Egito, Indonésia, Sri Lanka, Turquia, Brasil, etc¹⁶.

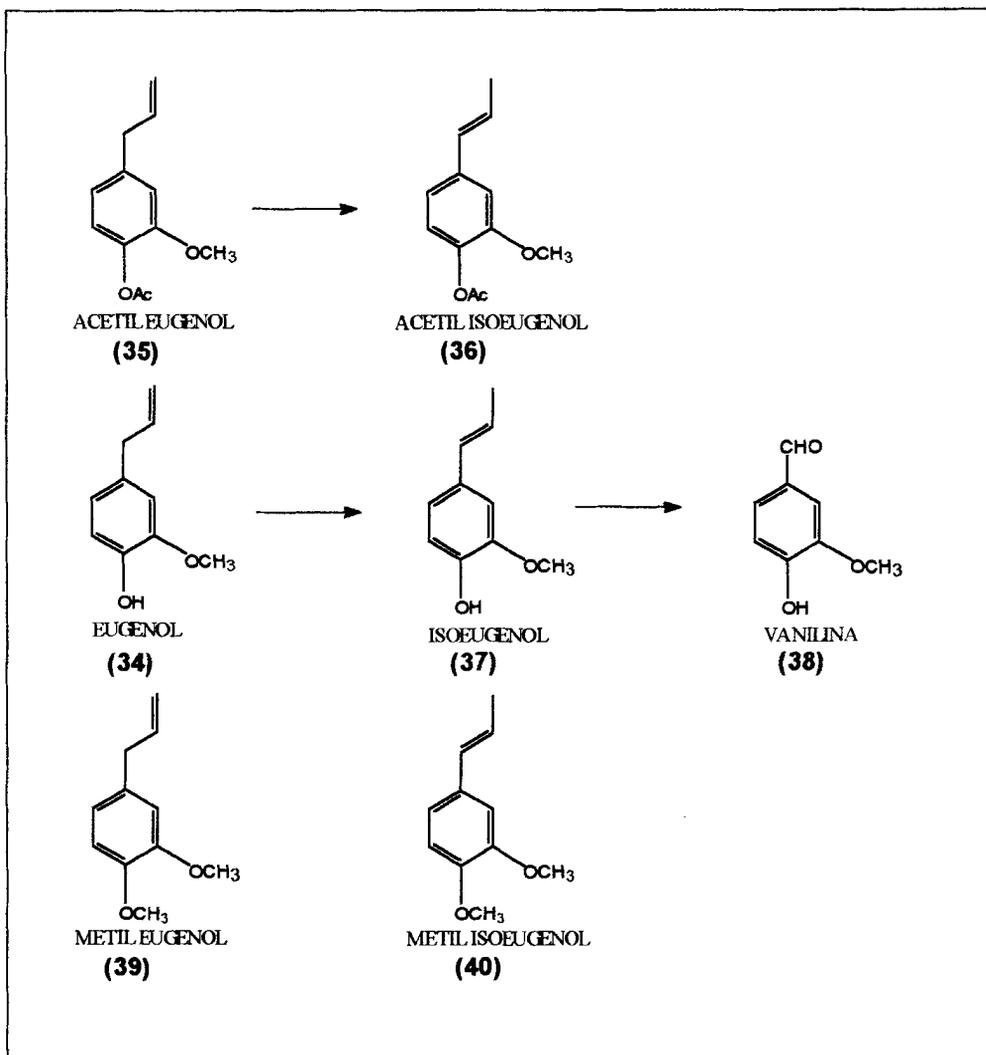
Países mais desenvolvidos importam óleos essenciais como matéria-prima barata e valorizam o produto através purificação, isolamento de constituintes, modificações químicas e sínteses de componentes com alto valor comercial.

Três exemplos de óleos essenciais produzidos no Brasil, cujos constituintes principais e seus derivados despertam interesse industrial são apresentados a seguir:

- Óleo de *Eucalyptos citriodora* Hook.
- Óleo de *Eugenia caryophylla* Thumb. (cravo).
- Óleo de *Cymbopogon citratus* Stapf. (capim-limão).

No Brasil, a maior produção de *Eugenia caryophylla* Thumb. (cravo-da-índia) vêm dos craveiros que estão situados nas regiões de Valença, Taperoá e Ituberá, na Bahia. O botão do cravo contém 17% e o talo 4,5 a 6% de óleo essencial^{15,33}.

O eugenol (34), componente majoritário deste óleo, é largamente utilizado em preparações farmacêuticas (ex. anestésico odontológico)¹, na perfumaria, em cosméticos, serve também como material de partida para fabricação de alguns ésteres e éteres de interesse comercial¹⁶, esquema 3.

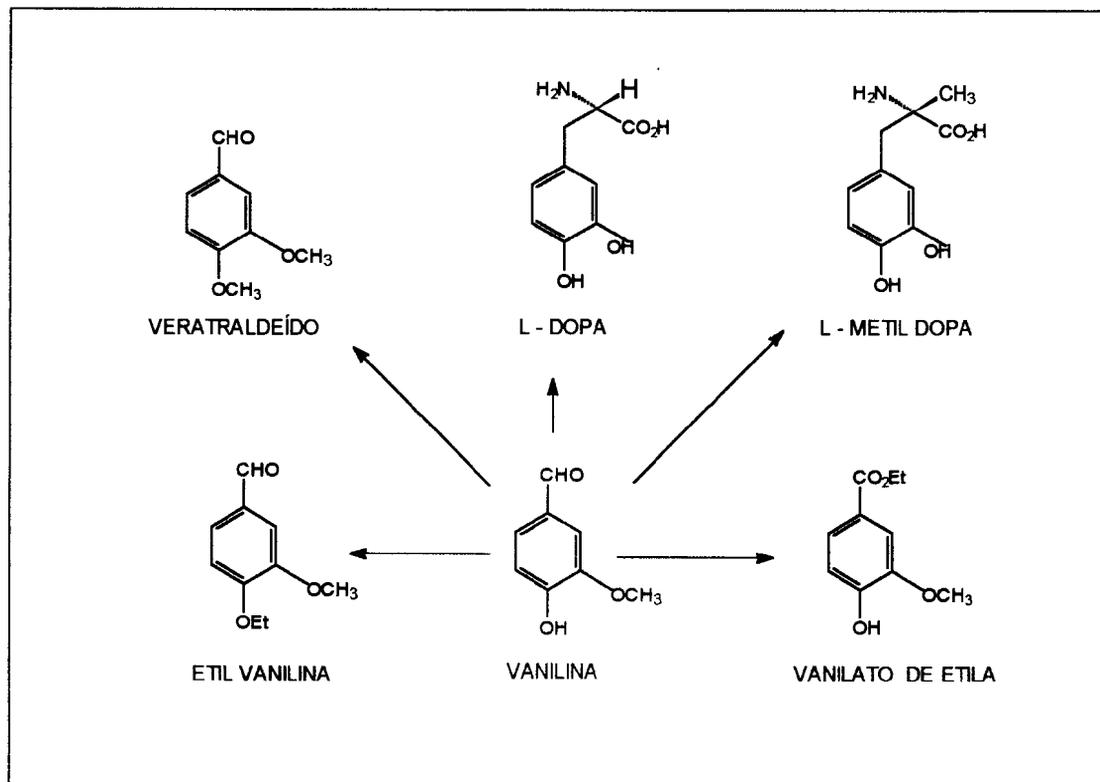


Esquema 3 - Principais derivados do eugenol

Um dos derivados do eugenol de interesse industrial é o metil eugenol (39), largamente utilizado na composição de perfumes do tipo oriental, além disso, existem estudos de atividade desta substância como hipoanalgésico¹.

Entre estes derivados, a vanilina (38) talvez seja um dos mais conhecidos e importantes, pois é usada como aromatizante em vários tipos de preparações

alimentícias e farmacêuticas e está sendo cada vez mais utilizada na síntese de princípios ativos de medicamentos¹⁶, como mostra o esquema 4.



Esquema 4 - Utilização da vanilina em sínteses.

→ O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* Stapf. (capim-limão) produzido principalmente no nordeste, é composto basicamente de citral (41) (figura 11), sendo que o seu teor nas folhas varia de 60 a 80%, determinando o preço do óleo¹⁶⁻³³.

O citral trata-se basicamente de uma mistura dos isômeros geranial (41a) e neral (41b) (figura 11) separáveis por CGAR, é muito utilizado na composição

de aromas sintéticos (tipo limão, lima, laranja, etc.) e também entra na composição de perfumes e cosméticos¹. Além disto, é utilizado como intermediário em sínteses e utilizado como aditivo na fabricação de bebidas não alcoólicas, sorvetes, pudins, doces, gelatinas, goma de mascar, condimentos e conservas¹⁶.

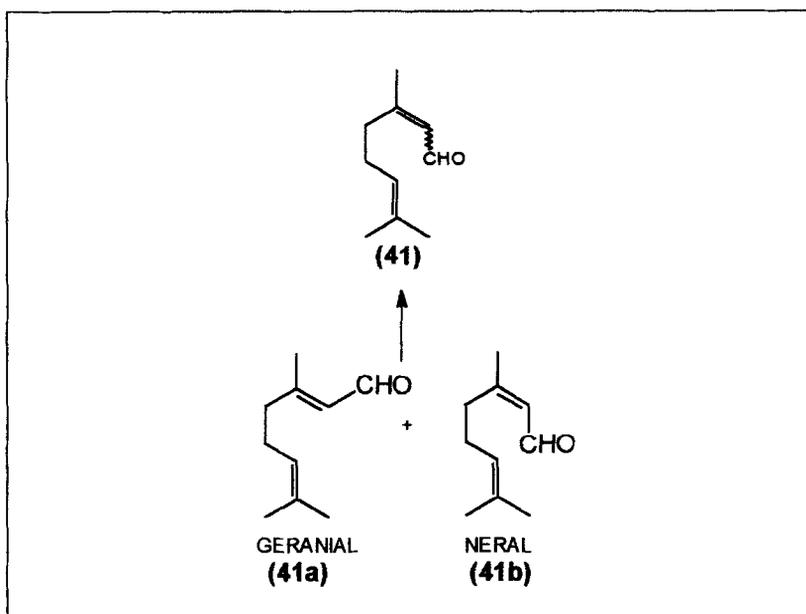
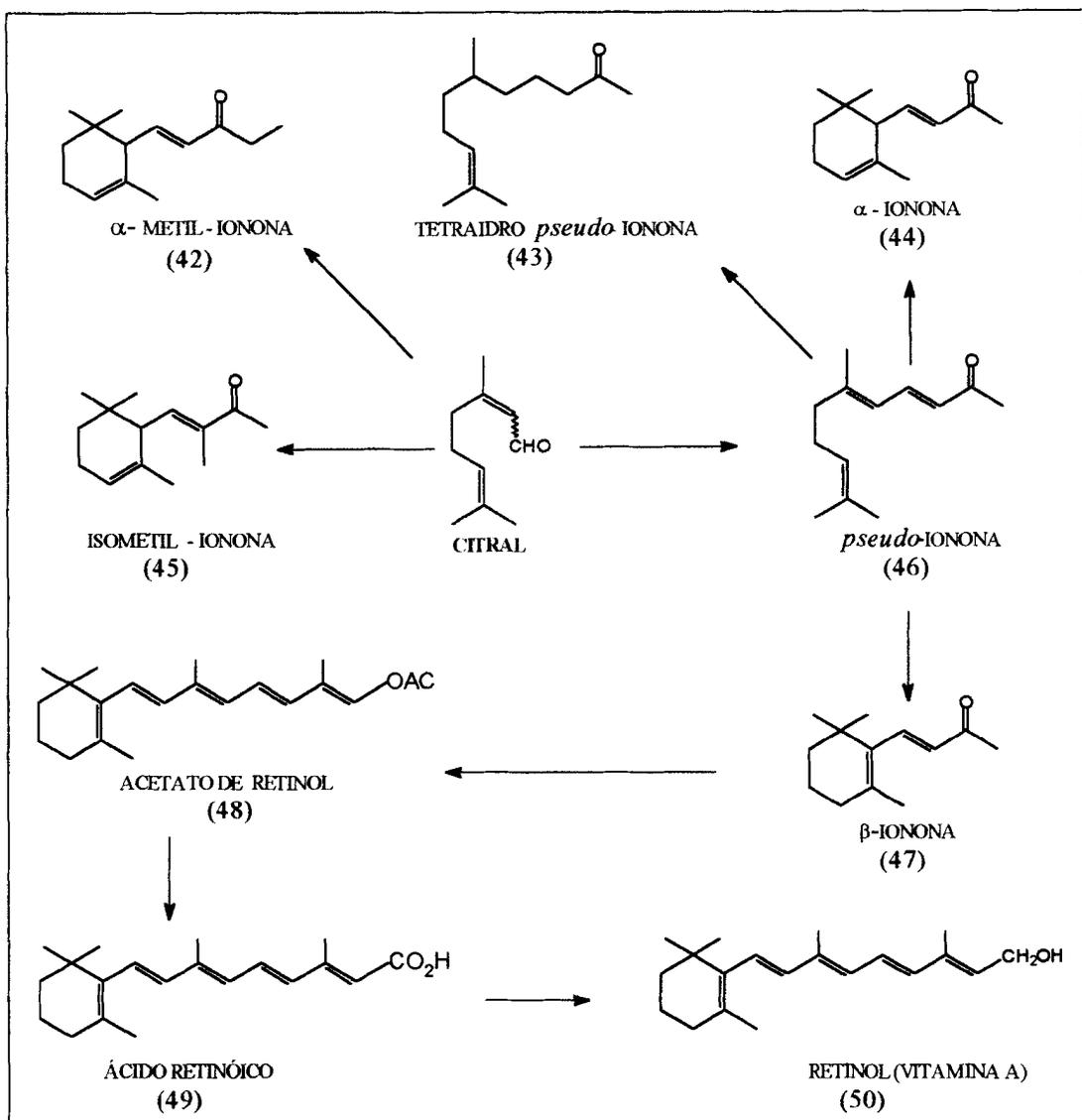


Figura 11 - Citral, mistura dos isômeros neral e geranial

Na reação de condensação do citral com cetonas, os derivados obtidos são comercializados como produtos finos ou como substâncias de partida para outras sínteses, como pode ser observado no esquema 5.

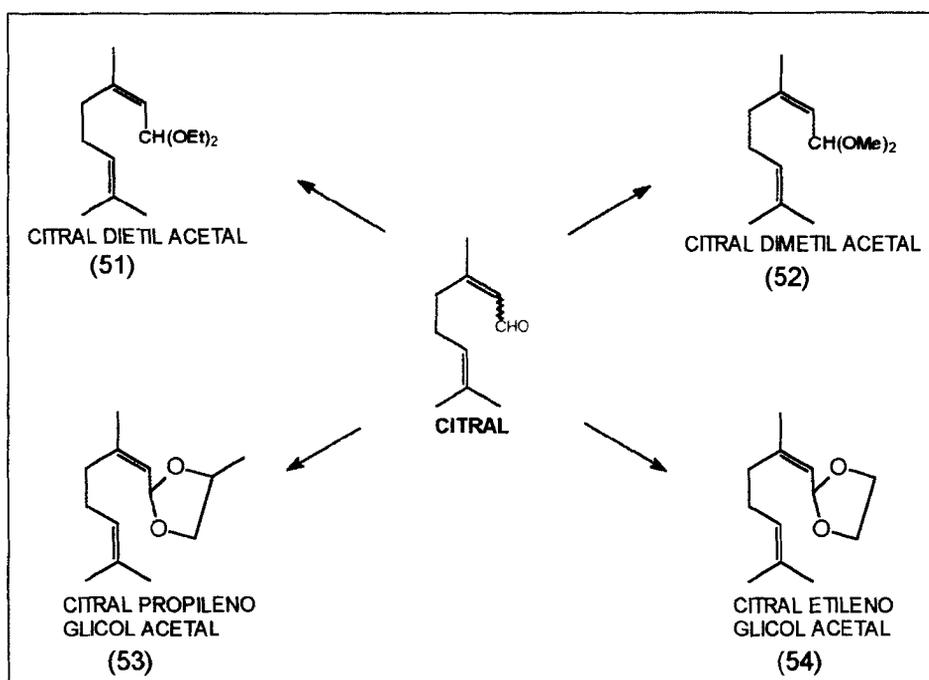


Esquema 5– Produtos de condensação do citral com cetonas de interesse para indústria.

A isometil-ionona (45) e a α-metil-ionona (42), são utilizadas na indústria de alimentos, principalmente em bebidas não alcoólicas, sorvetes, doces, gelatinas, pudins, etc. A pseudo-ionona (46) é utilizada como fragrância e intermediário na síntese das α- e β-iononas (44) e (47). A β-ionona (47) têm maior valor comercial em comparação com os outros derivados do citral, devido

à sua utilização como produto de partida para a síntese do acetato de retinol (48), que é transformado em ácido retinóico (49) e em retinol (50)¹⁶.

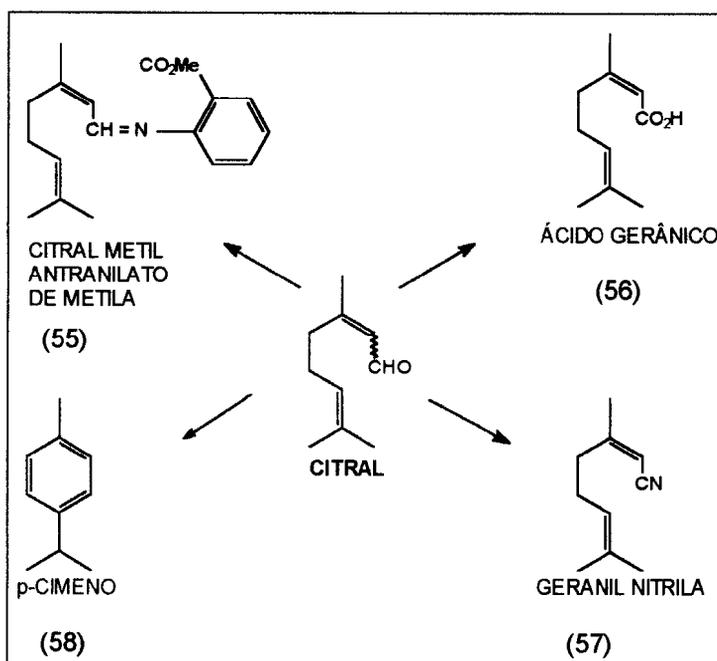
A reação de condensação simples do citral com álcoois e glicóis, produz acetais como: citral dietil acetal (51), citral dimetil acetal (52), citral propileno glicol acetal (53), citral etileno glicol acetal (54), que são utilizados nas indústrias de aromas e alimentos¹⁶, esquema 6.



Esquema 6 – Produtos da reação do citral com álcoois (acetais).

Dentre outros produtos derivados do citral que apresentam interesse industrial, estão o citral metil antranilato de metila (55), ácido gerânico (56), o geranil nitrila (57) e o *p*-cimeno (58). Este último destaca-se dos demais, pois é um intermediário importante na obtenção de "musks" sintéticos e empregado na composição de essências artificiais¹⁶. Além disto, é utilizado para aromatizar

uma série de produtos, devido a sua propriedade de mascarar odores desagradáveis^{1,4}, esquema 7.

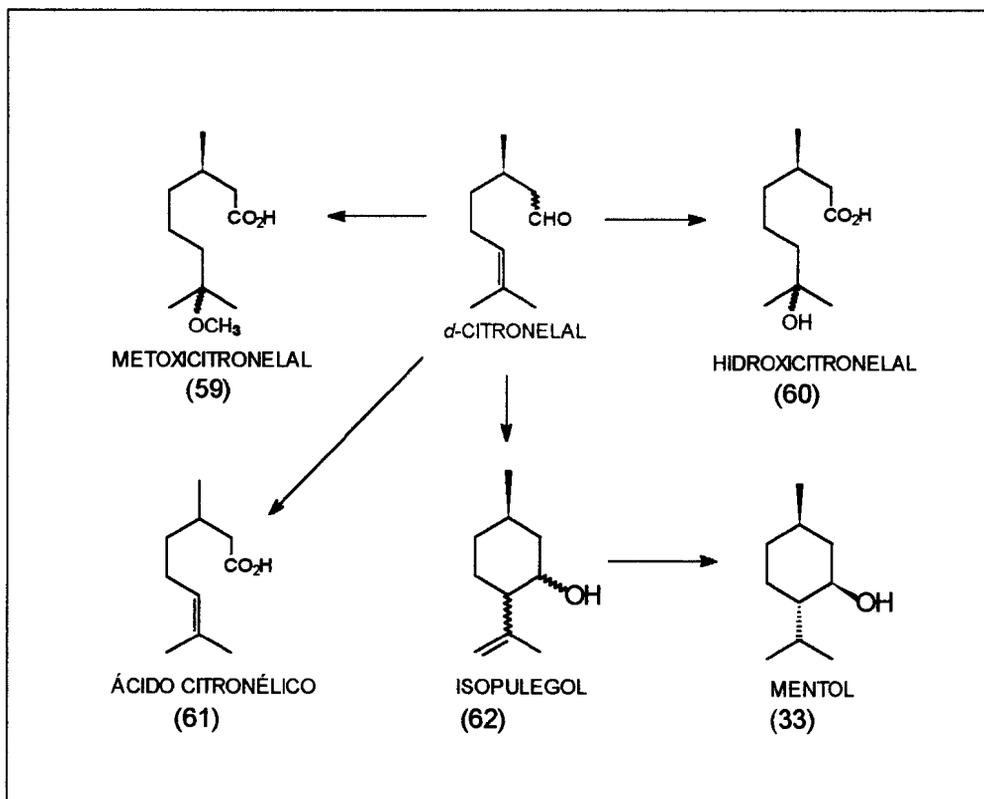


Esquema 7 - Derivados do citral importantes na indústria de fragrâncias.

→ No óleo de *Eucalyptus citriodora* o principal componente é o d-citronelal (59) que ocorre numa proporção entre 65 a 80%. Um alto teor que viabiliza este óleo como fonte de matéria-prima para inúmeras propostas de sínteses. O d-citronelal é industrialmente usado como aromatizante, serve para compor a essência artificial de rosa e apresenta a propriedade repelente contra insetos^{1,4,16}.

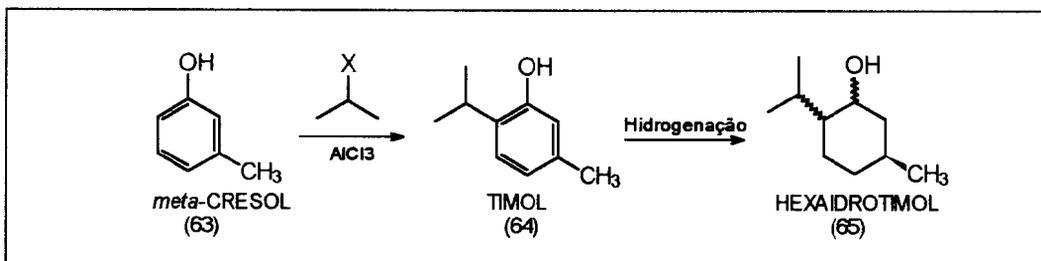
O esquema 8, mostra alguns produtos derivados do d-citronelal, como o metoxicitronelal (60), substância aromatizante que também é empregado como intermediário em sínteses, o hidroxicitronelal (61), ác. citronélico (62) e o l-mentol

(33) que são utilizados na indústria alimentícia. Dos produtos de síntese do citronelal, o l-mentol é depois da vanilina (38) o aromatizante mais usado pelas indústrias de cosméticos e alimentícia, respectivamente¹⁶.



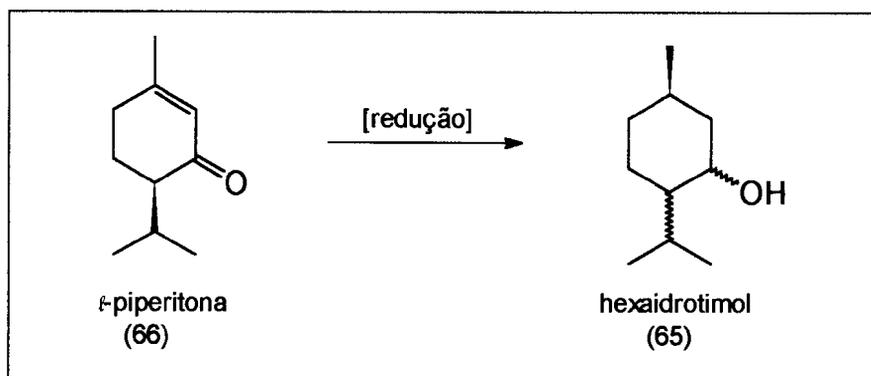
Esquema 8 - Alguns produtos derivados do citronelal de interesse industrial

Atualmente, vários processos para obtenção do mentol sintético têm sido propostos¹⁶. Dentre eles destacam-se o de Haarmann & Reimer, que parte do *meta*-cresol (63) o qual é alquilado a timol (64) e hidrogenado a hexaidrotimol (65), esquema 9. A mistura de mentol racêmico é então separada por destilação fracionada¹⁶.



Esquema 9 – Obtenção do mentol sintético processo Haarmann & Reimer

Outro método de obtenção do mentol é através da reação de redução da *l*-piperitona¹⁶ (66), esquema 10.

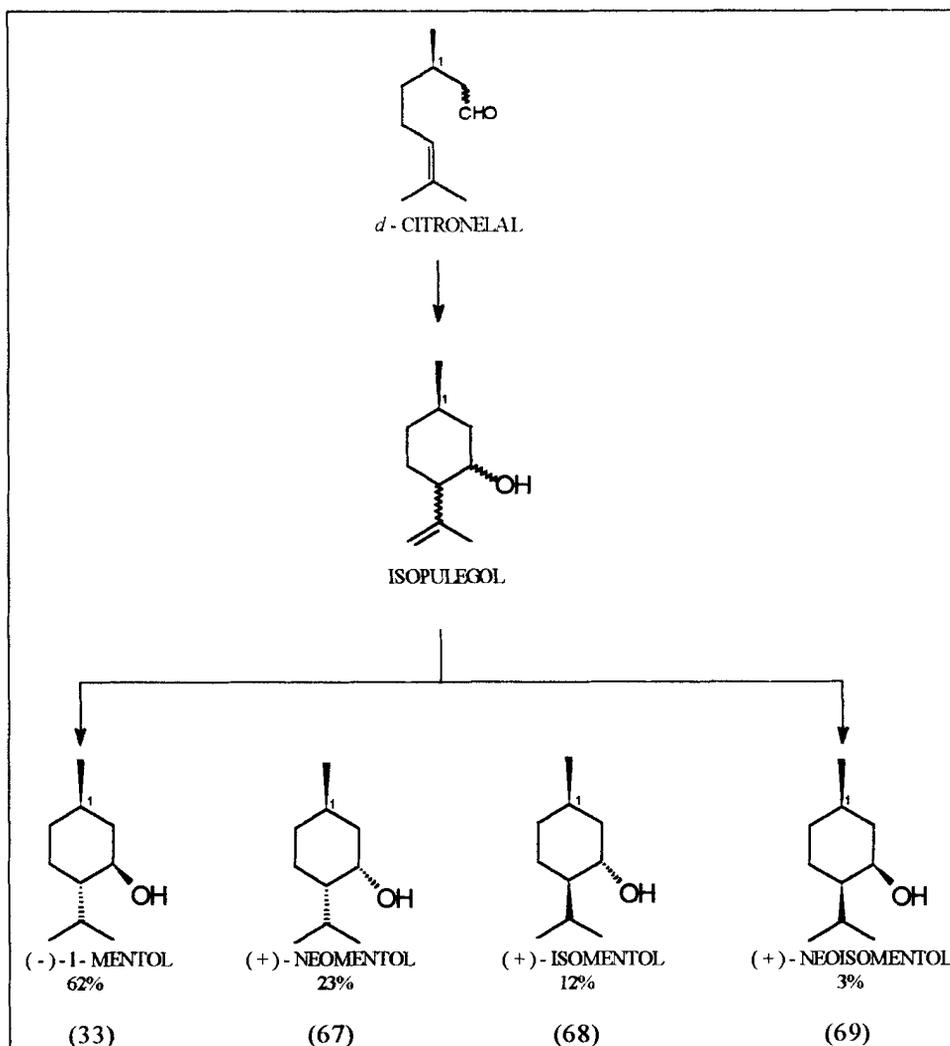


Esquema 10 – Obtenção do mentol sintético a partir da *l*-piperitona.

Embora existam no Brasil plantios de menta, o mentol é sintetizado a partir do *d*-citronelal obtido do óleo de eucalipto, vastamente cultivado em nosso país.

O mentol possui três centros quirais, por conseqüência apresenta oito isômeros óticos. Porém, quando é obtido a partir do *d*-citronelal apenas quatro isômeros são formados devido a manutenção do centro quiral em 1 na ciclização

a isopulegol (62), estes são: (-)-l-mentol (33), (+)-neomentol (67), (+)-isomentol (68) e (+)-neoisomentol¹⁶ (69), representados na esquema 11.



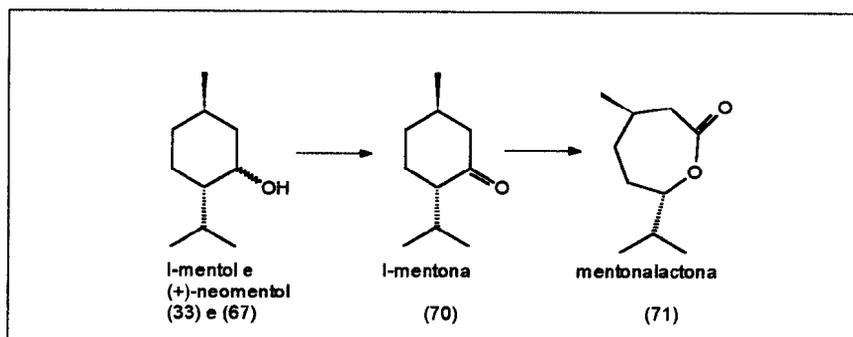
Esquema 11 – Isômeros do mentol obtidos à partir do citroneal.

A mistura racêmica do mentol sintético é de grande interesse industrial, por sua utilização na preparação de produtos para higiene bucal. Sabe-se entretanto, que o isômero l-mentol (33), encontrado no óleo de menta natural, têm maior valor comercial por ser o responsável pelas propriedades

refrescantes, anestésicas e o aroma de menta. Tais propriedades refrescantes do mentol são atribuídas a estereoquímica dos grupos metila, hidroxila e isopropila no anel cicloexânico¹⁶.

Os quatro isômeros do mentol mostrados no esquema 11, são interconversíveis, desta forma, aquecendo-se qualquer um destes isômeros com metóxido de sódio numa temperatura entre 180-200°C, o mentol desejado é formado numa proporção de 62%. Este pode ser separado por destilação fracionada, a resolução da mistura racêmica pode ser obtida após a derivatização a ésteres benzóicos e posterior cristalização.

No esquema 12, pode-se observar que pela oxidação da mistura de l-mentol (33) e (+) - neomentol (67) ocorre a produção da l-mentona (70) e esta pela reação de Bayer-Villiger, produz a mentona lactona (71) ambos produtos são utilizados nas indústrias de alimentos¹⁶.



Esquema 12 – Produtos derivados da mistura l-mentol e (+)-neomentol

1.4- A FAMÍLIA MYRTACEAE E AS ESPÉCIES DE *EUGENIA* ESTUDADAS

A família Myrtaceae possui cerca de 100 gêneros, com aproximadamente 3000 espécies, quase que exclusivamente tropicais. Localizam-se em dois centros de diversificação que são os trópicos da América e a Austrália³⁶.

Aproximadamente 400 espécies pertencentes à esta família são encontrados no Brasil, onde é muito bem representada em todas as regiões, desempenhando portanto, uma função significativa na caracterização da vegetação das restingas brasileiras³⁶.

O gênero *Eugenia* e suas espécies, contribuem com numerosos representantes para o ecossistema do Estado do Rio de Janeiro, sendo um dos gêneros da família Myrtaceae mais abundante da América do Sul^{37,38}.

Uma das espécies de *Eugenia* mais estudadas é a *E. uniflora* L., conhecida popularmente no Brasil como pitangueira, é bem distribuída pelo território nacional e muito utilizada na medicina popular³⁸⁻⁴⁰. Também é encontrada na Austrália e em alguns países da América do Sul e na Nigéria, onde é usada como planta ornamental e medicinal, com atividades carminativas, digestivas e eupépticas³⁹⁻⁴⁰.

O óleo essencial das folhas de *E. uniflora* L., apresenta propriedades farmacológicas importantes como: reguladora da taxa de colesterol no sangue, redutora de níveis de ácido úrico, anti-reumática, antitérmica, antimicrobial e recentemente foi descoberto seu potencial inibidor contra a xantina-oxidase³⁸.

Estudos da composição química do óleo essencial⁴⁰, relatam a predominância de sesquiterpenos oxigenados (>65%), seguida pelos sesquiterpenos hidrocarbonetos (>23%) e um baixo percentual de monoterpenos (4%). Apresenta esqueletos importantes do tipo furânico, por exemplo o furanodieno (72) e os derivados oxigenados tipo selinênicos, como a selinatrienona (73), figura 12.

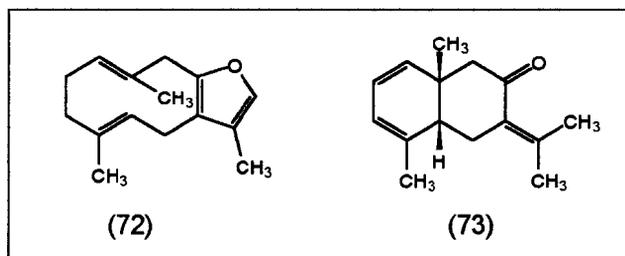


Figura 12 – Compostos importantes obtidos de *E. uniflora* L.

Um estudo relatado na literatura mostra a composição dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eugenia* : *E. schuechiana* Berg. (nome popular : guamirim), *E. plicato-costata* Berg. (nome popular : desconhecido), *E. rostrifolia* Legrand (nome popular : batinga), *E. involucrata* de Candolle (nome popular : cerejeira) e *E. timguyensis* Camb. (nome popular : murta). Todas as espécies apresentam frutos comestíveis e suas folhas são utilizadas pela medicina popular como antidiarreica³⁸.

O grupo de sesquiterpenos hidrocarbonetos e derivados oxigenados com núcleo aromadendrênico tipo viridifloreno (74), α -gurjuneno (75), ledol (76) ou globulol (77) fazem parte da composição do óleo de todas as amostras em diferentes quantidades, figura 13.

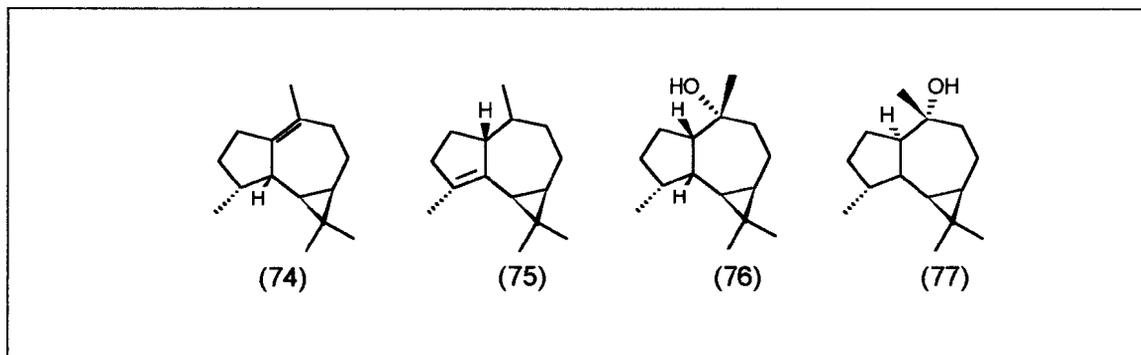


Figura 13 - Sesquiterpenos tricíclicos presentes em algumas espécies do gênero *Eugenia*

Várias outras espécies do gênero *Eugenia* têm a análise de seus óleos essenciais descritos na literatura, como por exemplo:

- *E. puniceifolia* (HBK) DC (nome popular : murta, pedra-hume-caá): o estudo da composição do óleo essencial⁴² mostrou o β -cariofileno (78) como componente majoritário, numa quantidade que variou entre 33 a 24%.
- *E. ovalifolia* Camb. (nome popular : murta, murtinha): este óleo essencial⁴³ apresentou dois componentes majoritários : globulol (77), em 13% e viridiflorol (79) em 11%.
- *E. nítida* Camb. (nome popular : manga-do-brejo) : o estudo⁴⁴ do óleo essencial identificou como componentes majoritários o γ -elemeno (80) e o β -cariofileno (73) com aproximadamente 8% cada.
- *E. banderensis* Urb., apresentou na composição do óleo essencial 45 predominância do sesquiterpeno (23%) de T-muurolol (81), figura 14.

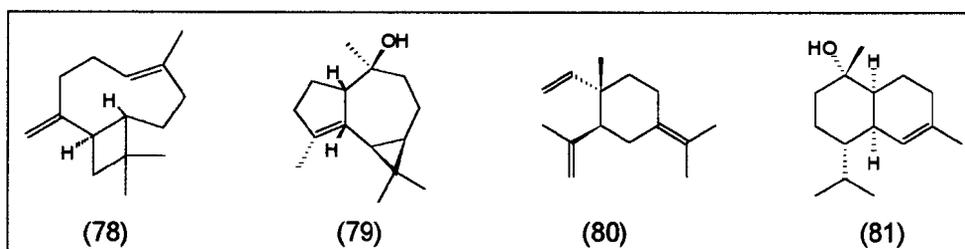


Figura 14- Sesquiterpenos de *E. ovalifolia* Camb., *E. nitida* Camb. e *E. banderensis* Urb.

A tabela 6 mostra espécies do gênero *Eugenia* que apresentam quantidades relevantes de monoterpenos na composição química de seus óleos essenciais⁴⁶⁻⁴⁹ e a figura 15 mostra quais os monoterpenos mais abundantes.

Espécies do gênero <i>Eugenia</i>	Monoterpenos majoritários (%)
<i>E. javanica</i> Lamk.	α -pineno (18.2) γ -terpineno (28.5) p -cimeno (13.7)
<i>E. jambos</i> L. (nome popular : "rose-apple")	α -pineno (25.0) limoneno (25.0)
<i>E. jambolana</i> Lamk. (nome popular : jabolão)	α -pineno (30.1) β -pineno (20.5)
<i>E. brasiliensis</i> Lam. (nome popular : grumichama)	α -pineno (10.9) limoneno (13.9)

Tabela 6– Espécies do gênero *Eugenia* que apresentam monoterpenos.

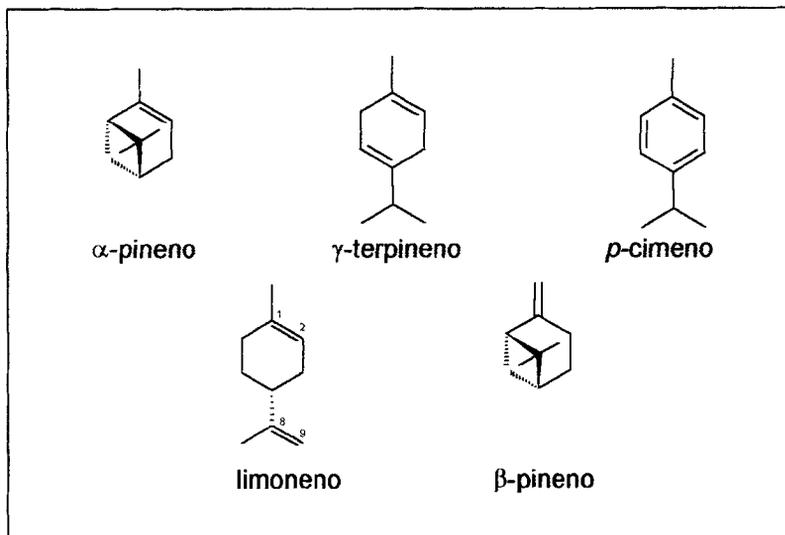


Figura 15 - Monoterpenos mais comuns encontrados em algumas espécies do gênero *Eugenia*.

1.5 - CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DA ESPÉCIE *EUGENIA SPECIOSA* CAMB.

A espécie *Eugenia speciosa* Camb., é encontrada no Brasil, desde a metade norte do Estado do Rio Grande do Sul até o sul de Minas Gerais^{36,50}.

Seus sinônimos são : *Phyllocalyx speciosus* Camb., *Phyllocalyx retusus* Berg., *Phyllocalyx marginatus* Berg., *Phyllocalyx limbatus* Berg. e *Eugenia caldensis* Kiaerskou, é popularmente conhecida no estado de Santa Catarina como laranjinha-do-mato ou araçazeiro. É utilizada na medicina popular por suas propriedades carminativas, digestivas e tônicas⁵⁰.

Nos campos litorâneos assume a forma de um sub-arbusto, enquanto que na floresta toma forma de árvore silvícola, alcançando de 15 a 20 metros de

altura e 20-40 cm de diâmetro, com raminhos e pecíolo jovens pubérulos, plantas adultas ou frutíferas glabras⁵⁰.

Suas folhas são cartáceas até rígidas, discolores. As jovens, evênias com o hipofilo grisáceo ou amarelado finamente rugoloso, as adultas com a face superior mais ou menos venosa e a nervura central é pouco impressa. Sua forma muito constantemente obversa, quase sempre obovado-oblonga, com ápice geralmente atenuado arredondado, às vezes um pouco retuso ou também amplamente arredondado, mais raramente angular-obtuso⁵⁰.

A base da folha é mais ou menos longamente cuneada. Medem de 3-6 cm de comprimento por 1-3 cm de largura, com pecíolos de 4-5 mm. As formas subarbustivas campestres costumam ter folhas pequenas, às vezes orbiculares cuneiformes de 1,5-2,4 cm de comprimento por 1,2-1,4 cm de largura. Bordo da folha marginado por uma laminazinha cartilaginea amarelada, que se destaca geralmente muito claramente sobre o fundo escuro epifilo foliar. Possui glândulas muito densas pouco salientes na superfície superior, enegrecidas por baixo⁵⁰.

Seus pedúnculos de 1-2 cm isolados nas partes desnudas dos ramos, com bractéolas subflorais caducas ou persistentes, oblongas as maiores de 6 mm, freqüentemente menores, de 3-4 mm, parecendo lineares por enrolamento de seus bordos. Apresenta alabastros um pouco sobrepassados pelos sépalos de 8-10 mm ovado-subcordados de até 8 mm de largura ou, freqüentemente também ovado-oblongas até 4 mm de larguras⁵⁰.

Possui tronco bastante reto, muitas vezes com pequenas caneluras, casca lisa do tipo araçazeiro ou cambuí, encimado por copa relativamente pequena.

As formas arbóreas fornecem ótima lenha. O fruto maduro têm aspecto alaranjado, pouco verrugoso, globoso e periforme, mede de 1,5 a 2,5 cm, são comestíveis. Floresce durante os meses de outubro, novembro, dezembro e janeiro. Os frutos maduros são encontrados nos meses de janeiro, fevereiro e março⁵⁰.

Segundo A. Cronquist⁵¹, sua classificação sistemática é a seguinte:

<p>Divisão : Magnoliophyta</p> <p>Classe : Magnoliopsida</p> <p>Sub-Classe : Rosidae</p> <p>Ordem : Myrtales</p> <p>Família : Myrtaceae</p> <p>Sub-Família : Myrtoideae</p> <p>Gênero : <i>Eugenia</i></p> <p>Espécie: <i>Eugenia speciosa</i> Camb.</p>
--

Tabela 7 - Classificação sistemática da espécie *E. speciosa* Camb.

1.6- IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise de óleos essenciais é extremamente trabalhosa e difícil, pois estes possuem uma composição complexa que apresenta um grande número de constituintes com estruturas e/ou propriedades físico-químicas semelhantes, além disso coexistem substâncias em concentração variadas⁵². As dificuldades decorrem principalmente dos métodos analíticos tradicionais utilizados para separação e identificação os quais se baseiam justamente nas diferenças estruturais e físico-químicas existentes entre as substâncias.

Para as análises qualitativas e quantitativas de óleos essenciais, existe a necessidade de métodos analíticos e/ou seletivos para cada um dos componentes desta mistura aliados a alta sensibilidade que confere exatidão e precisão⁵².

Dentre os modernos métodos de análise, a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), ocupa sem dúvida, um lugar de destaque no que diz respeito à separação de espécies químicas e de misturas, sem a necessidade do isolamento destes componentes. A base para esta separação é a distribuição da amostra em duas fases: uma fase estacionária e uma fase gasosa móvel⁵²⁻⁵⁴.

Atualmente, a CGAR é a principal ferramenta para análise de misturas complexas. Um dos principais motivos que destacam esta técnica é sua sensibilidade, que dependendo da seletividade do detetor utilizado pode chegar a 10^{-12} g. Além disto, os resultados quantitativos são excelentes, sendo possível quantificar concentrações que variam de picogramas a miligramas⁵³.

Tudo isto permite uma análise rápida, a utilização de pequenas quantidades de amostras e a possibilidade de detecção de substâncias em pequenas concentrações. Porém, quando a amostra à ser analisada não é volátil ou é termicamente instável, há a necessidade da preparação de derivados com estas características⁵² ou utilização de outras técnicas.

Assim sendo, a CGAR é usada nas mais diversa áreas, como a ambiental, nas indústrias químicas e farmacêuticas, nas análises de alimentos, de produtos petroquímicos, na medicina, na pesquisa, etc. Como exemplo, pode-se citar as seguintes análises⁵³:

- Controle de poluição do ar, água, solos, etc.
- Controle de qualidade, desde a matéria-prima até o produto acabado.
- Controle de alguns constituintes de alimentos, como lipídeos e carboidratos.
- Controle de adulterações, contaminações e decomposição de alimentos.
- Controle terapêutico de certas drogas ou em caso de intoxicações.
- Separação de vários fármacos extraídos de soro, etc.

A análise de óleos essenciais têm se fundamentado nesta técnica que tornou-se ainda mais eficiente com o acoplamento ao espectrômetro de massas (CGAR-EM).

A CGAR-EM fornece os espectros de massas dos componentes da amostra analisada, permitindo assim a análise de sua natureza tanto através dos íons moleculares quanto da análise de seus principais íons de fragmentação de massas. Além disto, a utilização de sistemas informatizados permite a

comparação dos espectros obtidos com aqueles armazenados em bibliotecas de espectros de massas como por exemplo, as conhecidas NIST, Wiley. Mas, algumas vezes apenas esta comparação não é o suficiente, pois ocorrem espectros de massas idênticos devido a similaridade estrutural dos terpenos ou as várias fragmentações e rearranjos após as ionizações. Por isso, são necessárias mais duas etapas: uma delas é propor rotas para os principais íons de fragmentações, e a outra é calcular os índices de retenção para cada componente do óleo essencial, bem como compará-los com os da literatura.

Realizada-se então uma trabalhosa comparação dos índices de retenção calculados em duas colunas de fases diferentes, com aqueles encontrados na literatura especializada, que fornece valores tabelados de centenas de componentes de óleos essenciais em diversos tipos de colunas.⁵²

Um dos métodos usados para auxiliar na identificação dos componentes de óleos essenciais é o índice de Retenção de Kováts (IK), que analisa a relação entre os valores de retenção relativas e a temperatura obtidas em colunas com condições isotérmicas, figura 16.

Kováts estabeleceu que o tempo de retenção da amostra desconhecida guarda uma relação logarítmica com os tempos de retenção das n-parafinas anterior e posterior à ela no cromatograma obtido. Sugerindo que os logaritmos dos tempos de retenção ajustados das n-parafinas aumenta linearmente com o aumento da cadeia. Propôs então a seguinte fórmula para o cálculo dos índices de retenção, que passou a ser conhecida por índice de retenção de Kováts:

$$IK = \left(\frac{\log t'_{R_{subst.}} - \log t'_{R_n}}{\log t'_{R_{n+1}} - \log t'_{R_n}} \times 100 \right) + n$$

Figura 16 - Fórmula para o cálculo do índice de retenção de Kováts.

Onde:

- IK → índice de retenção de Kováts sob condições isotérmicas;
- $t'_{R_{subst.}}$ → tempo de retenção ajustado da substância desconhecida;
- t'_{R_n} e $t'_{R_{n+1}}$ → tempos de retenção ajustados das n-parafinas (padrões) anterior e posterior no cromatograma.
- n → número de carbonos da n-parafina (padrão) anterior, logo;

$$t'_R(n) \leq t'_{R_{subst.}} \leq t'_{R_{n+1}}$$

O valor 100 foi atribuído arbitrariamente à distância entre dois n-alcanos, assim o índice de retenção deve ser igual a 100 vezes o número de átomos de carbono do n-alcano.

O tempo de retenção ajustado é obtido pela seguinte equação :

$$t'_R = t_R - t_M$$

Onde :

- t'_R = tempo de retenção ajustado;
- t_R = tempo de retenção;
- t_M = tempo de permanência da fase móvel na coluna (tempo morto), que é obtido diretamente através da injeção de um gás, podendo ou não ser o gás de arraste.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

O objetivos deste trabalho foram :

- Identificar os constituintes do óleo essencial de *Eugenia speciosa* Camb. (Myrtaceae), através de técnicas modernas como cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM).
- Calcular os índices de retenção de Kováts em duas colunas capilares de polaridades diferentes para minimizar à margem de erros e correlacioná-los com os da literatura especializada.
- Comparar também os espectros de massa obtidos com os das bibliotecas de espectros de massas NIST e Wiley.
- Mostrar as rotas biossintéticas para os componentes identificados, e além disso, quando necessário, fazer propostas de fragmentações para os principais íons de fragmentação de massas registrados nos espectros.

Concluídas as etapas acima correlacionar a espécie estudada com outras espécies do gênero *Eugenia*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- IDENTIFICAÇÃO DO ESPÉCIMEM E LOCAL DA COLETA

A identificação da planta foi feita pela Dr^a Graziela Barroso, pesquisadora aposentada do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Foram colhidas 865g de folhas frescas de *E. speciosa* Camb., na praia do Bonfim em Angra dos Reis - Rio de Janeiro - Brasil, em 16 de fevereiro de 1996.

3.1- PROCESSO EXPERIMENTAL PARA A OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial foi obtido das folhas da *Eugenia speciosa* Camb. logo após a coleta, pelo método de arraste à vapor com cooção em um dispositivo tipo de Clevenger modificado. A extração durou aproximadamente 4 horas e de 865g das folhas frescas, obteve-se 2,5g de óleo essencial com um rendimento de 0.29%.

O material foi então depositado em frascos de cor âmbar, à fim de evitar possíveis degradações por foto-oxidação e em seguida estocado em um freezer à baixas temperaturas para prevenir a perda de material volátil.

Para o cálculo da umidade, as folhas de *E. speciosa* Camb. foi utilizado um aparelho tipo "Dean Stark", onde empregou-se 10g de material e 75 ml de

tolueno, que serviu como solvente para o experimento, o qual teve duração de 4 horas.

Um resumo com os dados obtidos durante o processo de coleta e extração do óleo essencial se encontra na tabela 8.

<i>Eugenia speciosa</i> Camb.				
Quantidade de óleo obtido (g)	Rendimento do óleo (%) (folhas frescas)	Local da coleta	Quantidade de folhas frescas utilizadas (g)	Umidade calculada (%)
2,5	0,29	Praia do Bonfim Angra dos Reis - RJ Brasil	865	56

Tabela 8 – Resumo dos dados experimentais obtidos de *E. speciosa* Camb.

3.2- ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ÓLEO ESSENCIAL

As análises por CGAR foram realizadas num aparelho HP- 5890 Série II, injetor com divisão de fluxo (Split) na razão de 1:100 e com detetor de ionização de chama.

Foram utilizadas duas colunas capilares com diferentes polaridades para a análise do óleo essencial e para a série homóloga de hidrocarbonetos utilizada (C₇-C₂₆) oriundos da Aldrich.

Uma das colunas utilizadas possui fase estacionária 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (SE-54) e as seguintes especificações: 25m x 0.2 mm d.i. x 0.33 µm, considerada pouco polar.

A programação utilizada para análise com a coluna SE - 54 foi a seguinte:

- Temperatura inicial da coluna: 60°C por 2 minutos.
- Temperatura final da coluna: 240°C por 20 minutos.
- Velocidade de aquecimento: 4°C por minuto.
- Temperatura de injetor: 280°C.
- Temperatura do detetor: 300°C.
- Volume injetado: 0.02 ml.
- Fluxo do gás de arraste (Hidrogênio): 1 ml/min.

A outra coluna utilizada na análise do óleo essencial de *E. speciosa* Camb., considerada polar, têm fase estacionária de 100% polietileno-glicol (INNOWax) e apresenta as seguintes especificações: 30 m. x 0.32 mm d.i. x 0.50 μ m.

A programação utilizada para análise na coluna INNOWax, obedeceu as seguintes condições:

- Temperatura inicial da coluna: 70°C por 5 minutos.
- Temperatura final da coluna: 200°C por 35 minutos.
- Velocidade de aquecimento: 4°C por minuto.
- Temperatura de injetor: 250°C.
- Temperatura do detetor: 250°C.
- Volume injetado: 0.01 μ l.
- Fluxo do gás de arraste (Hidrogênio): 1ml/min.

Após cada análise do óleo essencial, a série homóloga de hidrocarbonetos (C_7 - C_{26}) foi injetada sob as mesmas condições de programação. Esta série homóloga, foi utilizada a fim de que fossem efetuados os cálculos dos IK.

3.3- ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL POR CGAR-EM

Utilizou-se para esta análise um cromatógrafo gasoso Shimadzu acoplado ao espectrômetro de massas modelo GCMS - QP5000 - Shimadzu, ionização de chamas, 70eV, quadrupolo.

A coluna utilizada para efetuar esta análise foi uma DB-1 de fase estacionária de 100% dimetilpolisiloxano de 30 m x 0.25 mm d.i. x 0.33 μ m. A programação foi:

- Temperatura inicial da coluna: 40°C por 5 minutos
- Temperatura final da coluna: 270°C por 35 minutos
- Taxa de aquecimento: 4°C por minuto.
- Temperatura de injetor: 250°C.
- Temperatura da interface: 200°C
- Fluxo do gás de arraste (Hélio): 1 ml/min.

Os espectros obtidos foram analisados e comparados com aqueles encontrados nas bibliotecas de espectros de massas Wiley e NIST e também com os dados da literatura⁵⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL POR CGAR E CGAR-EM

A análise do Óleo essencial de *E. speciosa* Camb. por CGAR revelou três regiões de eluição distintas no cromatograma, correspondentes aos monoterpenos hidrocarbonetos, monoterpenos com funções oxigenadas e a última região revelou a presença de sesquiterpenos hidrocarbonetos e alguns derivados oxigenados. Na análise, foram utilizadas duas colunas com polaridades diferentes: uma pouco polar de fase 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano (SE-54) e outra polar de fase 100% polietilenoglicol (INNOWax).

Como pode ser observado, à partir dos dois cromatogramas obtidos (figura 17 e 18) a região dos monoterpenos compreendeu 85% de área relativa do cromatograma e apresentou componentes em altas concentrações onde destacaram-se o limoneno e o α -terpineol, já os compostos sesquiterpênicos se limitaram a apenas 15% de área relativa. Estes resultados conferiram um perfil pouco comum ao óleo essencial da espécie *E. speciosa* Camb. comparando-o com àqueles descritos na literatura para várias espécies do gênero *Eugenia* já estudadas³⁶⁻⁵⁰.

A Identificação dos picos no cromatograma foi feita tomando-se por base os índices de retenção de Kováts (IK), calculados a partir dos tempos de retenção (t'_R) de cada componente e dos respectivos t'_R dos padrões de hidrocarbonetos lineares utilizados (C₇ - C₂₆), que foram cromatografados em condições idênticas as do óleo e pela consulta à literatura⁵⁶⁻⁶⁴.

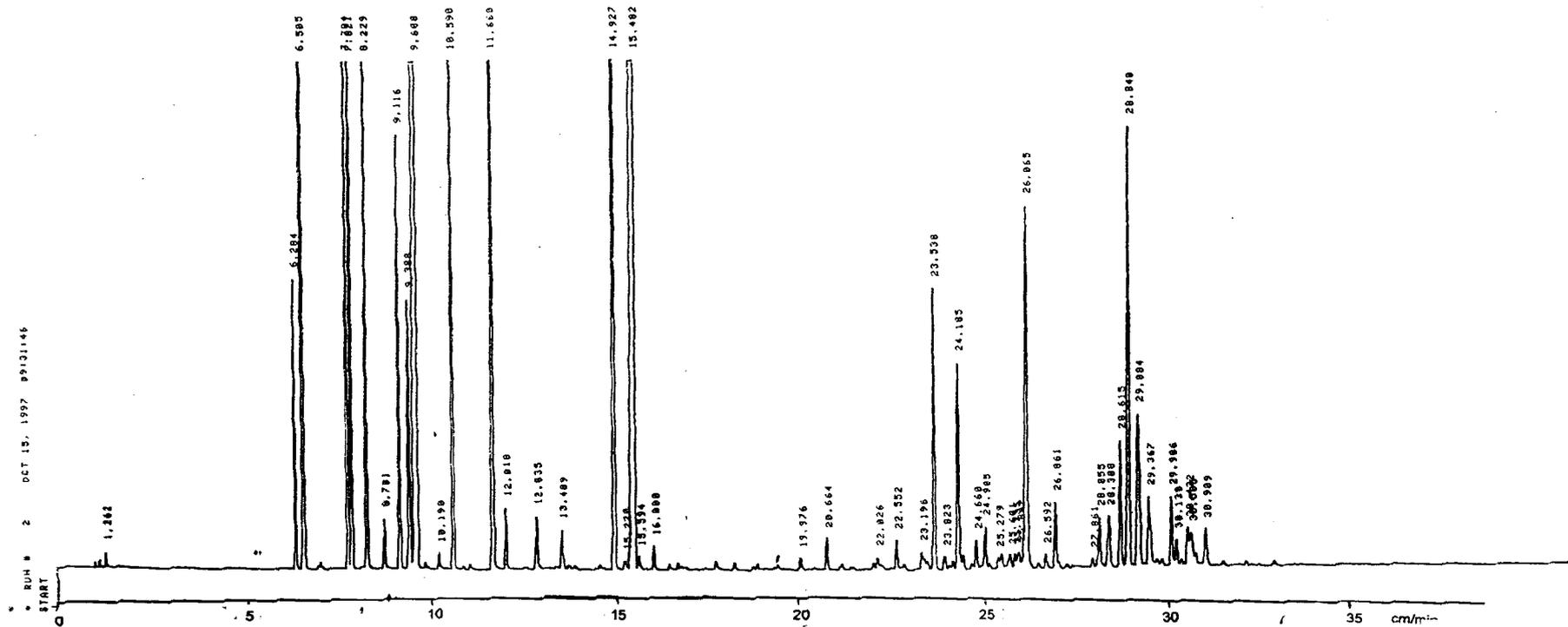


Figura 17 : Cromatograma obtido na coluna pouco polar SE-54

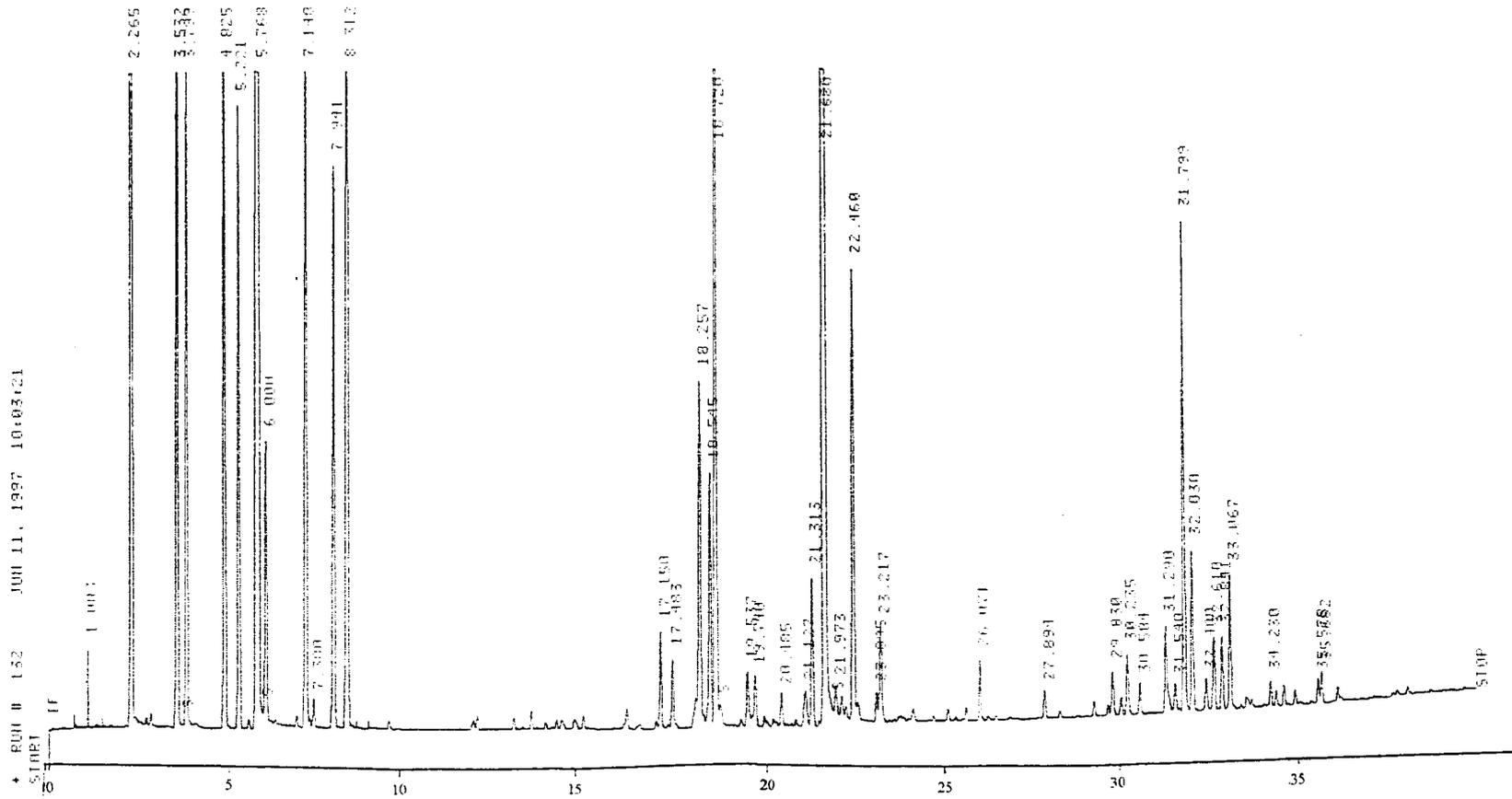


Figura 18 : Cromatograma obtido na coluna polar INNOWax

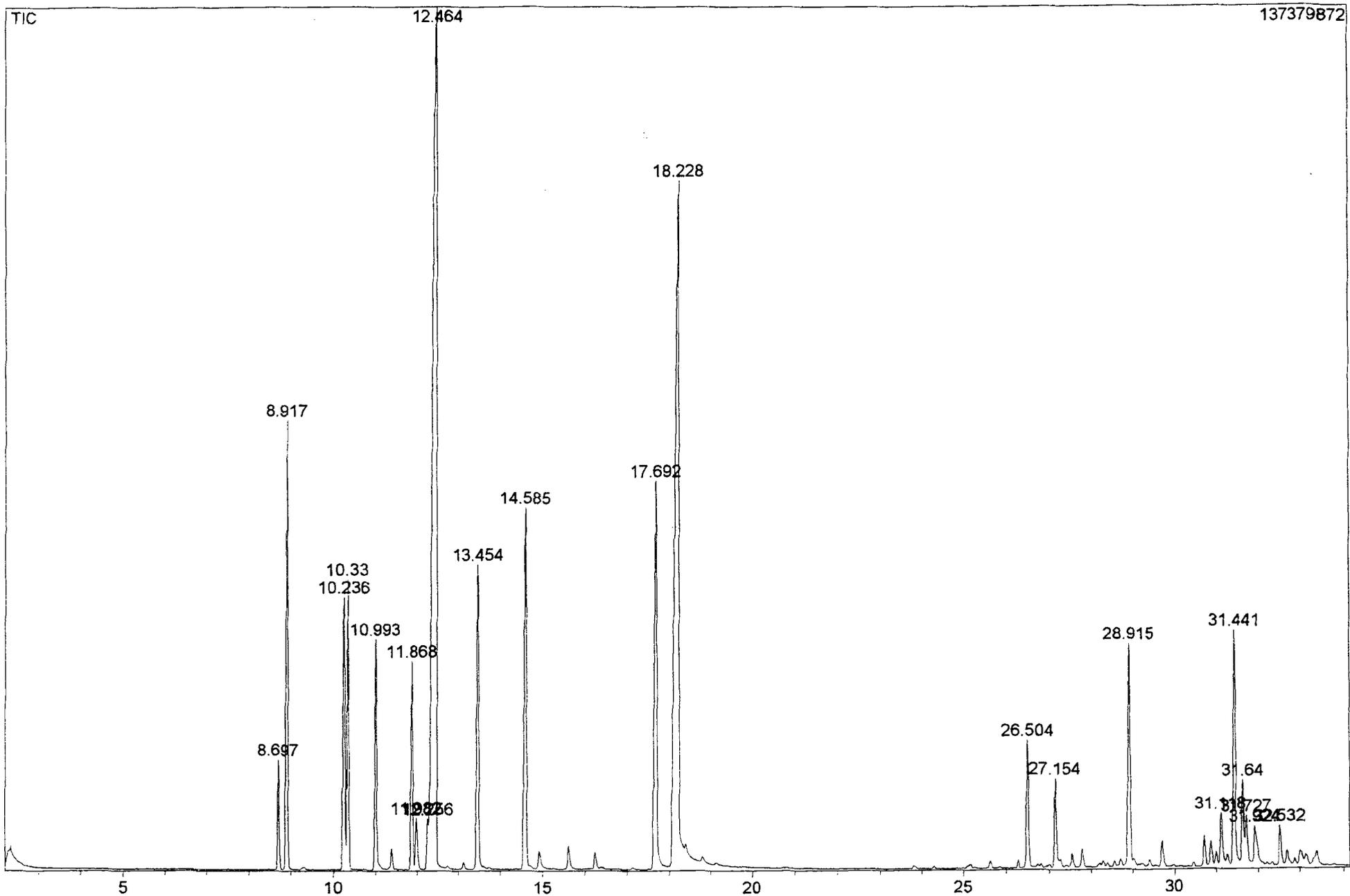


Figura 19 : Cromatograma de íons totais (CIT)

Escolheu-se trabalhar com o cromatograma da coluna pouco polar de fase 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (SE-54), figura 17, devido a pequena variação observada entre os IK calculados para esta fase e àqueles encontrados na literatura⁵⁵⁻⁶⁴ para esta fase estacionária e similares. Desta forma, os IK puderam ser relacionados, facilitando o trabalho de identificação e aumentando a confiabilidade dos resultados.

Embora o cromatograma obtido da coluna polar apresente uma melhor separação das regiões, figura 18, o mesmo procedimento de identificação e comparação citado anteriormente torna-se difícil para esta coluna, pois os valores dos IK da literatura para colunas polares⁶⁵⁻⁷⁸, apresentam grande discrepância entre si. Porém, este cromatograma serviu para confirmar alguns dos componentes previamente identificados, tabela 9.

Na coluna pouco polar os picos que apresentaram IK 1036, 1196, 940, 1182, 1092, 978, 1064, 982, 993, 1021, 1029 e 932 são relativos aos seguintes monoterpenos majoritários: limoneno (33.7%), α -terpineol (18.9%), α -pineno (5.8%), terpin-4-ol (5.0%), terpinoleno (4.5%), sabineno (3.1%), γ -terpineno (3.1%), β -pineno (2.9%), mirceno (2.2%), α -terpineno (1.9%), *p*-cimeno (1.4%) e α -tujeno (1.0%), respectivamente, tabela 10.

Dentre os sesquiterpenos identificados neste óleo essencial, os mais significativos foram os que apresentaram IK 1594, 1504, 1428, 1602 e 1448 relativos respectivamente ao globulol (2.7%), biciclogermacreno (2.7%), β -cariofileno (1.6%), viridiflorol (1.3%) e longifoleno (1.2%), tabela 10.

Estas atribuições foram confirmadas pela análise por CGAR-EM, realizada numa coluna apolar de fase 100% dimetil polisiloxano (DB-1), figura 19.

Obteve-se um CIT (Chomatograma de íons Totais) com regiões de eluição muito semelhante ao do cromatograma obtido da coluna pouco polar de fase 5% difenil 95% dimetil polisiloxano (SE-54) e, a partir dos respectivos sinais foram obtidos os espectros de massas de cada constituinte, tabela 11. A análise destes espectros foi feita por comparações com as bibliotecas de espectros de massas NIST e Wiley, e com a literatura⁵⁵⁻⁶⁴, além disso, o presente trabalho sugeriu rotas para os principais íons de fragmentações de massas.

A reunião destas técnicas, permitiu a identificação de 28 componentes, o que representa 96% da área relativa do cromatograma do óleo essencial de *E. speciosa* Camb.

As estruturas dos compostos identificados no óleo essencial de *E. speciosa* Camb. estão na figura 21.

Tempo de retenção na INNOWax	Componente	IK Calculado	IK (literatura)	Concentração(%)
2265	α -pineno	1012	1012/1024/1041	8.3
3562	β -pineno	1120	1120/1105/1111	3.4
3799	sabineno	1133	1130/1128/1115	3.6
4825	α -felandreno	1177	1177/1165/1150	3.0
5221	α -terpineno	1191	1192/1177/1182	2.1
5768	limoneno	1211	1210/1190/1187	29.9
6000	β -felandreno	1220	1217/1208/1196	0.9
7148	γ -terpineno	1259	1251/1244/1231	3.4
7941	<i>p</i> -cimeno	1267	1268/1274/1258	2.0
8312	terpinoleno	1293	1290/1286/1274	5.1
17150	linalol	1501	1502/1533/1555	0.3
18257	<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	1599	1597/1628	1.6
18545	β -cariofileno	1609	1606/1577/1588	1.01
18720	terpin-4-ol	1615	1610/1628/1637	5.4
20485	<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	1673	1660/1560	0.2
21680	α -terpineol	1712	1713/1685/1693	20.0
22460	biciclogermancreno	1740	1742/1731/1720	1.9
23217	δ -cadineno	1766	1766/1773/1730	0.4
27894	palustrol	1934	1934	0.1
31799	globulol	2085	2085/2093/2064	1.9
32030	viridiflorol	2094	2091/2103/2112	0.6
32610	espatulenol	2117	2120/2110/2153	0.3

Tabela 9- Valores dos IK calculados na fase 100% polietilenoglicol. Onde: **IK Literatura =** Referências 56, 65-78.

Componente	IK (calculado na SE-54)	IK (literatura)	Área (%)	Identificação
α -tujeno	932	934/931	1.03	IK, EM, Lit.
α -pineno	940	941/939	5.81	IK, EM, Lit.
sabineno	978	972/953	3.08	IK, EM, Lit.
β -pineno	982	980	2.83	IK, EM, Lit.
mircenno	993	992/991	2.22	IK, EM, Lit.
α -felandreno	1007	1004/1005	0.23	IK, EM, Lit.
α -terpineno	1021	1020/1018	1.91	IK, EM, Lit.
<i>p</i> -cimeno	1029	1026/1026	1.40	IK, EM, Lit.
β -felandreno	1029	1029/1031	0.33	IK, EM, Lit.
limoneno	1036	1032/1031	33.74	IK, EM, Lit.
γ -terpineno	1064	1061/1062	3.06	IK, EM, Lit.
terpinoleno	1092	1092/1088	4.54	IK, EM, Lit.
linalol	1101	1094/1140	0.29	IK, EM, Lit.
<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	1125	1128/1140	0.28	IK, EM, Lit.
<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	1144	1142/1121	0.24	IK, EM, Lit.
terpin-4-ol	1182	1178/1177	5.00	IK, EM, Lit.
α -terpineol	1196	1191/1189	18.87	IK, EM, Lit.
β -cariofileno	1428	1431/1418	1.58	IK, EM, Lit.
longifoleno	1448	1398/1402	1.21	EM
α -humuleno	1462	1462/1454	0.16	IK, EM, Lit.
seicheleno	1470	1460	0.27	EM
biciclogermancreno	1504	1490/1494	2.71	EM
δ -cadineno	1522	1524	T	IK, EM, Lit.
palustrol	1569	1565/2314	0.34	IK, EM, Lit.
espatulenol	1577	1596	0.42	EM
globulol	1594	1583	2.73	EM
viridiflorol	1602	1588/1590	1.26	EM
β -eudesmol	1647	1643/1649	0.42	IK, EM, Lit.

Tabela 10 : Composição do óleo essencial de *E. speciosa* Camb.

Onde : T = traço; Ik = Índice de Retenção de Kováts ; EM = Espectros de massas da Wiley e NIST e da ref. 55 e Lit. = literatura, referências 55-64.

Cromatograma de Ions Totais (CIT)	
Tempo de retenção na DB-1	Componente
8.697	α -tujeno
8.917	α -pineno
10.236	sabineno
10.336	β -pineno
10.993	mirreno
11.369	α -felandreno
11.868	α -terpineno
11.988	<i>p</i> -cimeno
12.256	β -felandreno
12.464	limoneno
13.454	γ -terpineno
14.585	terpinoleno
14.900	linalol
15.592	<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol
16.242	<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol
17.692	terpin-4-ol
18.228	α -terpineol
26.504	β -cariofileno
27.154	longifoleno
27.544	α -humuleno
27.774	seicheleno
28.915	biciclogermancreno
29.701	δ -cadineno
30.992	palustrol
31.118	espatulenol
31.441	globulol
31.640	vindiflorol
32.532	β -eudesmol

Tabela 11 - Tempo de retenção dos constituintes do óleo essencial obtidos do Cromatograma de Ions Totais (CIT).

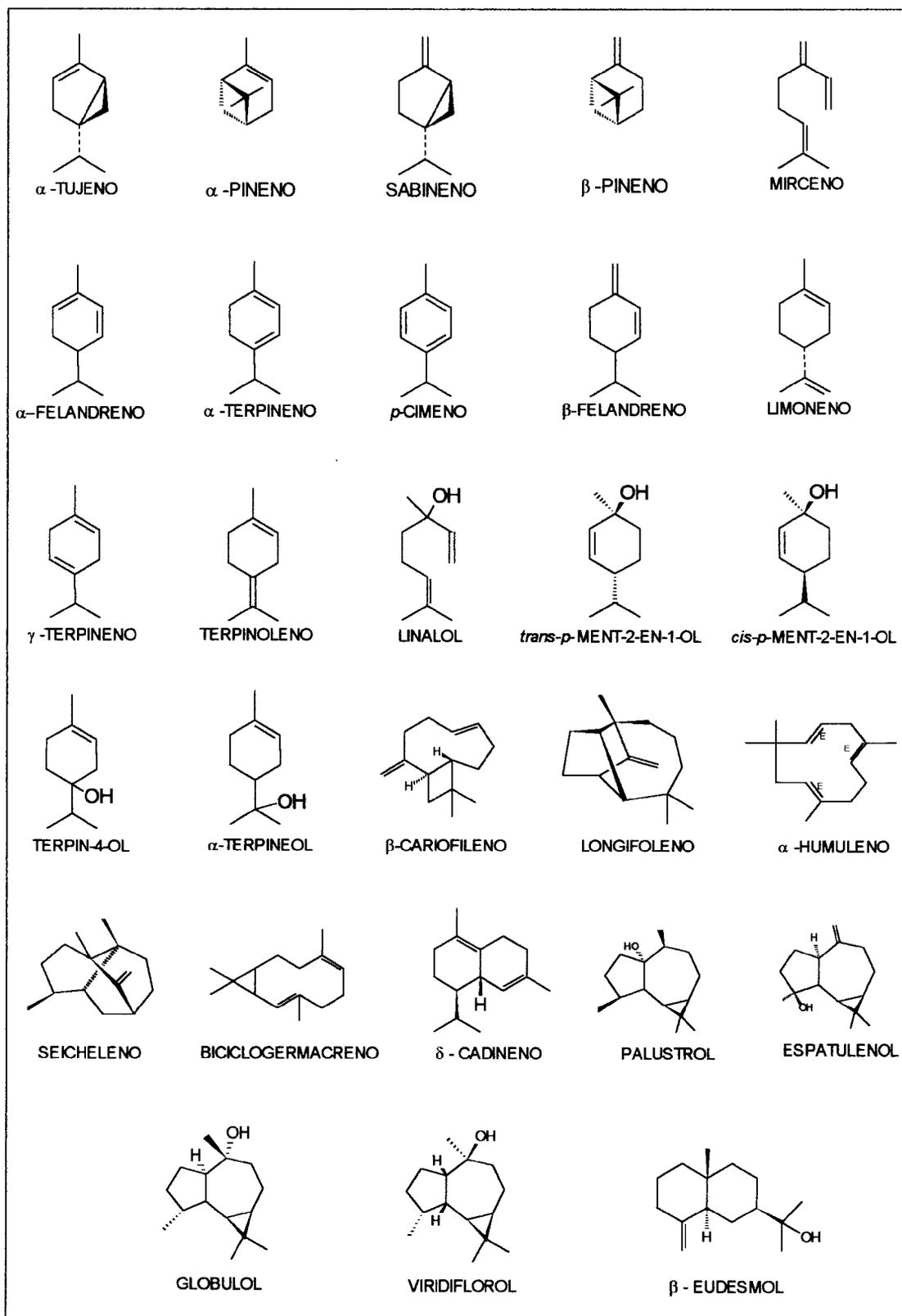


Figura 20 – Estruturas dos compostos identificados em *E. speciosa* Camb.

A composição química do óleo essencial de *E. speciosa* Camb. mostrou-se predominantemente composta por monoterpenos, este fato diferencia o óleo essencial da espécie estudada da maioria daqueles obtidos no gênero *Eugenia* (onde predominam os sesquiterpenos³⁸⁻⁴⁵), aproximando-o apenas de algumas poucas espécies que apresentam concentrações relevantes de monoterpenos⁴⁶⁻⁴⁹, tais como: *E. brasiliensis* Lam., *E. jambos* L., *E. javanica* Lamk. e *E. jambolana* Lamk., tabela 6 (pág. 35).

Ao analisar detalhadamente tais espécies, foi observado uma similaridade qualitativa entre os óleos essenciais da espécie estudada com os de *E. javanica* Lamk. e *E. brasiliensis* Lam.

A espécie *E. javanica* Lamk. também apresentou 85% de área relativa equivalente aos monoterpenos na composição química de seu óleo essencial e destes, 15 componentes são comuns *E. speciosa* Camb., porém encontram-se em diferentes concentrações.

Já a espécie *E. brasiliensis* Lam. apresentou em sua composição química 51% de área relativa equivalente aos monoterpenos, onde o limoneno foi o componente majoritário. Destes monoterpenos, 11 foram comuns àqueles identificados no óleo da espécie estudada. Os componentes comuns à estes óleos essenciais estão mostrados na tabela 12.

Tal resultado sugere que ambas possuam rota biossintética e sistema enzimático muito semelhantes.

Monoterpenos identificados em <i>E. speciosa</i> Camb.	Concentração (%) em <i>E. speciosa</i> Camb.	Concentração (%) em <i>E. brasiliensis</i> Lam.	Concentração (%) em <i>E. javanica</i> Lamk.
α -tujeno	1.0	0.1	-
α -pineno	5.8	10.9	18.2
sabineno	3.1	-	-
β -pineno	2.8	6.1	4.3
mirreno	2.2	0.8	3.7
α -felandreno	0.2	-	0.9
α -terpineno	1.9	-	1.7
<i>p</i> -cimeno	1.4	0.6	13.7
β -felandreno	0.3	0.1	0.1
limoneno	33.7	13.9	1.3
γ -terpineno	3.1	0.3	28.5
terpinoleno	4.5	-	4.1
linalol	0.3	6.0	1.6
<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	0.3	-	0.1
<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	0.2	-	0.1
terpin-4-ol	5.0	0.4	5.0
α -terpineol	18.9	2.2	1.3

Tabela 12 – Monoterpenos comuns as espécies *E. speciosa* Camb., *E. javanica* Lamk. e *E. brasiliensis* Lam.

Existem trabalhos na literatura que comprovam que certos monoterpenos isolados e alguns óleos essenciais ricos em monoterpenos de substâncias apresentam funções aleloquímicas⁹, repelente de insetos^{12,18-20}, atividade ictiotóxica¹⁵, atividade contra microorganismos patogênicos²¹⁻²⁷ e atividades anti-inflamatórias e analgésicas²⁹. Partindo destas evidências, pode-se vislumbrar

que o óleo essencial de *E. speciosa* Camb., apresente certo potencial de atividade biológica, devido a seu perfil que se mostrou abundante em compostos monoterpênicos (85%). Uma das possíveis indicações é devido a presença do monoterpeneo α -terpineol (18.9%) que apresenta atividade anti-séptica¹. Como perspectiva, este trabalho levanta a possibilidade de encaminhar o óleo para testes de atividade biológica.

4.2- ANÁLISE DOS ESPECTROS DE MASSAS ATRAVÉS DOS PRINCIPAIS ÍONS DOS COMPONENTES IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia speciosa* Camb.

A análise dos espectros de massas dos constituintes do óleo é uma tarefa trabalhosa, uma vez que muitos deles são isômeros e, apresentam espectros de massas muito semelhantes. Mesmo assim, procurou-se neste trabalho propor fragmentações para os principais íons encontrados nos espectros.

Dos sesquiterpenos identificados no óleo de *E. speciosa* Camb., 8 são comuns as espécies *E. ovalifolia* Camb. e *E. nítida* Camb., rica em sesquiterpenos, e suas propostas de fragmentações já haviam sido sugeridas por Duarte⁴³ e Martins⁴⁴, respectivamente.

Foi sugerido neste estudo, rotas para os principais íons de fragmentação de massas para os monoterpênicos identificados.

A tabela 13 mostra os valores dos principais fragmentos (m/z) e suas respectivas abundâncias relativas, referentes aos monoterpênicos.

Composto	Principais fragmentos no espectro de massas m/z e suas abundância relativas (%)
α -tujeno	M ⁺ 136(6), 121(2), 107(1), 105(4), 93(100) , 91(56), 79(12), 77(43), 67(2), 65(7), 43(10), 41(19).
α -pineno	M ⁺ 136(9), 121(11), 119(2), 107(6), 105(11), 93(100) 92(46), 91(45), 79(26), 77(34), 69(1), 67(8), 65(7), 43(14), 41(31).
sabineno	M ⁺ 136(14), 121(4), 107(3), 105(2), 93(100) , 91(41), 79(30), 77(41), 69(13), 67(4), 65(8), 43(11), 41(41).
β -pineno	M ⁺ 136(9), 121(11), 107(5), 105(2), 93(100) , 92(13), 91(27), 79(25), 77(24), 69(39), 67(12), 65(6), 43(7), 41(77).
mirreno	M ⁺ 136(3), 121(3), 107(2), 105(1), 93(58), 91(14), 79(7), 77(7), 69(46), 67(8), 65(3), 43(4), 41(100) .
α -felandreno	M ⁺ 136(21), 119(2), 105(3), 93(100) , 92(37), 91(54), 79(7), 77(38), 67(1), 65(7), 43(8), 41(14).
α -terpineno	M ⁺ 136(48), 121(96), 107(12), 105(22), 93(100) , 91(50), 79(32), 77(38), 67(4), 65(13), 43(27), 41(30).
p-cimeno	M ⁺ 135(2), 134(26), 119(100) , 105(3), 92(2), 91(25), 79(2), 77(7), 65(11), 41(11).
β -felandreno	M ⁺ 136(18), 121(7), 107(3), 105(2), 93(100) , 91(42), 79(22), 77(38), 67(2), 65(5), 43(7), 41(19).
limoneno	M ⁺ 136(16), 121(16), 107(17), 105(4), 93(46), 91(15), 79(27), 77(14), 68(100) , 67(19), 65(6), 43(4), 41(28).
γ -terpineno	M ⁺ 136(32), 121(27), 107(8), 105(11), 93(100) , 91(47), 79(23), 77(39), 67(3), 65(9), 43(32), 41(26).
terpinoleno	M ⁺ 136(70), 121(88), 107(19), 105(25), 93(100) , 91(39), 79(45), 77(39), 67(13), 65(12), 43(32), 41(44).
linalol	M ⁺ 139(2), 136(4), 121(14), 107(6), 105(4), 96(12), 93(61), 92(13), 91(4), 83(18), 80(33), 79(8), 77(5), 71(100) , 69(40), 67(19), 65(2), 55(69), 43(94), 41(98).
<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	M ⁺ 154(3), 139(14), 136(7), 121(10), 111(15), 107(1), 97(4), 93(15), 79(10), 77(8), 71(24), 69(18), 67(10), 65(3), 55(14), 43(100) , 41(24).
<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	M ⁺ 154(2), 139(15), 136(7), 121(12), 111(12), 107(3), 97(5), 93(16), 91(5), 79(16), 77(4), 71(16), 69(19), 67(9), 65(3), 55(13), 43(100) , 41(24).
terpin-4-ol	M ⁺ 154(8), 139(2), 136(12), 111(41), 107(5), 98(1), 93(43), 91(9), 79(4), 77(9), 71(100) , 65(4), 55(26), 43(69), 41(35).
α -terpineol	M ⁺ 139(7), 136(37), 121(44), 107(7), 105(3), 93(58), 91(21), 81(40), 79(15), 77(11), 67(20), 65(4), 59(100) , 43(60), 41(27).

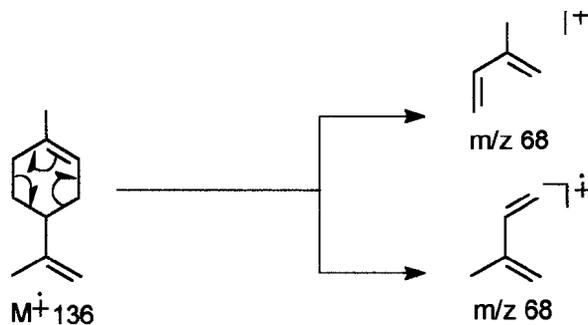
Tabela 13 – Principais íons de fragmentação m/z encontrados nos monoterpênos.

Na comparação dos espectros de massas do α -felandreno, β -felandreno e limoneno, algumas observações podem ser levadas em consideração, baseadas na grande semelhança dos espectros e nas abundâncias relativas dos principais íons de fragmentações destes monoterpenos, tabela 14:

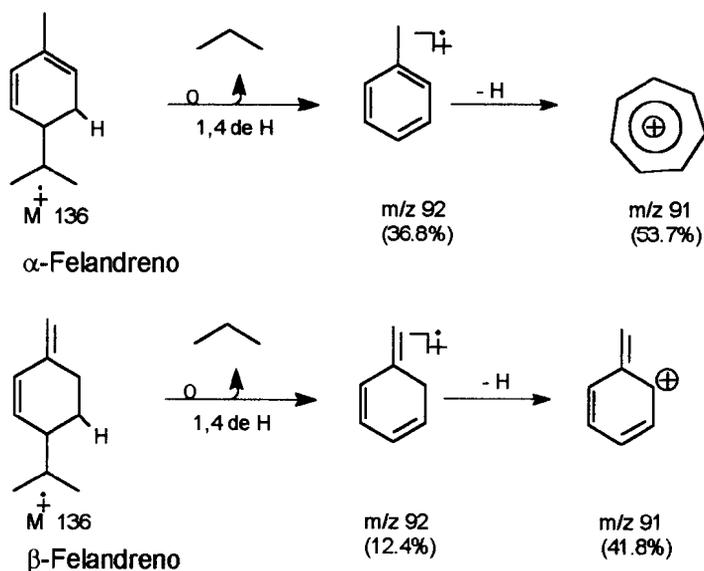
Principais Fragmentos Encontrados (m/z)			
	α -felandreno	β -felandreno	limoneno
	%	%	%
136	20.6	17.5	15.6
121	1.9	6.2	16.2
119	2.0	-	-
107	-	3.1	17.2
105	2.5	2.8	4.3
93	100.0	100.0	46.3
92	36.8	12.4	19.3
91	53.7	41.8	15.5
79	5.0	21.8	26.7
77	38.1	38.1	14.3
68	<1.0	-	100.0
67	<1.0	1.9	18.8
65	6.2	5.0	6.2
43	11.2	9.9	3.7
41	13.7	19.3	28.1

Tabela 14 : Comparação entre os principais íons de fragmentações do α - e β -felandreno e do limoneno em relação às suas abundâncias relativas.

De todos estes isômeros o mais fácil de ser identificado é o limoneno, que apresenta pico base de m/z 68, oriundo de uma tradicional reação de *retro* Diels-Alder^{93,94} a partir do íon molecular M^+ 136.

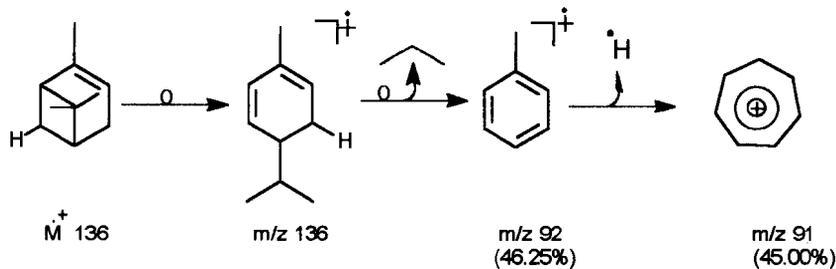


O α -felandreno e β -felandreno podem ser diferenciados pelos seus espectros de massas através do íon de fragmentação de m/z 92 que para o α -felandreno resulta num composto aromático. Seus índices de Kováts também auxiliam na identificação da ordem de saída destes compostos, que são IK 1007 e 1029, respectivamente.

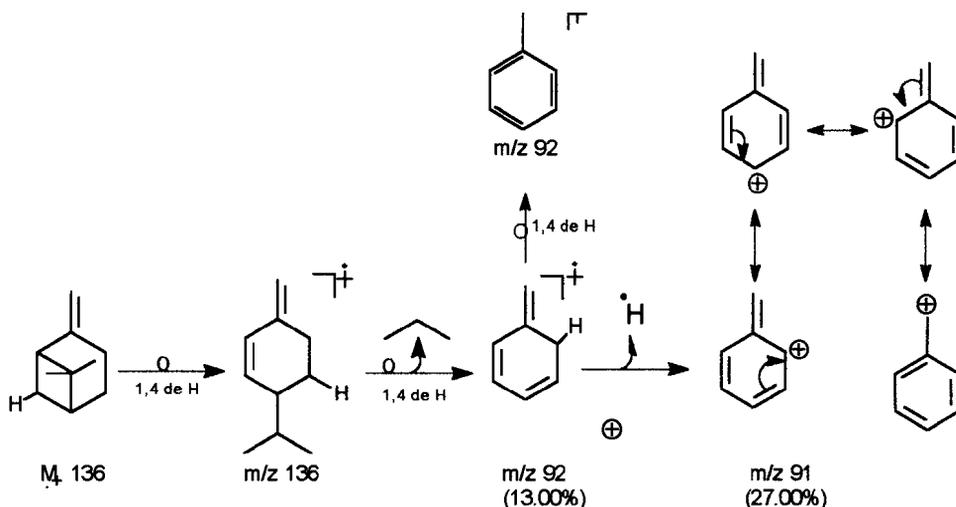


Os isômeros α -pineno e β -pineno, possuem espectros de massas muito próximos, diferenciando-se principalmente pelos íons de fragmentação de m/z 92, 91 e 69.

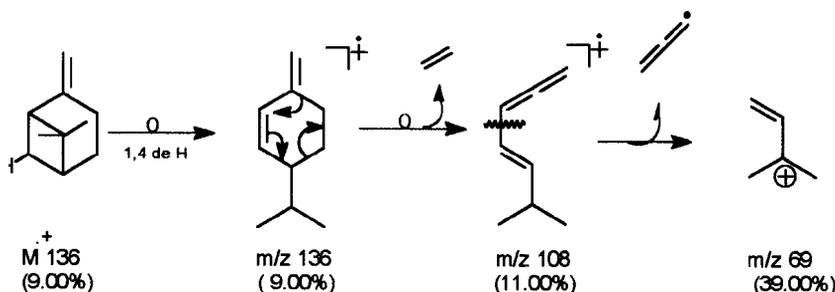
Para o α -pineno, pode-se observar que os íons de fragmentação de m/z 92 (46.25%) e 91 (45.00%) podem ter origem, a partir de um rearranjo 1,4 de hidrogênio, seguido da perda de isopropila e de um radical hidrogênio, respectivamente à partir do íon molecular.



Para o β -pineno este mesmo raciocínio pode ser aplicado, sendo que os intermediários formados m/z 92 (13%) e m/z 91 (27%) são menos estáveis do que aqueles propostos para o α -pineno, o que justifica a baixa intensidade relativa deste íon de fragmentação de massas.



O registro do íon de m/z 69 (39%) para o β -pineno pode ser explicado por um rearranjo inicial tipo 1,4 de H, seguido por uma R.D.A. seguida da perda de 28 u.m.a, e posterior perda de 39 u.m.a. .



A semelhança entre estes espectros tornam a identificação destas substâncias muito difíceis, e a identificação só pode ser realizada, com o cálculo dos índices de retenção de Kováts e através da racionalização das estruturas propostas para os íons de fragmentação de cada componente, tendo-se como base, principalmente a estabilidade destes fragmentos, associadas as intensidades relativas.

Outros espectros de massas que apresentaram semelhanças são o γ -terpineno, α -terpineno, terpinoleno, α -tujeno e sabineno, que possuem a mesma origem biossintética e apresentaram como principais íons de fragmentação de massas m/z 121, 105, 93, 91, 79, 77, 65, 43, 41, sendo o m/z 93 o íon base para todos, tabela 13.

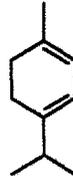
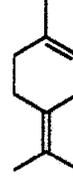
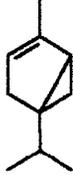
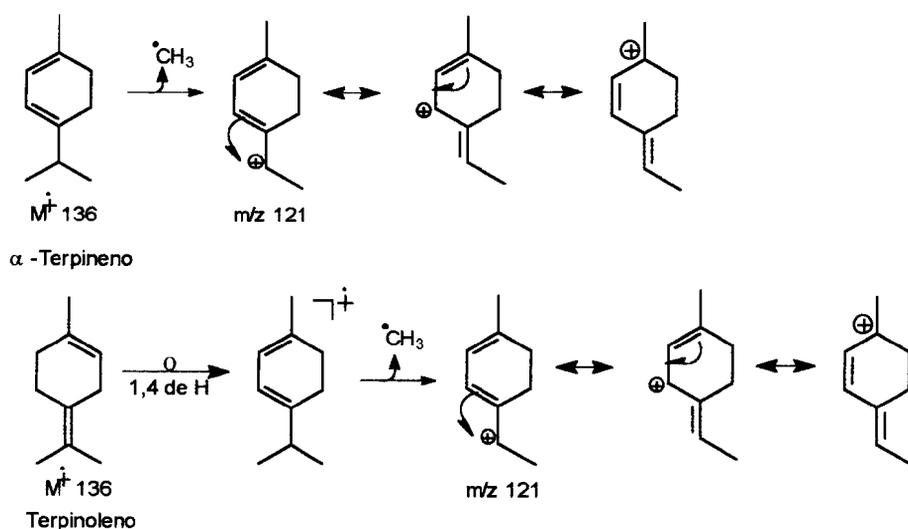
Principais Fragmentos Encontrados (m/z)					
	γ -TERPINENO %	α -TERPINENO %	TERPINOLENO %	α -TUJENO %	SABINENO %
136	33.1	48.8	70.6	10.0	14.0
121	27.0	96.3	89.3	2.5	4.0
119	3.0	5.6	6.2	-	-
107	-	12.0	18.8	-	3.0
105	10.7	22.5	26.3	4.3	2.0
93	100.0	100.0	100.0	100.0	100
92	-	13.6	13.7	-	-
91	50.6	50.0	52.3	56.2	42.0
79	23.8	32.5	45.9	12.5	30.0
77	-	38.7	39.4	-	-
69	-	-	-	-	13.0
68	-	-	3.1	-	-
67	-	4.0	13.1	-	-
65	9.4	13.7	11.8	6.9	8.0
43	37.5	28.1	32.3	10.0	13.0
41	26.5	30.6	45.0	20.0	61.0

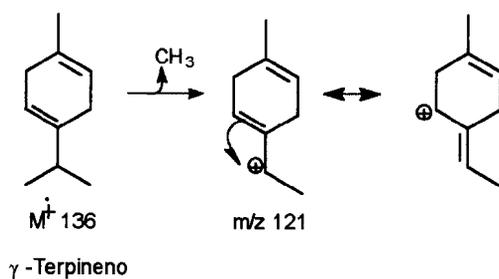
Tabela 15 - Comparação entre os principais íons de fragmentações do γ - e α -terpineno, terpinoleno, α -tujeno e sabineno em relação às suas abundâncias relativas.

É fácil entender, por exemplo, a abundância relativa do íon de fragmentação de massas de m/z 121 para os monoterpenos α -terpineno (96.3%) e o terpinoleno (89.3%). Este tem origem na perda de 15 u.m.a., a partir do íon molecular (M^+ 136) e conduz em todos os casos a formação de um carbocátion secundário estabilizado por ressonância (pág. 72).

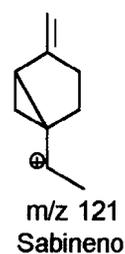
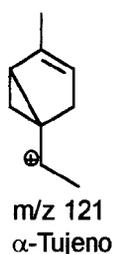
Com o auxílio do cálculo IK, pode-se determinar a ordem de saída do α -terpineno (IK 1021) e do terpinoleno (IK 1092) e, desta forma conciliar os espectros de massas correspondentes a cada um deles.



A abundância relativa do íon m/z 121 não é tão pronunciada para o γ -terpineno (27%), que embora apresente conjugação com uma dupla ligação apresenta menor número de estruturas de ressonância.



No caso do α -tujeno e sabineno, a perda deste íon radical metila não é favorecida por não ser estabilizada por ressonância, isto é evidenciado pela baixa intensidade relativa destes 2.5% e 4.0%, respectivamente.

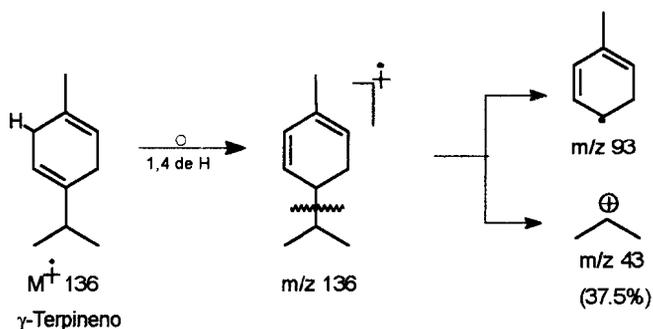


As discussões em torno das estabilidades dos íons de fragmentação de massas são voltadas para as espécies que são detectadas no espectrômetro de massas, ou seja, pelos íons positivos (cátions) ou pelo íon radical-cátion.

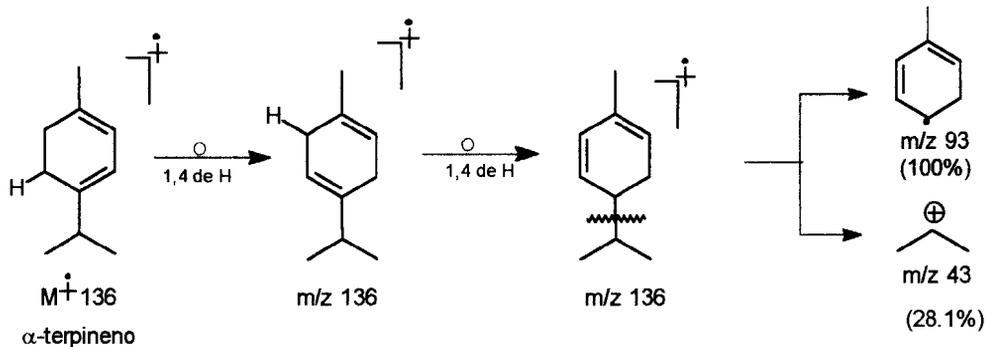
Este trabalho ousa propor a discussão sobre as estabilidades do íon gerado e não detectado pela espectrometria de massas.

O íon de m/z 43 corresponde a perda do cátion isopropila, presente na maioria dos monoterpenos e sesquiterpenos. A estabilidade deste íon é invariável em qualquer uma das situações aqui relatadas. Por outro lado, o íon radical gerado a partir da formação do cátion isopropila é variável em função de suas estabilidades, como por exemplo:

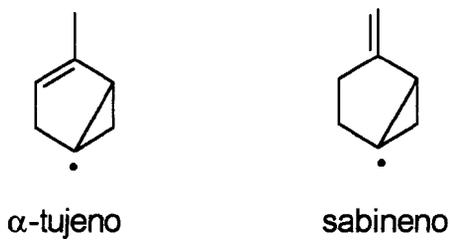
Para que ocorra a ruptura da ligação que conduz a formação do íon (carbocátion) isopropila a partir do γ -terpineno, é necessário que ocorra um rearranjo da dupla ligação, este íon radical apresenta uma certa estabilidade em virtude da conjugação:



Para o α -terpineno serão necessário dois rearranjos:



E, no caso do tujeno e sabineno o radical gerado ficará localizado sobre um carbono ciclopropânico, muito pouco provável o $m/z 43$ apareceu com abundância relativa de (10.0%) e (13.0%), respectivamente.



Alguns fragmentos característicos que se repetiram foram observados tanto nos monoterpenos hidrocarbonetos quanto nos derivados oxigenados. A tabela 16 sugere as prováveis perdas de massas.

Monoterpenos hidrocarbonetos		
Íon de origem (m/z)	Fragmento registrado (m/z)	Massa perdida (u.m.a.)
136	121	15 (·CH ₃)
	107	29 (·C ₂ H ₅)
	94	42 (·C ₃ H ₆)
	93	43 (·C ₃ H ₇)
	43	93 (·C ₄ H ₉)
121	119	2 (H ₂)
	105	16 (CH ₄)
119	93	26 (C ₂ H ₂)
107	105	2 (H ₂)
105	77	28 (C ₂ H ₄)
94	79	15 (·CH ₃)
	93	1 (H)
93	77	26 (C ₂ H ₂)
	92	1 (H)
	91	2 (H ₂)
	67	26 (C ₂ H ₂)
92	91	1 (H)
91	65	26 (C ₂ H ₂)
79	77	2 (H ₂)
67	65	2 (H ₂)
43	41	2 (H ₂)
Monoterpenos hidrocarbonetos com funções oxigenadas		
Íon de origem	Fragmento registrado	Massa perdida
154	139	15 (·CH ₃)
	136	18 (H ₂ O)
	111	43 (·C ₃ H ₇)
139	121	18 (H ₂ O)
	111	28 (H ₂ C=CH ₂)
	81	58 (C ₃ H ₆ O)
136	93	43 (·C ₃ H ₇)
111	71	
	93	18 (H ₂ O)

Tabela 16: Principais íons de fragmentação frequentemente observados nos espectros de massas de monoterpenos .

À seguir são mostrados os espectros de massas dos monoterpenos e as respectivas sugestões para os principais íons de fragmentações de massas.

Scan# : (776-784)
 Mass Peak# : 29 Ret. Time : (8.632-8.718)
 Date Peak : 02.10 (2023/10/09)

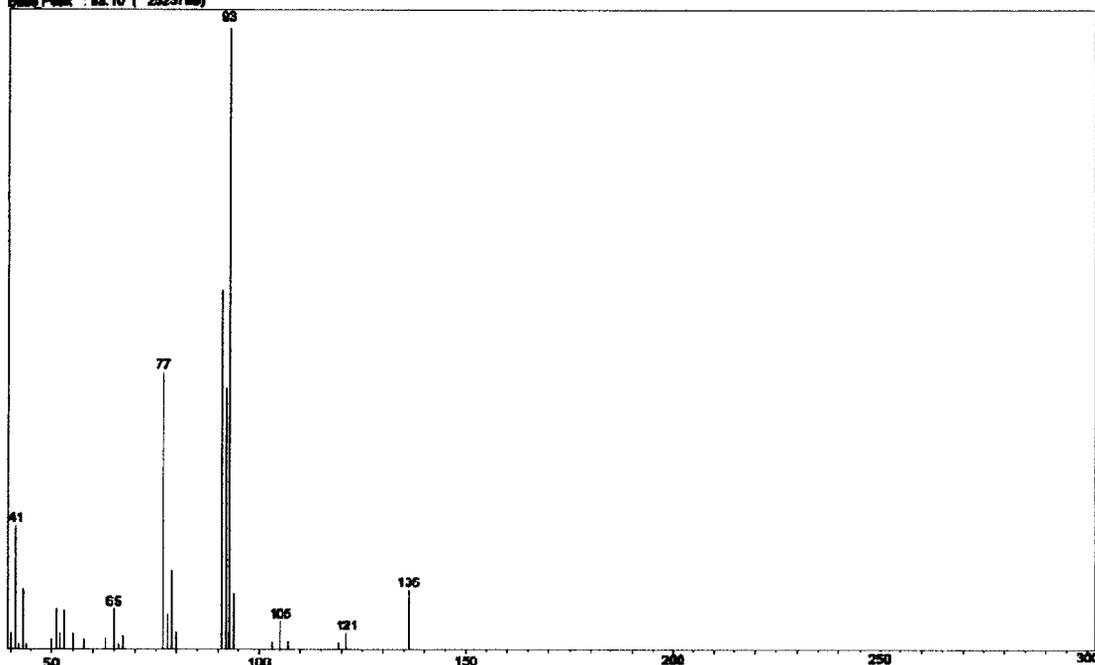
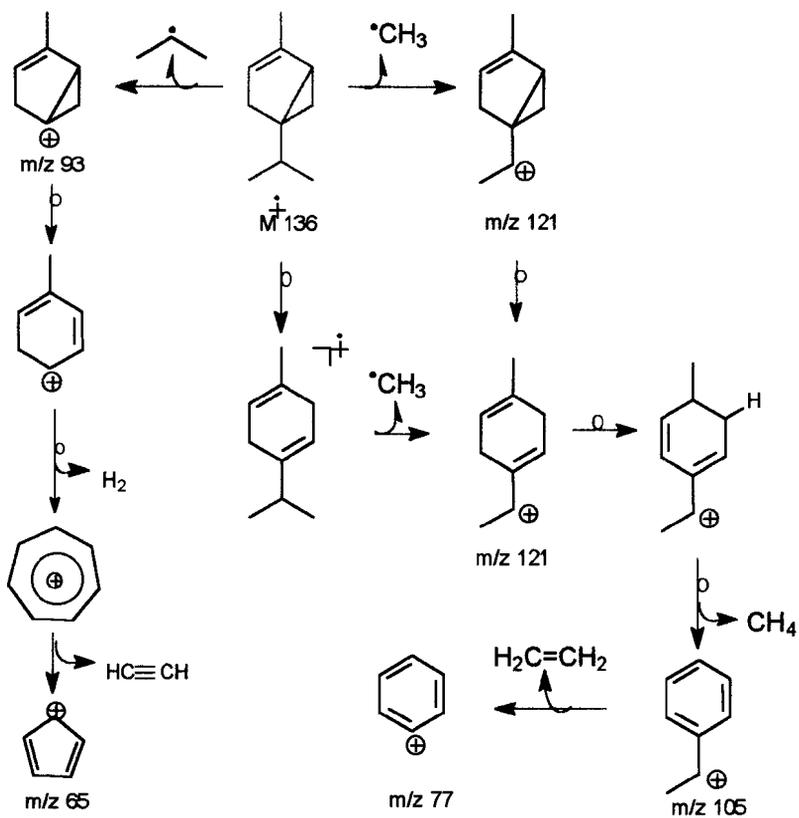


Figura 21 : Espectro de massas do α -tujeno.



Esquema 13 : Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do α -tujeno.

Scan # : (803-811)
 Mass Peak #: 36 Ret Time : (8.882-8.950)
 Base Peak : 93.10 (9882208)

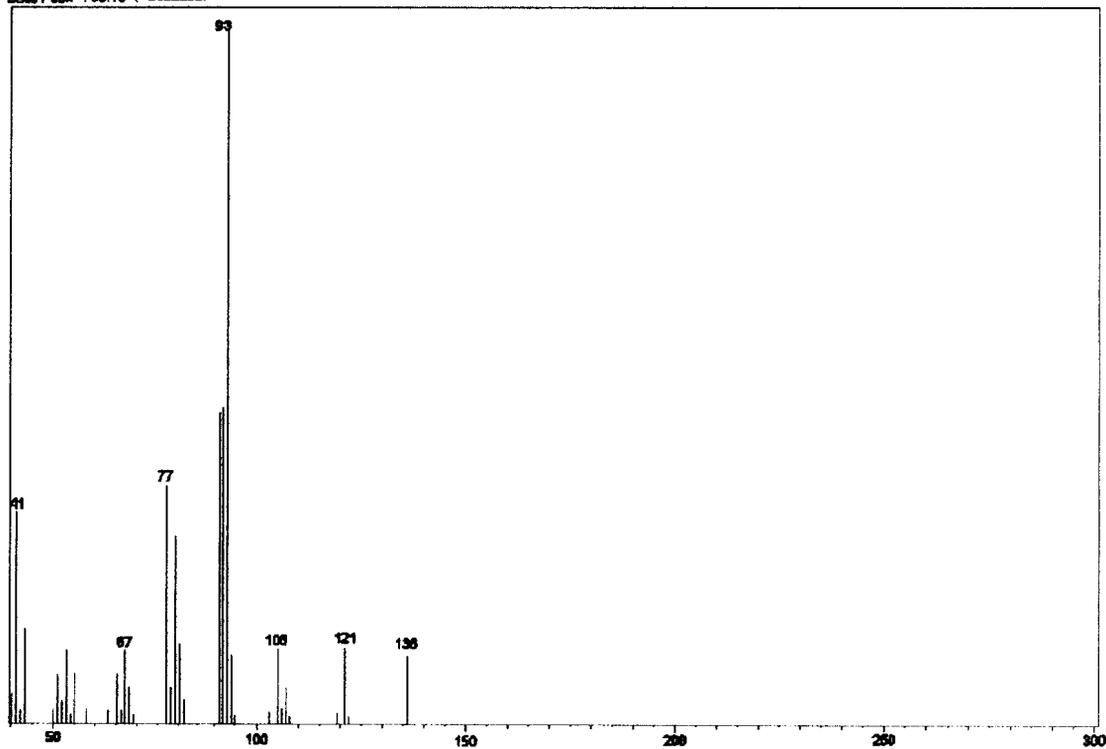
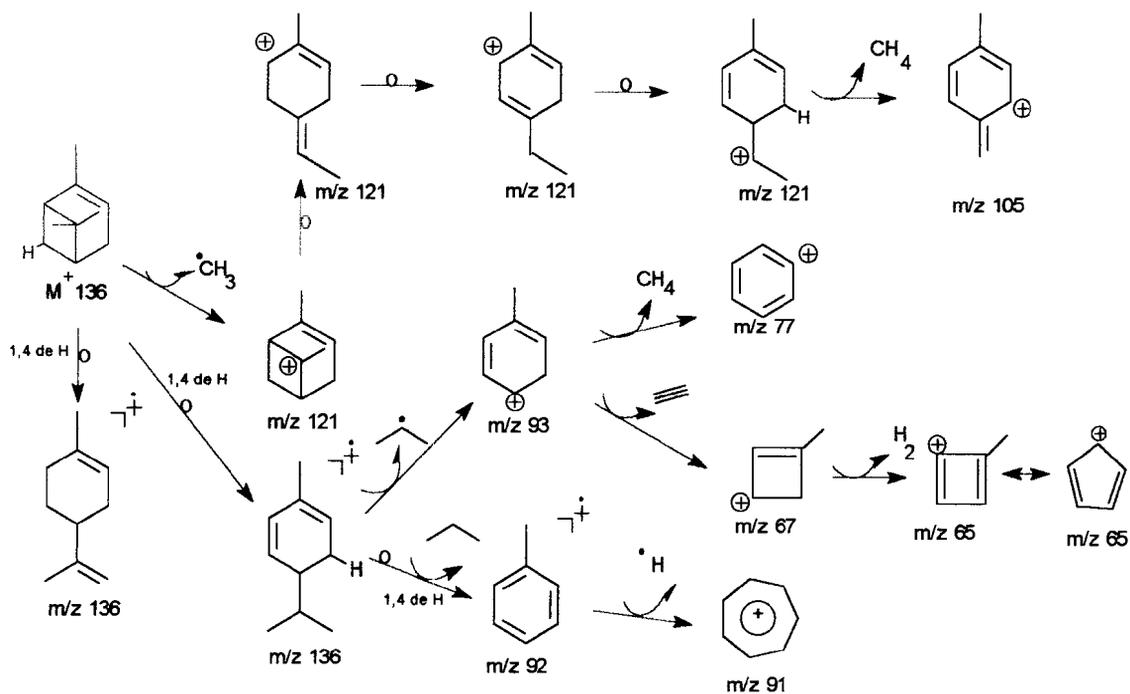


Figura 22 : Espectro de massas do α -pineno.



Esquema 14 : Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do α -pineno.

Scan # : (977 - 979) B.G. Scan # : (971 - 972)
 Mass Peak # : 33 Ret. Time : (10.333 - 10.360)
 Base Peak : 93.10 (7470890)

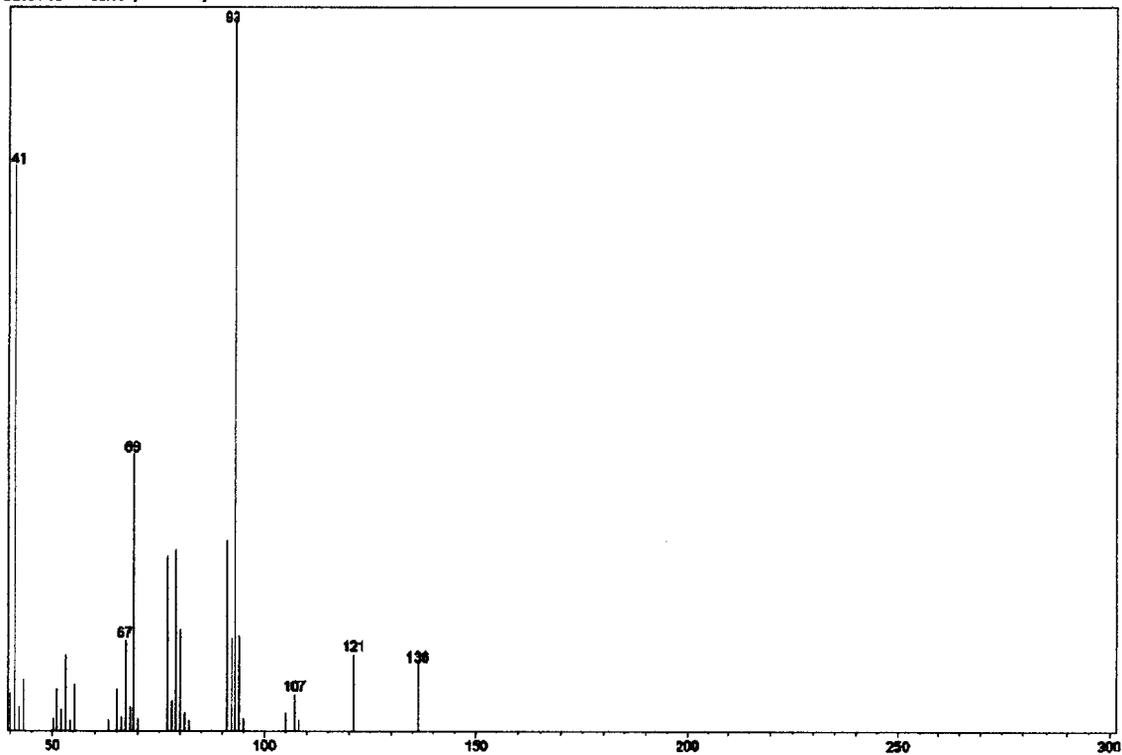
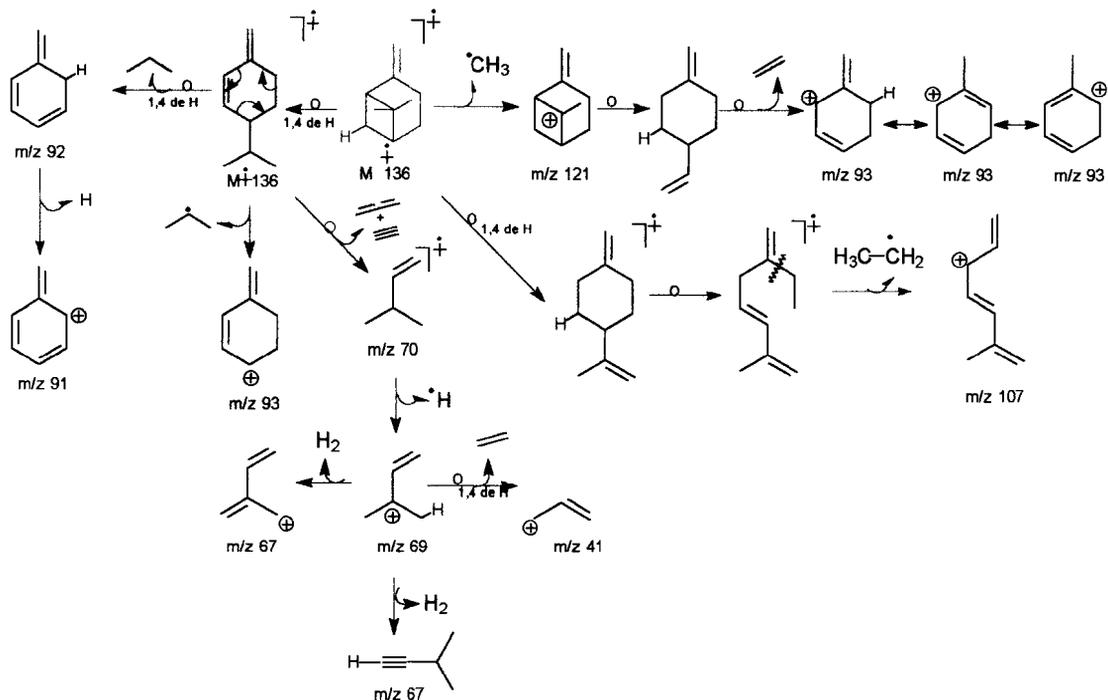


Figura 24 : Espectro de massas do β -pineno.



Esquema 16 : Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do β -pineno.

Scan # : (1055 - 1058)
 Mass Peak #: 27 Ret. Time : (10.801 - 11.803)
 Base Peak : 41.05 (1073084)

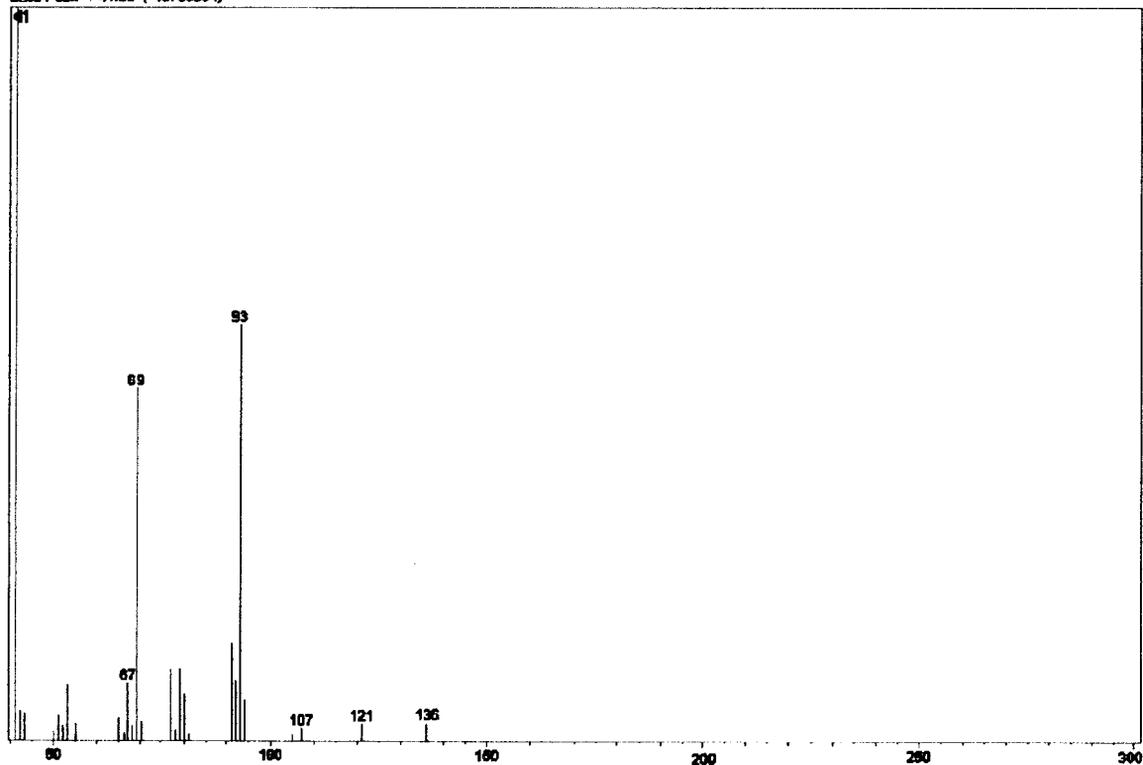
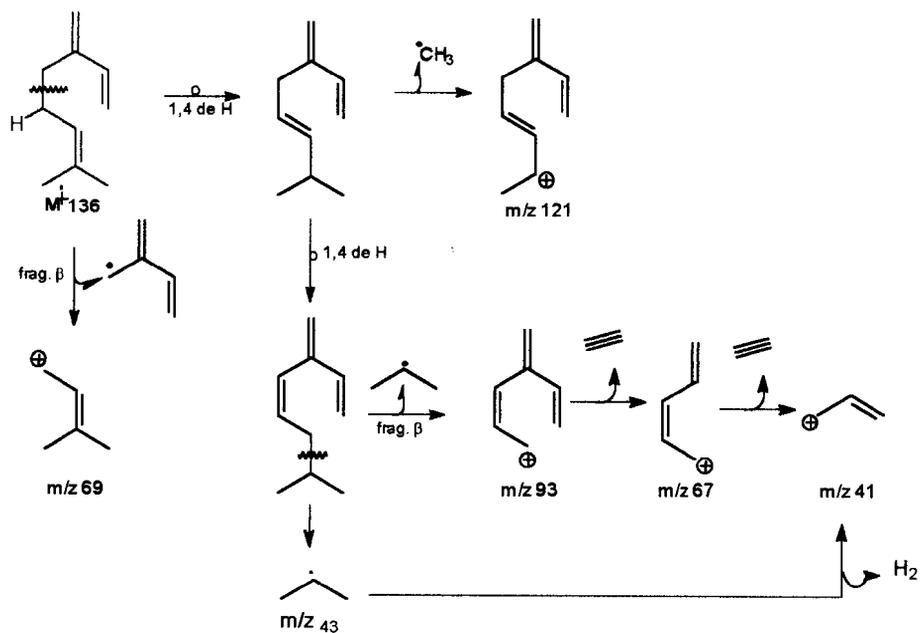


Figura 25 : Espectro de massas do mirceno.



Esquema 17 : Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do mirceno.

Scan # : 1162
 Mass Peak # : 41 Ret. Time : 11.875
 Base Peak : 93.10 (5249611)

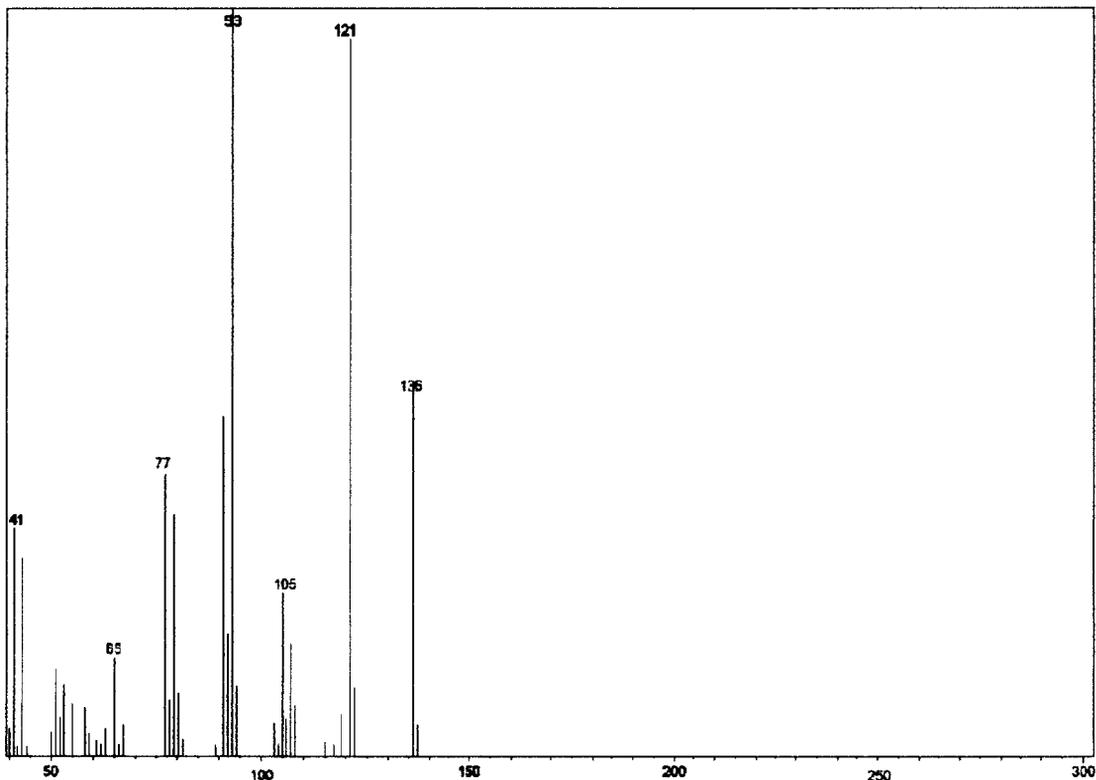
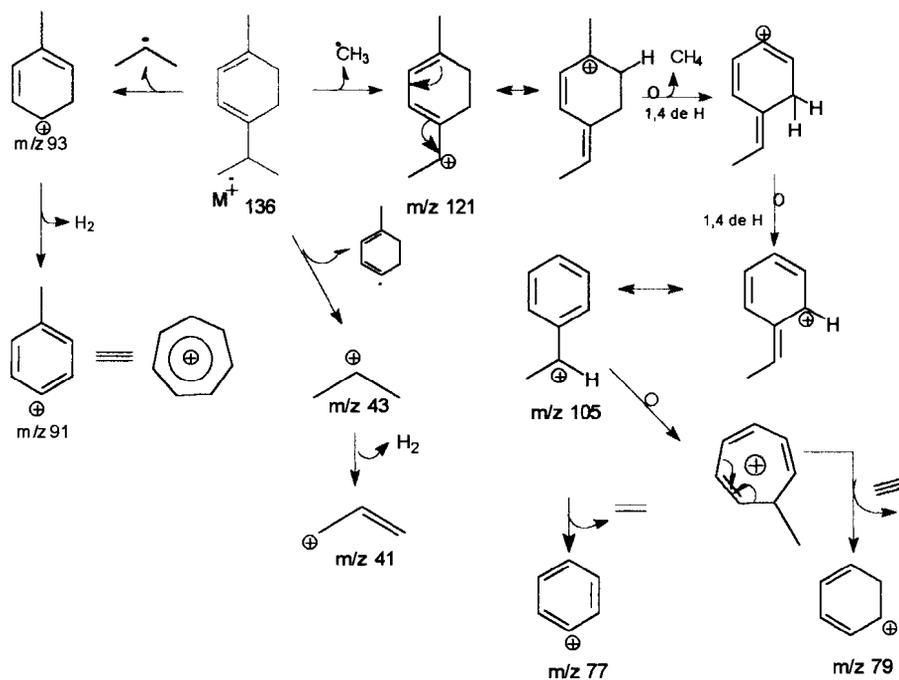


Figura 27 : Espectro de massas do α -terpineno.



Esquema 19 : Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do α -terpineno.

Scan # : (1348 - 1355)
 Mass Peak # 38 Rel. Time : (13.426 - 13.478)
 Base Peak : 93.10 (7270349)

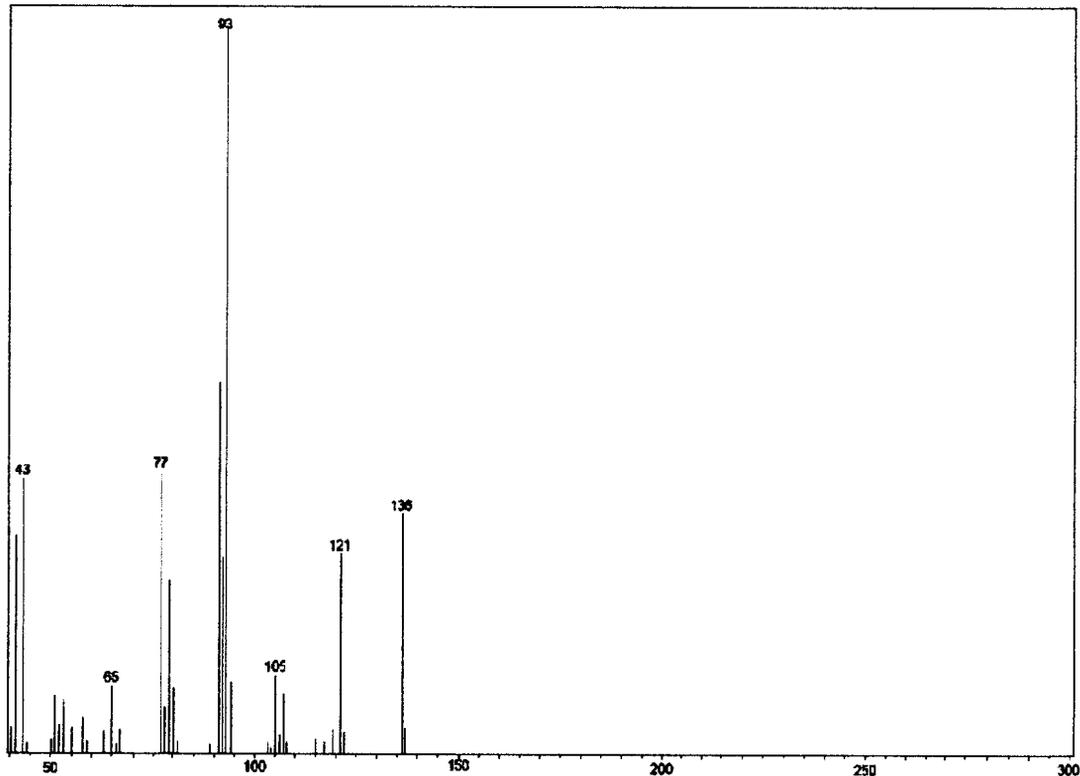
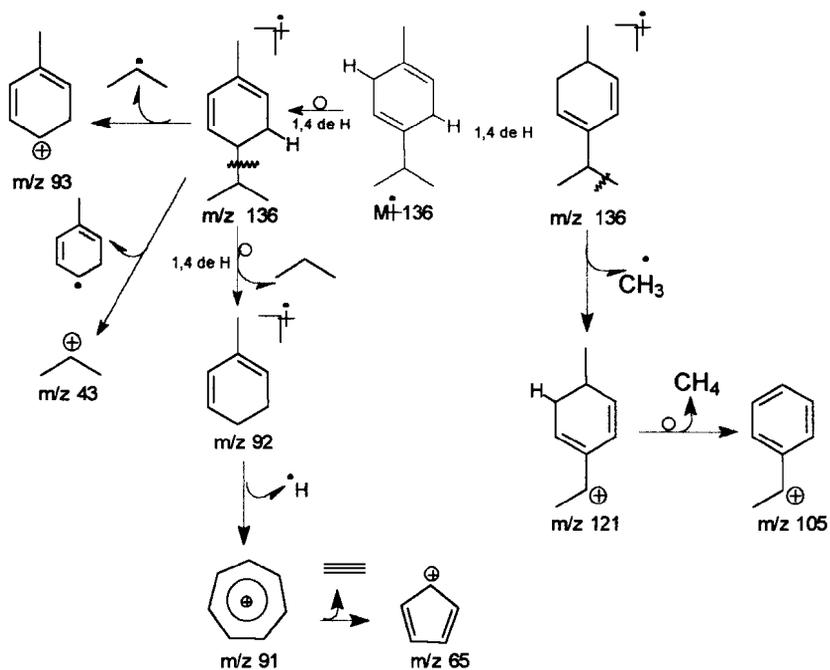


Figura 31 : Espectro de massas do γ -terpineno.



Esquema 23 : Proposta para os principais íons de fragmentações do γ -terpineno.

Scan # : (1525 - 1528) B.G. Scan # : (1514 - 1518)
 Mass Peak #: 50 Ret. Time : (14.900 - 14.925)
 Base Peak : 71.10 (325416)

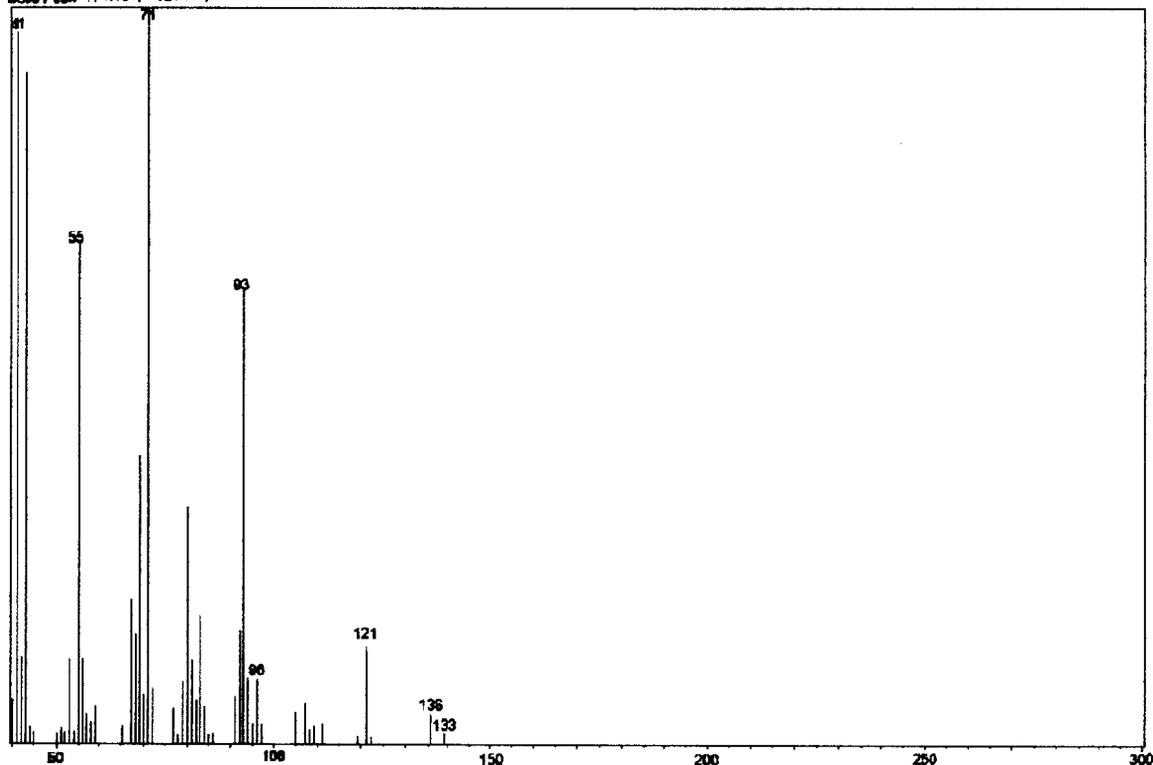
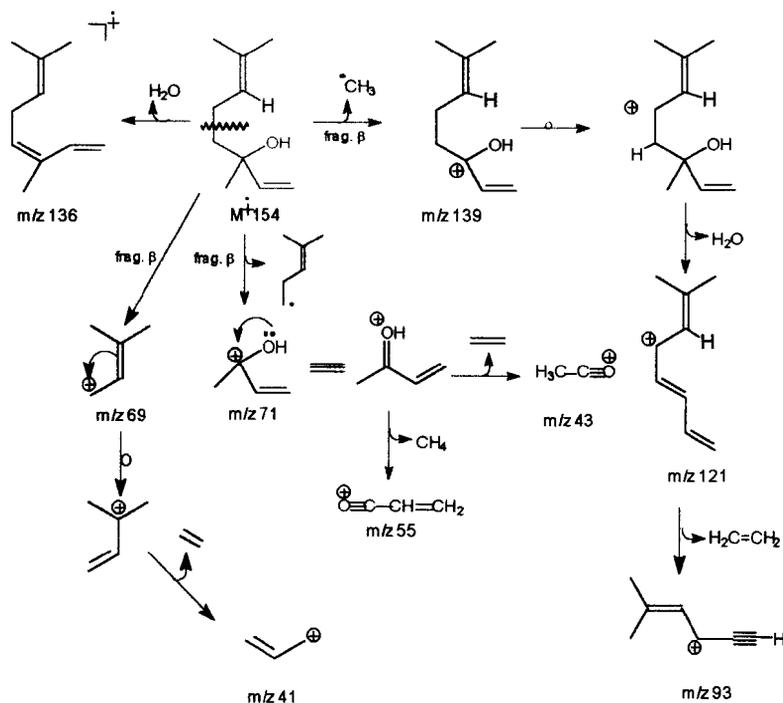


Figura 33 : Espectro de massas do linalol.



Esquema 25 : Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do linalol.

Scan # : (1608 - 1613) B.G. Scan # : (1587 - 1593)
 Mass Peak # : 53 Rel Time : (15.582 - 15.833)
 Base Peak : 43.06 (715119)

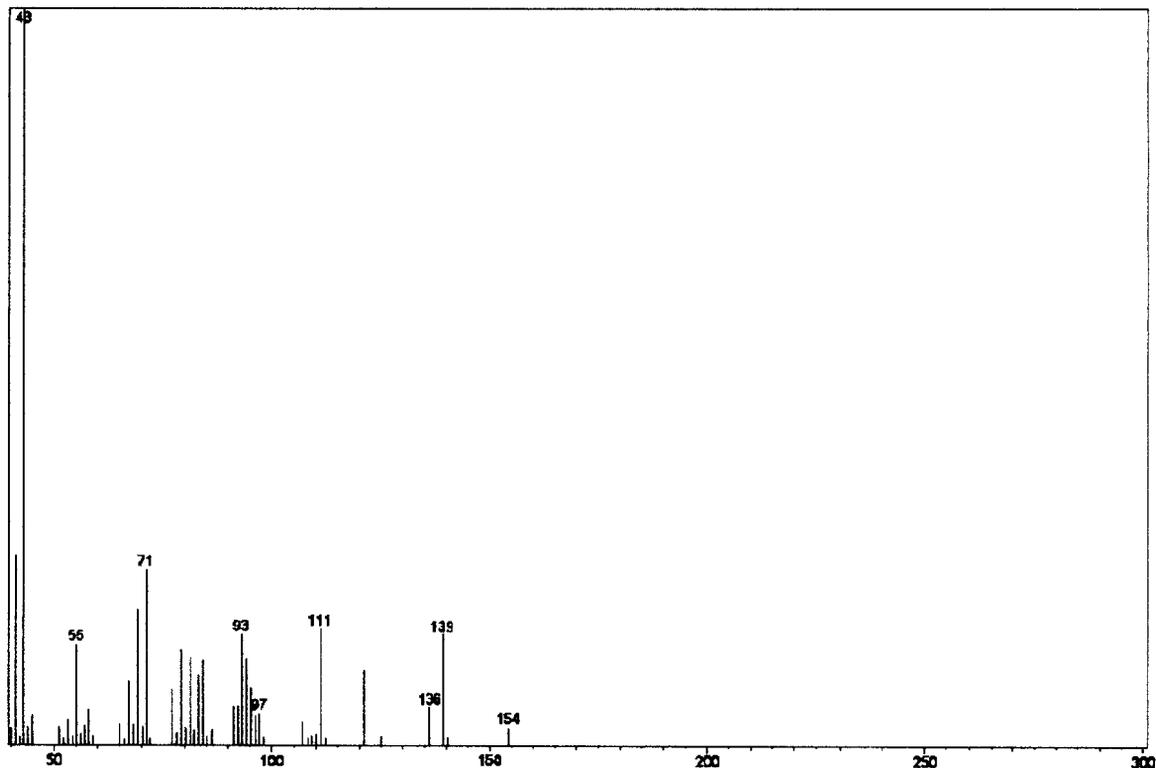
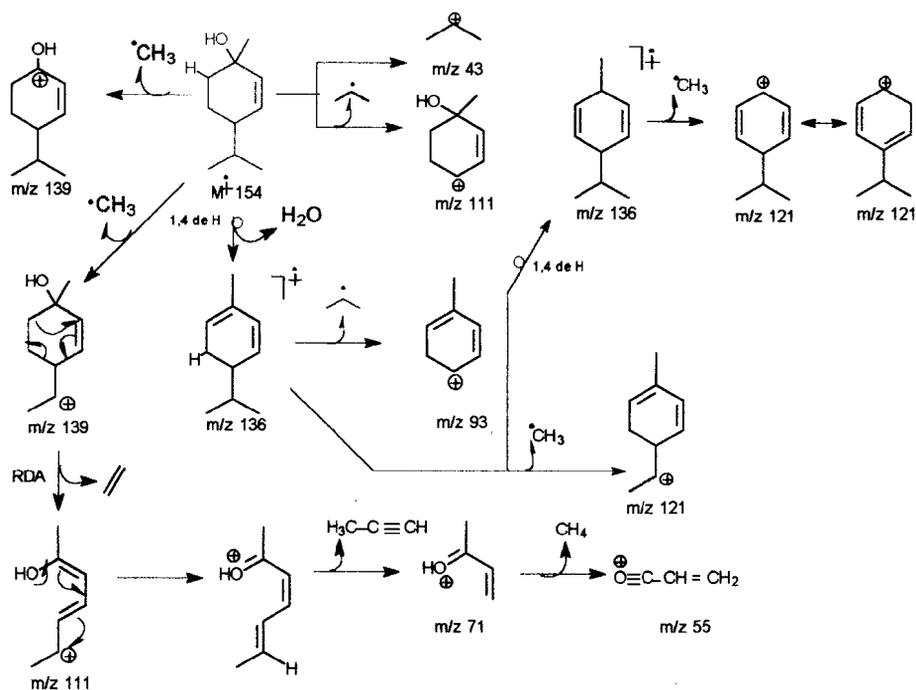


Figura 34 : Espectro de massas do *trans-p*-ment-2-en-1-ol.



Esquema 26 : Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do *trans-p*-ment-2-en-1-ol.

Scan #: (1686 - 1688) B.G. Scan #: (1686 - 1689)
 Mass Peak #: 49 Rel. Time: (16.242 - 16.258)
 Base Peak: x3.05 (610516)

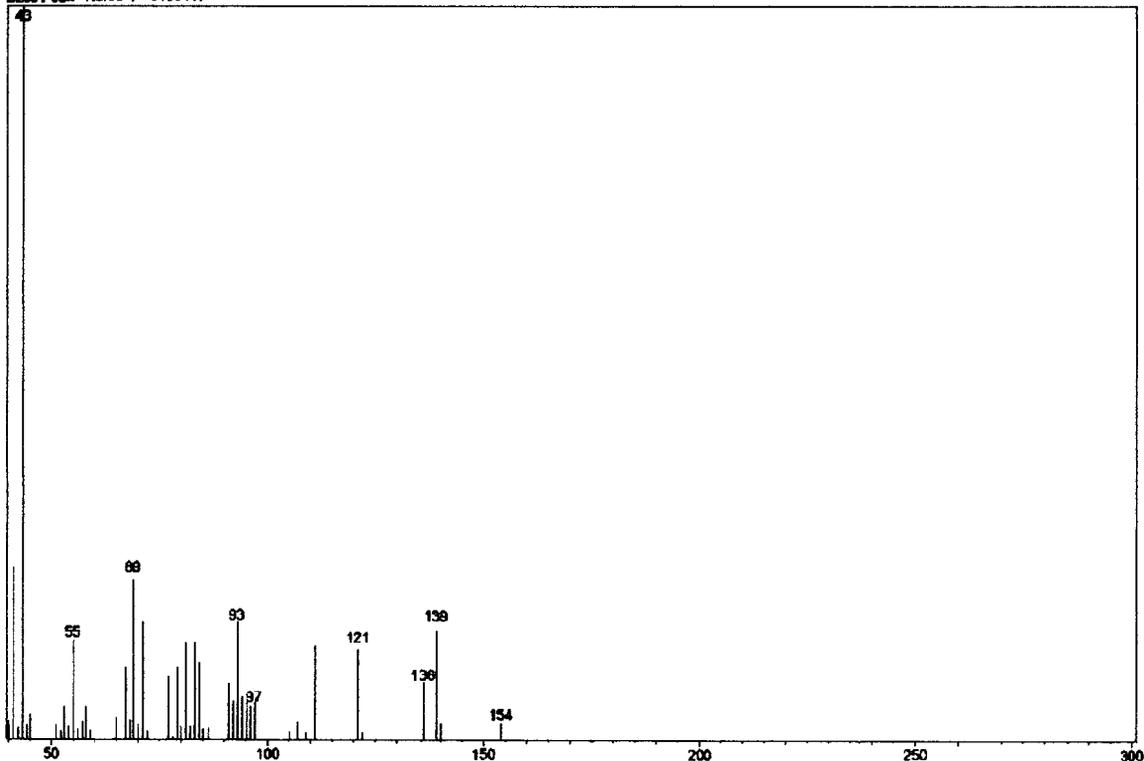
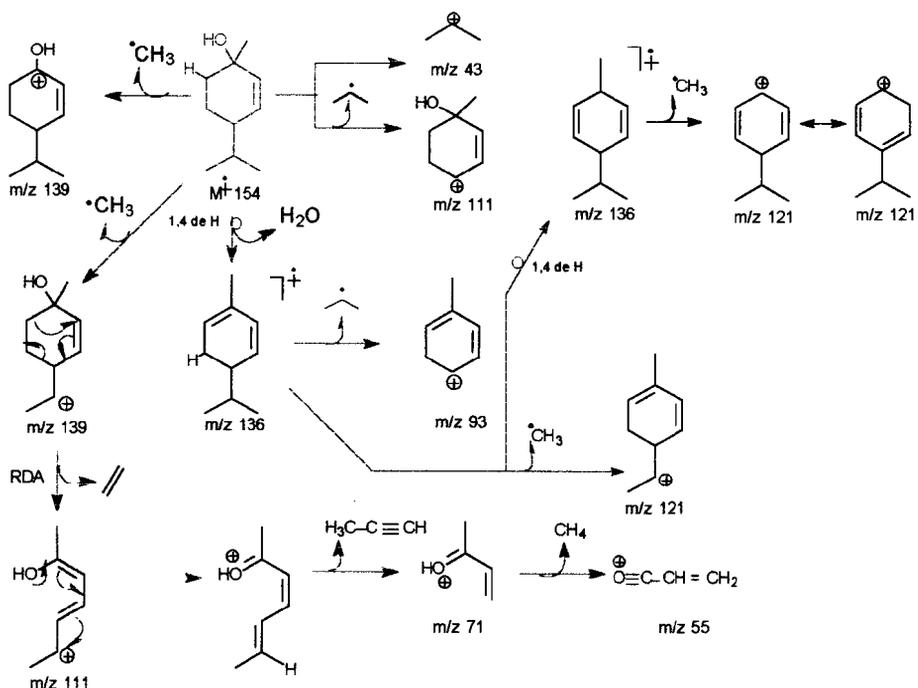


Figura 35 : Esquema de massas do *cis-p*-ment-2-en-1-ol.



Esquema 27 : Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do *cis-p*-ment-2-en-1-ol.

Scan # : (1657 - 1663)
 Mass Peak # 46 Ret. Time : (17.660 - 17.710)
 Base Peak : 71.05 (932436)

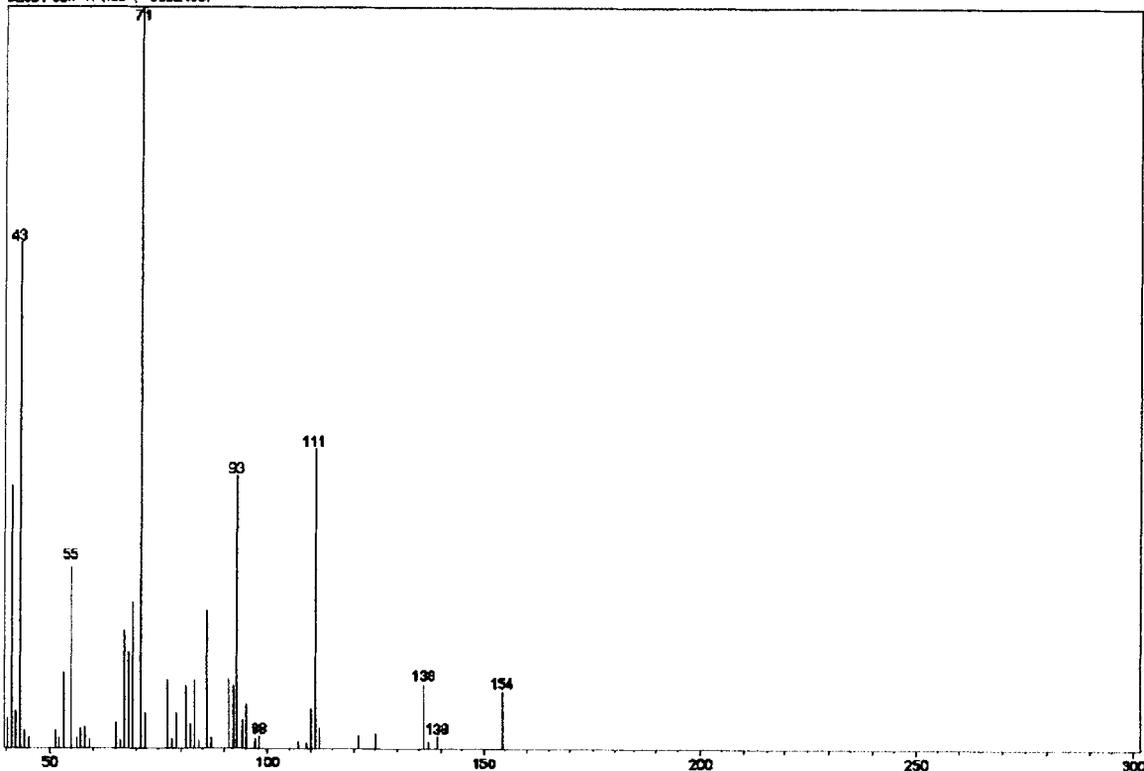
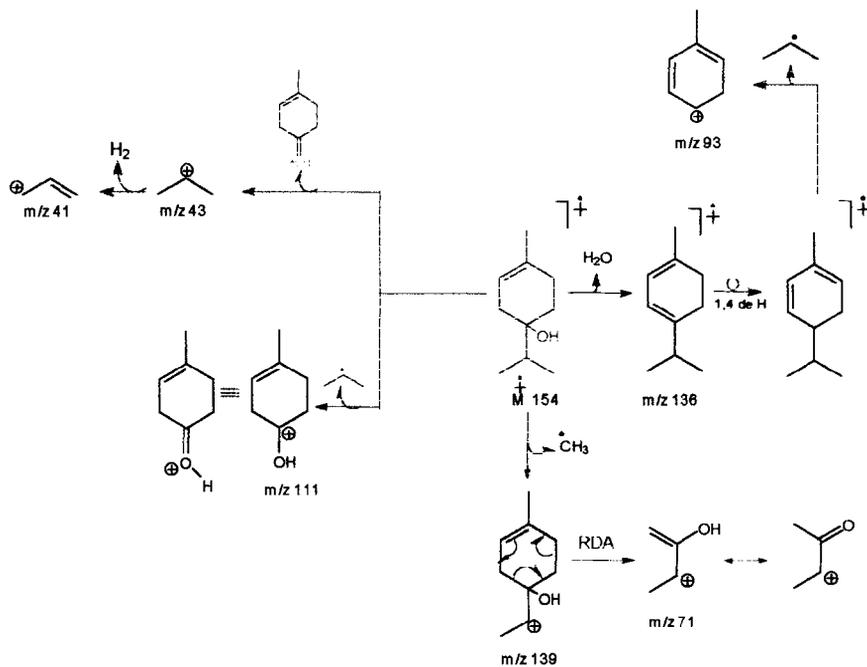


Figura 36 : Espectro de massas do terpin-4-ol.



Esquema 28 : Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do terpin-4-ol.

Scan #: (1919 - 1927) S.G. Scan#: (1892 - 1895)
 Mass Peak#: 42 Ret. Time: (18.163 - 18.260)
 Base Peak: 59 (15148672)

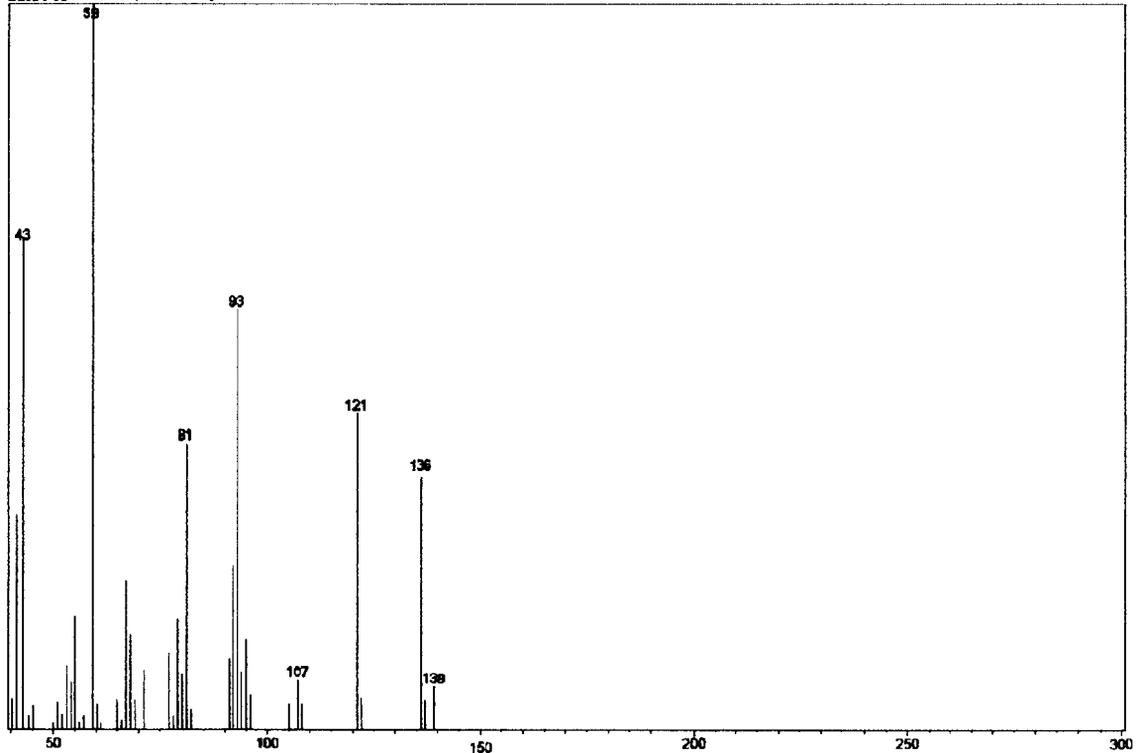
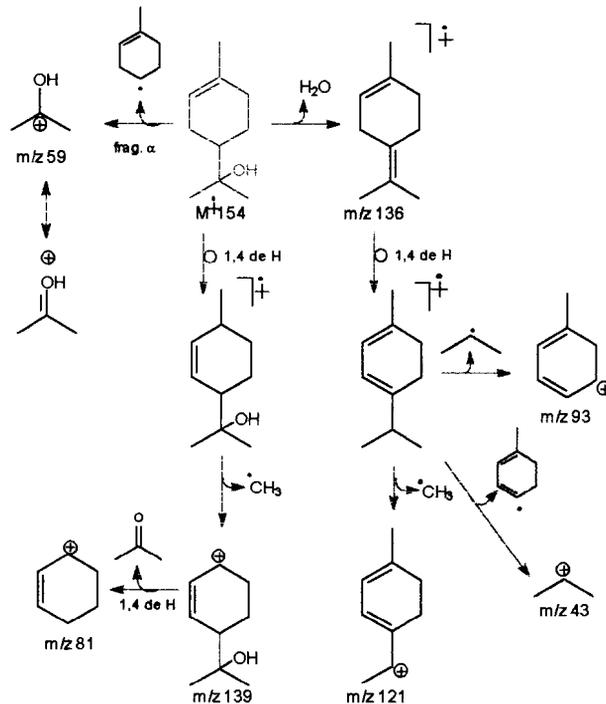


Figura 37 : Espectro de massas do α -terpineol.



Esquema 29 - Proposta para os principais íons de fragmentações de massas do α -terpineol.

**BIOSSÍNTESE PARA OS MONOTERPENOS
IDENTIFICADOS**

5- BIOSSÍNTESE PARA OS MONOTERPENOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. SPECIOSA* CAMB.

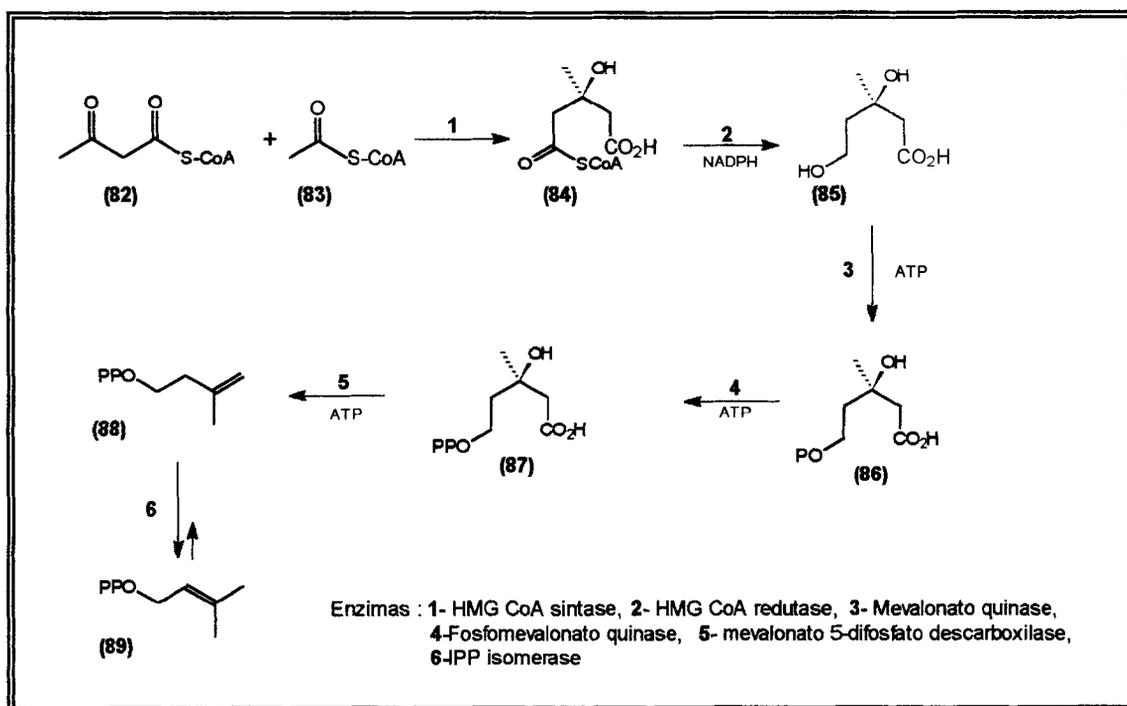
O estabelecimento das rotas biossintéticas para os produtos naturais do metabolismo secundário das plantas, nos últimos anos têm sido feito principalmente através do isolamento de enzimas que catalisam e promovem as etapas que levam a produtos específicos, auxiliado ainda pelos estudos com precursores marcados isotopicamente.

O fato da composição química do óleo essencial de *E. speciosa* Camb. apresentar abundância e variedade de monoterpenos, além de diferenciá-la da maioria das espécies de *Eugenia* relatadas pela literatura, despertou o interesse pela busca de correlações biossintéticas entre os constituintes do seu óleo essencial.

O caminho biossintético dos monoterpenos caracterizados no óleo essencial de *Eugenia speciosa* Camb. encontra-se bem definido e vastamente descrito na literatura⁷⁹⁻⁹⁰.

A condensação da Acetoacetil-coenzima A (82) e da Acetil-coenzima A (83), produz a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) (84), que após uma redução enzimática dá origem ao Ácido Mevalônico (MVA - ácido 3-metil-3,5-diidróxi-pentanóico) (85). O mevalonato é o precursor original dos terpenóides⁷⁹⁻⁹⁰, esquema 30.

Após sofrer algumas etapas reacionais enzimáticas, o MVA (85), produz dois isômeros: isopentenil pirofosfato (IPP) (88) que é convertido ao dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) (89), pela ação de uma isomerase⁷⁹⁻⁸².



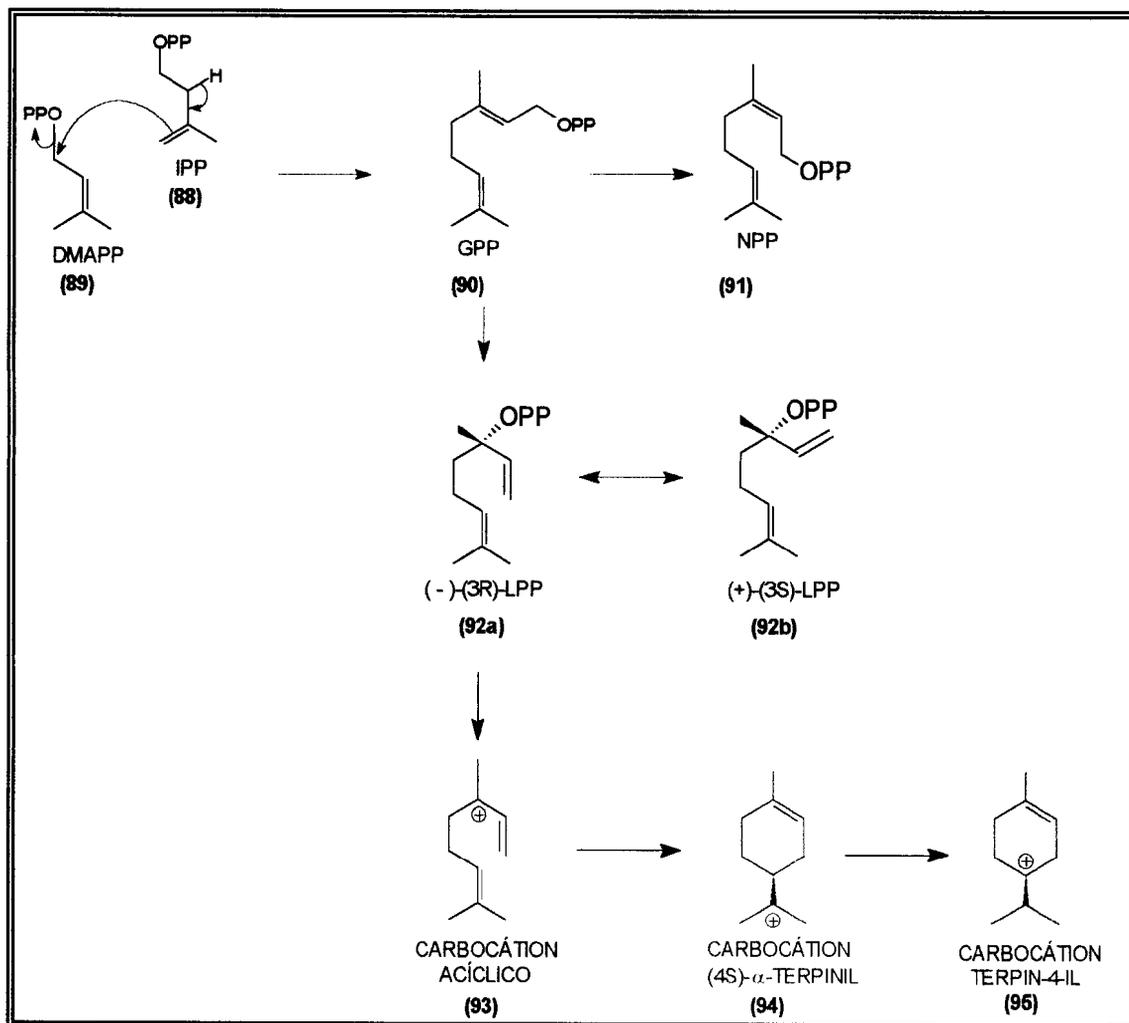
Esquema 30 - Biossíntese do MVA, IPP e DMAPP.

É interessante mencionar, que todo o processo biossintético é catalisado por enzimas existentes na planta, algumas dependentes de NADPH outras não, por vezes é necessário a presença de O_2 , sendo geralmente o ATP fornecedor das unidades de fósforo necessárias para as etapas de fosforilação, e em alguns casos os íons Mg^{+2} e Mn^{+2} atuam como cofatores enzimáticos.

Os monoterpenos (C_{10}) diferem dos sesquiterpenos (C_{15}), pela biossíntese a nível de geranyl pirofosfato (GPP) (90), o primeiro intermediário a surgir na rota

clássica que conduz aos monoterpenos⁸². Por reação de adição eletrofilica tipo cabeça-calda do DMAPP (89) ao IPP (88), ocorre a formação do GPP (90).

Dependendo da estereoquímica de isomerização inicial, o GPP produz o (+)-(3S)-linalil pirofosfato (LPP) (92b) ou o (-)-(3R)-linalil pirofosfato (LPP) (92a), que favorecem a ciclização do (4S)- α -terpinil (94) e este, produz outros intermediários importantes para formação da maioria dos monoterpenos cíclicos, esquema 31.



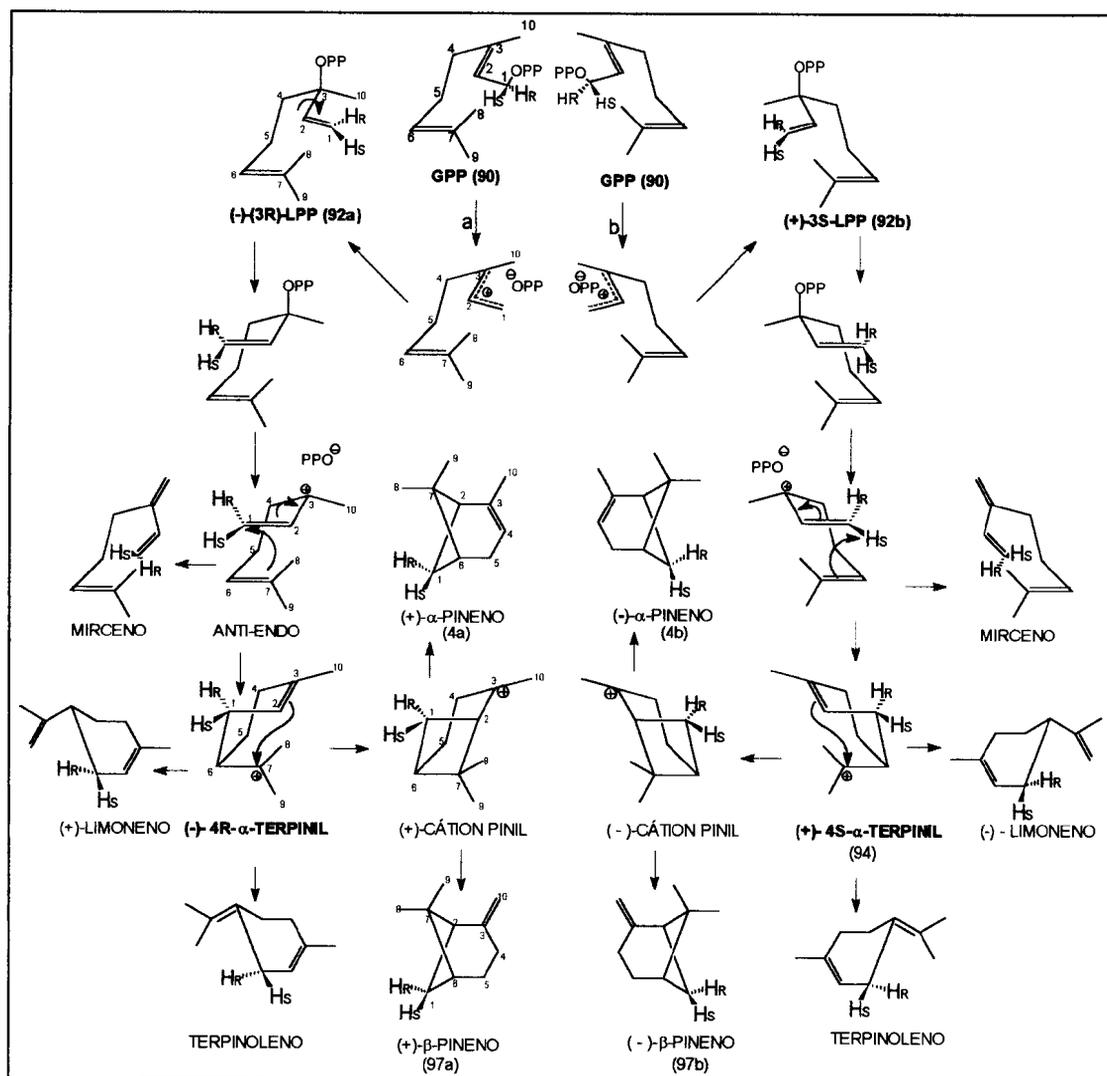
Esquema 31 - Precursores e intermediários na biossíntese de monoterpenos.

Extensos estudos têm proposto detalhes da biossíntese de monoterpenos, levando a uma formulação mecanística geral e a hipóteses estereoquímicas, que contam com a formação de protótipos desta classe de substâncias, que têm como precursor universal o GPP (90), que representa uma extensão da regra do isopreno, originalmente proposta por Ruzicka⁸³, a ionização inicial e o rearranjo suprafacial do GPP (90) conduz a formação dos isômeros alílico terciários (-)-3R-LPP (92a) e (+)-3S-LPP (92b). A rotação sobre a ligação C₂-C₃ do LPP, (91), seguida de ionização e ciclização do conformero cisóide *anti-endo* do intermediário linalil conduz a formação dos cátions (4R) (96) ou (4S)- α -terpinil (94), respectivamente. Este último intermediário pode ser transformado em vários monoterpenos cíclicos ou bicíclicos, através das apropriadas combinações de ciclizações eletrofílicas e/ou rearranjos seguidos de desprotonação ou captura de um nucleófilo externo, tal como a água ou o íon pirofosfato origina^{79,82}, esquema 32.

Estudos demonstraram que são raras as exceções onde GPP (90) é mais eficiente como substrato que o NPP (91) na biossíntese de monoterpenos cíclicos, devido aos fatores necessários para ciclização descritos acima^{79,82}.

Na biossíntese de α - e β -pinenos, Croteau et al^{84,85} consideram que a conversão do GPP (90) em (+)- α -pineno (4a) e (-)- β -pineno (97b), acontece pela isomerização inicial do substrato (-)-3R-LPP (92a) a (+)-3S-LPP (92b), com subsequente ciclização do conformero *anti-endo* destes intermediários. Isto ocorre com uma nítida retenção de configuração em C₁ do precursor GPP (90).

Os resultados indicam que a configuração C_1 do substrato foi retida na transformação enzimática de (+) e (-)-pinanos, que é perfeitamente consistente com a isomerização *syn* do GPP para LPP, com a rotação transóide para cisóide e, por último a ciclização *anti-endo*, esquema 32.

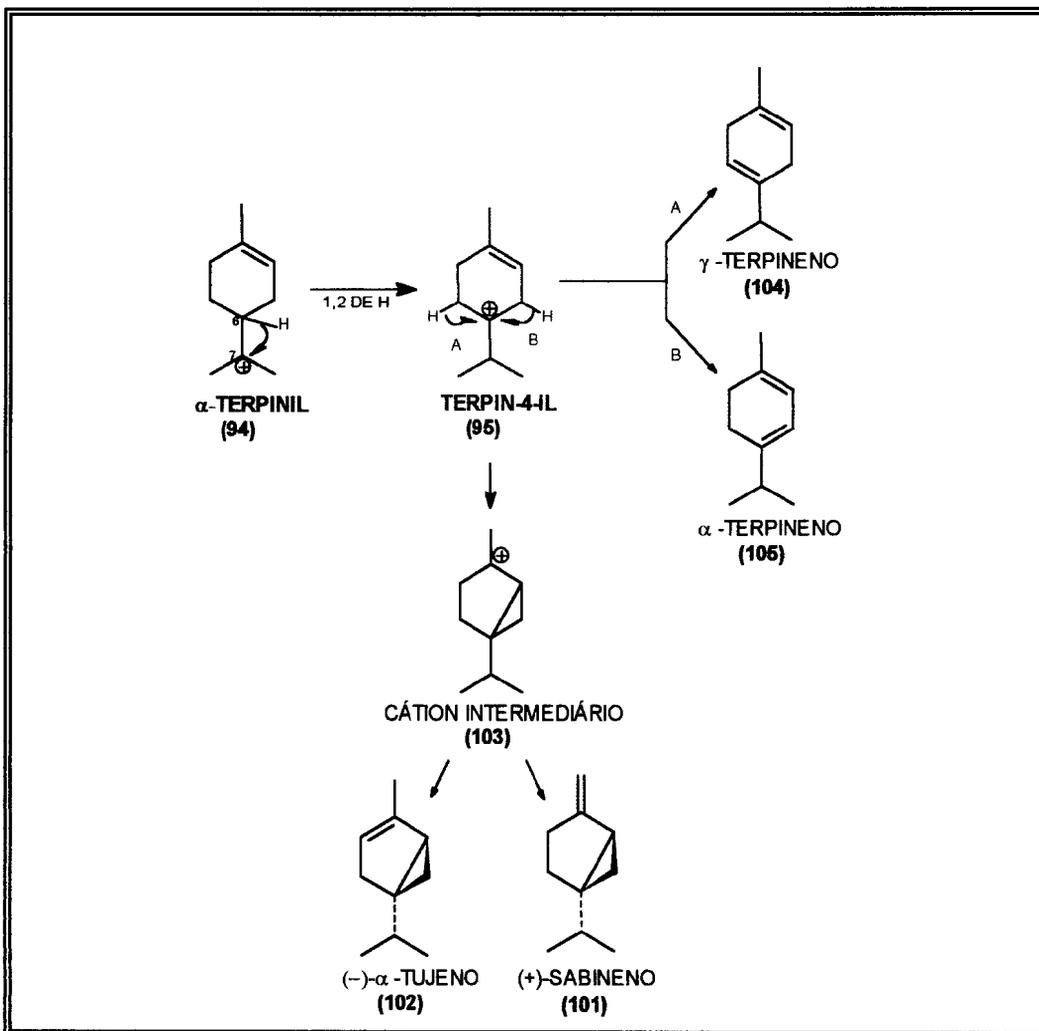


Esquema 32 – Modelos conformacionais do GPP que conduzem à formação de alguns monoterpenos hidrocarbonetos enantioméricos, através da ciclase I (caminho a) e da ciclase II (caminho b).

Um estudo *in vitro* da velocidade de formação dos α - e β -pinenos com o GPP isotopicamente marcado, confirmou que eles são formados a partir de um intermediário comum, o cátion pinil (98), pela ação de uma simples enzima ciclase. Estudos enzimáticos comprovaram que a enzima (-)- α -pineno ciclase transforma GPP em uma mistura de 40% de (-)- α -pineno (4b) e 60% de (-)- β -pineno (97b).

Experimentos demonstraram^{85,86} aumento na proporção de β -pineno quando [4-²H₂,1-³H] GPP foi usado como precursor, já o aumento na produção de α -pineno ocorreu quando [10²H₃,1-³H] GPP foi utilizado como precursor. Este resultado é consequência do efeito isotópico do deutério, durante a perda de um próton do cátion pinil marcado, afetando a velocidade de formação de cada produto. A formação do (-)- β -pineno (97b) requer a perda de H-7, que originalmente é o H-10 no GPP (90), esquema 33.

Efeitos análogos foram observados em *Pinus contorta*, onde a atividade de uma única enzima conduziu a formação de uma mistura de (-)- α -felandreno (99) e (-)- β -felandreno (100). Resultados mostraram que é a felandreno ciclase a responsável pela formação dos dois isômeros, que apresentam como intermediário comum o carbocátion felandril, após sofrer um rearranjo 1,2 ou 1,3 de hidreto⁸², esquema 33.

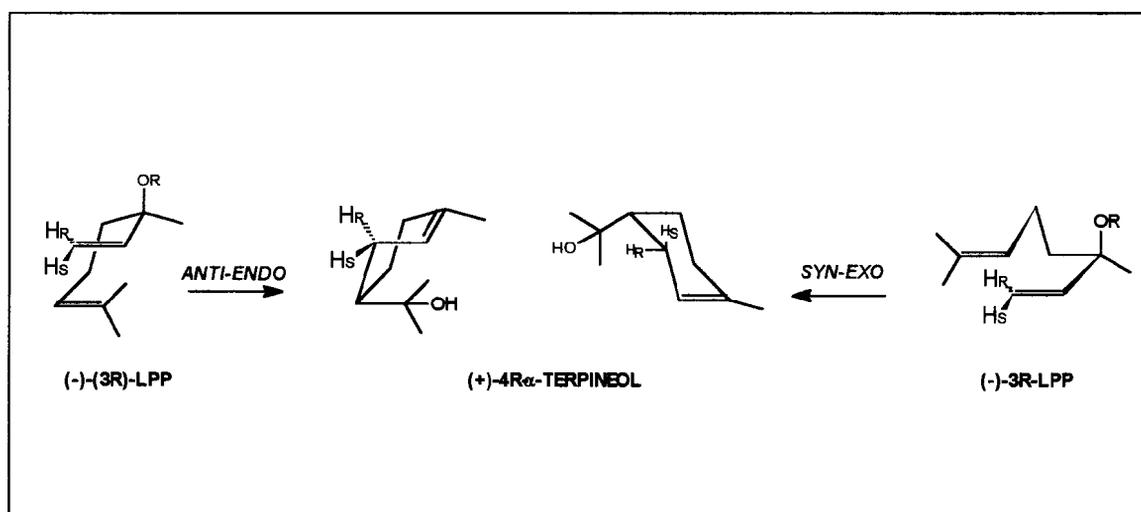


Esquema 34 - Formação dos tujanos, sabinanos, γ -terpineno e α -terpineno pela ação enzimática.

A enzima γ -terpineno sintase conduz a formação do γ -terpineno (104), através das reações que envolvem um rearranjo 1,2 de hidreto (C₆-C₇) do carbocátion 4S- α -terpinil (94) a um intermediário terpin-4-il (95), que é produzido pela perda de um próton do γ -terpineno (104) e outras olefinas relacionadas, ou pode ainda sofrer ataque eletrofílico sobre a dupla ligação do cicloexeno gerando

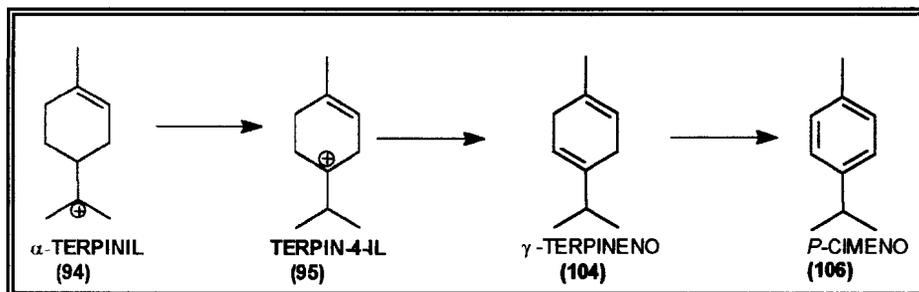
o anel ciclopropânico do sabineno e produtos relacionados⁸⁸, mostrados no esquema 34.

A solvólise dos ésteres de (3R)-LPP leva a produção do (4R)- α -terpineol, com grande excesso de um enantiômero⁸², e a ciclização pode ser efetuada tanto pelo processo *syn-exo*, quanto pelo *anti-endo*, estes estão representados no esquema 35.



Esquema 35 - Formação do α -terpineol pela solvólise de ésteres do 3R-LPP.

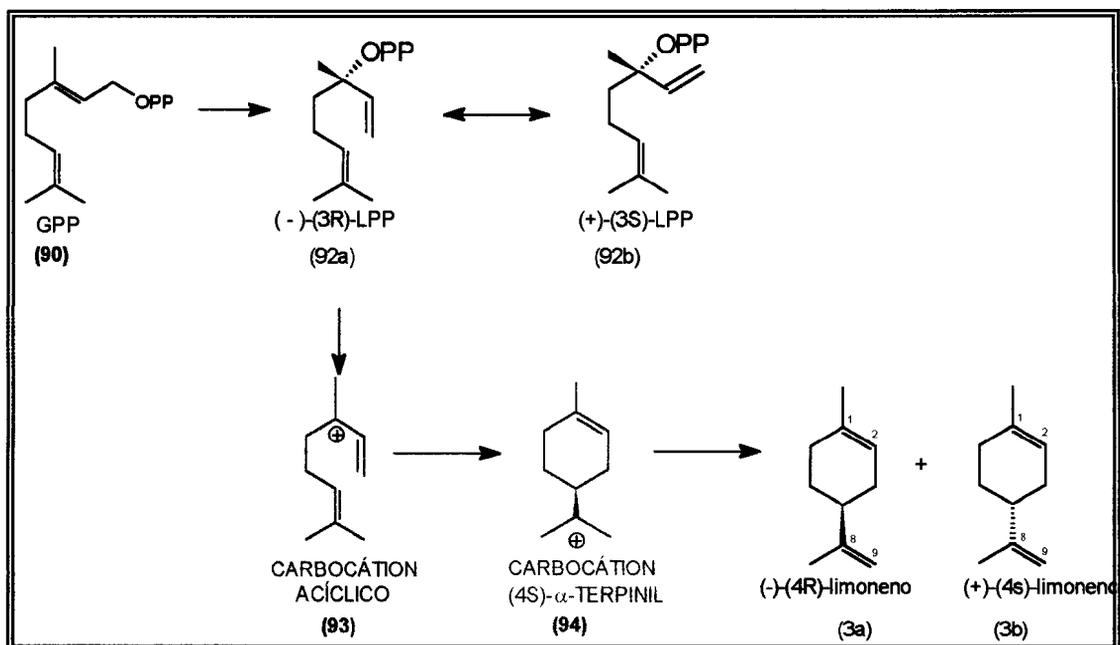
Granger et al⁸⁹, propuseram que os monoterpenos aromáticos são derivados via aromatização não enzimática do γ -terpineno. Em 1978, Croteau e Polouse⁹⁰ obtiveram resultados da incorporação de γ -[6-³H] terpineno em folhas jovens de tomilho e propuseram que o γ -terpineno (104) é o precursor imediato na biossíntese do *p*-cimeno (106) e de outros monoterpenos aromáticos, com forte evidência que esta conversão é enzimática, esquema 36.



Esquema 36 - Conversão enzimática do γ -terpineno a *p*-cimeno.

Das folhas de *Thymus vulgaris* foi purificada⁹⁰ a enzima γ -terpineno ciclase, que possui habilidade de ciclar o GPP (111) e produzir pequenas quantidades de α -tujeno (102), mirceno (2), α -terpineno (105), limoneno (6), linalol (1), α -terpineol (107) e terpin-4-ol (108). Todos estes monoterpenos apareceram como co-produtos da seqüência reacional que conduz ao γ -terpineno (104).

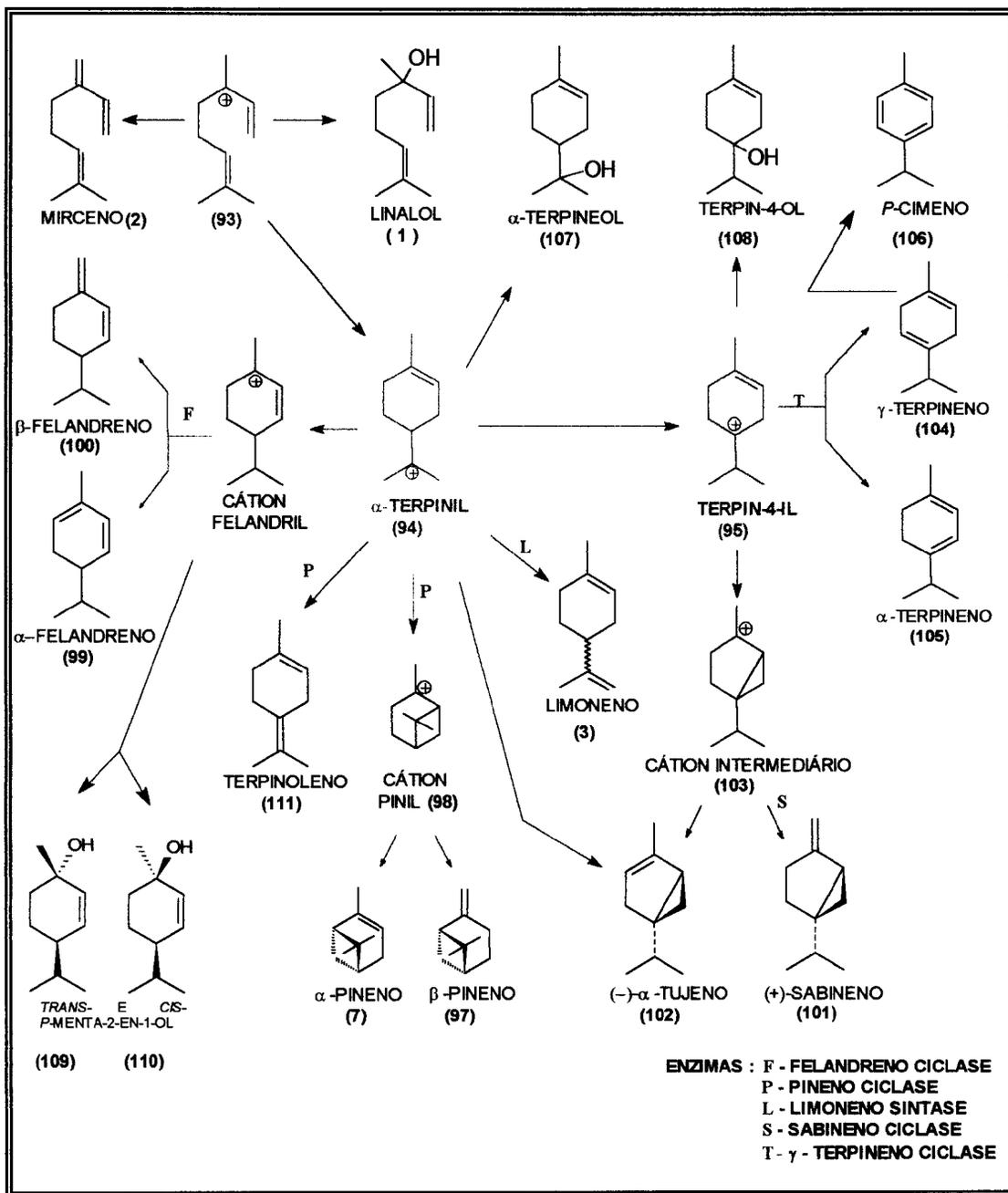
Transformações enzimáticas do GPP (90) em monoterpenos cíclicos simples, por exemplo o (-)-(4S)-limoneno (3a), já estão bem estabelecidas⁸². Por intermédio da marcação isotópica, estudos demonstraram que a biossíntese do limoneno, em *Citrus sinensis* é realizada por uma única ciclase, provavelmente via carbocátion α -terpinil. Inicialmente ocorre a isomerização do GPP a LPP seguido da ciclização do carbocátion acíclico (93), gerando o (4S)- α -terpinil (94), o qual perde um próton para produzir limoneno (3a), esquema 37



Esquema 37 – Produção de limoneno por atuação da limoneno sintase sobre o GPP.

Recentes estudos⁹¹ relatam o isolamento e a caracterização de enzimas (4S)-limoneno sintase, localizada em filamentos (pêlos) glandulares de ambas espécies de *Mentha piperita* e *M. spicata*. Ambas enzimas são monoméricas, com propriedades idênticas de transformar GPP (90) principalmente a limoneno (exclusivamente com configuração 4S) e em pequenas quantidades de mirceno (2), α -pineno (4) e β -pineno (97).

Um resumo com as principais rotas biossintéticas que originam os monoterpenos caracterizados na espécie *E. speciosa* Camb., pode ser visto no esquema 38.



Esquema 38— Rotas biossintéticas dos monoterpenos caracterizados em *E. speciosa* Camb.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

A reunião das técnicas utilizadas neste trabalho, permitiu a identificação de 28 componentes, cerca de 96% da composição química do óleo essencial de *E. speciosa* Camb. Dentre os compostos identificados, os monoterpenos foram os mais abundantes com 85% de área relativa no cromatograma e os sesquiterpenos apareceram em apenas 15% de área relativa, todos compostos apresentaram esqueletos terpênicos originados do geranyl pirofosfato.

Tal perfil diferencia este óleo essencial da maioria daqueles relatados para este gênero, onde há na maioria das vezes predominância de compostos sesquiterpênicos. Porém, em relação aos compostos monoterpênicos foi observada uma relação qualitativa com os óleos essenciais de *E. javanica* Lamk. e *E. brasiliensis* Lam.

Na análise por CGAR foi constatada uma melhor separação dos componentes e das regiões na coluna polar de fase 100% polietilenoglicol, porém a comparação dos índices de Kováts obtidos nesta fase com os da literatura é muito discrepante. Este fato já não ocorreu quando utilizou-se a coluna pouco polar de fase 5%fenil 95%dimetilpolisiloxano.

CGAR, CGAR-EM, IK, comparações com bibliotecas de espectros de massas e com a literatura, bem como as propostas de fragmentações de massas continuam sendo as melhores técnicas para identificação de componentes de óleos essenciais utilizadas ultimamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Craveiro, A.A. ; Fernandes, A.G. et al (1981) : *Óleos essenciais de plantas do Nordeste*. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará.
- 2- Magalhães, M.T. (1985) Composição Química de Óleos Essenciais. *IN: Simpósio de Óleos Essenciais, I*, São Paulo, Campinas, Fundação Cargil, p. 21-25
- 3- Gottlieb, O.R. (1985) Evolução e Função de Óleos Essenciais *IN: Simpósio de Óleos Essenciais, I*, São Paulo, Campinas, Fundação Cargil, 175-183
- 4- Craveiro, A.A.; Machado, I.L. (1986) : *Ciência Hoje*, 4(23), 55-63.
- 5- Koketsu, M.; Gonçalves, S.L.(1991) *Óleos Essenciais e sua Extração por Arraste a Vapor*, EMBRAPA – CTAA, 24p.
- 6- Secretaria de Vigilância Sanitária (Ministério da Saúde), Portaria Nº 645 de 16 de dezembro de 1997.
- 7- Torquillo, H. de S. (1997) : *Dissertação de mestrado*, IQ-UFRJ.
- 8- Júnior, A.J. de S.(1985) Aspectos da Produção de Óleos Essenciais Cítricos *IN: Simpósio de Óleos Essenciais, I*, São Paulo, Campinas, Fundação Cargil, 175-183
- 9- Ward, B.B.; Courtney, K.J. et al (1997) : *J. Chem. Ecol.*, **23** (11), 2583-2598.
- 10- Scutareanu, P.; Drukkerbas et al (1997) : *J. Chem. Ecol.*, **23** (10), 2241-2270.
- 11- Ogihara, K ; Munesata K. et al (1989) : *Phytochemistry*, **28** (4), 1061-1067.
- 12- Dormont, L.; Roques, A. et al (1997) : *J. Chem. Ecol.*, **23** (10), 2261-2274.
- 13- Nishida, R. et al (1997) : *J. Chem. Ecol.*, **23** (10), 2275-2285.

- 14- Burden, R.S. E Kemp, M.S. (1984) : *Phytochemistry*, **23**, 2777-2779.
- 15- Teixeira, V.L. et al (1991) : *Química Nova*, **14** (2), 83-90.
- 16- Craveiro, A.A. e Queiroz, D.C. (1993) , *Química Nova*, **16** (3), 224-228.
- 17- Rose, J.(1995): *O livro da aromaterapia : Aplicações e Inalações*. Rj: Ed. Campus, 396p.
- 18- Ahn, Y.J. et al (1998) : *J. Chem. Ecol.*, **24** (1), 81-90.
- 19- Gutiérrez, C. et al (1997): *J. Chem. Ecol.*, **23** (6), 1641-1650.
- 20- Zou, J. (1997) : *J. Chem. Ecol.*, **23** (10), 2313-2326.
- 21- Chaib, A. ; Ababouch, L. H. et al(1997) : *Food Microbiology*: **14**, 161-174.
- 22- Adams, S.; Kunz, . et al (1996) : *J. Essent. Oil Res.*, **8**, 535-540.
- 23- Bishop, C.D. ; Thornton, L. H. et al (1997) : *J. Essent. Oil Res*, **9**, 77-82.
- 24- Chalchat, J.C.; Garry, R.P. (1997): *J. Essent. Oil Res*, **9**, 67-75.
- 25- Elaraki, A.T.; Lattaoui, N. et al (1993) : *J. Essent. Oil Res*, **5**, 45-53.
- 26- Domokos, J. ; Héthely, E. et al (1997): *J. Essent. Oil Res*, **9**, 41-45.
- 27- Valentin, A. ; Pélissier, Y. et al (1995) : *Phytochemistry*, **40** (5), 1439-1442.
- 28- Nazario, G. (1985) : Toxicidade de óleos essenciais e derivados - *IN: Simpósio de Óleos Essenciais*, I, São Paulo, Campinas, Fundação Cargil, p. 155-161.

- 29- Moretti, M.D.L.; Peana, A. T. et al (1997) : *J. Essent. Oil Res*, **9**, 199-204.
- 30- Kourounakis, A.P.; Rekka, E.A. et al (1997) : *J. Pharm. Pharmacol.* **49**, 938-942.
- 31- Kunta, J.R.; Goskonda, V.R. et al (1997) : *J. Pharm. Sciences*, **86** (12), 1369-1373.
- 32- Mattos, M.C.S.; Kover, W.B. (1991): *Química Nova*, **14** (2), 91-97.
- 33- Kiefer, H. (1985) : Exploração de Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais. *IN: Simpósio de Óleos Essenciais*, I, São Paulo, Campinas, Fundação Cargil, 15-20.
- 34- Maia, J.G.S.; Silva, M.L. et al (1987) : *Química Nova*, **10** (3), 200-204.
- 35- Barros, C. B. (1986): *Óleos Essenciais Cítricos do Brasil*, 2ª ed. ver. atual. Campinas, Fundação Cargil, 45p.
- 36- Lima, M.P.M.; Bruni, R.R.G. (1994) : *Reserva Ecológica de Macaé De Cima* : Nova Friburgo - RJ : Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares / Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jardim Botânico-RJ.
- 37- Fontenelle, G.B. ; Costa, G.C. et al (1994) : *Bot. J. Linn. Soc.*, **115**, 111-133.
- 38- Henriques, A. T.; Sobral, M.E. et al (1993) : *J. essent. Oil Res.*, **5** ,501-505.
- 39- Adebajo, A. C. et al (1989) : *Fitoterapia*, **60** (5), 451-453.
- 40- Weyerstahl, P.; Adeoye, A. O. et al (1988) : *Planta Médica*, 546-549.
- 41- Gopalakrishnan, M.; Menon, N. et al (1982) : *J. Food Science and Technol.*, **19**, 190-192.
- 42- Maia, J.G.S; Zoghgi, M.G.B. et al (1997) : *J. Essent. Oil Res*, **9** ,337-338.

- 43- Duarte, A. A. (1997) : *Dissertação de Mestrado*, UFRRJ.
- 44- Martins, R.C.C.(1998) : *Dissertação de Mestrado*, UFRRJ.
- 45- Bello, A. ; Rodrigues, M.L. et al (1995) : *J. Essent. Oil Res*, 697.
- 46- Suksamrarn, A.; Brophy. J.J. (1987) : *Flav. and Fragr. Journ.*, **2**, 37-40.
- 47- Lee, P.L. ; Hunter, G.L.K. (1975) : *J. Food Science*,**40** ,421-422.
- 48- Craveiro, A. A. ; Andrade, C.H.S. et al (1983) : *J. Nat. Prod.*, **46**, 591-592.
- 49- Vera, R. R. ; Laurent, J.S. et al (1994) : *J. Essent. Oil Res*, **6** ,155-159.
- 50- Legrand, D.C. E Klen, R.M. (1977) : *Flora Ilustrada Catarinense - Mirtáceas*
Suplemento I - I Parte - As Plantas, p. 111-114 .
- 51- Cronquist, A. (1988) *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. 2^a
ed. The New York Botanical Garden, New York.
- 52- Ciola,R. Análise Instrumental Aplicada à Análise dos Óleos Essenciais *IN:*
Simpósio de Óleos Essenciais, I, São Paulo, Campinas, Fundação Cargil,
27-71
- 53- Collins, G.L.B.; Braga,G.L. et al (1995): *Introdução a Métodos*
Cromatográficos . 6^a ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, p.141-180.
- 54- Lanças, F.M. ; Mcnair, H.M. (1983) : *Quím. Nova*, **1**, 6-14.
- 55- Adams, R.P. (1995) : *Identification of Essential Oil Components by Gas*
Chromatography / Mass Spectroscopy, Carol Steam. Illinóis, USA.
- 56- Davies, N.W.(1995) : *J. Chromatog.*, **503**, 1-24.
- 57- Lemberkovics, É. (1984) : *J. Chromatog.*, **286**, 293-300.
- 58- Píryl, J.; Príbela, A. et al (1995) : *Food. Chem.*, **54**, 73-77.
- 59- Ramaswami, S.K. ; Bryscese, P. et al (1986) : *Flav. and Frag. J.*, 951-960.

- 60- Loayza, I. ; Abiyder, D. et al (1995) : *Phytochemistry*, **38**(2), 381-389.
- 61- Adams, R.P. ; Zhang, Z.S. et al (1996) : *J. Essent. Oil Res*, **8**, 53-56.
- 62- Nieves, L.S. ; Bartley, J.P. (1996) : *Flav. and Frag. J.*, **11**, 49-51.
- 63- Weyerstahl, P. ; Weyerstahl, H.C. et al (1994) : *Flav. and Frag. J.* , **9**, 179-186.
- 64- Weyerstahl, P. ; Christiansen, C. (1992) : *J. Essent. Oil Res*, **4**, 439-445.
- 65- Wong, K.C. e Chu, S.g. (1996) : *J. Essent. Oil Res*, **8**, 545-547.
- 66- Wong, K.C. e Tie, D.Y. (1995) : *J. Essent. Oil Res*, **7**, 225-227.
- 67- Brophy, J.J. ; Goldsack, R.J. e Forster, P.I. (1997) : *Flav. and Frag. J.*, **12**, 103-108.
- 68- Noronha, R.G. e Abreu, P.M. (1997) : *Flav. and Frag. J.*, **12**, 79-83.
- 69- Jean, F.I. ; Loayza, I. ; David, A. et al (1995) : *Phytochemistry*, **38**(2), 381-389.
- 70- Goydou, E.M. ; Randriamiharisoa, R. e Bianchini, J.P. (1986) : *J. Agric. Food Chem.* , **34**, 481-487.
- 71- Oltra, H.Y. ; Barrero, A.F. e Altarejos, J. (1993) : *Flav. and Frag. J.* , **8**, 185-189.
- 72- Chyau, C.C. ; Mau, J.L. e Wu, C.M. (1996) : *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1096-1099.
- 73- Ramaswami, S.K. ; Brixese, P et al (1996) : *Flav. and Frag. J.*, 951-955.
- 74- Sakai, T. ; Moarse, H. et al (1967) *J. Agric. Food Chem.* , **15**(6), 1070-1071.
- 75- Nahrstealt, A. ; Engel, R. et al (1995) : *J. Essent. Oil Res.* , **7**, 473-484.
- 76- Farkas, P. Píry, Y. et al (1995) : *Food. Chem.* , **54**, 73-77.

- 77- Beek, T.A.V. ; Kleis, R. et al (1989) : *Phytochemistry*, **28**(7), 1009-1911.
- 78- Sbelman, C. e Schltge, W. (1995) : *J. Essent. Oil Res.* , **7**, 117-121.
- 79- Dewick, P.M. (1995) : *Nat. Prod. Rep.*, 507-533.
- 80- Bach, T.J. (1995) : *Lipids*, **30**(3), 191-202.
- 81- Banthorpe, D.V. And Branch, S.A. (1987) : *Nat. Prod. Rep.*, 157-173.
- 82- Croteau, R. (1987) : *Chem. Rev.*, **87**, 929-954.
- 83- Ruzicka, L.; Eschemmoser, A. et al (1953): *Experientia*, **9**, 357-367.
- 84- Croteau, R.; Gambriel, H. (1984):*J. Biol. Chem.* **259**(2), 740-748.
- 85- Croteau, R. ; Satterwhite, D.M. et al (1989): *J. Biol. Chem.* ,**264**(4), 2075-2080.
- 86- Croteau, R.; Gambriel, H. (1982): *J. Biol. Chem.* **257**(5), 235-2342.
- 87- Karp, F. et al (1990) : *Arch. Biochem. Biophys.*, 276, 219.
- 88- Alonso, W.R. And Croteau, R. (1991) : *Arch. Biochem. Biophys.*, 286(2), 511-517.
- 89- Granger,R. ; Passet, J. et al (1964) : *C.R. Acad. Science (Paris)*, **258**, 5539-5541.
- 90- Croteau, R. ; Polouse, A. J. (1978) : *Arch. Biochem. Biophys.*; **187**(2), 307-314.
- 91- Alonso, W.R. et al (1992) : *J. Biol. Chem.* ,**267**(11), 7582-7587.
- 92- Aragoni, D. ; Cane, D.E. et al (1993) : *Phytochemistry*, 32(3), 623-631.
- 93- Gottlieb O.R. ; Braz. R. (1975) : *Espectrometria de Massas* , Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas.

94- Gottlieb O.R. ; Braz. R. ;Craveiro, A. A. ; Alencar, J.W. (1983) : Introduccion a la espectrometria de masa de sustancias organicas. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, DC., 139p.