

**ESTUDO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Eugenia nitida* Camb. (Myrtaceae)
MANGA-DO-BREJO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ROBERTO CARLOS CAMPOS MARTINS

SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFA. DRA. LEILA VILELA ALEGRIO

1998

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

**ESTUDO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eugenia nitida* Camb. (Myrtaceae)**

ROBERTO CARLOS CAMPOS MARTINS

(Bacharel em Química)

SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA:

Dra. LEILA VILELA ALEGRIO

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 Mestre em Química
Orgânica.

SEROPÉDICA - RJ

MARÇO DE 1998

TÍTULO DA TESE

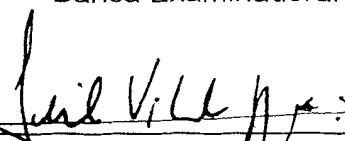
**ESTUDO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Eugenia nitida* Camb. (Myrtaceae)**

AUTOR

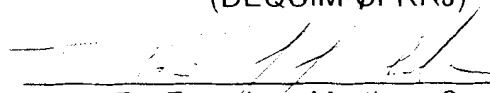
ROBERTO CARLOS CAMPOS MARTINS

APROVADA EM: ___/___/___

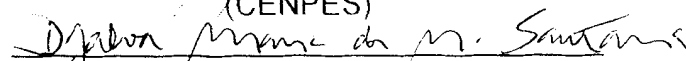
Banca Examinadora:




Profa. Dra. Leila Vilela Alegrino - Presidente
(DEQUIM-UFRRJ)



Dr. Francisco Martinez Concha
(CENPES)



Profa. Dra. Djalva Maria da Nóbrega Santana
(IT-UFRRJ)



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

*Este trabalho é dedicado
primeiramente a Deus por tudo que nos
concedeu, e aos meus pais, Alcindo e
Marta José e irmão Alcindo Junior
oelo que hoje sou e umanho atri.*

Na ausência dos fatos, o diabo é o espírito do sábio.

Allan Kardec

BIOGRAFIA

Roberto Carlos Campos Martins nasceu em 21 de setembro de 1972 em Belém-PA, filho de Alcindo da Silva Martins e Maria José Campos Martins.

Realizou o segundo grau técnico de Mineração na Escola Técnica Federal do Pará, em Belém, concluído em 1990 e em 1991, foi aprovado no vestibular da Universidade Federal do Pará (UFPA) para o curso de Química-Bacharelado.

Durante a graduação (1991-1995), atuou como vice-presidente e *presidente* do Centro Acadêmico de Química (CALBQUI) da UFPA nos anos de 1992 e 1993, respectivamente. Também atuou como bolsista de Iniciação Científica do CNPQ no período de dezembro de 1993 a fevereiro de 1996 no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFPA, sob a orientação da professora doutora Mara Sílvia Pinheiro Arruda, no projeto Investigação Fitoquímica de Plantas da Amazônia.

AGRADECIMENTOS

À prot^a. Dra. Leila Vilela Alegrio, pela excelente orientação, apoio, profissionalismo exemplar e pela grande amizade.

Aos drs. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy e Rosane Nora Castro, co-orientadores, pela colaboração, sugestões, auxílio sempre que possível e, principalmente pela amizade.

À profa. Dra. Aurea Echevarria Aznar, pela colaboração necessária, pela amizade e carinho.

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

Ao corpo docente do CPGQO: Marco Edilson Lima, João Batista Neves, Aurélio Baird, Anselmo A. Morais, Mário Geraldo de Carvalho, Vitor Marcos Rumjanek, pela atenção, sugestões e ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários Osmar, Reginaldo, Maurício, Rubens, Fábio, Eli, Carlão por toda a ajuda no decorrer do curso e pela amizade.

Ao prof. Dr. Gerson Luiz Coelho (IT-UFRRJ) pela cessão do cromatógrafo gasoso para as análises.

À Helena Torquilha, pelos espectros de massas e, principalmente pelas sugestões e pela amizade.

À Central Analítica do NPPN-UFRJ, pelas análises de CGAR-EM.

À Ana Paula dos Santos, pela presença amiga sempre constante e pelo carinho, muito úteis no decorrer deste trabalho.

Ao amigo André José Gabriel, por tudo, em especial pela confiança depositada no meu trabalho e incentivo nos momentos de desânimo.

À amiga e quase irmã Andréa Luzia de Souza, pela acolhida, pela confiança e por ser a responsável pelos momentos mais agradáveis durante o curso.

Às companheiras de orientação Denise e Luciana, pela amizade infinita que teve seu início nestes dois anos de convivência.

À Áurea Tatagiba e Frances Regiane, exemplos de competência, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório da sala 38.

Às amigadas que fiz na UFRRJ nestes dois anos : Geize, Daniela, Carlão, Heloísa, Paulo Afonso, Márcia Cristina, Edson, Raquel Vega, Noerna, Andressa, Rosane, Janaína, Lucinha, Margareth Rose, Astrid e Jadier pela excelente acolhida e ótimos momentos.

À minha família, pelo enorme apoio e incentivo.

À EMBRAPA/CTAA/ATOL pelo auxílio técnico.

Ao CNPQ, pela bolsa concedida.

ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	VI
ÍNDICE DE ESQUEMAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
ABREVIATURAS	XI
1 -INTRODUÇÃO	2
1.1- Os Óleos essenciais	2
1.2 - Cromatografia gasosa	5
1.3 - O Índice de Retenção como critério de identificação de Compostos Orgânicos	7
1.4 - Os óleos essenciais e a família Myrtaceae	17
1.4.1 - O estudo químico do gênero Eugenia	18
1.4.2 - O gênero Eugenia no Brasil	21
1.4.3 - Características da espécie estudada	21
2 - OBJETIVOS	23
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 - Análise do óleo essencial de <i>Eugenia nitida</i> Camb.	28
3.2 - As fragmentações de massas dos compostos identificados	38

3.2.1 - Origem dos fragmentos de massas mais observados entre os constituintes químicos de <i>E. nitida</i> Camb	39
3.2.2 -Proposta para a diferenciação entre o shyobunol e o 4 β -hidroxi-germacra-(10)5-dieno por fragmentação de massas	48
3.2.3 - Discussão dos índices de Retenção	85
4 - MATERIAL E MÉTODOS	104
4.1 - Coleta e identificação do material botânico	104
4.2 - Cálculo da umidade	105
4.3 - Análise cromatográfica do óleo essencial	105
4.4 - Análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massas do óleo essencial	107
5 - BIOSÍNTESE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. nitida</i> Camb.	110
5.1 - Origem das unidades precursoras dos constituintes terpenóides	110
5.2 - Propostas para a ciclização do FPP	113
5.3 - Biossíntese dos derivados do <i>Z,E</i> -Farnesil Pirofosfato e do nerolidil pirofosfato	116
5.4 - Biossíntese dos derivados do <i>E,E</i> - Farnesil Pirofosfato	123
6 - CONCLUSÃO	137
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1 : Unidades precursoras dos componentes dos óleos essenciais	2
Figura 2 : Esqueleto bicíclico selinênico	18
Figura 3 : Sesquiterpenos encontrados no gênero <i>Eugenia</i>	19
Figura 4 : Monoterpenos encontrados no gênero <i>Eugenia</i>	20
Figura 5 : Flavonóides e Triterpenos encontrados em espécies de <i>Eugenia</i>	20
Figura 6 : Cromatograma do óleo essencial de <i>E. nitida</i> Camb. feito em coluna 5% difenil e 95% dimetil polisiloxano (SE-54)	31
Figura 7 : Cromatograma do óleo essencial de <i>Eugenia nitida</i> Camb. Feito em coluna 100% polietileno glicol (Innowax)	32
Figura 8 : Estrutura dos principais constituintes químicos do óleo essencial de <i>E. nitida</i> Camb.	34
Figura 9 : Diferenciação entre os espectros de massas do terpinoleno e do E- β -ocimeno por meio do fragmento de m/z 121	40
Figura 10 : Origem do provável fragmento de m/z 119 do E- β -ocimeno	41
Figura 11 : Fragmento de m/z 105 do E- β -ocimeno e do terpinoleno	42
Figura 12 : Fragmentos de m/z 91 do isodieno e do γ -cadineno	44
Figura 13 : Estruturas relacionadas aos fragmentos de m/z 77 do γ -cadineno e do <i>cis</i> - β - <i>guaïeno</i>	45
Figura 14 : Fragmento de m/z 81 do shyobunol	51
Figura 15 : Fragmento de m/z 81 do 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno	51
Figura 16 : Estrutura do fragmento de m/z 43	52
Figura 17 : Espectro de massas do E- β -ocimeno	57

Figura 18 : Espectro de massas do terpinoleno	58
Figura 19 : Espectro de massas do δ -elemeno	59
Figura 20 : Espectro de massas do isoledeno	61
Figura 21 : Espectro de massas do sativeno	61
Figura 22 : Espectro de massas do E-cariofileno	62
Figura 23 : Espectro de massas do γ -elemeno	62
Figura 24 : Espectro de massas do α -guaieno	64
Figura 25 : Espectro de massas do α -humuleno	64
Figura 26 : Espectro de massas do γ -muuroleno	65
Figura 27 : Espectro de massas do β -selineno	66
Figura 28 : Espectro de massas do <i>cis</i> - β -guaieno	67
Figura 29 : Espectro de massas do valenceno	68
Figura 30 : Espectro de massas do δ -selineno	68
Figura 31 : Espectro de massas do α -bulneseno	68
Figura 32 : Espectro de massas do γ -cadineno	70
Figura 33 : Espectro de massas do δ -cadineno	71
Figura 34 : Espectro de massas do γ -selineno	71
Figura 35 : Espectro de massas do selin-4(14),7(11)-dieno	71
Figura 36 : Espectro de massas do 4b-hidroxi-germacra-l(10)5-dieno	72
Figura 37 : Espectro de massas do espatulenol	72
Figura 38 : Espectro de massas do humuleno epóxido II	73
Figura 39 : Espectro de massas do tujopsan-2 α -ol	74
Figura 40 : Espectro de massas do α -eudesmol	74
Figura 41 : Espectro de massas do T-cadinol	76
Figura 42 : Espectro de massas do T-muurolol	76
Figura 43 : Espectro de massas do β -eudesmol	76
Figura 44 : Espectro de massas do selin-11-en-4 α -ol	77
Figura 45 : Espectro de massas do α -cadinol	78

Figura 46 : Espectro de massas do α -eudesmol	78
Figura 47 : Espectro de massas do khusinol	80
Figura 48 : Espectro de massas do juniper cânfora	80
Figura 49 : Espectro de massas do ent-maalian-5-ol	82

ÍNDICE DE TABELAS**PÁGINA**

Tabela 1 : Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>E. nítida</i> Camb. e suas respectivas percentagens e índice de retenção calculado para coluna SE-54	37
Tabela 2 : Principais fragmentos e sua abundância relativa presentes nos espectros de massas dos constituintes químicos do óleo essencial de <i>E. nítida</i> Camb.	53
Tabela 3 : Compostos identificados no óleo essencial de <i>E. nítida</i> Camb. e comparação com a literatura de seus índices de retenção para coluna SE-54	86
Tabela 4 : Índices de retenção em coluna polar para alguns sesquiterpenos com funções oxigenadas encontrados no óleo essencial de <i>E. nítida</i> Camb.	88
Tabela 5 : Condições de análise de diversos óleos essenciais em colunas polares	92
Tabela 6 : Comparação dos índices de Retenção calculados segundo as fórmulas de Kováts e de temperatura programada	95
Tabela 7 : Índices de Retenção sob temperatura programada para 112 componentes de óleos essenciais em colunas polares	98

ÍNDICE DE ESQUEMAS	PÁGINA
Esquema 1 : Origem dos principais fragmentos de massas de mono e sesquiterpenos no espectro de massas	46
Esquema 2 : Proposta de fragmentação de massas para o shyobunol	49
Esquema 3 : Proposta de fragmentação de massas para o 4 β -hidroxi-germacra- 1 (10)5-dieno	50
Esquema 4 : Proposta de fragmentação para o E- β -ocimeno	57
Esquema 5 : Proposta de fragmentação para o terpinoleno	58
Esquema 6 : Proposta de fragmentação para o isodieno	60
Esquema 7 : Proposta de fragmentação para o sativeno	61
Esquema 8 : Proposta de fragmentação para o γ -elemeno	63
Esquema 9 : Proposta de fragmentação para o γ -muuroleno	65
Esquema 10 : Proposta de fragmentação para o β -selineno	66
Esquema 11 : Proposta de fragmentação para o <i>cis</i> - β - <i>guaiano</i>	67
Esquema 12 : Proposta de fragmentação para o α -bulneseno	69
Esquema 13 : Proposta de fragmentação para o γ -cadineno	70
Esquema 14 : Proposta de fragmentação para o humuleno epóxido II	73
Esquema 15 : Proposta de fragmentação para o γ -eudesmol	75
Esquema 16 : Proposta de fragmentação para o selin-11-en-4a-ol	77
Esquema 17 : Proposta de fragmentação para o α -eudesmol	79
Esquema 18 : Proposta de fragmentação para o khusinol	81
Esquema 19 : Proposta de fragmentação para o ent-maalian-5-ol	82
Esquema 20 : Formação das unidades IPP e DMAPP a partir do MVA	111
Esquema 21 : Formação do geranil pirofosfato	112
Esquema 22 : Formação do farnesil pirofosfato e seus isômeros	112
Esquema 23 : Formação dos carbocátions a partir dos isômeros do FPP	113
Esquema 24 : Ciclização do FPP por vários caminhos	114
Esquema 25 : Formação e ciclização do NPP	115

Esquema 26 : Formação dos grupos cadinano e muurolano	117
Esquema 27 : Proposta de caminho biossintético para os muurolanos	119
Esquema 28 : Proposta de caminho biossintético para cadinanos	120
Esquema 29 : Proposta de caminho biossintético para o α -humuleno, humuleno epóxido e <i>E</i> -cariofileno	122
Esquema 30 : Formação do cátion germacradienil	123
Esquema 32 : Proposta de caminho biossintético para os germacranos	124
Esquema 32 : Proposta de caminho biossintético para o grupo dos eudesmanos	125
Esquema 33 : Proposta de caminho biossintético para os selinenos e para o juniper cânfora	127
Esquema 33.1 : Formação do selin-11-en-4 α -ol e do selin-4(14), 7(11)-dieno	128
Esquema 34 : Proposta de caminho biossintético para os elemanos	129
Esquema 35 : Proposta de caminho biossintético para o valenceno	130
Esquema 36 : Proposta de caminho biossintético para o α -guaieno e α -bulneseno	131
Esquema 37 : Proposta de caminho biossintético para o <i>cis</i> - β -guaieno e para o isoledeno	132
Esquema 38 : Proposta de caminho biossintético para o espatulenol	133
Esquema 39 : Proposta de caminho biossintético para o ent-maalian-5-ol	134
Esquema 40 : Proposta de caminho biossintético para o sativeno	135

RESUMO

A espécie vegetal *Eugenia nitida* Camb., pertence à família Myrtaceae, gênero *Eugenia*, e é conhecida popularmente como manga-do-brejo. Seu habitat natural são áreas de restinga.

O óleo essencial extraído de suas folhas por hidrodestilação revelou predominância de sesquiterpenos hidrocarbonetos e com funções oxigenadas em sua composição química, quando analisado por CGAR e CGAR-EM. Foram identificados 33 compostos por comparação de seus espectros de massas com os da literatura e espectrotecas Willey e NIST e por seus índices de Retenção calculados para coluna de baixa polaridade (fase estacionária 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano). O componente majoritário do óleo essencial é o sesquiterpeno 4 β -hidroxi-germacra-1 (10) 5-dieno (9,8%), seguido pelo γ -elemeno (7,9%), E-cariofileno (7,9%) e β -selineno (4,3%).

Os índices de retenção calculados para coluna polar (fase estacionária 100% polietileno glicol) não foram conclusivos, pois existe uma grande diferença entre os valores destes índices para uma mesma substância na literatura. Esta discrepância pode ser explicada pelo uso de diferentes equações para o cálculo destes valores, e também pelo tipo de fase estacionária envolvida e programação de temperatura.

Propostas de fragmentação de massas e de rotas biossintéticas são sugeridas para os compostos identificados, visando a confirmação da identidade dos mesmos.

ABSTRACT

The plant *Eugenia nitida* Camb. which grows in reef areas, belongs to Myrtaceae family, genus *Eugenia* and is popularly known as manga-do-brejo.

The essential oil from its leaves, obtained by hydrodistillation, was analysed by HRGC and HRGC-MS and revealed a predominance of hydrocarbon sesquiterpenes and oxygenated sesquiterpenes in its chemical composition. Thirty-three compounds were identified by comparison of their mass spectra with the ones in the literature and Willey and NIST mass spectra library and by their Retention Indexes in a low-polarity fused silica capillary column (5% diphenyl and 95% dimethyl-polisiloxane stationary phase). The sesquiterpene 4 β -hidroxy-germacra-1 (10)5-diene is the major component of the oil (9,8%), followed by γ -elemene (7,9%), E-caryophyllene (7,9%) and β -selinene (4,3%).

The Retention Indexes calculated for a polar column (100% poliethylene-glicol 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 values and also by the type of stationary phase involved and temperature programming.

Mass fragmentation proposals and biosynthetic routes are suggested to confirm the identity of the compounds.

ABREVIATURAS

(segundo ordem de aparecimento no texto)

- CG-EM : Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
- CLAE : Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CGAR-EM : Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massas
- t_R' : Tempo de Retenção corrigido
- t_0 : Tempo de Retenção para um composto não retido
- t_R : Tempo de Retenção
- CCSF : Colunas capilares de Sílica Fundida
- RMN ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
- IR : índice de Retenção
- n : número de carbonos
- $t_{R\text{subst}}$: Tempo de Retenção da substância
- t_{Rn} : Tempo de Retenção da parafina com n átomos de carbonos
- t_{Rn+1} : Tempo de Retenção da parafina com n + 1 átomos de carbonos
- IK: índice de Retenção de Kováts
- t_M : Tempo do gás na fase estacionária (Tempo Morto)
- IRTP : índice de Retenção à Temperatura Programada
- T : Temperatura da coluna
- T_0 : Temperatura inicial
- r : Taxa de aquecimento da programação
- ΔI : Diferença entre os índices de retenção em colunas polar e de baixa polaridade
- IR_p : Índice de Retenção em coluna polar
- IR_e : Índice de Retenção em coluna de baixa polaridade
- T_{eq} : Temperatura equivalente
- δI : Incrementos ao índice de retenção
- I_{cp} : Índice de Retenção pela fórmula de Ettre

- FRG : Fator de Retenção de Grupo
- Z : Átomos de carbono equivalentes
- ϵ_{mc} : Somatória dos fatores de retenção de grupos funcionais ou substituintes
- NIST:
- m/z: Relação massa/carga
- M^+ : Pico do íon molecular
- GA: Ácido Giberélico
- 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 : Geranil difosfato sintase
- FPP : Farnesil difosfato sintase
- S-NPP : S - Nerolidil Pirofosfato
- NPP: Nerolidil Pirofosfato
- eV: Elétron-volts
- μm : microns

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1- Os óleos essenciais

Os Óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de matérias-primas para diversos tipos de indústria, principalmente as de perfumada, alimentos e farmacêutica ⁽¹⁾.

São produtos voláteis, normalmente odoríferos, obtidos a partir de tecidos vegetais, fungos, algas e, algumas vezes também de tecidos animais, possuindo uma composição química complexa. Em alguns casos chegam a conter mais de uma centena de componentes distribuídos em quantidades variáveis ⁽²⁾, Seus constituintes químicos usualmente são terpenóides (mono e sesquiterpenos oxigenados ou não) e/ou lignóides, como alil- e fenilpropanóides e cumarinas, que ostentam os esqueletos carbônicos originados das unidades precursoras 1 e 2, respectivamente (fig. 1) ⁽³⁾:

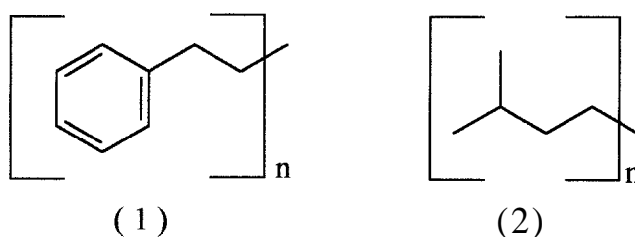


Figura 1: Unidades precursoras dos componentes dos óleos essenciais

A natureza química dos inúmeros componentes de óleos essenciais é relativamente limitada, porém, os arranjos de esqueletos carbônicos e as posições variáveis de diversos grupamentos, aumentam sensivelmente a quantidade de substâncias odoríferas, cada uma delas assumindo a sua individualidade ⁽¹⁾.

Os óleos essenciais são obtidos geralmente por arraste de vapor d'água e outras técnicas que vem sendo descobertas e se constituem em outras opções a uma extração segura e com rendimento satisfatório, como a hidrodestilação, extração por headspace, extração utilizando gordura, por fluidos supercríticos, entre outras. ⁽⁴⁾

O valor comercial dos óleos essenciais vem se mostrando relativamente estável há muitos anos, sendo sua produção explorada em regiões pouco desenvolvidas em função das atividades agrícolas primárias envolvidas em países menos exigentes. Países como Guatemala, Índia, China, Egito, Indonésia, Sri Lanka, Turquia e Brasil são tradicionais exportadores de óleos essenciais ⁽⁵⁾.

Os países mais desenvolvidos importam estes óleos como matéria-prima barata e por meio de operações como purificação, destilação, preparação de derivados, isolamento dos constituintes químicos e modificações químicas, valorizam o produto, agregando-lhe valor comercial. Em relação às modificações estruturais, os óleos essenciais, por serem fontes de produtos naturais puros, podem ser utilizados como matéria-prima para a síntese de compostos de alto valor comercial ⁽¹⁾.

O crescente desenvolvimento nas duas últimas décadas dos métodos analíticos instrumentais para detecção de substâncias orgânicas, tais como CG-EM, CLAE, RMN entre outras vem fazendo com que pesquisadores de Produtos Naturais do mundo inteiro aprimorem seus estudos visando maior conhecimento fitoquímico das diversas famílias botânicas já existentes. Neste sentido, a cromatografia gasosa, uma técnica desenvolvida há cerca de quarenta anos, provou ser a ferramenta ideal para a análise de misturas complexas e, principalmente, de óleos essenciais⁽⁵⁾.

Em particular, a técnica de CGAR-EM foi uma das que sofreram maior aperfeiçoamento no decorrer dos anos e desperta um interesse crescente da parte de muitos pesquisadores, que vêm utilizando esta técnica cada vez mais no estudo de componentes voláteis de espécies vegetais, englobando assim a análise de óleos essenciais. Este interesse deve-se basicamente a fatores que tornam atrativo este tipo de análise, como o baixo custo operacional envolvido; o tempo de análise relativamente curto, se comparado aos métodos fitoquímicos tradicionais; a economia de reagentes; a facilidade de manuseio da instrumentação utilizada e, principalmente, a confiabilidade dos resultados obtidos. Esta otimização da análise reflete-se no número cada vez maior de trabalhos publicados ^(6,7,8) que relatam estudos qualitativos e quantitativos de voláteis e óleos essenciais empregando CGAR-EM.

1.2 - Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é um dos métodos modernos de análise que vem ocupando um merecido destaque no que diz respeito à separação, caracterização e quantificação de compostos orgânicos. Segundo definições de algumas décadas atrás, trata-se de um método físico de separação onde os componentes a ser separados distribuem-se por duas fases: a fase estacionária, que é uma fase fixa com uma grande área superficial, e a fase móvel, que se trata de um gás que percola a fase estacionária ^(9,10,11) Nos dias de hoje, com o avanço da técnica, a cromatografia gasosa é vista simplesmente como um método de separação e detecção de substâncias químicas, que utiliza um determinado gás como fase móvel e materiais poliméricos de diferentes composições e polaridades ligados a uma Coluna Capilar de Sílica Fundida (CCSF) como fase estacionária

O aparelho utilizado para as análises cromatográficas em fase gasosa é o cromatógrafo, constituído basicamente de três partes: um injetor, por onde a amostra é inserida no aparelho e posteriormente volatilizada, uma coluna cromatográfica, que é onde acontece o fenômeno de separação dos componentes químicos, e um detector, onde os componentes separados da mistura são detectados. Outros componentes a se levar em consideração são o gás de arraste (fase móvel) e o registrador/detector, através do qual se obtém o cromatograma, que é o registro gráfico da análise. Nele estão indicados os tempos de retenção

das substâncias encontradas na coluna cromatográfica utilizada e o grau de concentração em que se encontravam em determinado momento da análise⁽¹¹⁾.

O tempo de retenção dos compostos é definido como sendo o tempo gasto (em condições de operação pré-fixados de vazão, temperatura e coluna) entre o instante de injeção até a altura máxima do pico no cromatograma, e é representado genericamente por t_R , e o tempo de eluição para um composto não retido sendo chamado t_0 ⁽¹¹⁾. O tempo de retenção corrigido ($t_{R'}$), que é o tempo real de retenção da substância, é dado pela seguinte fórmula:

$$t_{R'} = t_R - t_0$$

(1)

Os componentes básicos do cromatógrafo vêm sendo constantemente aperfeiçoados com o intuito de melhorar cada vez mais os resultados das análises. A partir da modernização das colunas cromatográficas, com a introdução em 1960 do uso de CCSF, que substituiu o de colunas empacotadas, a cromatografia gasosa sofreu um grande impulso, conferindo um grande desenvolvimento a cromatografia em fase gasosa de alta resolução (CGAR)⁽¹²⁾

As colunas capilares utilizadas atualmente em CGAR possuem características de inércia e eficiência excepcionais^(12,13). São constituídas por um tubo capilar de diâmetro interno entre 0,05-1 mm e comprimentos que variam de 5 a 100 metros ou mais. Na parede interna deposita-se um filme homogêneo da fase estacionária com espessura uniforme que varia entre 0,1-5 μ . O tubo capilar

é de sílica fundida, as chamadas Colunas Capilares de Sílica Fundida (CCSF). Os materiais poliméricos empregados nas fases estacionárias (difenilmetilamina, difenilpolisiloxano) caracterizam-se por possuírem baixa temperatura de fusão ou amolecimento, baixíssima pressão de vapor e/ou baixa velocidade de decomposição a altas temperaturas aliadas a uma estabilidade térmica que não altera sua composição química, e assim, a capacidade de separação das substâncias⁽¹⁴⁾.

1.3 - O índice de Retenção como critério de identificação de Compostos Orgânicos

Os principais métodos utilizados atualmente na identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais são baseados nas análises de CGAR e CGAR-EM, que levam em consideração principalmente os tempos de retenção dos solutos nos cálculos dos índices de retenção, e seus respectivos espectros de massas, que permitem a comparação com espectros de massas de substâncias conhecidas e catalogadas^(14,15).

Nos últimos anos, outras técnicas como RMN¹³C e mesmo variações da CGAR, como a co-eluição de uma amostra padrão com tempo de retenção conhecido sob determinadas condições cromatográficas, também têm sido utilizados com grande sucesso neste tipo de trabalho. O inconveniente da utilização da técnica de RMN¹³C é a quantidade de isômeros estruturais em.

mistura. Isto dificulta a atribuição de deslocamentos químicos para cada substância em particular.

Em relação á técnica da co-eluição com padrões juntamente com a amostra desconhecida, o problema consiste em se obter padrões de mono e sesquiterpenos puros e isolados. Porém, tanto a técnica de co-eluição quanto as análises espectroscópicas por RMN¹³C são aliados importantes na análise de óleos essenciais.

Particularmente, o uso do índice de Retenção (IR) na identificação de compostos orgânicos, especialmente voláteis, continua sendo, mesmo através dos anos, o método mais seguro e confiável, pois toma como referência o tempo de retenção da amostra ($t_{R\ sub=}$) em relação aos tempos de retenção de duas parafinas com n e $n+1$ átomos de carbono (t_{Rn} e t_{Rn+1})⁽¹⁶⁾

A história da aplicação dos IR como critério de identificação iniciou-se na primeira metade da década de 50, quando o pesquisador alemão E. Kováts, estudando parafinas por cromatografia gasosa, descobriu que os tempos de retenção de uma série homóloga de n -parafinas sob condições de análise isotérmicas, estavam relacionados com o número de carbonos do esqueleto de cada composto⁽¹⁷⁾.

Os tempos de retenção guardavam entre si uma relação linear e aumentavam à medida que se aumentava o número de carbonos da cadeia.

A partir de tal observação, Kováts formulou o seu conhecido índice de Retenção, que, de início, propunha para uma parafina contendo n átomos de carbono, um índice de retenção da ordem de 100 vezes o número de carbonos. Desta forma:

$$I = 100 n$$

(2)

Assim, uma parafina contendo 8 átomos de carbono eluiria preferencialmente a uma outra contendo 9 átomos de carbono e possuiria um índice de retenção 800 enquanto a parafina de 9 possuiria um índice de valor 900.

Para outras substâncias, que não fossem parafinas, Kováts assumiu que seus IR situar-se-iam entre os de duas parafinas da série homóloga que possuísem semelhantes números de carbonos. Desta forma, ele estabeleceu que o tempo de retenção da amostra desconhecida guardaria uma relação logarítmica com os tempos de retenção das parafinas, agora chamadas padrões, anterior e posterior a ela no cromatograma obtido. Isto sugeria que os logaritmos dos tempos de retenção guardavam uma relação linear entre si no cromatograma, indicando que o logaritmo do tempo de retenção ajustado das n -parafinas aumentaria linearmente com o aumento da cadeia⁽¹⁸⁾

Em 1958, Kováts propôs a seguinte fórmula, com base nas observações acima, que era uma variação aperfeiçoada de seu Índice de Retenção:

$$IK = \left(\frac{\log t_{R' \text{ subst}} - \log t_{R' n}}{\log t_{R' n+1} - \log t_{R' n}} + n \right) \times 100$$

(3)

sendo que $t_{R'n} \leq t_{R' \text{ subst}} < t_{R'n+1}$, onde:

IK = índice de Retenção de Kováts sob condições isotérmicas;

$t_{R' \text{ subst}}$ = Tempo de retenção ajustado da amostra desconhecida;

$t_{R'n}$ e $t_{R'n+1}$ = Tempos de retenção ajustados dos padrões anterior e posterior no cromatograma da série homóloga;

n = número de carbonos do padrão posterior.

Com esta fórmula, também é possível prever o número de carbonos do soluto, logicamente se respeitadas as mesmas condições de análise tanto para a amostra desconhecida quanto para a série homóloga.

Para o ajuste dos tempos de retenção é utilizado o tempo de retenção de um gás na coluna, por exemplo metano, propano, butano, que também podem ser utilizados como gás de arraste. Este tempo é descontado do tempo de retenção da amostra no cromatograma⁽¹¹⁾.

Logo:

$$t_{R'} = t_R - t_M$$

(4)

onde $t_{R'}$ = Tempo de retenção ajustado

t_R = Tempo de retenção observado

t_M = Tempo de um soluto (gás) não retido pela fase estacionária (tempo morto)

Como conclusão, Kováts deduziu que, a partir dos cálculos de IK, cada substância teria o seu próprio índice, devido às diferenças estruturais intrínsecas de cada espécie, permitindo, assim, que cada composto fosse caracterizado individualmente. A fórmula de Kováts foi aceita universalmente e começou a ser amplamente utilizada.

O surgimento, nos anos seguintes, da modalidade de análise por temperatura programada, para atender às necessidades da tecnologia que requeriam menor tempo, como as análises de drogas farmacêuticas, petróleo, alimentos, "flavors" e cosméticos, levou alguns grupos de pesquisadores a questionar se o uso do índice de Kováts seria adequado para temperatura programada. O índice de Kováts era usado para análises isotérmicas e sob condições de gradientes de temperatura, os tempos de retenção dos solutos e da série teoricamente não se relacionariam mais de forma linear⁽¹⁹⁾.

Uma generalização da definição de Kováts para o campo da cromatografia gasosa com temperatura programada foi proposta por Van Den Doole e Kratz⁽²⁰⁾ em 1963. Eles determinaram que as temperaturas de retenção dos n-alcenos (que passaram a ser usados na série homóloga) são linearmente dependentes de seu índice de retenção, como definido por Kováts.

A equação sugerida por Van Den Doole e Kratz é a seguinte:

$$IRTP = \left(100n + 100 \times \frac{T_{Rsubst} - T_{Rn}}{T_{Rn+1} - T_{Rn}} \right)$$

(5)

onde IRTP significa índice de Retenção à Temperatura Programada e $T_{Rn} < T_{Rsubst} < T_{Rn+1}$ são as temperaturas de retenção do n-alceno da série homóloga com n átomos de carbono, do soluto e do n-alceno com n+1 átomos de carbono, respectivamente⁽¹⁹⁾.

Estudos posteriores mostraram que a temperatura de retenção, que é a temperatura na qual um determinado soluto é retido pela fase estacionária, pode ser substituída pelo tempo de retenção ajustado correspondente, $t_{R'}$, desde que, para programação de temperatura linear, a relação entre $t_{R'}$ e temperatura T seja:

$$T = T_0 + r t_{R'}$$

(6)

sendo T_0 a temperatura inicial da coluna e r a taxa de aquecimento da programação⁽²¹⁾.

Uma das observações feitas pelos pesquisadores desta área foi que os tempos de retenção dos compostos em colunas de baixa polaridade modificavam pouco em relação ao mesmo soluto analisado em outras colunas de mesma polaridade. Por sua vez, em colunas polares, havia diferenças entre os índices de retenção para os compostos quando analisado em outras semelhantes. Isto, em parte, se explica pelas interações da fase estacionária polar com o soluto, retendo-o mais de acordo com suas características estruturais, o que lhe confere um tempo de retenção maior, e, por consequência, um índice de retenção diferente daquele obtido no cálculo das análises em colunas de baixa polaridade.

Em 1970, McReynolds determinou IR para diversos compostos em cerca de 200 fases estacionárias a 120°C em condições padronizadas. Com o intuito de caracterizar as diversas colunas existentes, ele utilizou como padrões 10 compostos de estruturas diferentes e determinou seus IR. A experiência mostrou que o a fase estacionária constituída pelo esqualeno (pouco polar) produzia, para todos os 10 compostos, os menores valores de índices de retenção⁽¹⁴⁾.

Com base nesta observação, McReynolds determinou que:

$$\Delta I = IR_p - IR_e$$

(7)

onde ΔI era a diferença entre os IR obtidos em uma coluna polar (IR_p) e em uma coluna de baixa polaridade (IR_e), sendo esta, no caso, o esqualeno.

Muitas outras fórmulas foram propostas para calcular IR, como as de Erdey et al.⁽²²⁾, que não utiliza os dados relativos à série homóloga dos n-alcenos, as de Giddings⁽²³⁾, Lee e Taylor⁽²⁴⁾, Curvers et al.⁽²⁵⁾, que propôs uma equação baseada em dados termodinâmicos da análise, como parâmetros entrópicos e entálpicos; Golovnya e Uraletz⁽²⁶⁾, que propuseram uma equação simples que levava em consideração uma certa "temperatura equivalente" (T_{eq}) derivada da temperatura experimental, além de diversos outros.

Ettre, na década de 60, publicou uma série de artigos^(27,28) sugerindo um método de cálculo de IR para colunas pouco polares baseado no somatório de incrementos relativos a parâmetros estruturais na molécula (existência de ligações duplas ou tríplices, funções oxigenadas e/ou nitrogenadas, presença de halogênios, etc.), ao IR do n-alceno correspondente. O método constituiu-se numa ferramenta útil para se prever o índice de retenção de um composto desde que sua fórmula estrutural fosse conhecida previamente. Buchman et al (29) fizeram, já na década de 80, um aperfeiçoamento do trabalho de Ettre e reportou que, ao se observar o efeito de um substituinte em particular numa série homóloga de poucos compostos de referência, incrementos ao IR (δI) relativos

àquele substituinte podiam ser estabelecidos em ambas as colunas, polares e não-polares. Em outras palavras, se I_{subst} é o IR de um composto que possui um determinado substituinte e I_0 é o IR daquele composto sem o substituinte, então:

$$\delta I = I_{\text{subst}} - I_0$$

(8)

Acompanhando este trabalho, Peng et al (30-33) desenvolveram um método que previa os tempos de retenção usando três parâmetros: (I) o número total de átomos de carbono (N) ou o número total de átomos de carbono e átomos de carbono equivalentes (Z) na molécula, (II) o incremento do índice de retenção e, (III) o Fator de Retenção de Grupo (FRG) para substituintes e grupos funcionais. Desta informação, pode-se prever o índice de retenção segundo Peng (I_{cp}) pela seguinte fórmula:

$$I_{cp} = 100Z + \sum m_i + \sum n_i$$

(9)

onde $100Z$ representava a contribuição dos átomos de carbono na molécula ao IR, m_i e n_i representando os FRGs dos grupos funcionais (30) e são dados por:

$$m, n = \delta I - 100Z$$

(10)

Foram feitos muitos testes utilizando o sistema desenvolvido por Peng, incluindo análises para álcoois alílicos e seus ésteres⁽³⁴⁾ com resultados satisfatórios.

Mesmo com a ampla gama de fórmulas desenvolvidas para a análise qualitativa de compostos orgânicos por CGAR, as fórmulas de Kováts, para análises isotérmicas e de Van Den Doolen e Kratz para temperaturas programadas ainda são as mais utilizadas e podem ser adequadas inclusive a análise de componentes de óleos essenciais, ainda que hoje em dia a maioria destas análises sejam feitas apenas por temperatura programada.

Muitos métodos computacionais estão surgindo com o avanço da tecnologia, com a função de auxiliar os cálculos de IR (21) no intuito de se obter resultados cada vez melhores.

O que se observa, no entanto, na maioria dos trabalhos envolvendo o uso do índice de retenção em análises de óleos essenciais e voláteis é que não é citada a fórmula pela qual o índice foi obtido, muitas vezes fazendo com que índices de retenção de vários compostos, sob as mesmas condições de análise, apresentem-se com valores diferentes em diversas publicações.

1.4 - Os Óleos Essenciais e a família Myrtaceae

Os óleos essenciais de conhecidas famílias botânicas (Lauraceae, Annonaceae, Piperaceae, etc.) têm sido estudados com frequência^(6,7,8), pelo fato de espécies pertencentes a elas apresentarem comprovadas propriedades medicinais ou aromas característicos atribuídos a seus óleos.

A família Myrtaceae é uma das mais estudadas⁽³⁶⁾. Possui cerca de 100 gêneros, entre os quais se destacam os gêneros Myrcia, abundantemente encontrado no continente Americano, com mais de 300 espécies⁽³⁷⁾, o gênero Eucalyptus, talvez o mais estudado dentre todas as famílias vegetais com espécies bastantes aromáticas e utilizadas na medicina popular e os gêneros Syncarpia, Uromyrtus, Myrtus e Eugenia⁽³⁷⁻⁴⁰⁾.

O gênero Eugenia é bastante vasto, possuindo por volta de 500 espécies, das quais mais de 400 se encontram distribuídas no Brasil e países sul-americanos vizinhos como Argentina, Uruguai e Chile, além de raras espécies na região das Índias Ocidentais. Caracteriza-se por possuir espécies com frutos e folhas com odores característicos nas suas espécies, além de apresentarem propriedades farmacológicas, como antidiarreico, inibidor de enzimas e bactericida.

1.4.1 - O Estudo Químico do gênero *Eugenia*

Muitos grupos de pesquisa tem dedicado atenção especial ao estudo químico dos óleos essenciais de várias espécies de *Eugenia*⁽⁴²⁾.

A espécie *Eugenia uniflora* L., popularmente conhecida como pitangueira, tem o maior número de trabalhos publicados do ponto de vista químico das suas diversas partes vegetais, que vai de estudos físicos e químicos da polpa de seu fruto⁽⁴¹⁾, ao estudo farmacológico de seu óleo essencial, que revelou uma ampla variedade de usos benéficos na medicina, como regulador da taxa de colesterol no sangue, redutor dos níveis de ácido úrico, anti-reumático, anti-térmico, além de recentes descobertas de que pode ser inibidor da atividade da enzima xantina-oxidase, e atividade anti-microbial⁽⁴²⁾. Este óleo constitui-se basicamente de sesquiterpenos com o esqueleto bicíclico selinênico (3) (figura 2)⁽⁴²⁾.

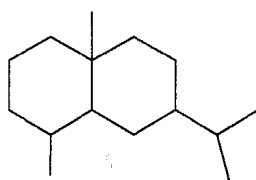


Figura 2 : Esqueleto bicíclico selinênico

Outras espécies de *Eugenia* possuem atividade antidiarréica e seus óleos essenciais são constituídos, principalmente, por sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados, como as espécies *Eugenia rostrifolia* L. e

Eugenia involucrata Cand., que apresentam quantidades consideráveis de viridifloreno (4)⁽⁴²⁾. Já as espécies *Eugenia schuechiana* Berg. e *Eugenia plicato-costata* Berg. têm como principal constituinte de seus óleos essenciais o β -cariofileno e seu óxido (5 e 6), que totalizam juntos, cerca de 30% do conteúdo total dos componentes dos óleos essenciais de cada uma⁽⁴²⁾. A planta *Eugenia tinguyensis* Camb. possui seu óleo essencial constituído de 25% de nerolidol⁽⁷⁾, enquanto que o de *Eugenia caryophilatta* Thumb., o tradicional óleo de cravo, tem predominância do alil benzeno eugenol (8)^(1,42).

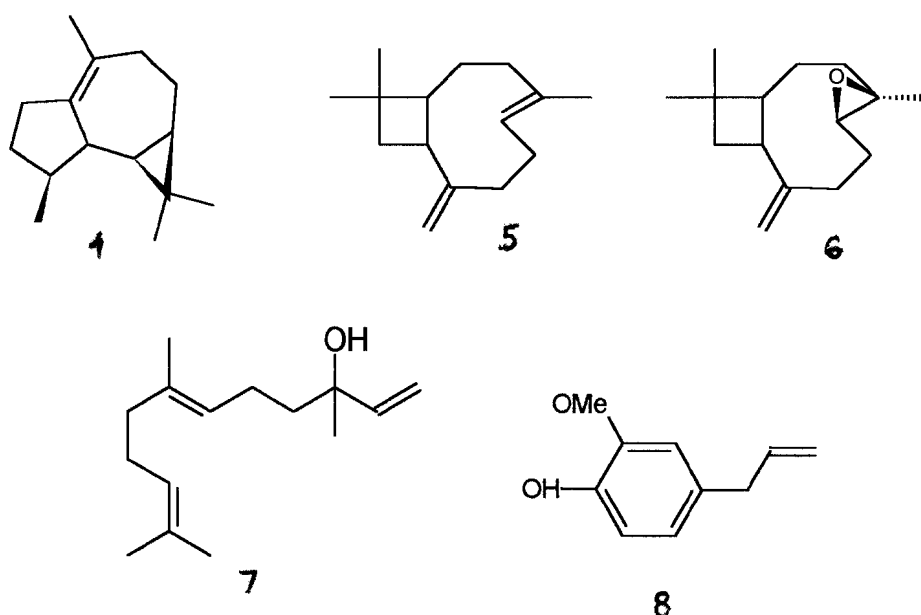


Figura 3 : Sesquiterpenos encontrados no gênero *Eugenia*

O estudo dos óleos essenciais das espécies *Eugenia jambos* L., *Eugenia jambolana* L. e *Eugenia brasiliensis* Lam. revelou presença majoritária de monoterpenos em sua composição⁽⁴³⁻⁴⁵⁾, assim como o de

Eugenia javanica Lam, que revelou como componentes majoritários: α -terpineno (9), β -ocimeno (10) e o α -pineno (11) (47).

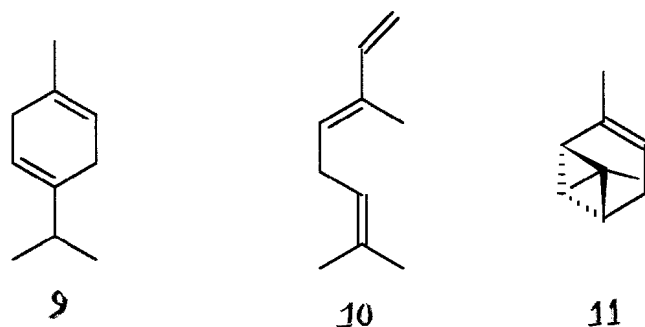


Figura 4 : Monoterpenos encontrados no gênero *Eugenia*

Algumas espécies, no entanto, foram estudadas satisfatoriamente pelos métodos fitoquímicos clássicos revelando a presença de triterpenóides dos grupos oleanano e ursano em mistura, no extrato etanólico da madeira de *Eugenia cachoeirensis* Berg. (47), flavonóides glicosilados nas partes aéreas de *Eugenia kurzii* Duthie(48) e a flavanona desmetoxi-mateucinol (12), o ácido oleanólico (13) e o β -sitosterol (14) nas flores de *Eugenia javanica* Lam.(46)

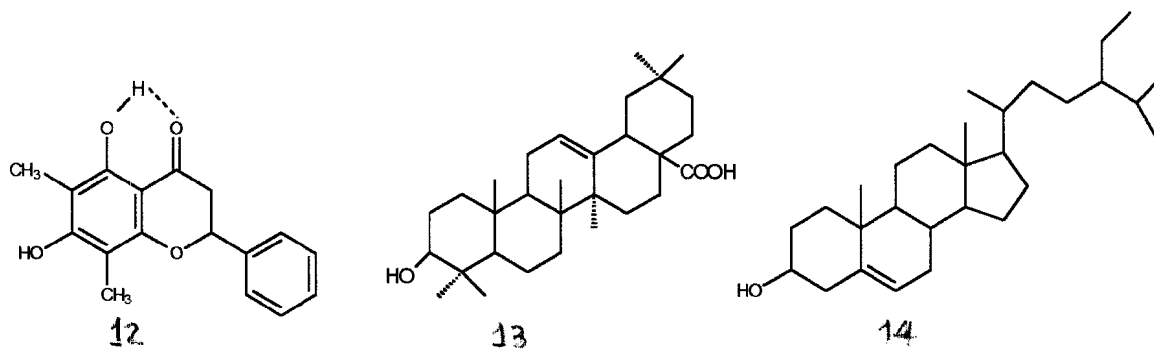


Figura 5: Flavonóides e triterpenos encontrados em algumas espécies de *Eugenia*

Desta forma, o gênero *Eugenia* se torna um importante objeto de pesquisa, pela diversidade estrutural de metabólitos secundários encontrados em suas espécies, que podem levar a estudos quimiosistemáticos mais complexos para o conhecimento de sua evolução.

1.4.2- O Gênero *Eugenia* no Brasil

A distribuição geográfica das espécies de *Eugenia* no Brasil está limitada entre os estados da Bahia e do Rio Grande do Sul, com predomínio de algumas espécies na Região Sul, notadamente Santa Catarina e Rio Grande do Sul^(49,50).

A maioria das espécies, no entanto, é encontrada nos estados da Região Sudeste, como nos estados de Minas Gerais e áreas de restinga do Estado do Rio de Janeiro, como a restinga de Marambaia, na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro e na faixa litorânea da Região Sul do estado, próximo aos municípios de Angra dos Reis e Paratí. Dentre as espécies encontradas nesta região, estão a *Eugenia nitida* Camb., *Eugenia speciosa* Camb. e *Eugenia ovalifolia* Camb.^(49,50)

1.4.3 - Características da espécie estudada

A espécie estudada neste trabalho faz parte da família Myrtaceae e do gênero *Eugenia*. Trata-se da *Eugenia nitida* Camb., conhecida vulgarmente como manga-do-brejo. É um arbusto de tronco liso, folhas opostas oblongo-lanceoladas, agudo-acuminadas, discolores, glabras com flores dispostas em

cimeiras. Possui fruto baga, comestível, de sabor adstringente, pouco agradável. O tronco possui casca tanífera ⁽⁵¹⁾.

Sua classificação sistemática, segundo A.Cronquist é a seguinte:

Divisão : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sub-Classe : Rosidae

Ordem : Myrtales

Família : Myrtaceae

Sub-família : Myrtoideae

Gênero : Eugenia

Espécie : ***Eugenia nitida***

OBJETIVOS

2- Objetivos

Os principais objetivos do estudo do Óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. são os seguintes:

1. Identificar e quantificar os principais constituintes químicos do Óleo essencial da espécie *Eugenia nitida* Camb. (Myrtaceae) por meio de análises de Cromatografia Gasosa e Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas. Estas análises compreendem o cálculo do índice de Retenção para cada sinal distinguível no cromatograma e posterior comparação dos dados obtidos com os valores que constam na literatura. Também compreendem a comparação dos espectros de massas dos componentes do óleo com os espectros de massas dos compostos orgânicos existentes na literatura e em espectrotecas de massas como Wiley e NIST.
2. Propor fragmentações de massas para as estruturas químicas dos compostos que ainda não tenham sido propostos em trabalhos anteriores e que possam auxiliar na confirmação de sua identidade através das medidas de intensidade dos fragmentos no espectro de massas.
3. Propor rotas biossintéticas para os constituintes químicos identificados com o auxílio da literatura.
4. Avaliar a utilização do índice de Retenção como critério de identificação dos constituintes químicos de óleos essenciais levando em consideração as

fórmulas utilizadas no cálculo e fatores cromatográficos como atividade da coluna cromatográfica, polaridade da coluna, ponto de ebulição dos compostos eluídos e taxas de aquecimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I : RESULTADOS

3 - Resultados e Discussão

3.1. Análise do Óleo Essencial de *Eugenia nitida* Camb.

O óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb, quando analisado por CGAR e CGAR-EM revelou três regiões distintas no cromatograma: uma pertencente aos monoterpenos, outra dos sesquiterpenos hidrocarbonetos e, finalmente, a região dos sesquiterpenos com funções oxigenadas. As duas últimas regiões caracterizaram-se pela abundância de picos, demonstrando a predominância deste tipo de metabólito no óleo.

A análise dos cromatogramas (figuras 6 e 7) obtidos na coluna cromatográfica polar com fase estacionária 100% polietileno-glicol (INNOWAX) e de baixa polaridade com fase estacionária 5% difenil e 95% dimetil polisiloxano (SE-54) foram realizadas baseando-se nos índices de retenção de cada componente, calculados a partir dos tempos de retenção de cada pico no cromatograma do óleo, e dos tempos de retenção das n-parafinas no cromatograma da série homóloga C₉-C₂₆.

Observações a respeito da sua composição volátil, nos levam a aconselhar que o óleo essencial deve ser analisado logo em seguida à sua obtenção. Mesmo sob refrigeração, existe possibilidade de perda dos constituintes mais voláteis.

Com a utilização dos tempos de retenção (t_R), tanto dos picos no cromatograma obtido na coluna SE-54, quanto das n-parafinas da série C₉- C₂₆,

obtido pela mesma coluna cromatográfica, foi possível determinar os índices de retenção para 67 picos no cromatograma.

Um pico que possui índice de retenção de 1556, com concentração de 9,78 % é relativo ao constituinte majoritário do óleo. Segundo comparação dos índices de retenção calculados com os encontrados na literatura para esta coluna e similares, encontrou-se que este valor poderia pertencer a um destes compostos: 4 β -hidroxi-germacra-1(10),5-dieno, elemicina, germacreno B, 1-norbourbonona entre outros, que apresentam índices de retenção próximos a este valor.

A atribuição do componente majoritário ao germacreno B ou a qualquer um dos outros ficaria confirmado pela análise por CGAR-EM. A análise do óleo por este método em coluna polar HP-FFAP (fase estacionária 100% polietileno-glicol modificada) nos forneceu um cromatograma onde cada pico possuía o seu respectivo espectro de massas. A comparação dos espectros de massas com os existentes na literatura (15, 52-54) e nas espectrotescas Wiley e NIST, decidiu em favor do 4 β -hidroxigermacra-1 (10),5-dieno.

Tal comparação levou também à identificação de 33 compostos, dentre os quais o γ -elemeno como o segundo composto de maior concentração no óleo essencial (7,98%). Este sesquiterpeno também foi identificado pelo índice de retenção no cromatograma feito em coluna SE-54 e, assim, confirmando sua identidade. Outros compostos como o E-cariofileno, o β -selineno e o γ -muuroleno também foram encontrados em percentual alto, se comparados ao majoritário: 7,61%, 4,36% e 4,14%, respectivamente.

Alguns compostos identificados por espectrometria de massas não possuem até o momento, registros na literatura de seus índices de retenção, mas são substâncias cujos espectros de massas estão incluídos na versão mais atualizada da espectroteca NIST. Dentre estes estão o δ -selineno e o sativeno. Porém, quando comparamos seus respectivos espectros de massas com os da literatura e das espectrotecas ficou clara a identidade dos mesmos, confirmado através das fragmentação de massas propostas para cada um.

Um passo decisivo na etapa de caracterização química do óleo essencial seria o resultado da análise cromatográfica gasosa em coluna polar. Com este resultados, poderia ser possível confirmar a identidade de um determinado pico, haja visto que cada substância, teoricamente, deve possuir um único valor para o Índice de Retenção para uma determinada coluna. No entanto, de posse dos índices de retenção para os picos no cromatograma desta coluna verificamos que a comparação destes valores com os valores da literatura é uma tarefa complicada. Existe uma grande variação dos valores dos índices de retenção para um mesmo composto em uma mesma fase estacionária ou equivalente (discussão acerca do índice de Retenção na página). Mesmo assim, a alguns picos foram atribuídos índices de retenção de valores mais próximos dos calculados. O cromatograma do óleo essencial de *E. nitida* Camb. feito na coluna INNOWAX está na figura 7.

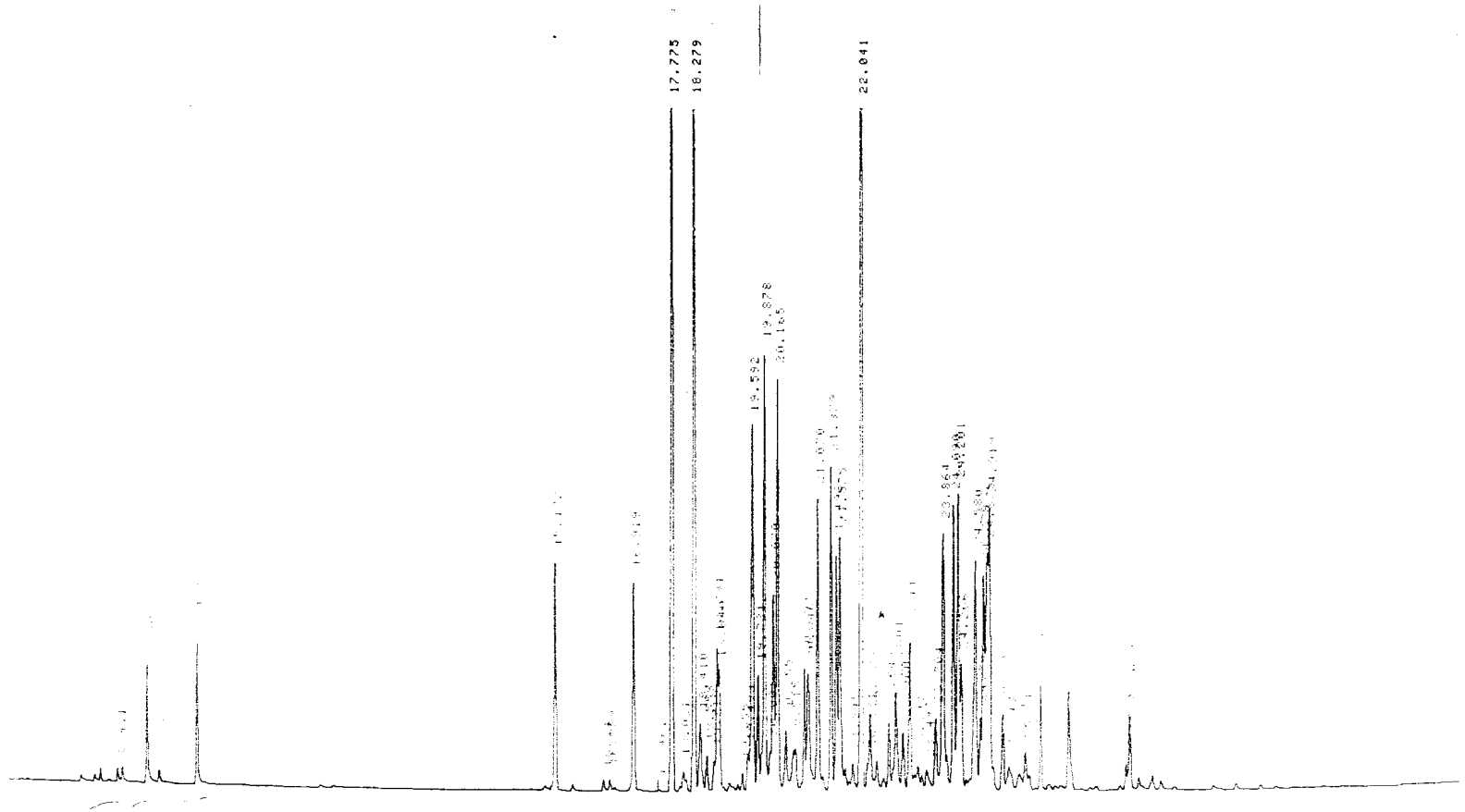


Figura 6 : Cromatograma do óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. feito na coluna 5% difenil e 95% dimetil polisiloxano (SE-54)

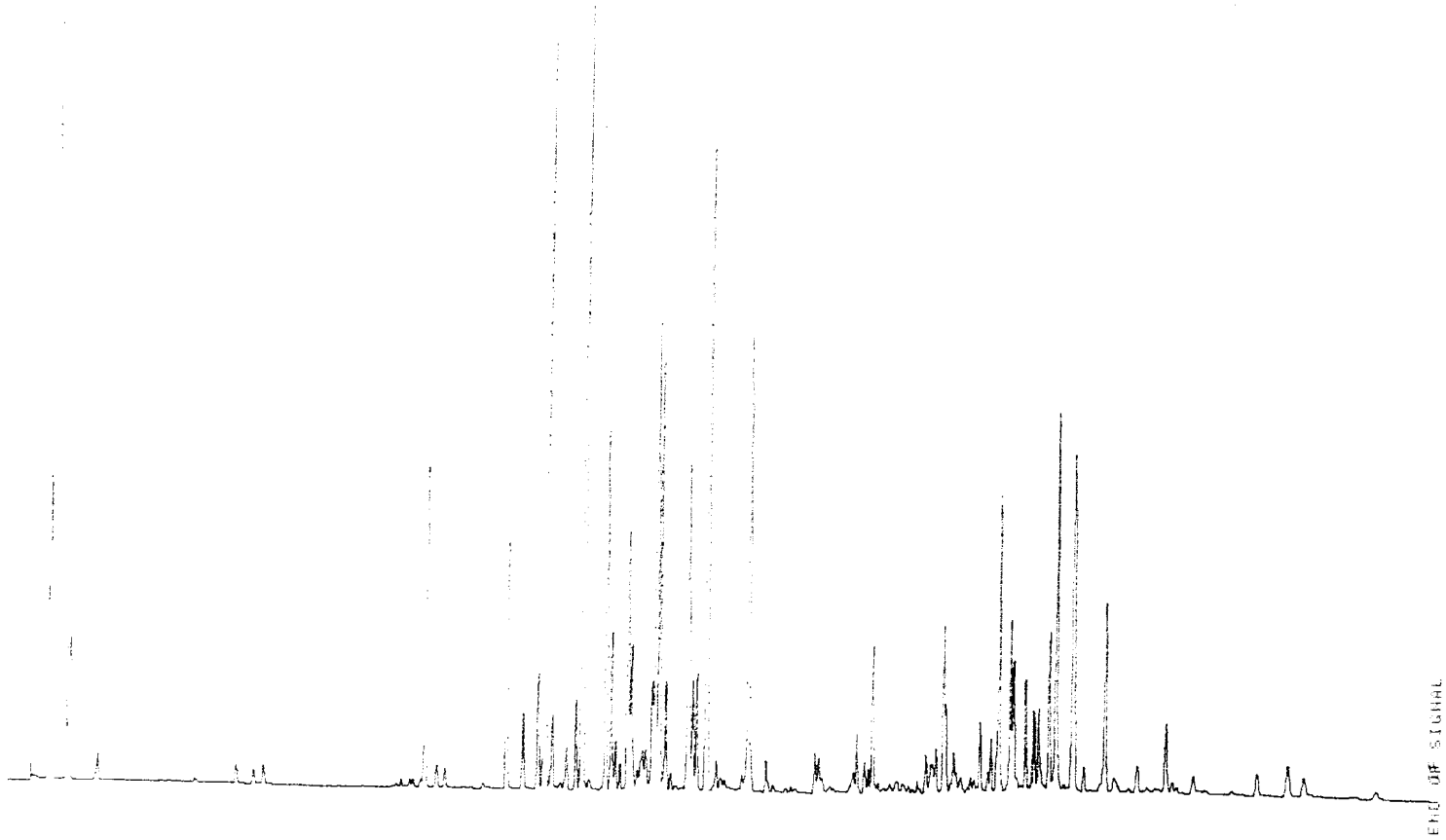


Figura 7 : Cromatograma do óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. feito em coluna 100% polietileno-glicol

Tendo em mãos o índice de retenção em coluna SE-54 e os espectros de massas dos componentes químicos do óleo essencial, determinamos com boa margem de confiança a maior parte de sua composição.

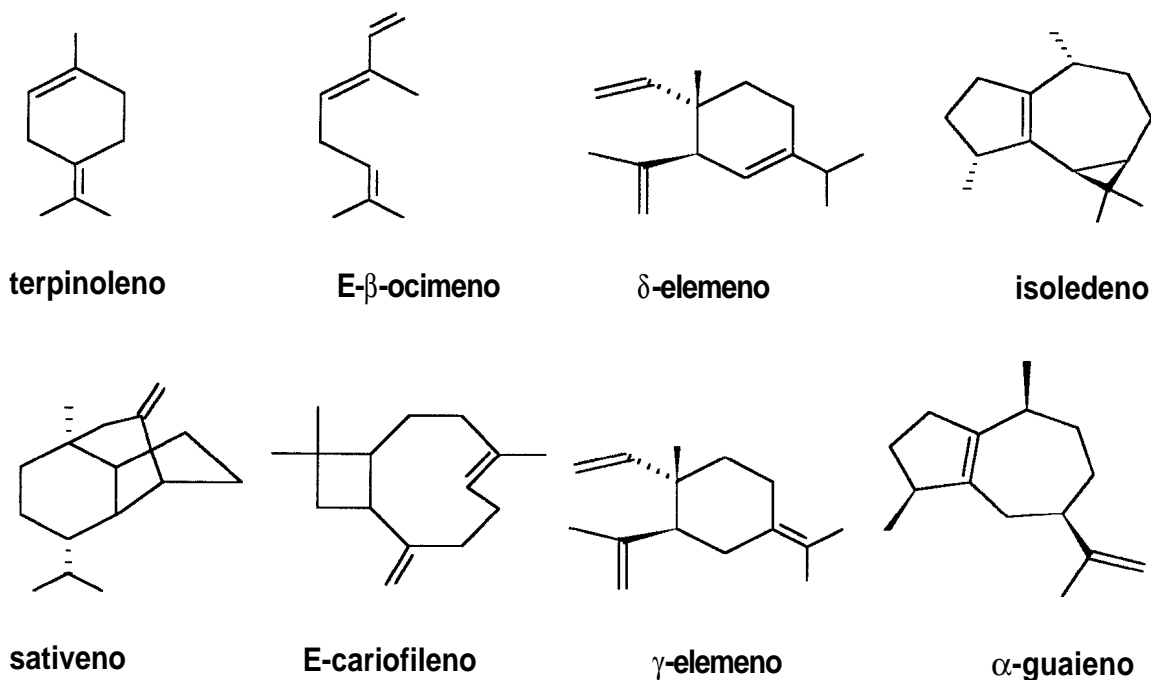
De acordo com o conjunto das análises, encontramos que os constituintes químicos em maior proporção no óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. foram os monoterpenos: α -terpinoleno e *E*- β -ocimeno e os sesquiterpenos: δ -elemeno, isoleveno, sativeno, *E*-cariofileno, γ -elemeno, α -guaiano, α -humuleno, γ -muuroleeno, β -selineno, *cis*- β -guaiano, valenceno, δ -selineno, α -bulneseno, γ -cadineno, δ -cadineno, selin-4(14),7(11)-dieno, γ -selineno, 4 β -hidroxigermacra-1(10),5-dieno, espatulenol, tujopsan-2 α -ol, humuleno epóxido II, γ -eudesmol, T-cadinol, T-muurolol, β -eudesmol, selin-11-en-4 α -ol, α -cadinol, α -eudesmol, khusinol, juniper cânfora e ent-maalien-4-ol. A estrutura destes compostos podem ser vistos na figura 9. Isto perfaz um total de 74,2% da composição química do óleo essencial segundo a proporção das áreas dos picos no cromatograma, onde estão presentes os constituintes químicos em maior proporção. O restante das substâncias presentes no óleo essencial possui concentração individual inferior a 0,01%, o que torna difícil a sua identificação.

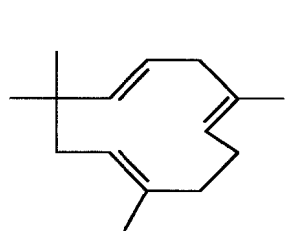
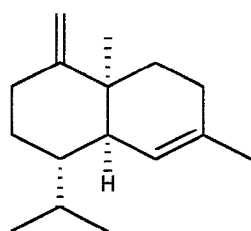
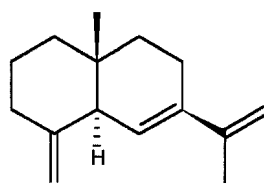
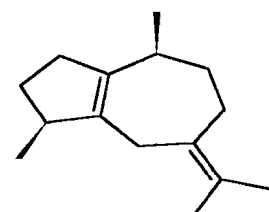
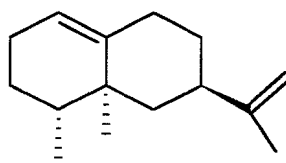
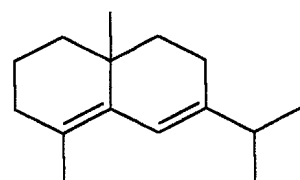
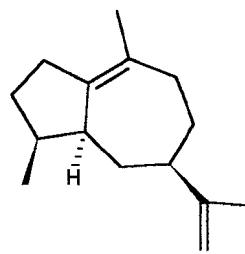
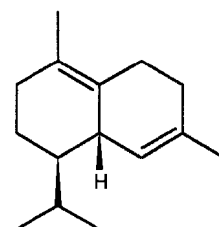
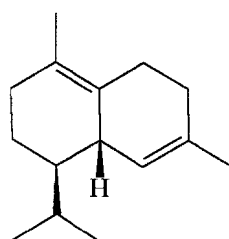
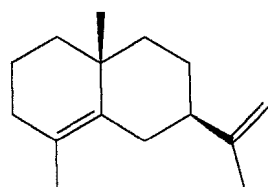
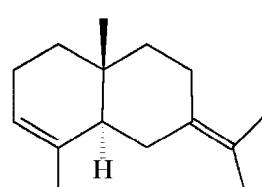
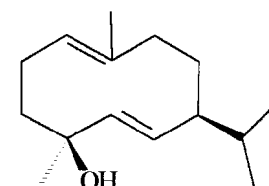
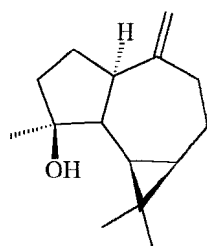
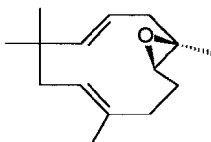
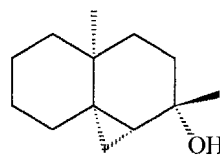
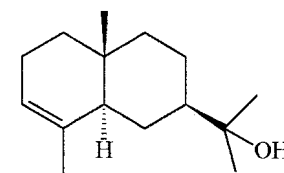
Dentre os grupos de substâncias encontrados, os selinenos respondem por um total de 11,8% do óleo essencial e os elemanos por um percentual de 10%. Tal observação pode ser utilizada para classificar o óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. como uma fonte dos grupos selineno e elemeno, sendo

que estudos recentes descobriram o uso deste último no tratamento de tumores cerebrais múltiplos metastáticos^(55,56). Diante desta observação, podemos classificar o óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. como fonte de elementos e sugerir testes biológicos para verificar se há resultados satisfatórios para sua aplicação neste tratamento.

As percentagens das substâncias identificadas no óleo essencial bem como os seus respectivos índices de retenção calculados em coluna SE-54 estão listadas na tabela 1.

Figura 8 : Estruturas dos principais constituintes químicos do óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb.



 **α -humuleno** **γ -muuroleno** **β -selineno****cis- β -guaieno****valenceno** **δ -selineno** **α -bulneseno** **γ -cadineno** **δ -cadineno** **γ -selineno****selin-4(14)7(11)-dieno****4 β -hidroxi-germacra-1(10)-5-dieno****espatulenol****humuleno epóxido II****tujopsan-2 α -ol** **γ -eudesmol**

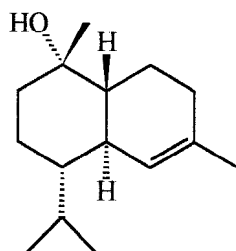
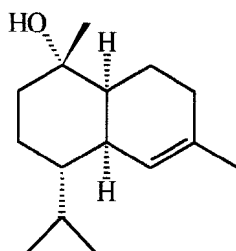
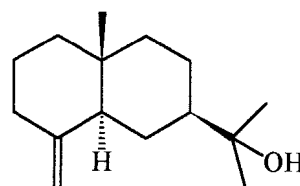
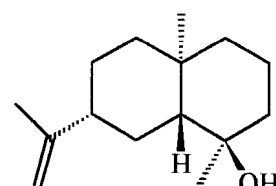
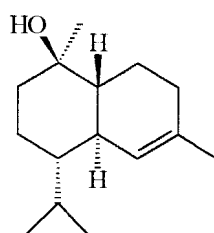
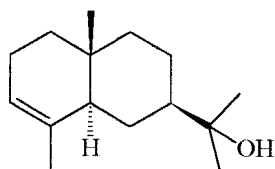
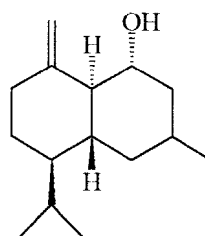
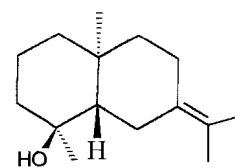
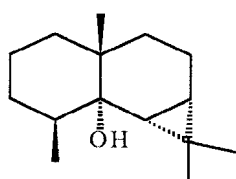
**T-cadinol****T-muurolool** **β -eudesmol****selin-11-en-
4 α -ol** **α -cadinol** **α -eudesmol****khusinol****juniper canfora****ent-maalian-5-ol**

Tabela 1 : Constituintes químicos identificados no óleo essencial *Eugenia nitida* Camb. e suas respectivas percentagens e índice de retenção calculado para coluna de baixa polaridade (SE-54).

Substância	IR	Percentagem	Identificação
<i>E-β</i> -ocimeno	1052	0,81	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>α</i> -terpinoleno	1089	0,95	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>δ</i> -elemeno	1338	2,00	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
isoleveno	1373	0,09	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
sativeno	1390	1,98	EM, Lit. ^(b)
<i>E</i> -cariofileno	1417	7,91	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>γ</i> -elemeno	1434	7,98	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>α</i> -guaiano	1439	0,87	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>α</i> -humuleno	1452	1,05	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>γ</i> -muuroloeno	1476	4,14	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>β</i> -selineno	1485	4,36	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
cis- <i>β</i> -guaiano	1490	2,01	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
valenceno	1492	3,90	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>δ</i> -selineno	-	2,07	EM, Lit. ^(b)
<i>α</i> -bulneseno	1505	0,57	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>γ</i> -cadineno	1512	1,21	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>δ</i> -cadineno	1523	2,81	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
selin-4(14),7 (11)-dieno	1542	2,43	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>γ</i> -selineno	-	traços	EM, Lit.
4 <i>β</i> -hidroxigermacra-1(10),5-dieno	1558	9,81	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
espatulenol	1576	0,75	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
tujopsan-2 <i>α</i> -ol	1581	1,37	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
humuleno epóxido II	1606	0,36	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>γ</i> -eudesmol	1631	1,15	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
T-cadinol	1642	2,87	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
T-muurolol	1646	0,67	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>β</i> -eudesmol	1649	2,12	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
selin-11-en-4- <i>α</i> -ol	1652	2,82	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>α</i> -cadinol	1654	2,70	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
<i>α</i> -eudesmol	1655	0,72	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
khusinol	1676	0,32	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
juniper cânfora	1692	0,96	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)
ent-maalien-4-ol	1767	0,66	IR ^(a) , EM, Lit. ^(b)

(a) : Índice de Retenção à temperatura programada comparado com o da literatura

(b) : Referências utilizadas : 15, 45, 66.

3.2- As fragmentações de massas dos compostos identificados

Muitos trabalhos envolvendo a análise de Óleos essenciais por espectrometria de massas esbarram num sério problema : a comparação dos espectros de massas obtidos da análise do óleo com os da literatura. A seriedade do problema deve-se principalmente ao fato de que um grande número de substâncias possui espectros de massas muito parecidos, com picos de mesmo valor de massa/carga (m/z), muitas vezes diferenciando apenas na intensidade de tais picos. Esta semelhança pode ser explicada pela origem biossintética dos compostos, haja visto que os compostos de origem terpenóide, neste estudo mais especificamente os mono e sesquiterpenos, possuem um precursor comum para cada classe, o farnesil pirofosfato, para os sesquiterpenos, e o geranyl pirofosfato para os monoterpenos, ambos originários das condensações de unidades isopentenil pirofosfato e dimetil-alil-pirofosfato (pág. 111). Estas unidades precursoras vão ciclicizar de diversas formas e sofrer rearranjos que conduzem a estruturas diferentes.

No entanto, o diferente modo de ruptura entre as ligações das moléculas durante o processo de fragmentação no espectrômetro de massas vai gerar fragmentos de intensidades tais que possam ser detectadas pelo aparelho. Fragmentos altamente estáveis, vão produzir sinais bastante intensos no espectro de massas e vice-versa. Desta forma, alguns fragmentos de mesmo valor de m/z , apesar de possuírem mesmo número de átomos, estes estão arranjados de formas diferentes, proporcionando diferentes formas de

estabilização na molécula. Isto vai originar picos de diferentes intensidades e, conseqüentemente, espectros de massas diferentes. Baseados nesta premissa, a análise da fragmentação de massas dos compostos se torna também um meio de diagnóstico seguro, principalmente confirmando uma proposta estrutural para uma dada substância.

3.2.1- Origem dos Fragmentos de Massas mais observados entre os constituintes químicos de *Eugenia nitida* Camb.

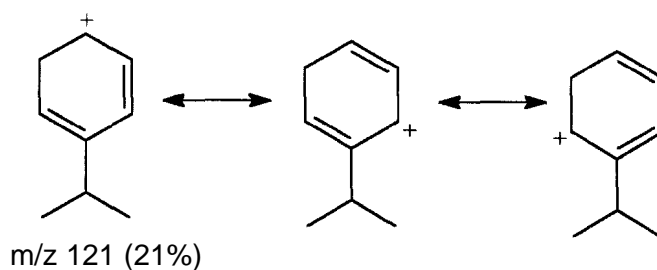
Entre as 33 substâncias identificadas por comparação dos espectros de massas, 16 delas já haviam sido identificadas também no óleo essencial de *Eugenia ovalifolia* Camb. e suas propostas de fragmentação foram sugeridas por Duarte⁽⁴⁹⁾ em sua dissertação de Mestrado. Este resultado sugere que os óleos essenciais extraídos de espécies do gênero *Eugenia* têm constituintes químicos característicos.

Neste estudo, propusemos rotas de fragmentação para todos os compostos não encontrados no trabalho citado e mesmo na literatura em geral.

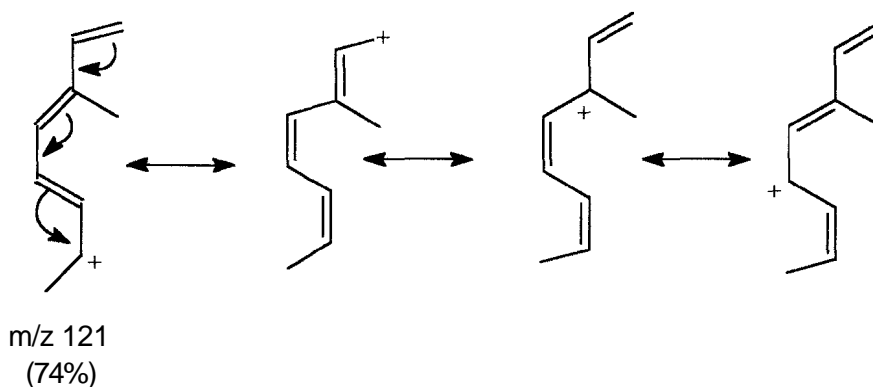
Um exemplo das propostas sugeridas está na identificação dos monoterpenos terpinoleno e *E*- β -ocimeno, que possuem espectros de massas bastante parecidos.

Uma das principais diferenciações observadas é a presença do pico de m/z 121 que apresenta uma abundância relativa muito superior para o terpinoleno (74%) em relação ao *E*- β -ocimeno. A origem do fragmento se deve à

perda de um radical metila do íon molecular M^+ 136. Em relação ao terpinoleno, o cátion formado é estabilizado por duas formas de mesomeria dentro do anel. No entanto, o pico de m/z 121 do E - β -ocimeno, de mesma origem, possui três formas mesoméricas que fazem com que a carga positiva esteja bem mais estabilizada, formando inclusive um carbocátion terciário numa das formas (fig. 9).



Mesomeria do fragmento 121 do terpinoleno



Mesomeria do fragmento de m/z 121 do E - β -ocimeno

Figura 9 : Diferenciação entre os espectros de massas do terpinoleno e do E - β -ocimeno por meio do fragmento de m/z 121.

Outra diferença encontrada entre os dois espectros é a ausência do íon de m/z 119 para o ocimeno e presente no espectro de massas do terpinoleno.

Podemos explicar este fato através da observação de que a molécula do ocimeno não possibilita a formação deste fragmento, visto que, partindo-se do íon molecular M^+ 136 para se obter o íon de m/z 119 teríamos que ter a perda de 17 unidades de massa. De acordo com a estrutura, esta perda não é viabilizada. Outra possibilidade seria a perda de H_2 do íon de m/z 121, também muito pouco provável, pois existiria a obrigatoriedade da formação de uma ligação tríplice eliminando, desta forma, a estabilização pela conjugação das duplas ligações, ou a localização de uma carga positiva sobre a dupla ligação.

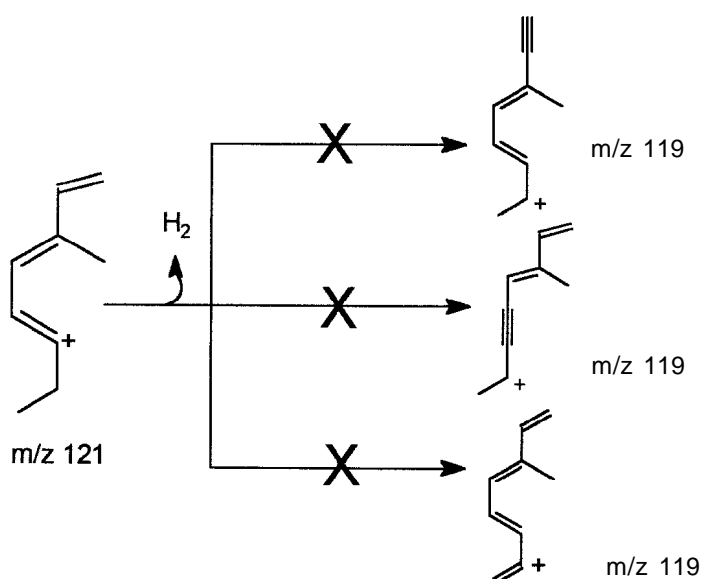


Figura 10 : Origem do provável fragmento de m/z 119 do E - β -ocimeno.

Temos ainda que a abundância relativa do íon de m/z 105 para o terpinoleno é de 30% e para o ocimeno é de 19,3%. Observando-se os dois fragmentos propostos poderíamos supor que esta diferença relaciona-se também a estabilidade dos íons em discussão através de estruturas de ressonância.

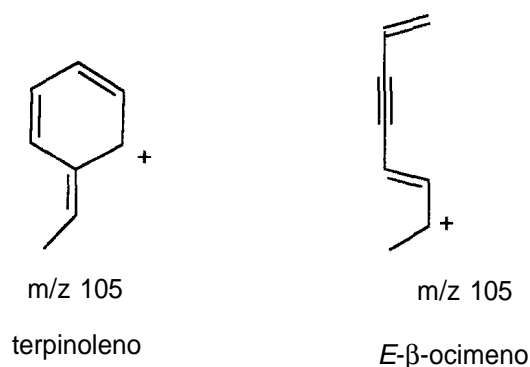


Figura 11 : Fragmento de m/z 105 do E - β -ocimeno e do terpinoleno

Para os sesquiterpenos, essas mesmas diferenças são observadas. Neste estudo em particular, observamos a frequência da presença de determinados picos nos espectros de massas, como m/z 189, m/z 161, m/z 147, m/z 133, m/z 121, m/z 119, m/z 105, m/z 93, m/z 91, m/z 81, m/z 79, m/z 77, m/z 67, m/z 65, m/z 55, m/z 43 e m/z 41. Como os diversos esqueletos encontrados são de origem terpênica, existe disponibilidade de hidrogênios, permitindo que sejam realizados muitos rearranjos 1,4 que explicam a saída de determinadas unidades de massas.

Os sesquiterpenos hidrocarbonetos, em geral, possuem massa molecular 204. Assim, não é difícil prevermos que o fragmento de m/z 189 é proveniente da perda de um radical metila da molécula, gerando um cátion. Algumas vezes essa perda de metila em forma de radical é dificultada pela presença de duplas ligações na estrutura requerendo um rearranjo para facilitar a saída do radical.

Isto pode ser observado na proposta de fragmentação para o sativeno (esq. 6), que precisa sofrer um rearranjo 1,4 para fornecer uma estrutura capaz de liberar o radical metila após o impacto de ionização e produzir o íon de m/z 189 capaz de, por sua vez, dar origem a outros fragmentos.

O fragmento de m/z 161 pode ser originado de duas formas: pela perda de 28 unidades do íon de m/z 189, o que corresponde a saída de etileno (C_2H_4) da estrutura, ou pela saída do radical isopropil ($.C_3H_8$) de massa 43 do íon molecular.

A partir do íon de m/z 161, é possível, pela perda de etileno, a formação de m/z 133, muito freqüente nos espectros de massas de sesquiterpenos. Por sua vez, a saída de isopropeno (C_3H_6) de m/z 189 gera o fragmento de m/z 147, que, conseqüentemente perde uma molécula de etileno e forma o íon de m/z 119, ou ainda pode perder novamente isopropeno e produzir o íon de m/z 105.

O fragmento carregado de m/z 105 pode ser produzido tanto a partir de m/z 147, pela saída de isopropeno, quanto pela perda de CH_4 do fragmento de

m/z 121, este geralmente sendo produzido pela perda de uma molécula neutra de massa 40 (um aleno ou um isopropino) do íon de m/z 161.

O fragmento de m/z 91, geralmente é associado ao íon tropílio, altamente estável. Porém, encontramos outras estruturas menos estáveis para o pico de m/z 91, como no caso do isoledeno e do γ -cadineno (fig. 12).

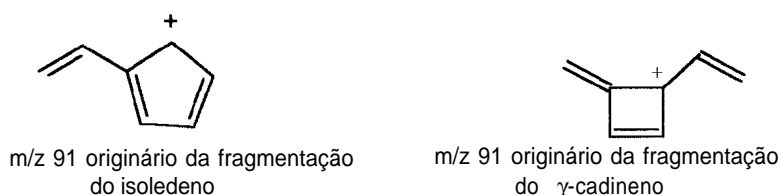


Figura 12 : Fragmentos de m/z 91 do isoledeno e do γ -cadineno

A origem do fragmento de m/z 91 é mais freqüentemente relacionada à perda de uma molécula de etileno da estrutura do fragmento de m/z 119. Também pode ser proveniente da perda de H_2 do íon de m/z 93, este por sua vez derivado de m/z 133 devido à saída de 40 unidades de massa (C_3H_4).

Muitas vezes torna-se difícil encontrar a origem dos fragmentos de m/z 81, 79 e 77. Em se tratando do fragmento de m/z 77 podemos supor que é o anel benzênico carregado positivamente ou de outras poucas estruturas de fórmula molecular idêntica ($C_6H_5^+$) segundo mostra o fragmento do γ -cadineno (fig. 13). O fragmento de m/z 81 pode se originar da perda de C_3H_4 de m/z 121, enquanto o fragmento de m/z 79 pode ser proveniente da saída de C_2H_2 da estrutura de m/z 105.

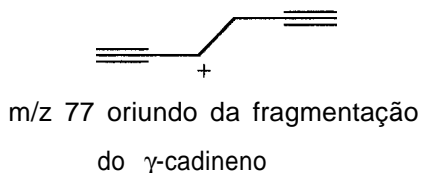


Figura 13 : Estruturas dos fragmentos iônicos de m/z 77 do γ -cadineno

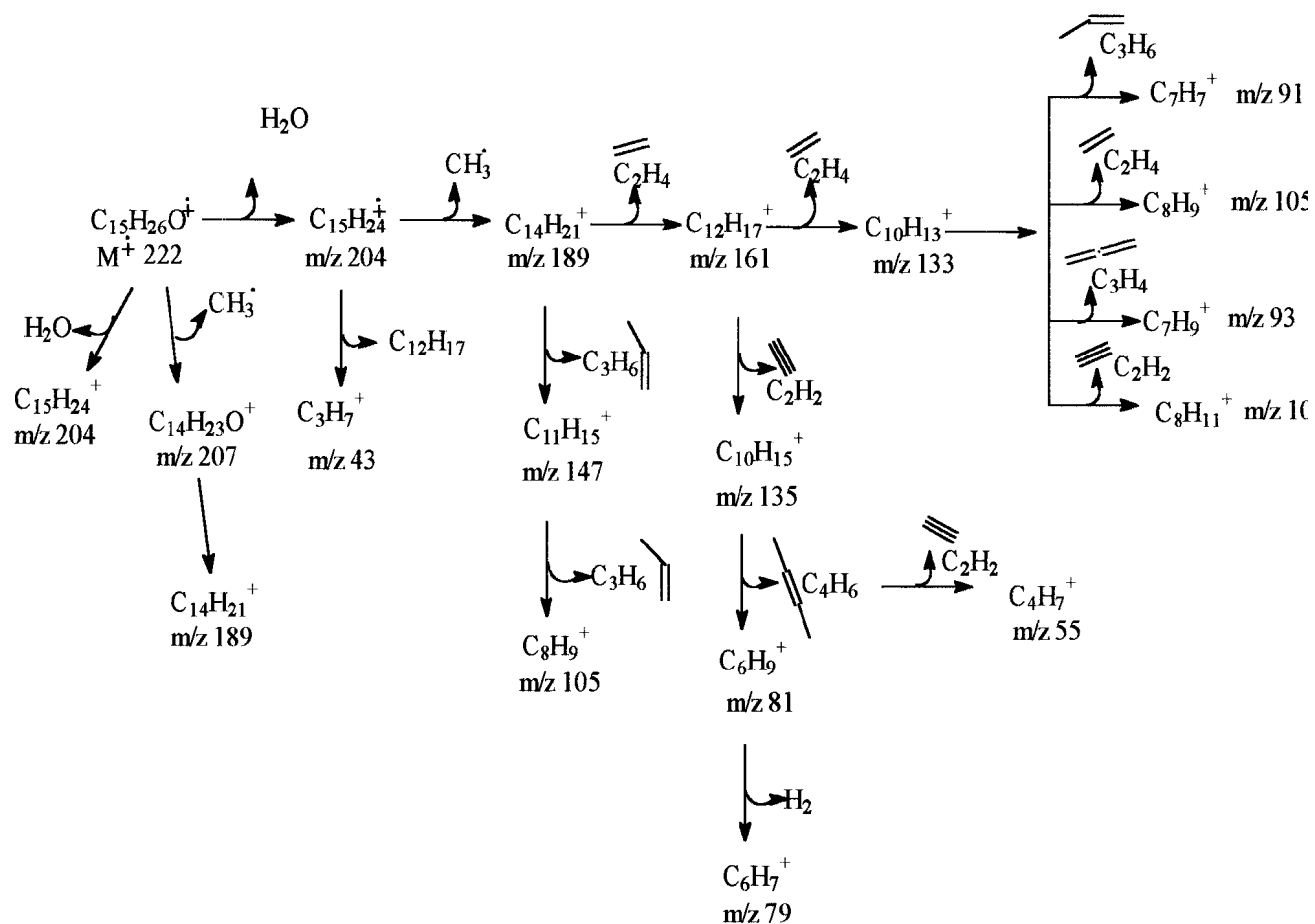
Origem semelhante a do fragmento de m/z 79 tem o fragmento de m/z 67, que também se origina da perda de C_2H_2 do fragmento de m/z 93, entre outras rotas.

Os fragmentos de m/z 55, 43 e 41, inevitavelmente possuem a fórmula molecular C_4H_7 , C_3H_7 e C_3H_5 . Devido ao pequeno número de átomos presentes, as possibilidades estruturais para os fragmentos são limitadas. A presença do pico destes fragmentos como pico-base leva à observação de que os outros fragmentos são ainda menos estáveis do que estes.

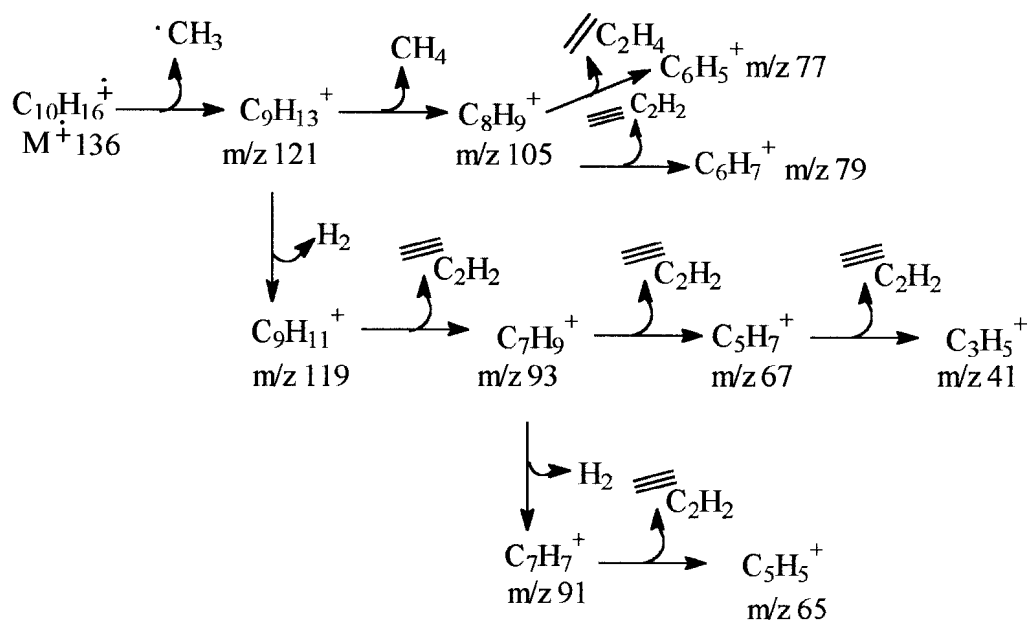
Na discussão apresentada acima, não limitamos a formação dos fragmentos apenas a partir das origens propostas. Achamos, no entanto, tratarem-se de rotas mais lógicas para a formação dos fragmentos, que podem perfeitamente ter outras origens, uma vez que o processo de fragmentação no espectrômetro de massa é complexo e não há evidências experimentais a respeito do mesmo. Esta discussão é ilustrada no esquema 1.

Esquema 1 : Origem dos principais fragmentos de massas de mono e sesquiterpenos no espectro de massas:

Sesquiterpenos:



Monoterpenos :



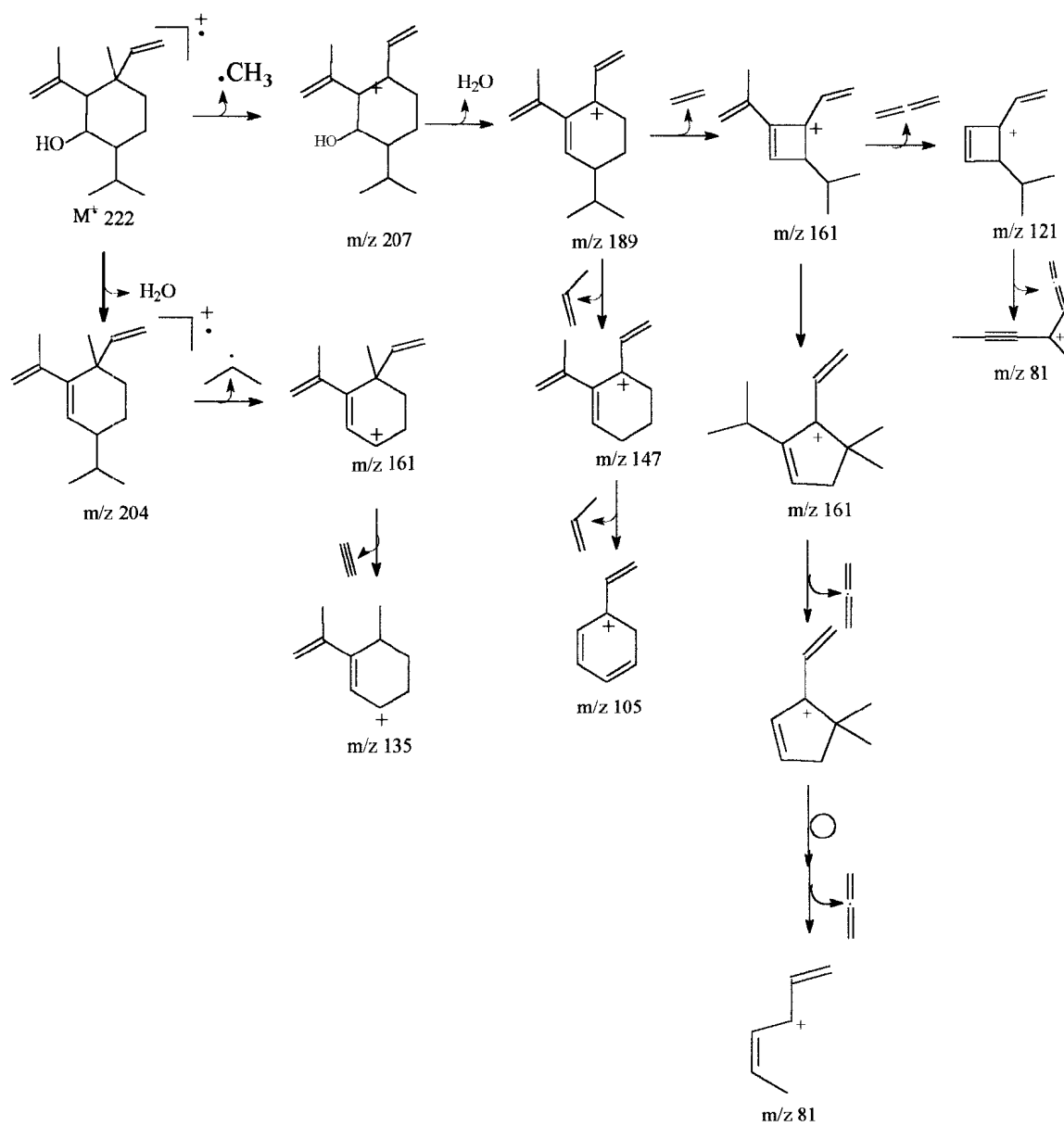
3.2.2- Proposta para a diferenciação entre o shyobunol e o 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno por fragmentação de massas.

O shyobunol e o 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno são sesquiterpenos oxigenados cujos espectros de massas são muito parecidos quando comparados entre si e ao do componente majoritário do óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. Para apontar qual das estruturas se enquadra mais ao perfil do espectro de massas do composto, recorreremos às fragmentações em busca de uma proposta que pudesse desfazer a ambigüidade.

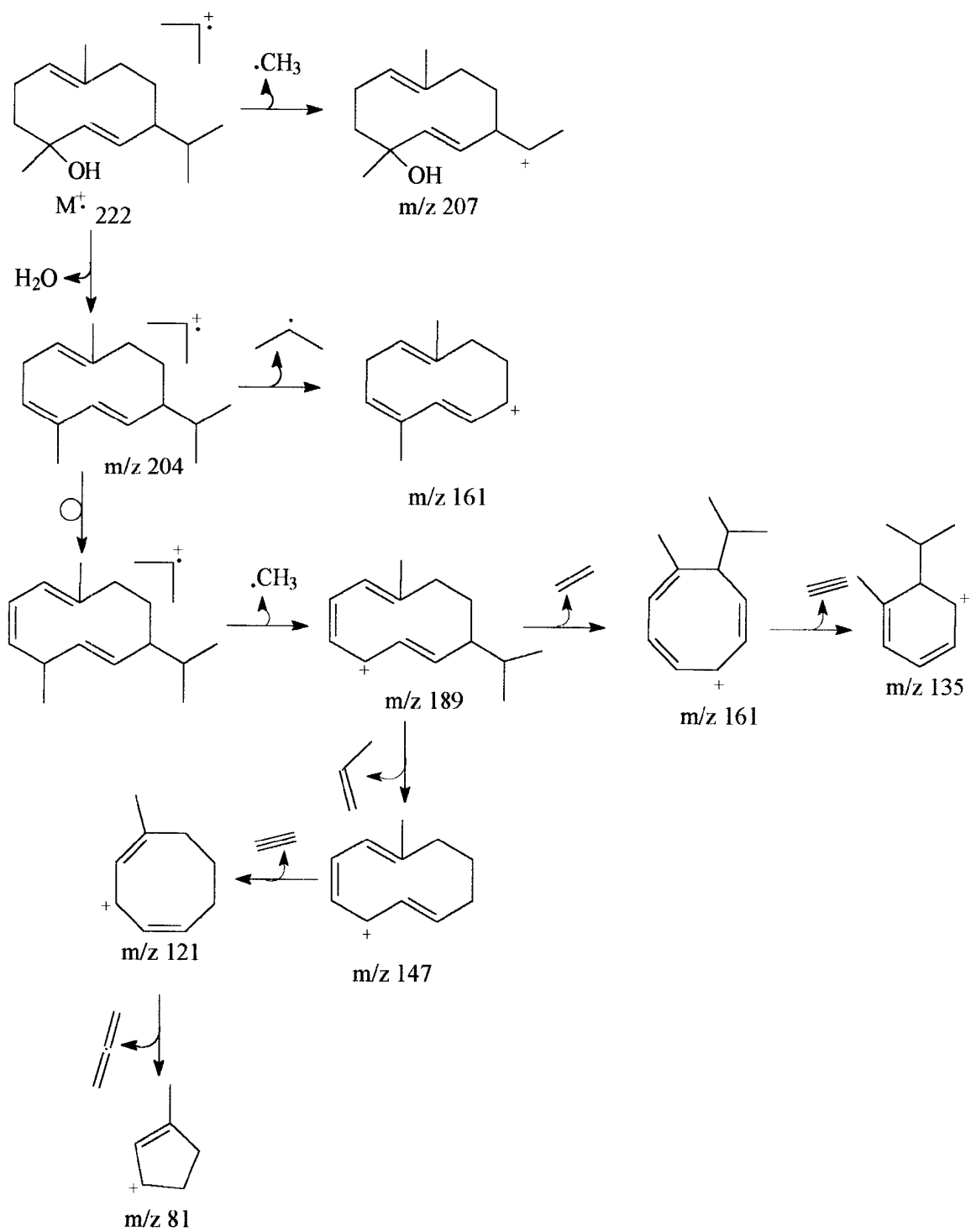
O recurso de apelar para as fragmentações de massas para distingüir a identidade do composto foi ainda mais indicado quando não encontramos na literatura o valor do índice de retenção do shyobunol. O isolamento deste sesquiterpeno oxigenado foi relatado apenas uma vez⁽⁵⁷⁾ e até o presente momento não há registros relativos à sua identificação entre os constituintes químicos de Óleos essenciais e, por conseqüência do valor de seu Índice de Retenção.

O composto 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno, ao contrário, possui um valor de índice de retenção para coluna de baixa polaridade condizente com o valor calculado para o composto de maior concentração. No entanto, caso o shyobunol apresente um índice de retenção muito próximo ao dele, fica ainda difícil a atribuição da identidade do composto desconhecido a qualquer um deles.

Esquema 2 : Propostas de Fragmentação de Massas para o shyobunol



Esquema 3 : Propostas de Fragmentação de Massas para o 4β-hidroxi-germacra-1(10)5-dieno



O pico de m/z 81 (96,5 %) é conclusivo nesta análise e é relativo ao íon $C_6H_9^+$. Segundo o esquema 2, o shyobunol possui um íon de m/z 81 pouco estável, apesar de se tratar de um carbocátion terciário. Porém, ele é vizinho a um grupo eletroatrator, que desestabiliza a carga (fig. 17).

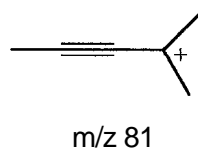


Figura 14 : Fragmento de m/z 81 do shyobunol

Já no fragmento m/z 81 oriundo do 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno a carga é estabilizada por duas formas de ressonância, na qual uma delas leva à formação de um carbocátion terciário (fig. 18):

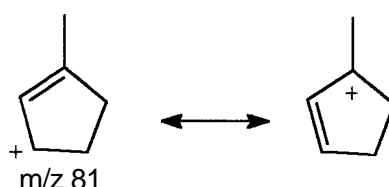


Figura 15 : Fragmento de m/z 81 do 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno

A maior probabilidade de origem do íon de m/z 81 é a partir do fragmento m/z 121 pela perda de C_3H_4 , mas existem outras possibilidades de fragmentação para o 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno envolvendo rearranjos mais complexos e outras etapas.

O pico base de m/z 43 (100%) não foi diagnóstico neste caso, pois ambos os sesquiterpenos fornecem a mesma estrutura para o fragmento iônico (fig. 19) :

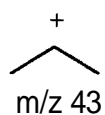


Figura 16 : Estrutura do fragmento de m/z 43

Os outros fragmentos possuem estruturas semelhantes e mesmas possibilidades de estabilização da carga. Porém, diante das possibilidades apresentadas é possível apontar o 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno como o composto majoritário presente na constituição química do óleo essencial.

Tabela 2 : Principais fragmentos e sua abundância relativa presente nos espectros de massas dos constituintes químicos do óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb.

Substância	Principais fragmentos no espectro de massas m/z (%)
<i>E-β-ocimeno</i>	M+. 136 (12), 121(21), 105(19,3), 93 (100), 79 (60), 67 (8,8), 53 (16,6), 44 (57)
Terpinoleno	M+. 136 (55), 121 (74), 119 (14), 105 (30), 93 (100), 79 (52), 77 (35), 63 (14), 53 (22), 44 (66).
δ-elemeno	M+. 204 (7), 189 (5), 161 (44), 147 (5), 136 (61), 121(100), 93 (96), 79 (33), 67 (10), 53 (15), 41 (29).
Sativeno	M+. 204 (31), 189 (43), 161 (50), 147 (31), 133 (41), 115 (37), 108 (100), 93 (75), 79 (49), 55 (35), 41 (60).
Não-identificado	M+. 204 (67), 189 (91), 161 (51), 147 (94), 133 (53), 105 (98), 91 (100), 77 (39), 55 (23), 44 (70).
<i>E-cariofileno</i>	M+. 204 (11), 189 (20), 161 (35), 147 (22), 133 (74), 119 (35), 105 (51), 93 (86), 91 (70), 79 (61), 69 (61), 41 (100).
Isoledeno	M+. 204 (52), 189 (30), 161 (100), 147 (7), 133 (46), 119 (35), 105 (88), 91 (44), 81 (26), 77 (21), 67 (11), 55 (12), 41 (39).
γ-elemeno	M+. 204 (8), 189 (19,3), 161 (29), 147 (14), 133 (23), 121 (100), 93 (72), 79 (31), 67 (32), 41 (50).
Não identificado	M+. 204 (67), 189 (27), 161 (100), 147 (19), 133 (53), 105 (97), 91 (99), 81 (50), 55 (37), 41 (63).
α-humuleno	M+. 204 (12), 189 (3), 147 (19), 122 (7), 121 (32), 93 (100), 80 (37), 67 (18), 53 (20), 41 (14).
<i>cis-β-guaieno</i>	M+. 204 (43), 189 (53), 161 (65), 147 (21), 133 (33), 119 (49), 105 (100), 91 (49), 77 (26), 65 (14), 41 (50).

Substância	Principais fragmentos no espectro de massas m/z (%)
γ-muuroleno	M+. 204 (44), 189 (34), 161 (100), 147 (12), 133 (28), 119 (48), 105 (68), 93 (48), 79 (40), 55 (16), 41 (40).
δ-selineno	M+. 204 (70), 189 (100), 161 (99), 145 (13), 133 (28), 105 (46), 91 (30), 81 (17), 55 (17), 41 (33).
γ-cadineno	M+. 204 (47), 189 (24), 161 (100), 147 (17), 133 (43), 105 (81), 91 (74), 79 (47), 69 (19), 55 (39), 41 (77).
β-selineno	M+. 204 (61), 189 (68), 161 (81), 147 (52), 133 (52), 107 (82), 105 (100), 93 (88), 91 (78), 79 (96), 67 (65), 41 (79).
α-bulneseno	M+. 204 (54), 189 (100), 161 (43), 147 (34), 133 (65), 107 (60), 105 (56), 93 (70), 91 (44), 81 (52), 67 (35), 41 (52).
Não -identificada	M+. 204 (60), 189 (14), 161 (24), 148 (60), 122 (35), 121 (99,6), 105 (100), 93 (56), 91 (54), 77 (32), 55 (25), 43 (53).
δ-cadineno	M+. 204 (46), 189 (18), 161 (100), 147 (9), 134 (39), 119 (52), 105 (47), 91 (37), 81 (23), 65 (9), 55 (18), 41 (37).
Não-identificado	M+. 204 (96), 189 (100), 161 (65), 147 (25), 133 (46), 119 (32), 105 (41), 91 (43), 77 (21), 55 (18), 41 (37).
Valenceno	M+. 204 (70), 189 (27), 161 (100), 147 (16), 133 (35), 122 (31), 105 (52), 93 (44), 79 (29), 67 (28), 41 (40).
Selin-4(14),7 (11)-dieno	M+. 204 (100), 189 (96), 161 (63), 121 (79), 107 (79), 105 (84), 93 (79), 91 (60), 79 (54), 53 (52), 41 (84).
γ-selineno	M+. 204 (30) 189 (16), 161 (52), 122 (35), 105 (50), 93 (38), 91 (36), 79 (46), 55 (39), 43 (100).

Substância	Principais Fragmentos nos espectros de massas m/z (%)
Não-identificado	M+. 222 (19), 204 (20), 189 (26), 179 (28), 161 (49), 121 (31), 105 (44), 81 (40), 59 (43), 44 (100).
Não-identificado	M+. 204 (38), 179 (18), 161 (48), 123 (23), 119 (96), 93 (39), 77 (31), 44 (100).
Tujopsan-2 α -ol	M+. 220 (8), 204 (21), 175 (5), 161 (53), 133 (14), 123 (100), 105 (34), 81 (34), 55 (23), 41 (42).
Humuleno epóxido II	M+. 220 (1), 204 (2), 178 (4), 161 (4), 138 (11), 135 (4), 123 (7), 109 (21), 96 (23), 93 (18), 79 (19), 67 (42), 51 (34), 53 (20), 43 (100), 41 (67).
Epatulenol	M+. 220 (ausente), 205 (70), 187 (21), 159 (47), 147 (34), 134 (13), 119 (46), 105 (61), 91 (44), 77 (45), 55 (39), 44 (100).
Não-identificado	M+. 220 (21), 207 (27), 204 (39), 189 (32), 175 (10), 161 (17), 147 (29), 121 (16), 105 (35), 81 (47), 59 (46), 43 (100).
Não-identificado	M+. 222 (ausente), 204 (23), 179 (76), 161 (46), 123 (12), 119 (32), 105 (21), 95 (22), 91 (22), 78 (33), 77 (19), 55 (22), 44 (100).
Não-identificado	M+. 222 (ausente), 204 (49), 189 (31), 161 (85), 147 (20), 122 (22), 121 (35), 105 (55), 93 (37), 79 (41), 55 (28), 43 (100).
4 β -hidroxi-germacra-1 (10) 5-dieno	M+. 222 (3), 207 (8), 204 (77), 189 (56), 179 (7), 161 (74), 135 (37), 121 (50), 105 (48), 93 (49), 81 (96), 67 (27), 43 (100).
γ -eudesmol	M+. 222 (13), 204 (79), 189 (100), 175 (10), 161 (95), 133 (45), 119 (16), 105 (42), 91 (44), 81 (39), 55 (31), 44 (47).

Substância	Principais fragmentos no espectro de massas m/z (%)
T-cadinol	M+. 222 (ausente), 204 (40), 189 (19), 161 (100), 134 (12), 119 (16), 105 (26), 81 (23), 69 (11), 43 (37).
T-muurolol	M+. 222 (12), 204 (65), 161 (67), 133 (16), 121 (65), 95 (95), 79 (41), 69 (28), 43 (100).
Não-identificado	M+. 222 (12), 204 (98), 189 (79), 161 (100), 134 (39), 119 (34), 105 (39), 81 (42), 55 (30), 43 (84).
α-eudesmol	M+. 222 (7), 204 (78), 189 (61,4), 161 (63), 149 (75), 122 (23), 107 (42), 91 (29), 59 (100), 41 (35).
β-eudesmol	M+. 222 (ausente), 204 (7), 189 (10), 164 (33), 149 (61), 135 (12), 108 (34), 105 (23), 79 (23), 59 (100), 43 (31,6).
α-cadinol	M+. 222 (9), 204 (56), 182 (5), 161 (49), 137 (15), 121 (81), 95 (100), 81 (41), 69 (22), 43 (75).
Selin-11-en-4α-ol	M+. 222 (9), 204 (56), 189 (42), 175 (10), 161 (35), 135 (49), 121 (29), 93 (39), 81 (84), 71 (56), 43 (100).
Khusinol	M+. 222 (ausente), 202 (53), 187 (100), 159 (13), 145 (19), 131 (17), 121 (19), 91 (19), 79 (15), 69 (16), 41 (32).
Não-identificado	M+. 220 (12), 187 (23), 177 (21), 162 (55), 159 (51), 147 (39), 119 (96), 91 (74), 55 (19), 43 (100).
Juniper cânfora	M+. 222 (55), 204 (67), 189 (100), 176 (17), 161 (48), 133 (46), 122 (37), 105 (60), 81 (74), 67 (37), 43 (98).
Ent-maalian-5-ol	M+. 220 (57), 202 (22), 187 (26), 177 (10), 162 (74), 149 (50), 147 (45), 131 (31), 121 (33), 119 (49), 105 (59), 91 (50), 77 (41), 67 (22), 55 (28), 53 (26), 43 (71).

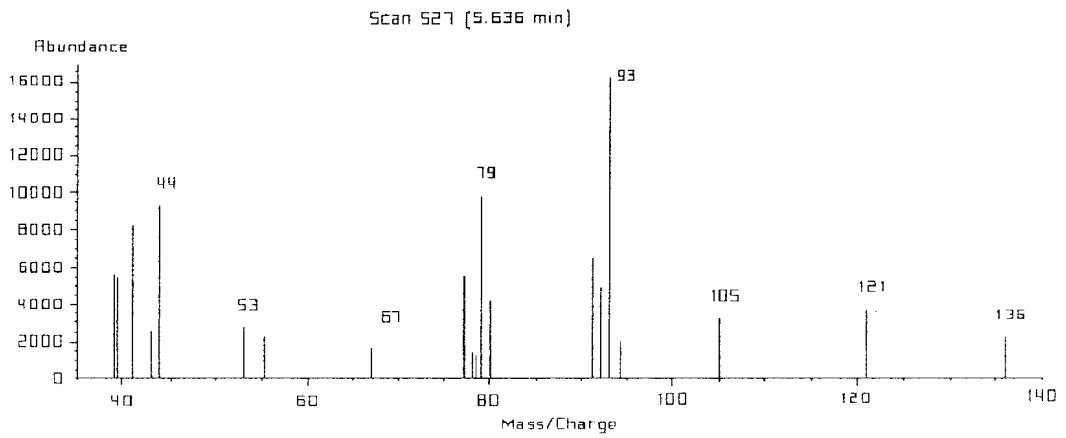
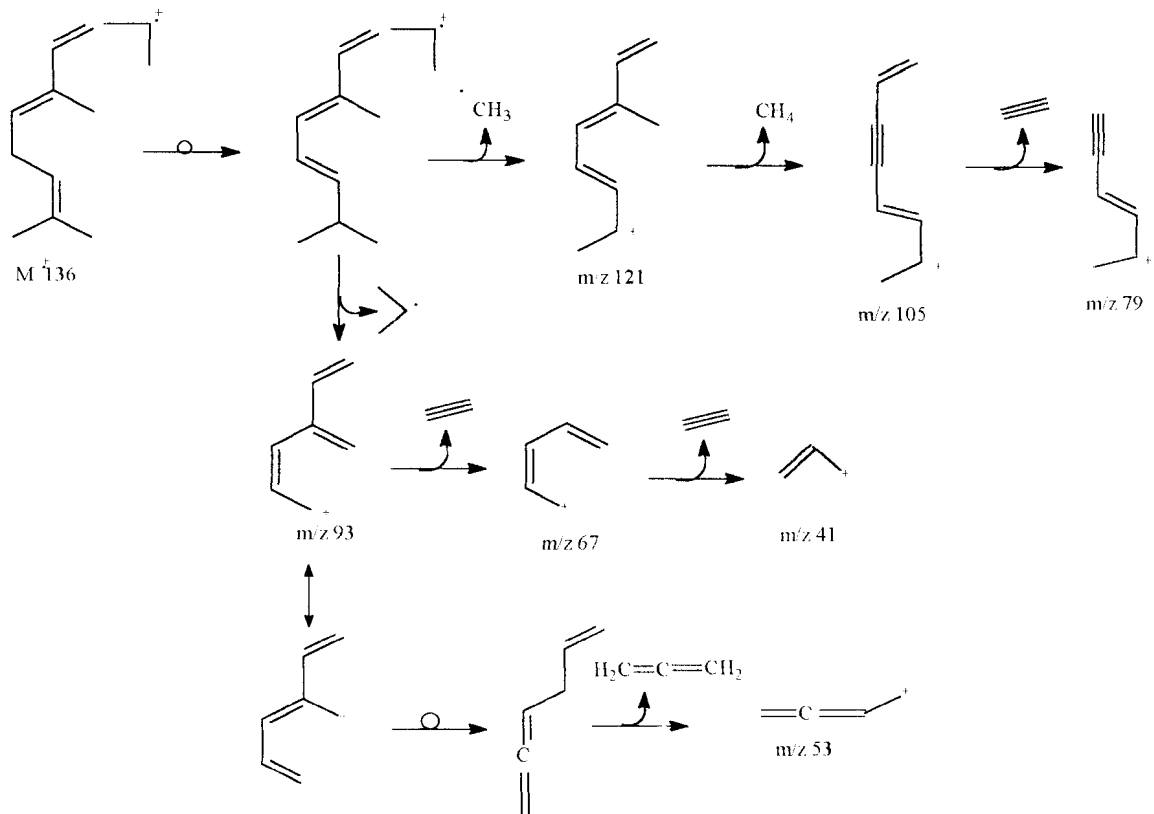


Figura 17 : Espectro de massas do *E*- β -ocimeno



Esquema 4 : Proposta de fragmentação para o *E*- β -ocimeno

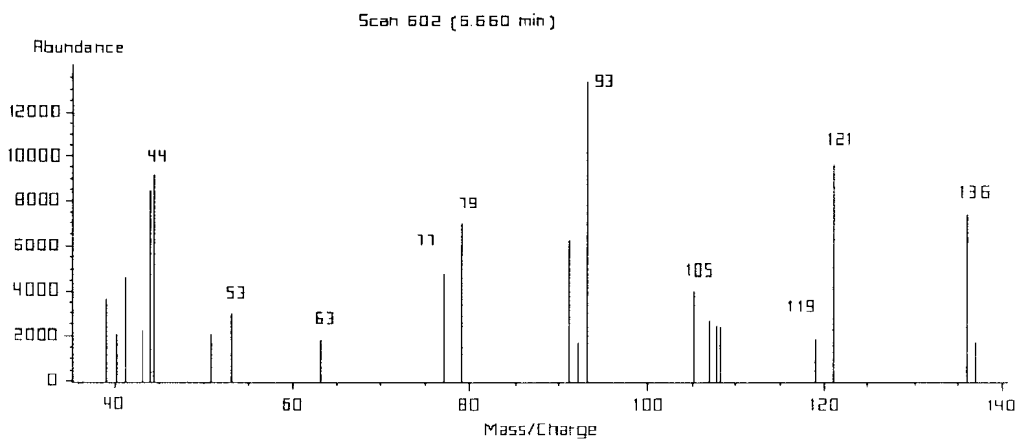
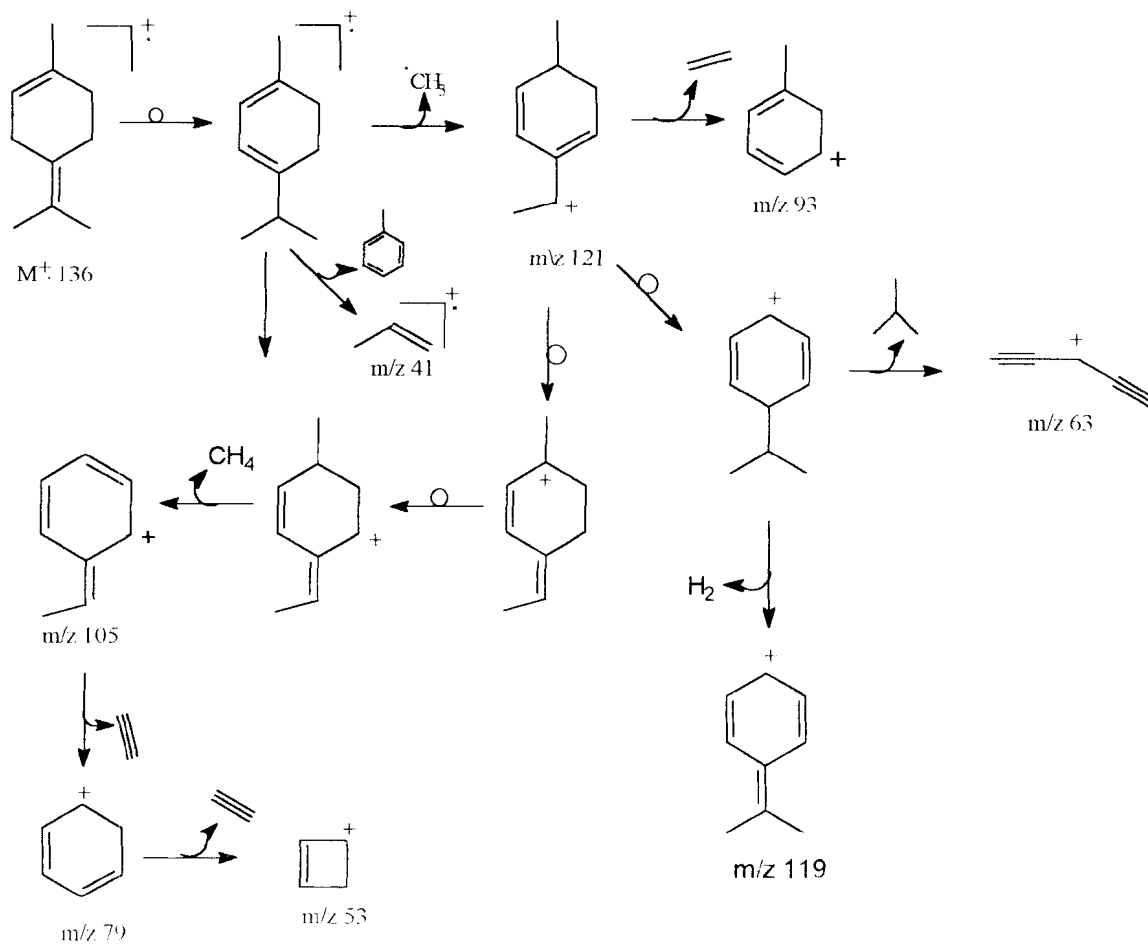


Figura 18 : Espectro de massas do terpinoleno



Esquema 5 : Proposta de fragmentação para o terpinoleno

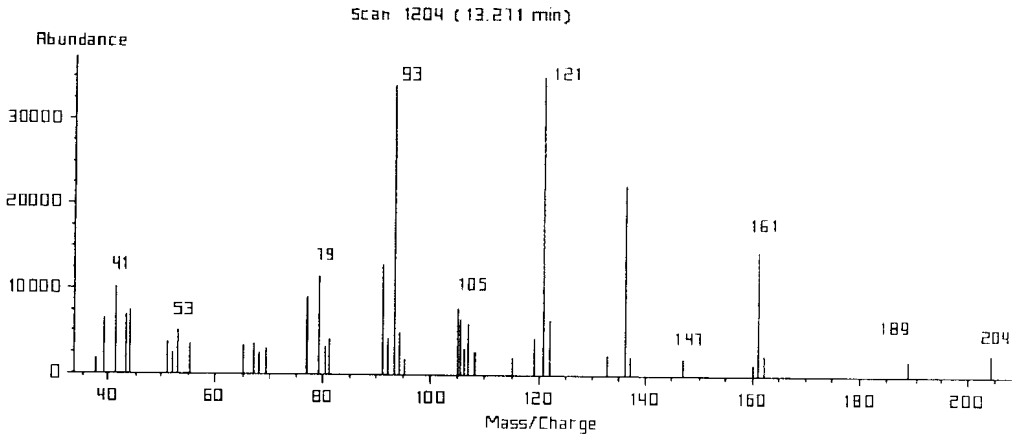


Figura 19 : Espectro de massas do δ -elemeno

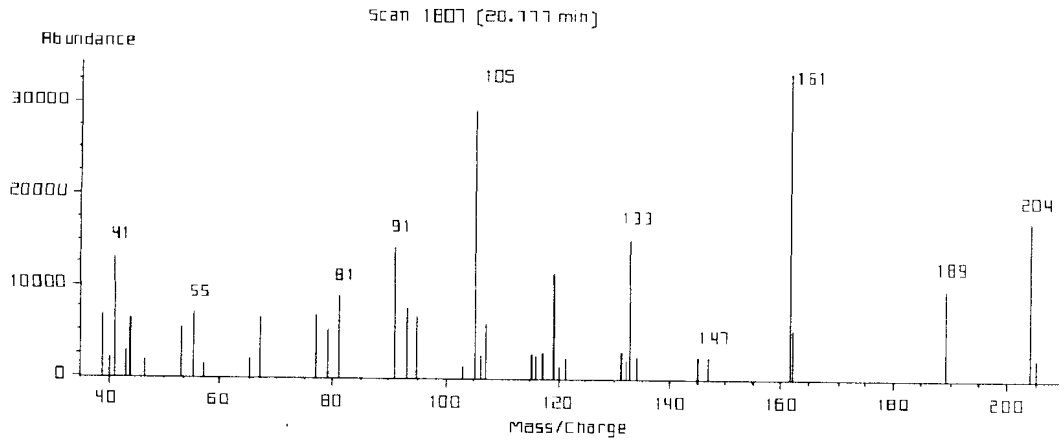
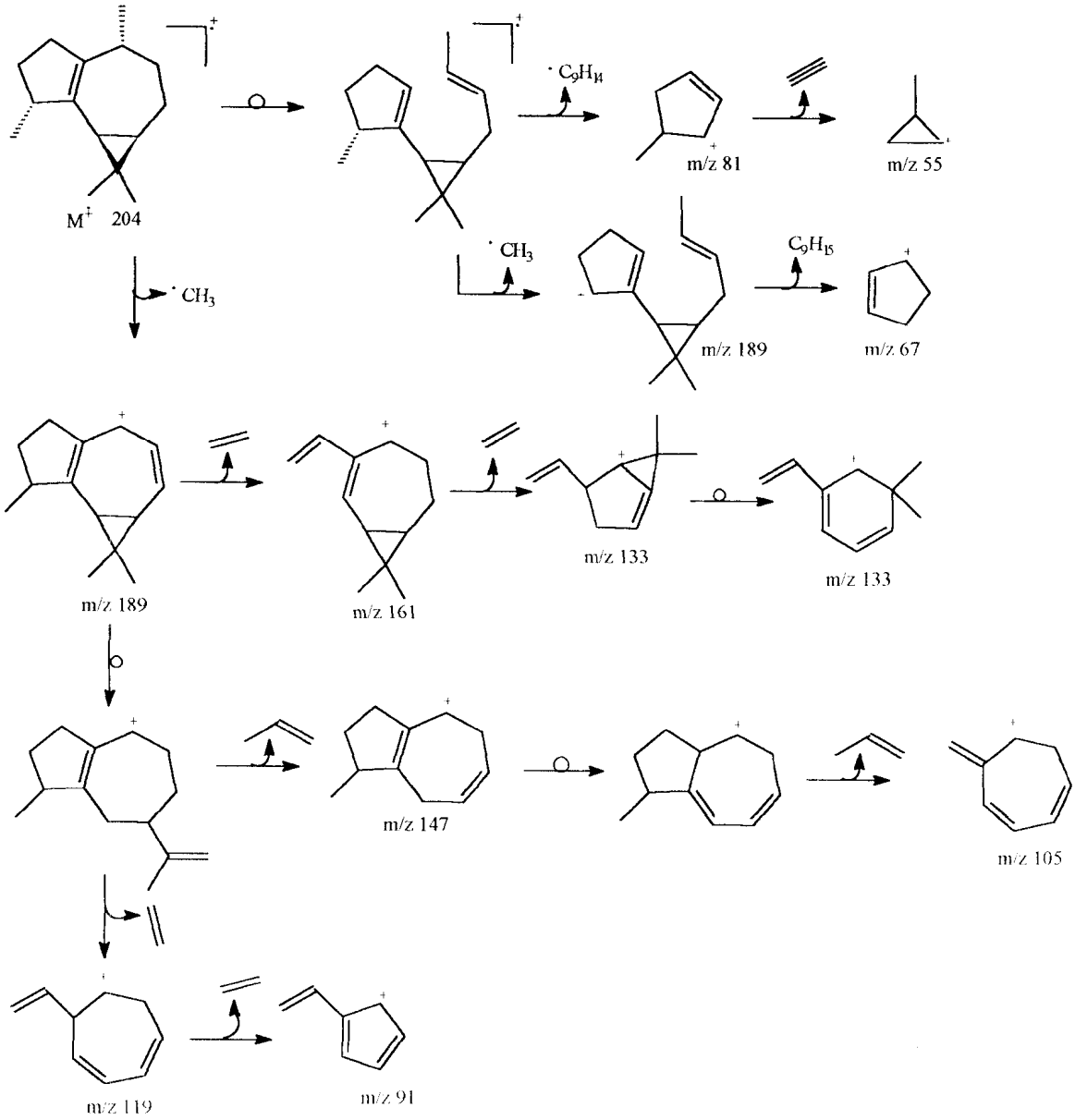


Figura 20 : Espectro de massas do isoledeno



Esquema 6 : Proposta de fragmentação para o isoledeño

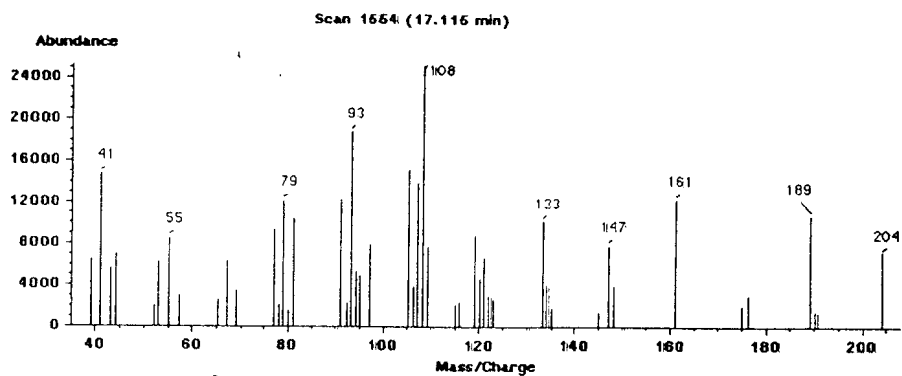
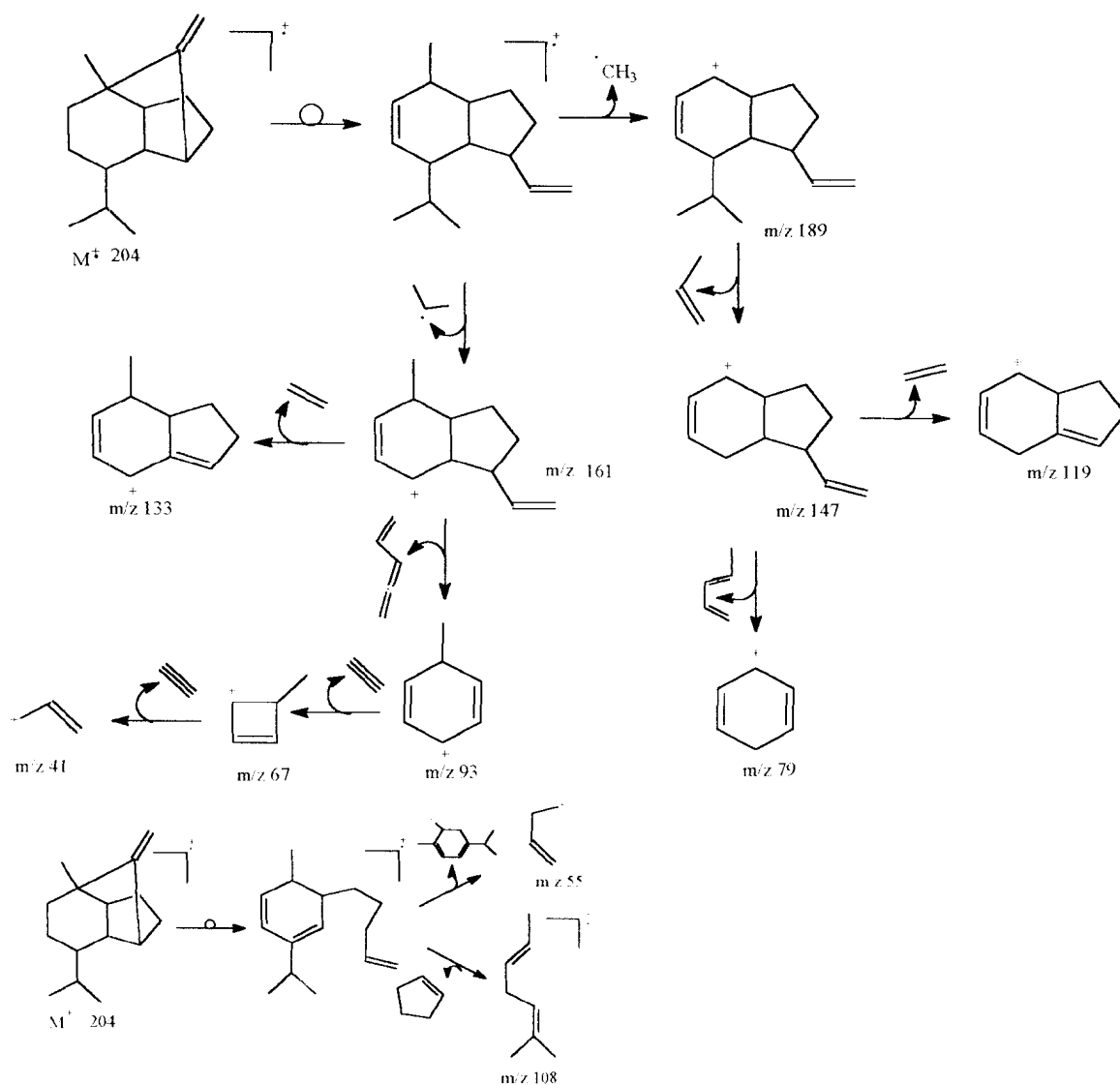


Figura 21 : Espectro de massas do sativeno



Esquema 7 : Proposta de fragmentação para o sativeno

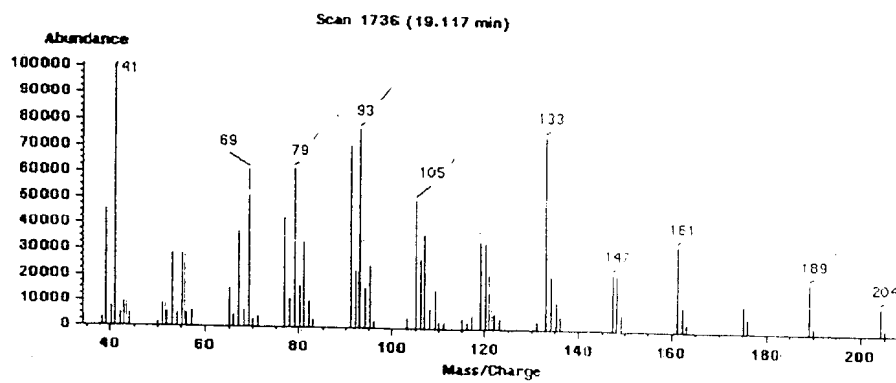


Figura 22 : Espectro de massas do *E*-cariofileno

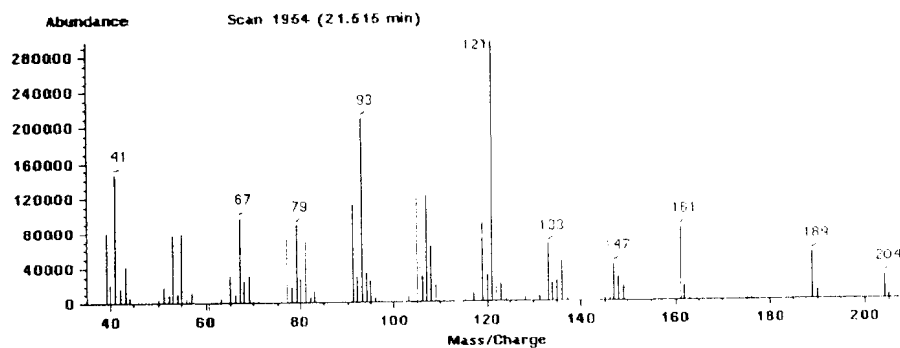
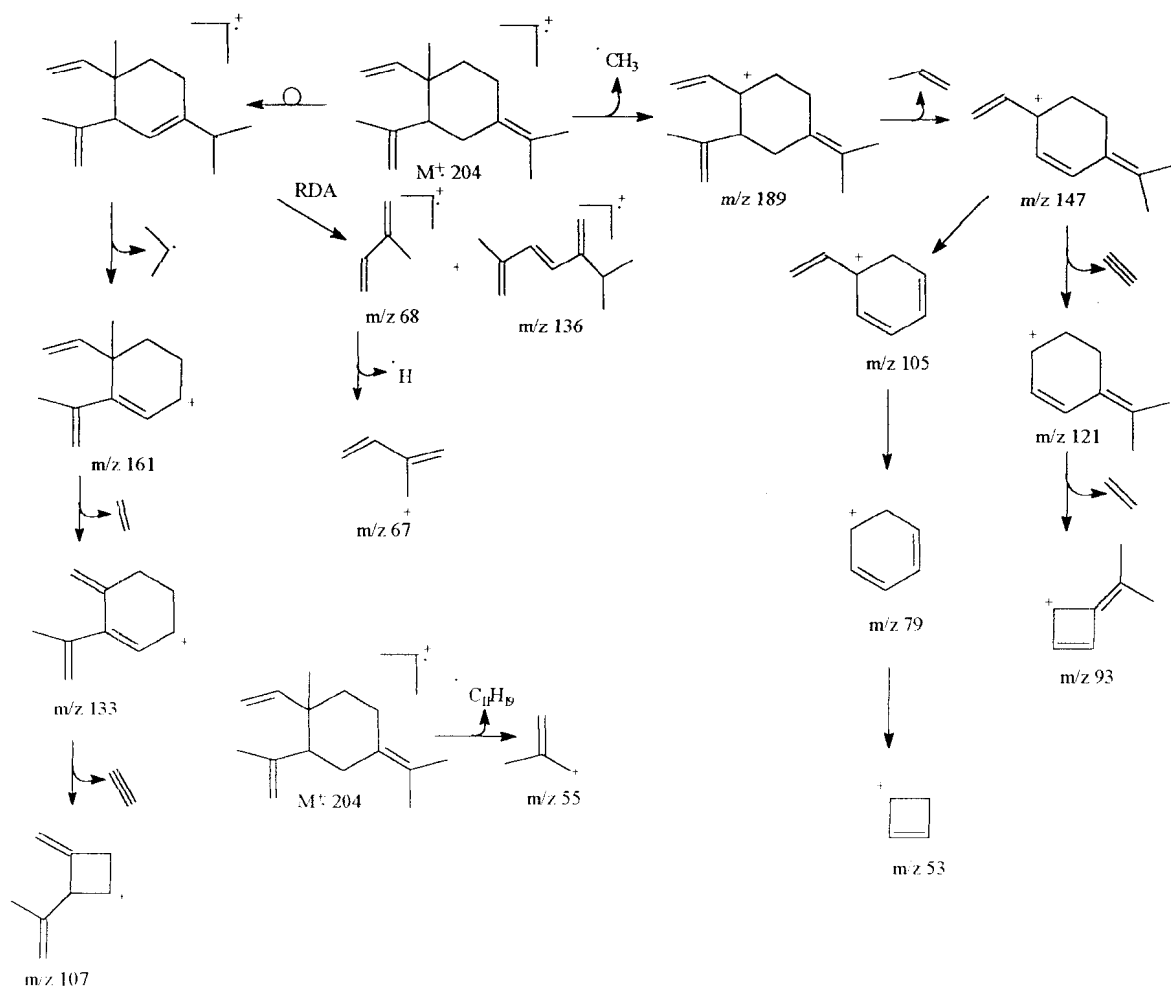


Figura 23 : Espectro de massas do γ -elemeno



Esquema 8 : Proposta de fragmentação para o γ -elemento

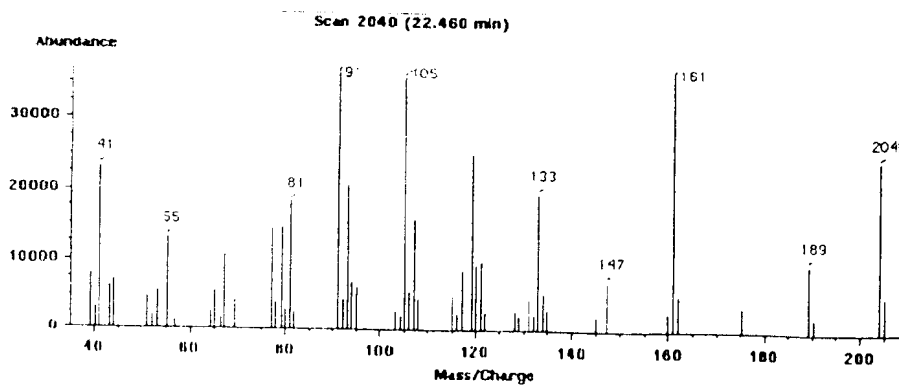


Figura 24 : Espectro de massas do α -guaieno

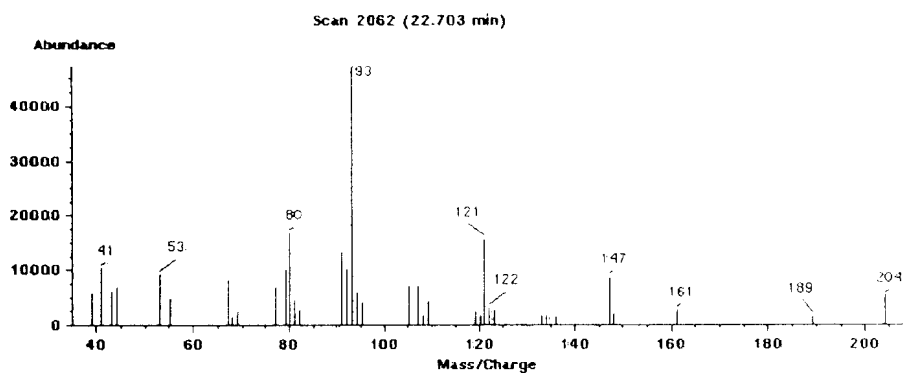


Figura 25 : Espectro de massas do α -humuleno

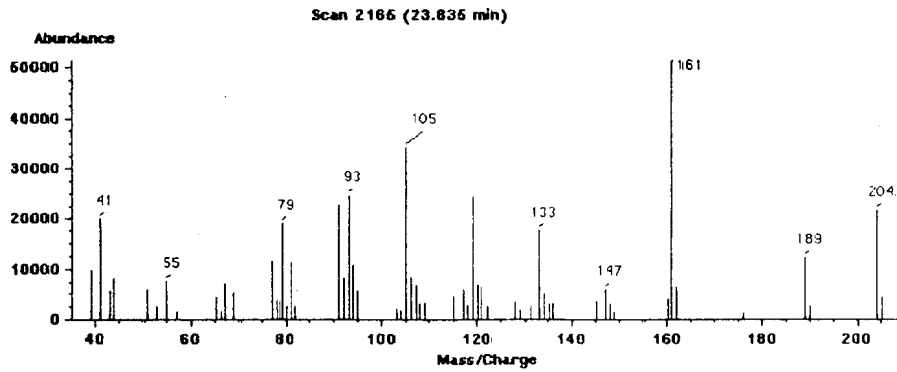
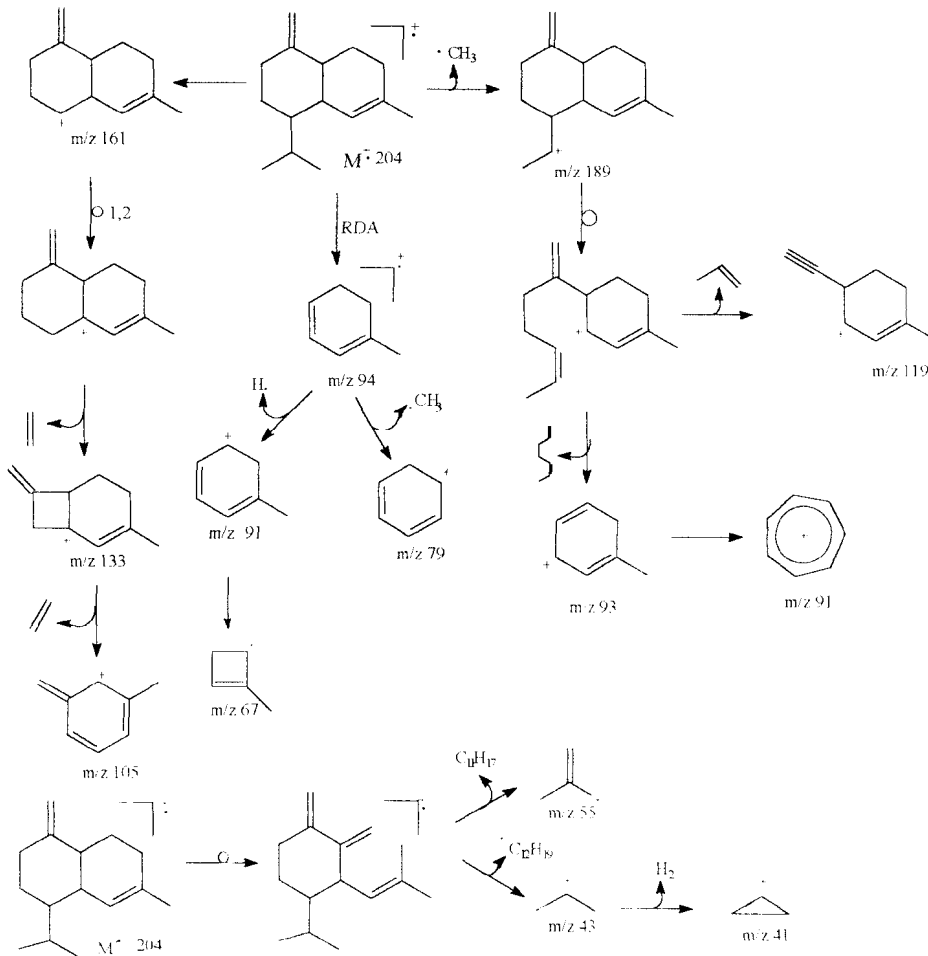


Figura 26 : Espectro de massas do γ -muuroleno



Esquema 9 : Proposta de fragmentação para o γ -muuroleno

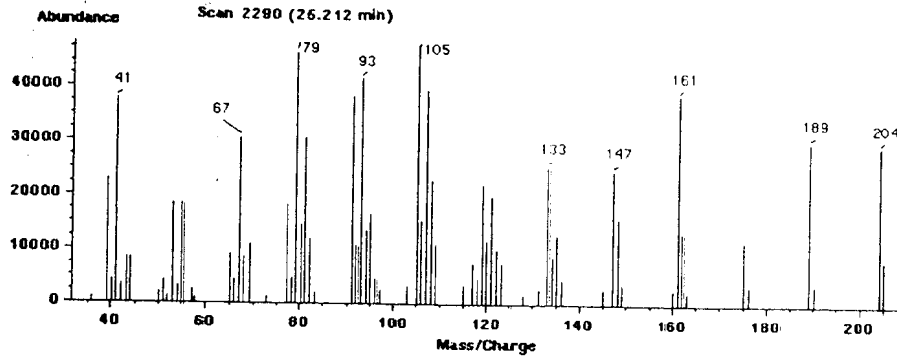
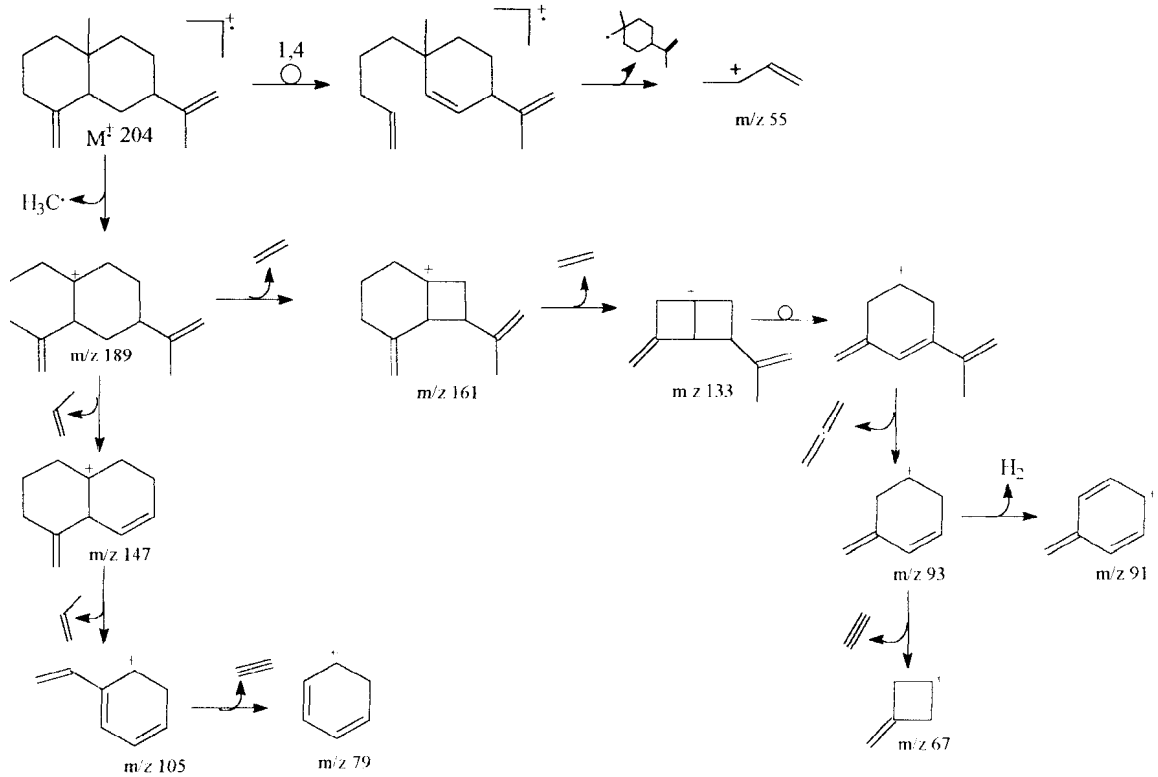


Figura 27 : Espectro de massas do β -selineno



Esquema 10 : Proposta de fragmentação para o β -selineno

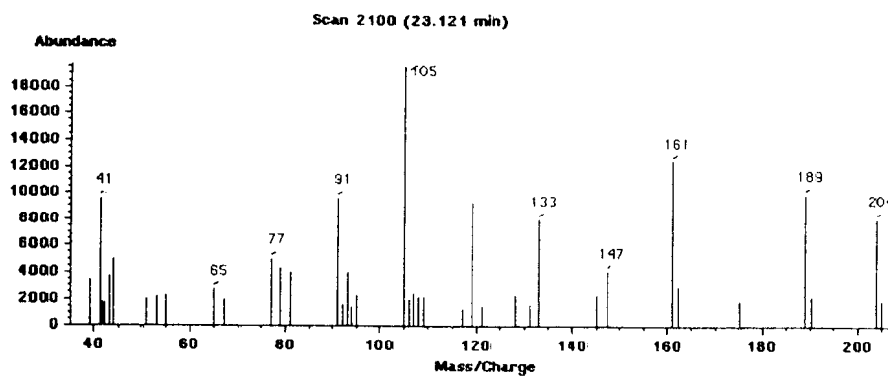
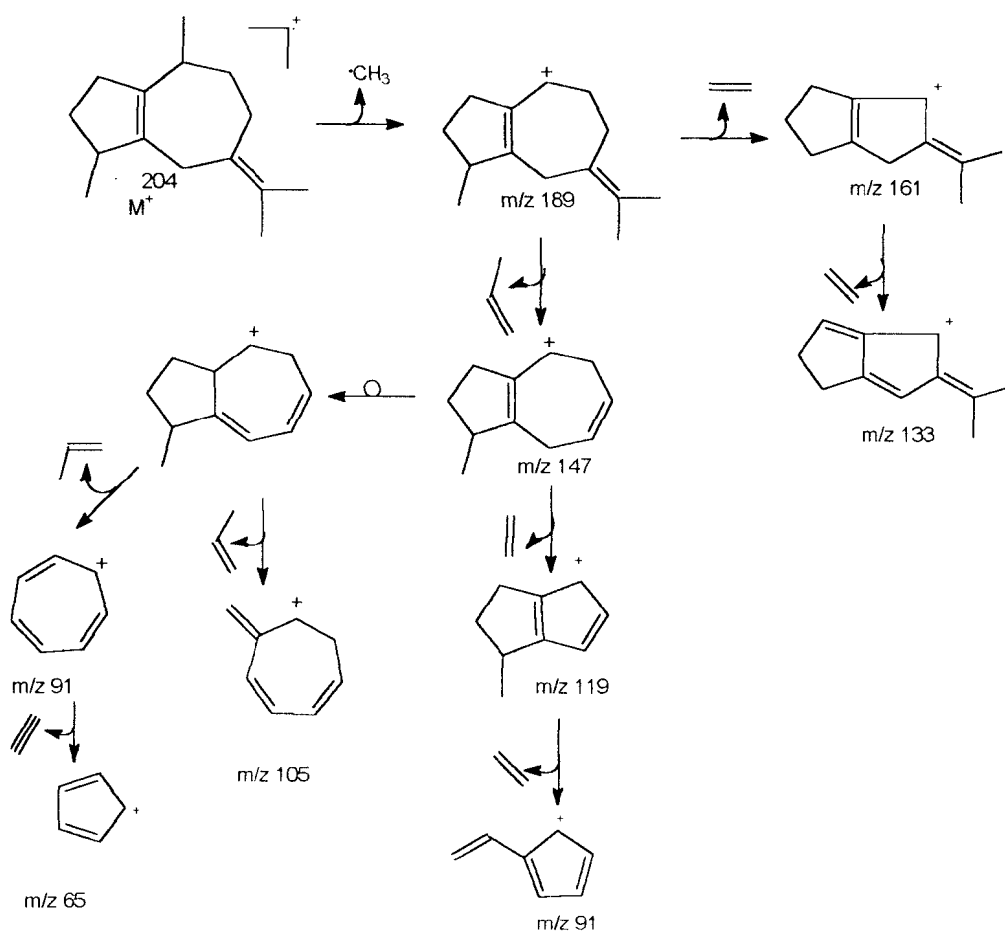


Figura 28 : Espectro de massas do *cis*- β -guaieno



Esquema 11 : Proposta de fragmentação para o *cis*- β -guaieno

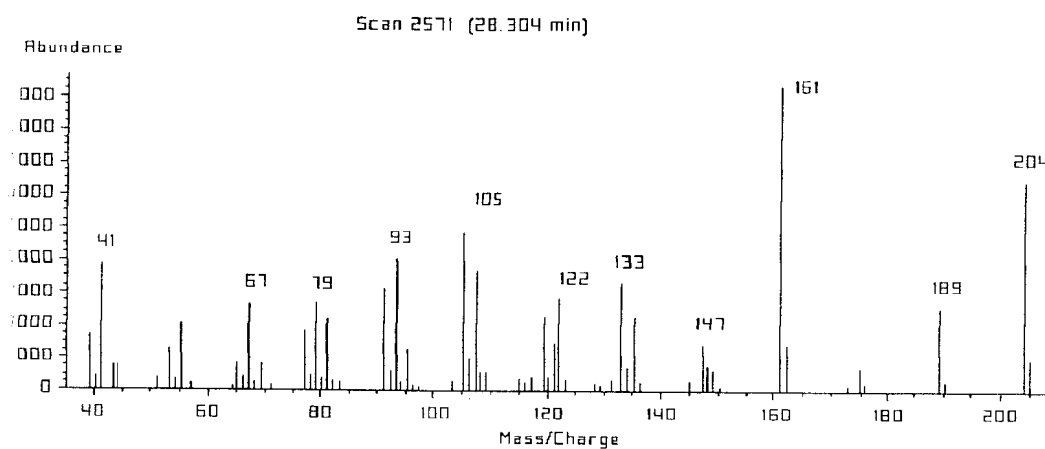


Figura 29 : Espectro de massas do valenceno

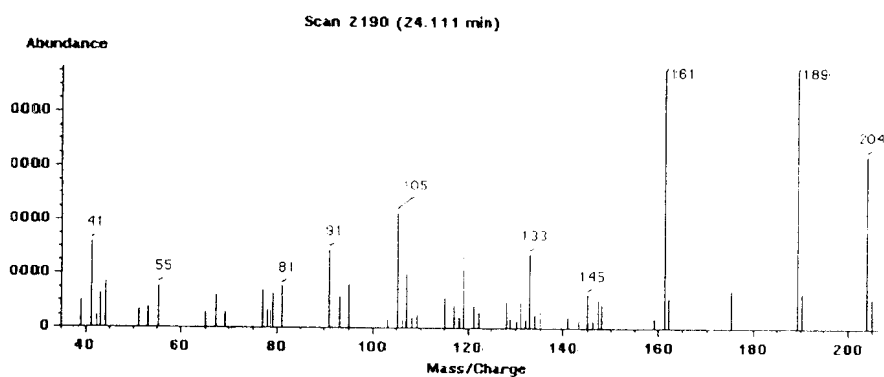


Figura 30 : Espectro de massas do δ -selineno

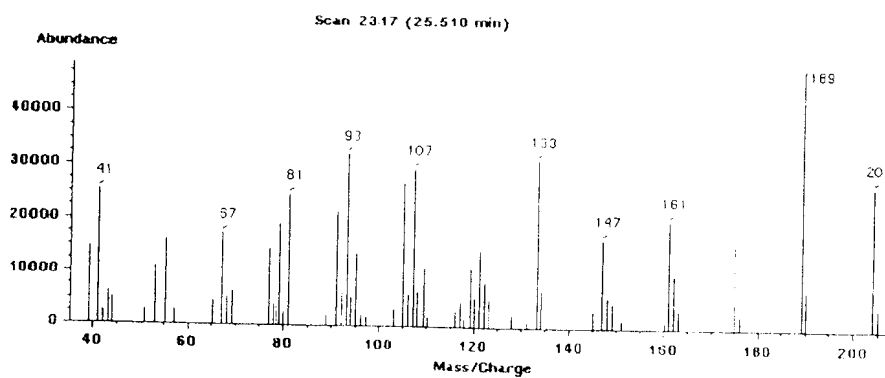
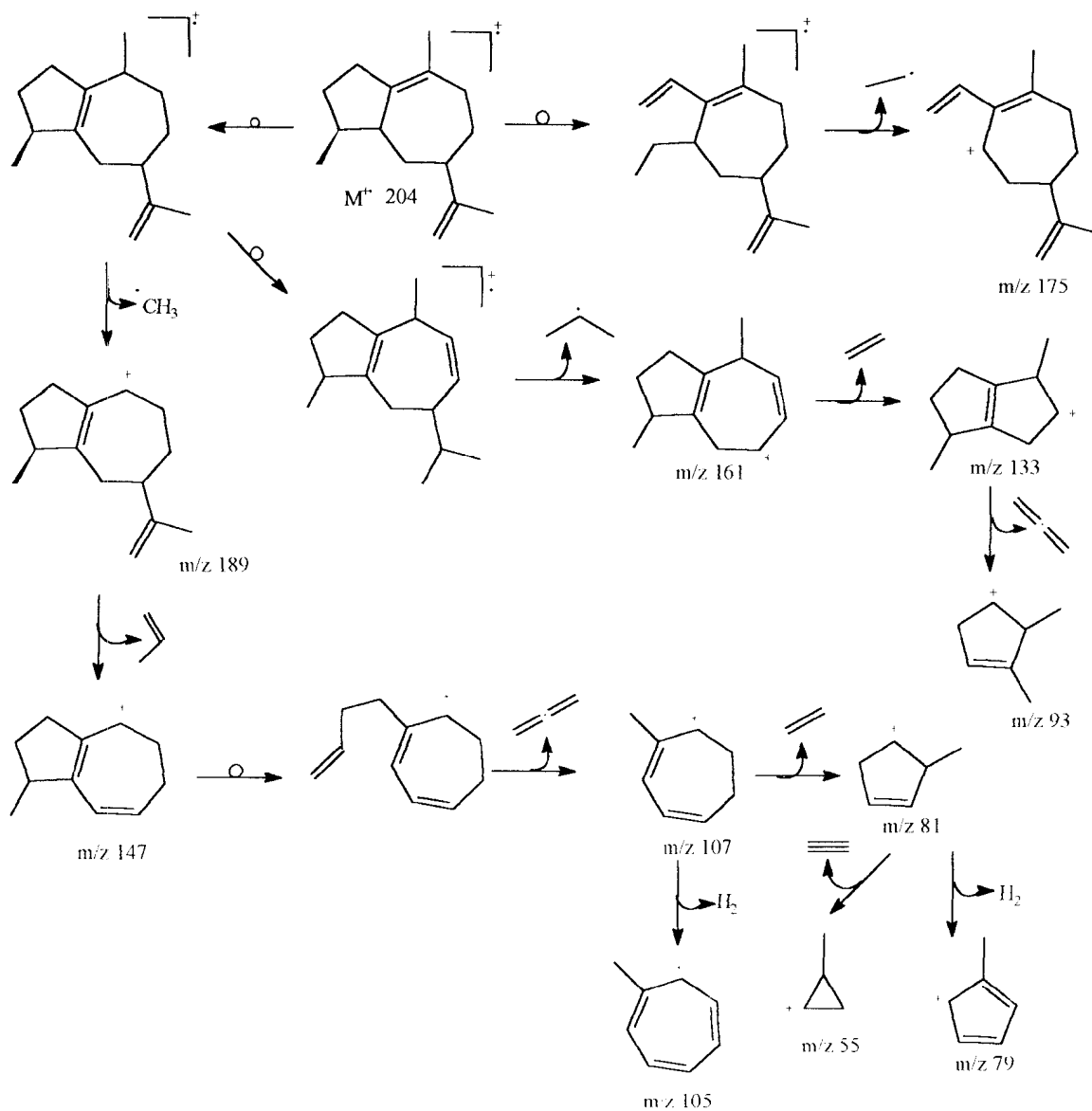


Figura 31 : Espectro de massas do α -bulneseno



Esquema 12 : Proposta de fragmentação para o α -bulneseno

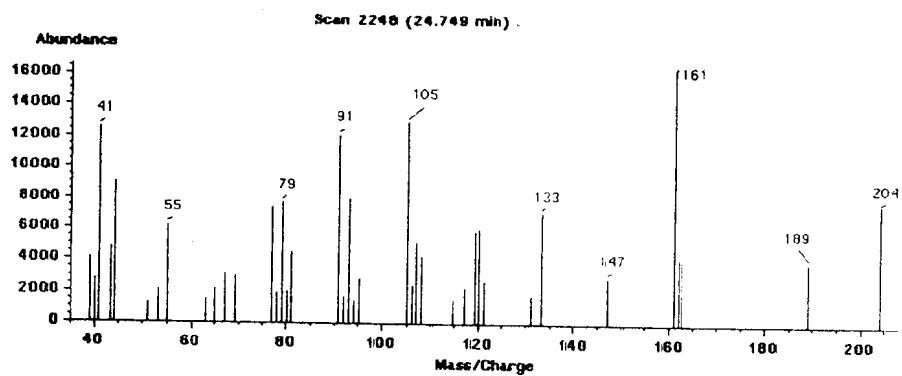
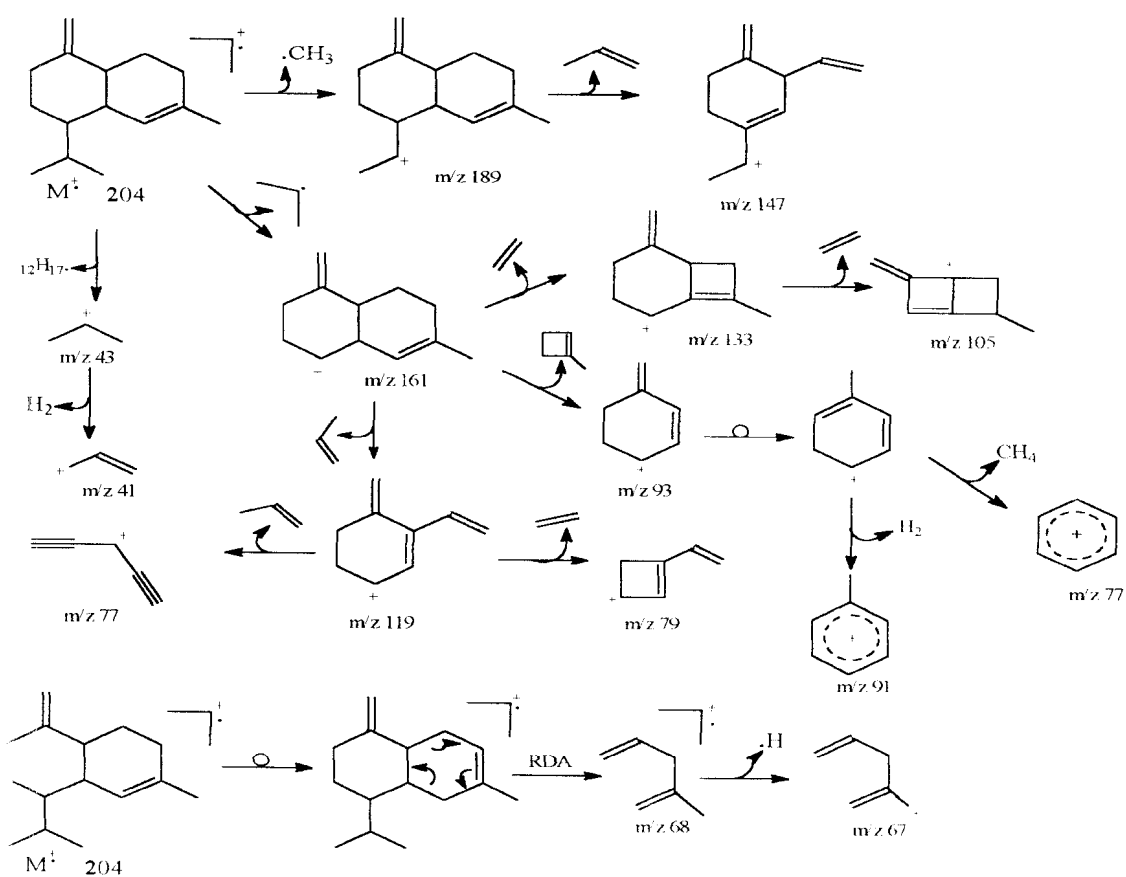


Figura 32 : Espectro de massas do γ -cadineno



Esquema 13 : Proposta de fragmentação para o γ -cadineno

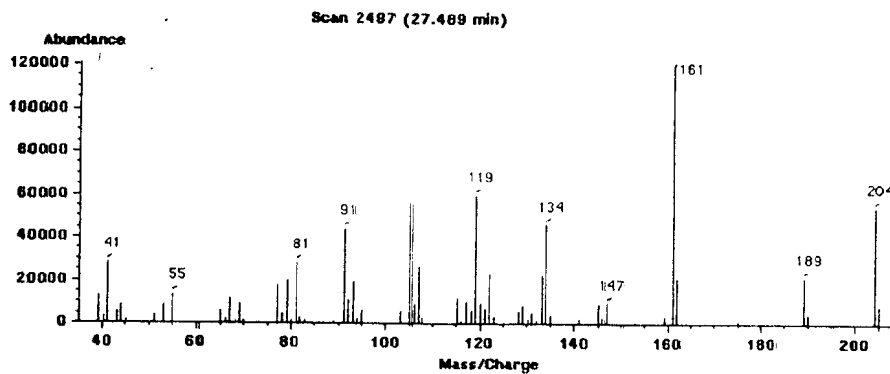


Figura 33 : Espectro de massas do δ -cadineno

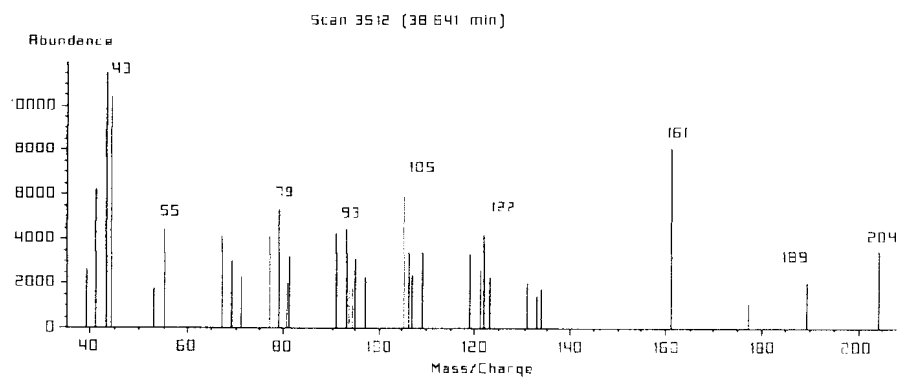


Figura 34 : Espectro de massas do γ -selineno

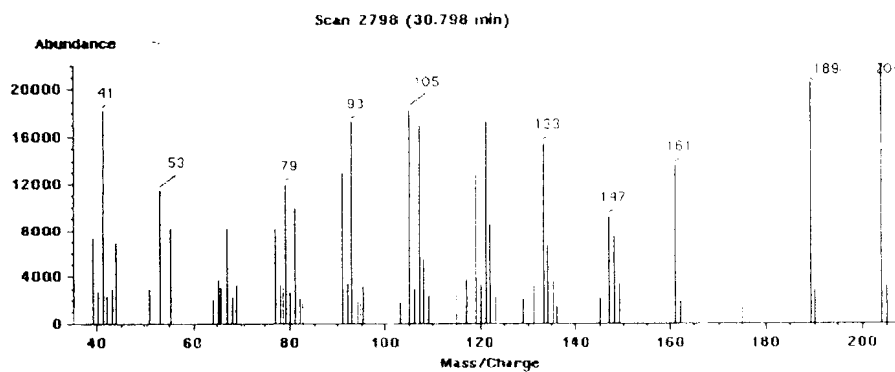


Figura 35 : Espectro de massas do selin-4(14),7(11)-diene

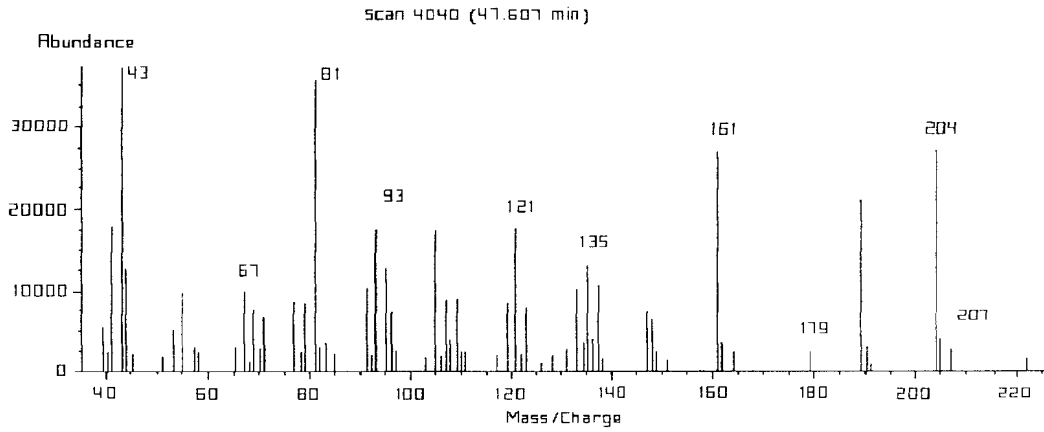


Figura 36 : Espectro de massas do 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno

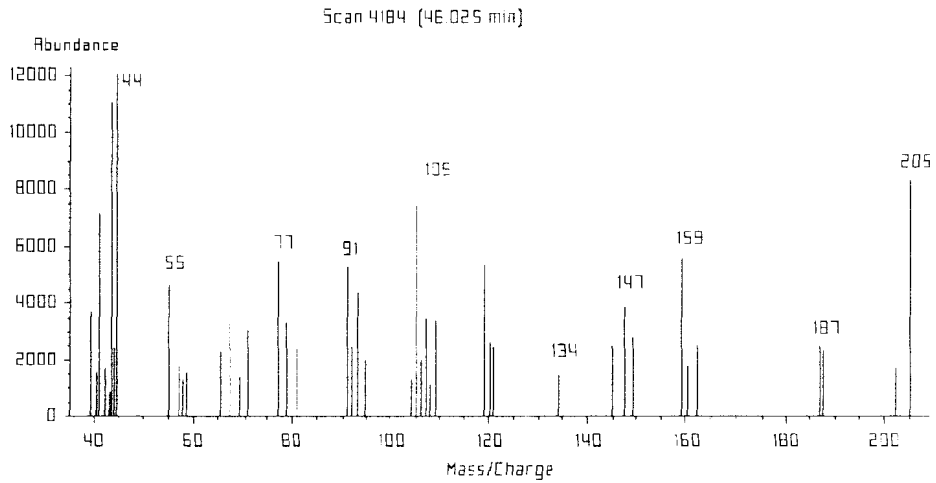


Figura 37 : Espectro de massas do espatulenol

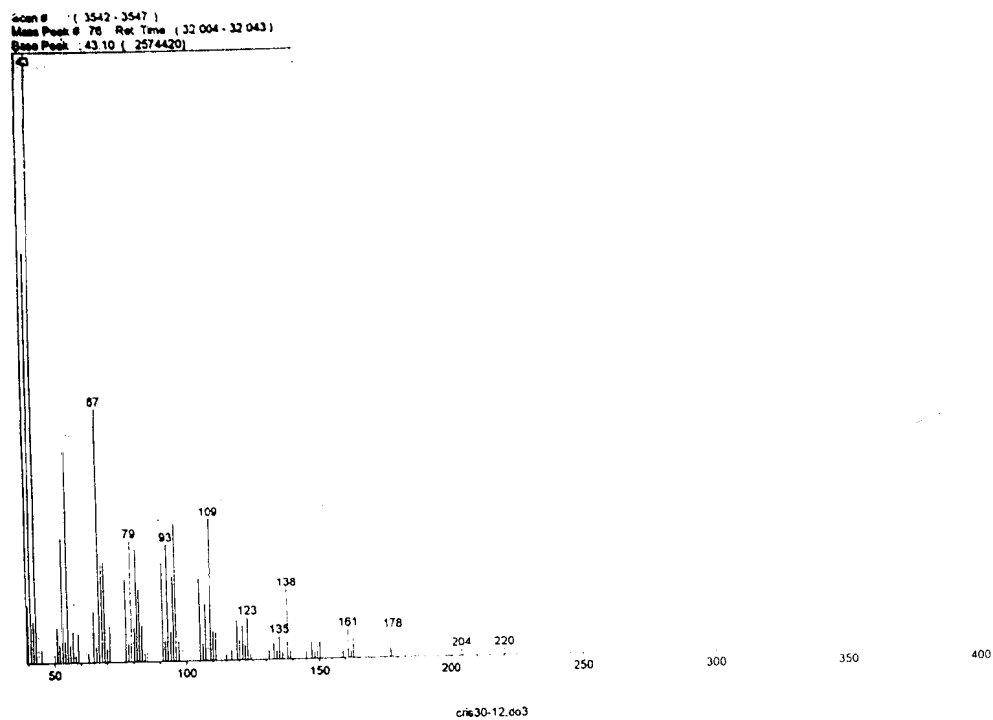
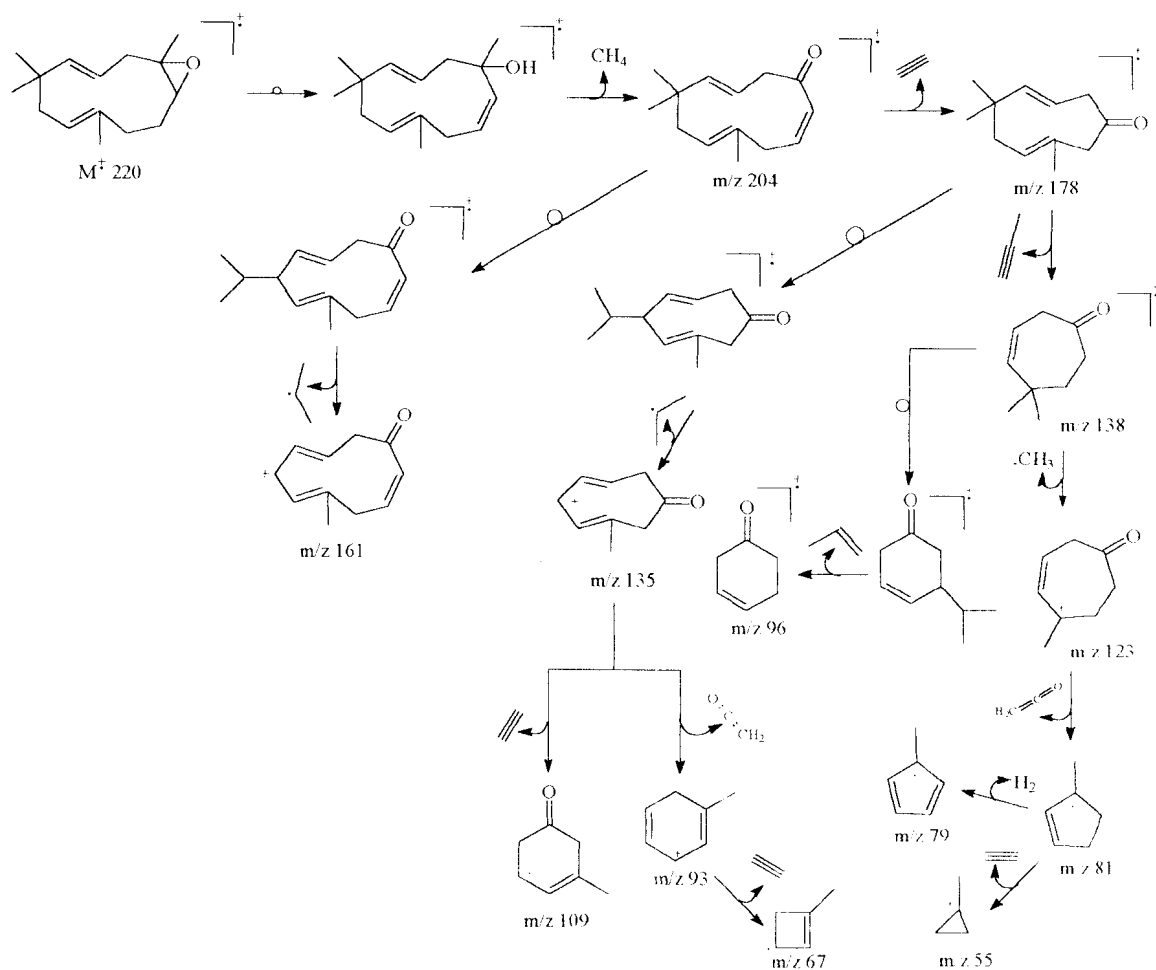


Figura 38 : Espectro de massas do humuleno epóxido II



Esquema 14 : Proposta de fragmentação para o humuleno epóxido II

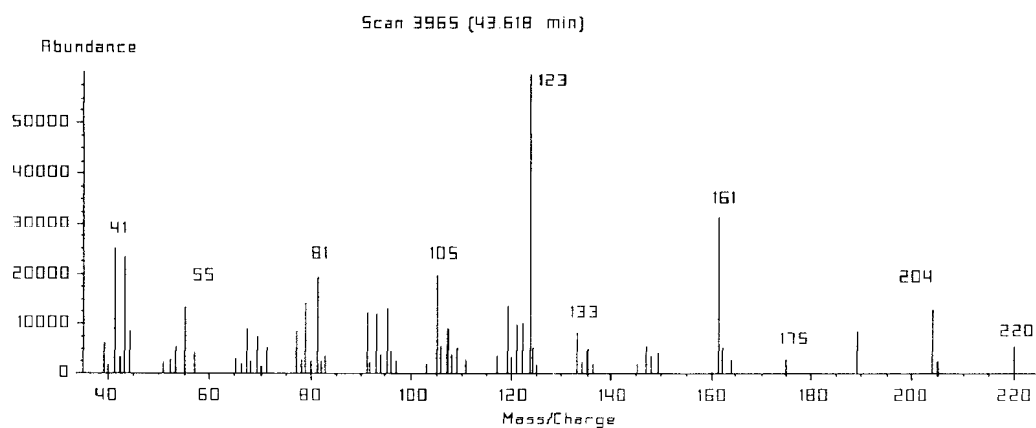


Figura 39 : Espectro de massas do tujopsan-2 α -ol

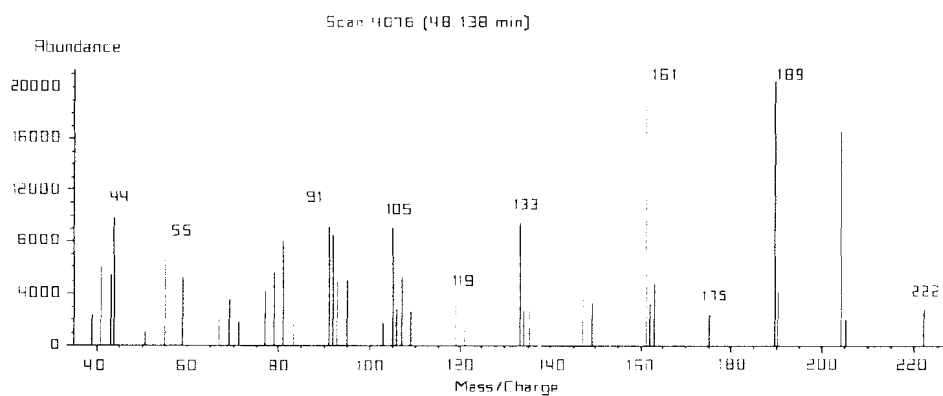


Figura 40 : Espectro de massas do γ -eudesmol

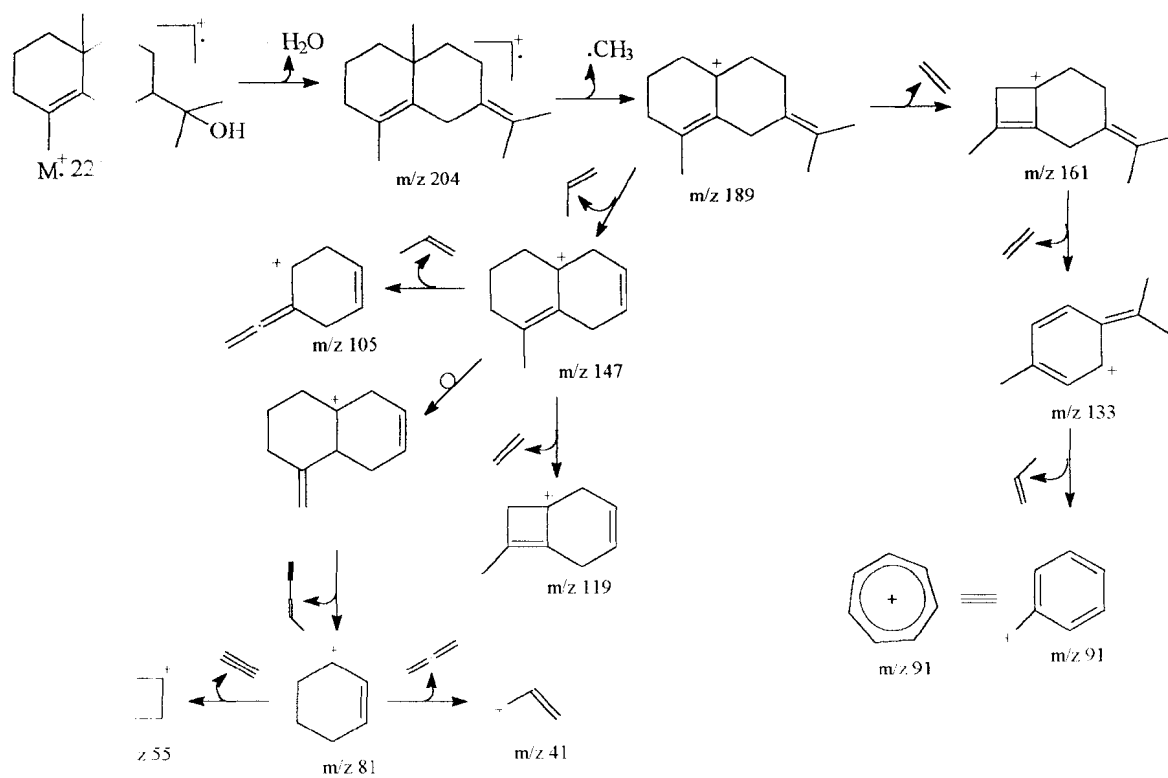


Figura 17: Proposta de fragmentação de massas para o γ -eudesmol

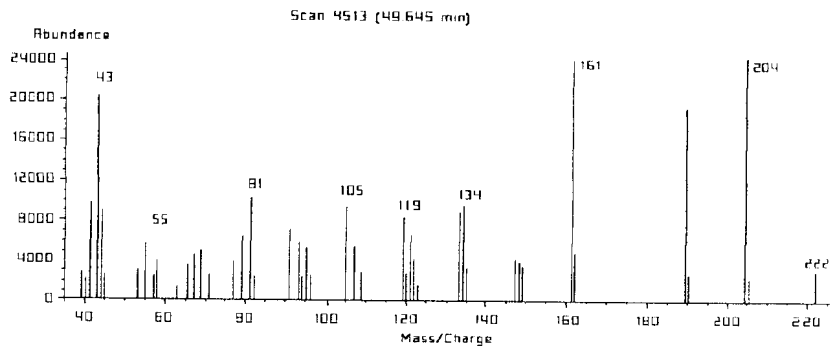


Figura 41 : Espectro de massas do T-cadinol

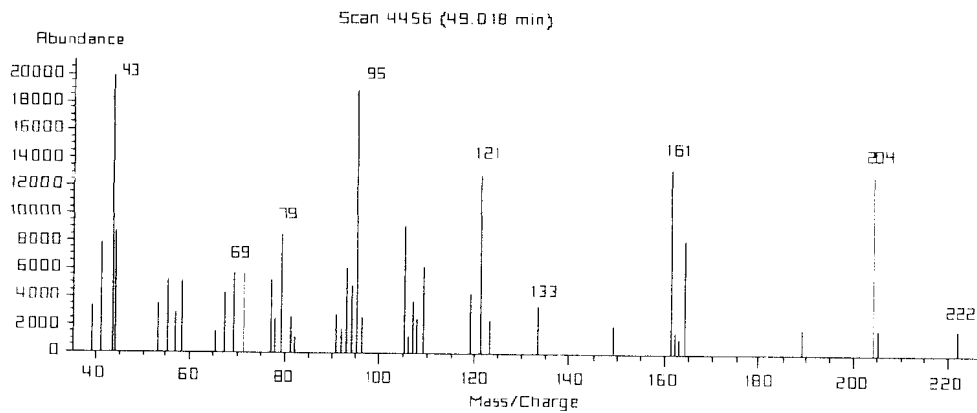


Figura 42 : Espectro de massas do T-muurolool

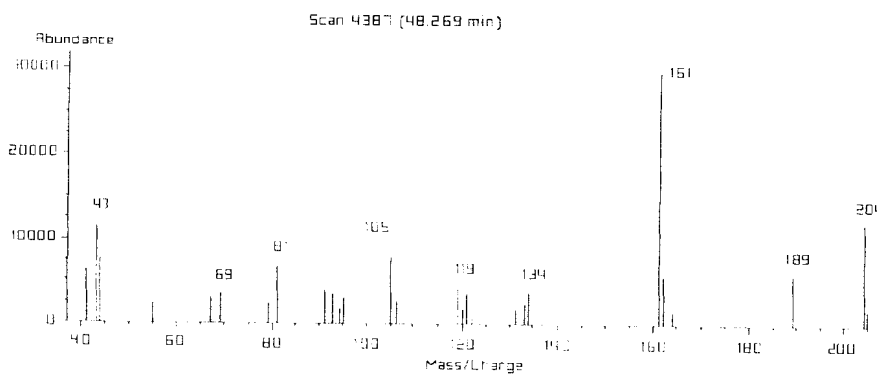


Figura 43 : Espectro de massas do β -eudesmol

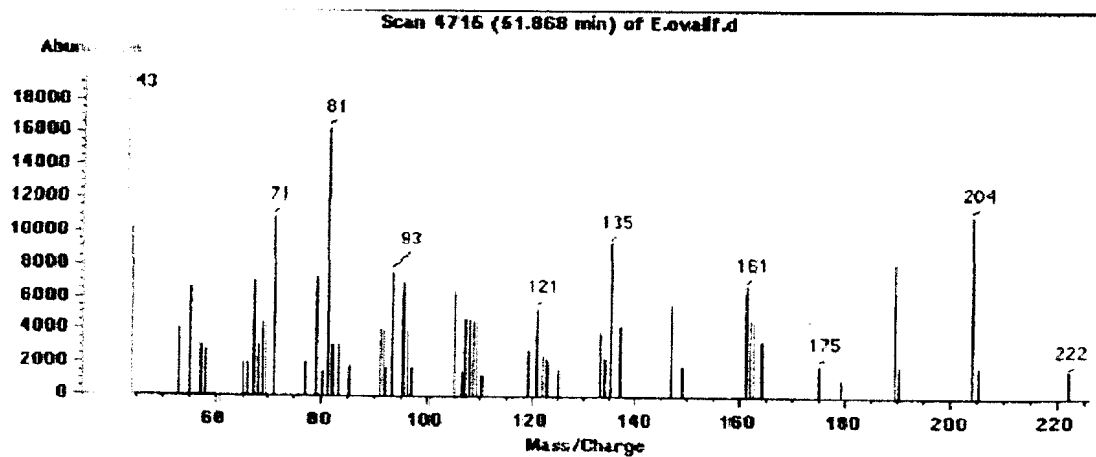
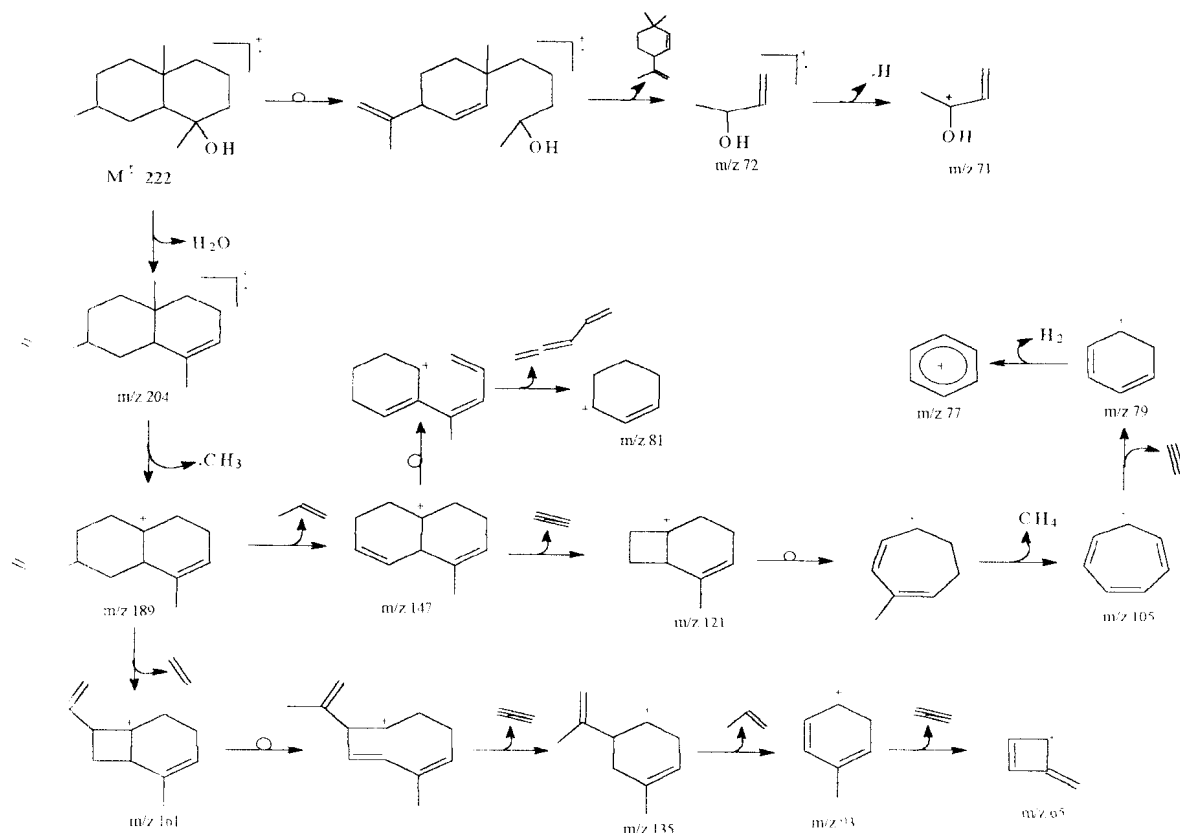


Figura 44 : Espectro de massas do selin-11-en-4 α -ol



Esquema 16 : Proposta de fragmentação para o selin-11-en-4 α -ol

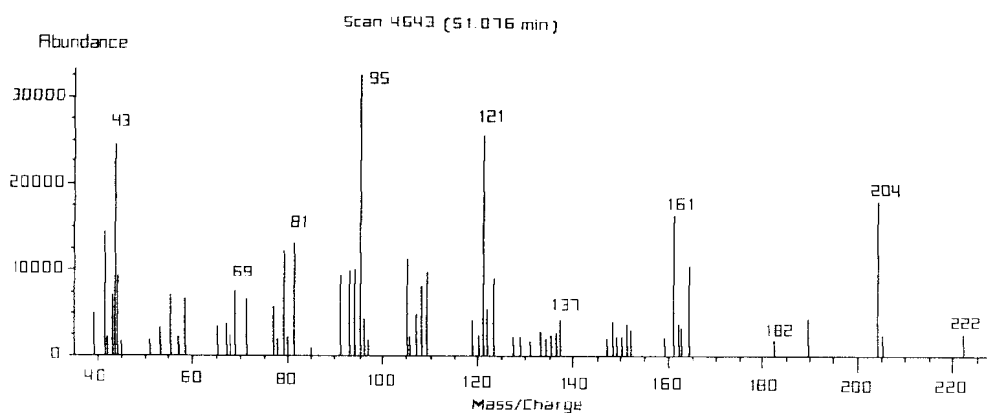


Figura 45 : Espectro de massas do α -cadinol

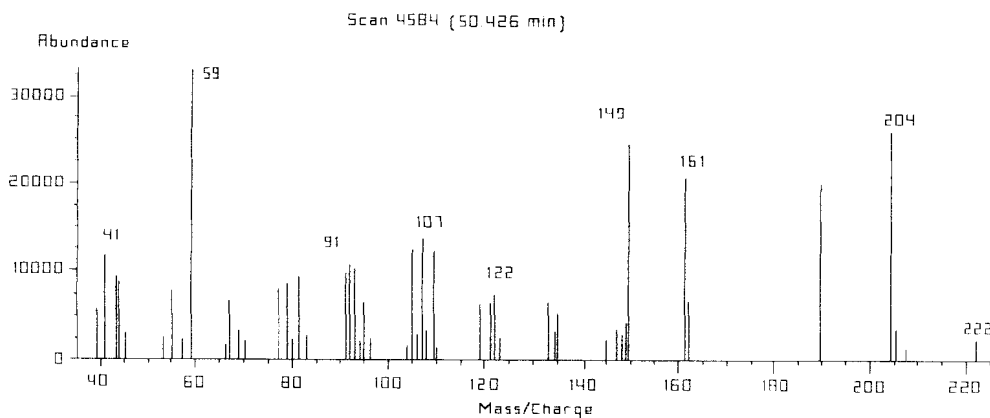
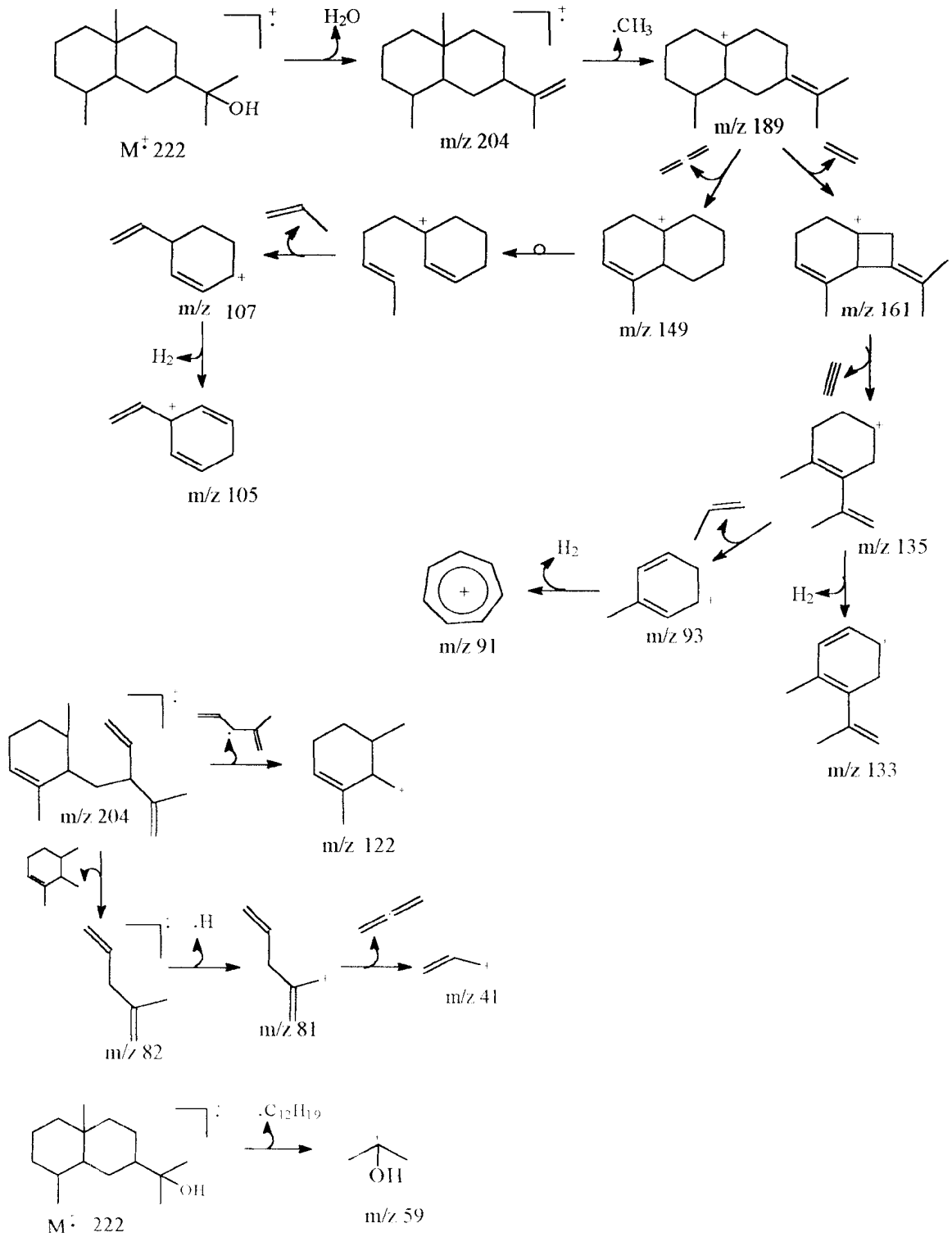


Figura 46 : Espectro de massas do α -eudesmol



Esquema 17: Proposta de fragmentação para o α -eudesmol

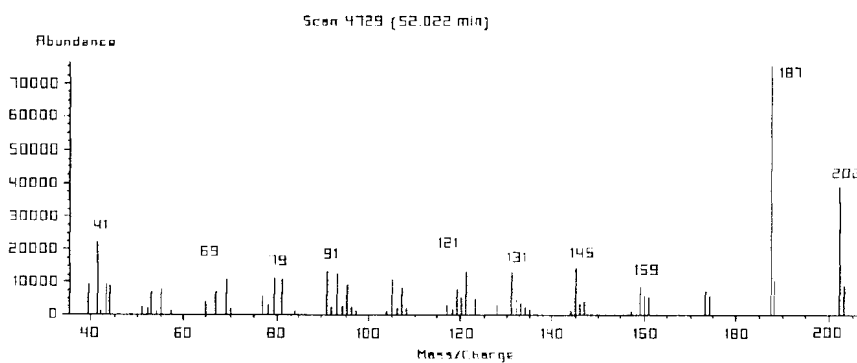


Figura 47 : Espectro de massas do khusinol

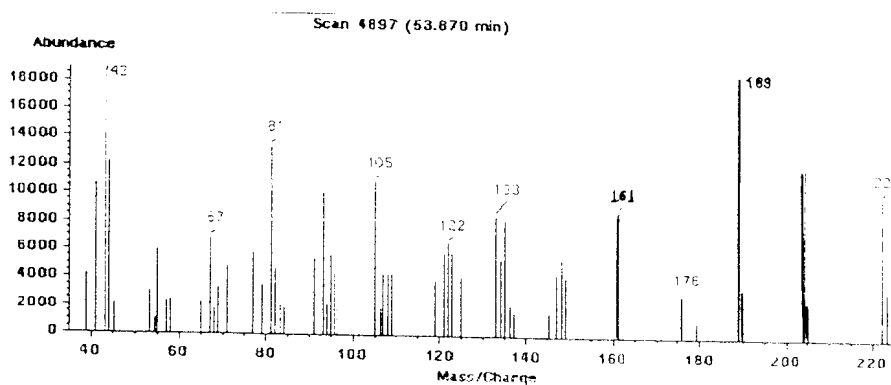
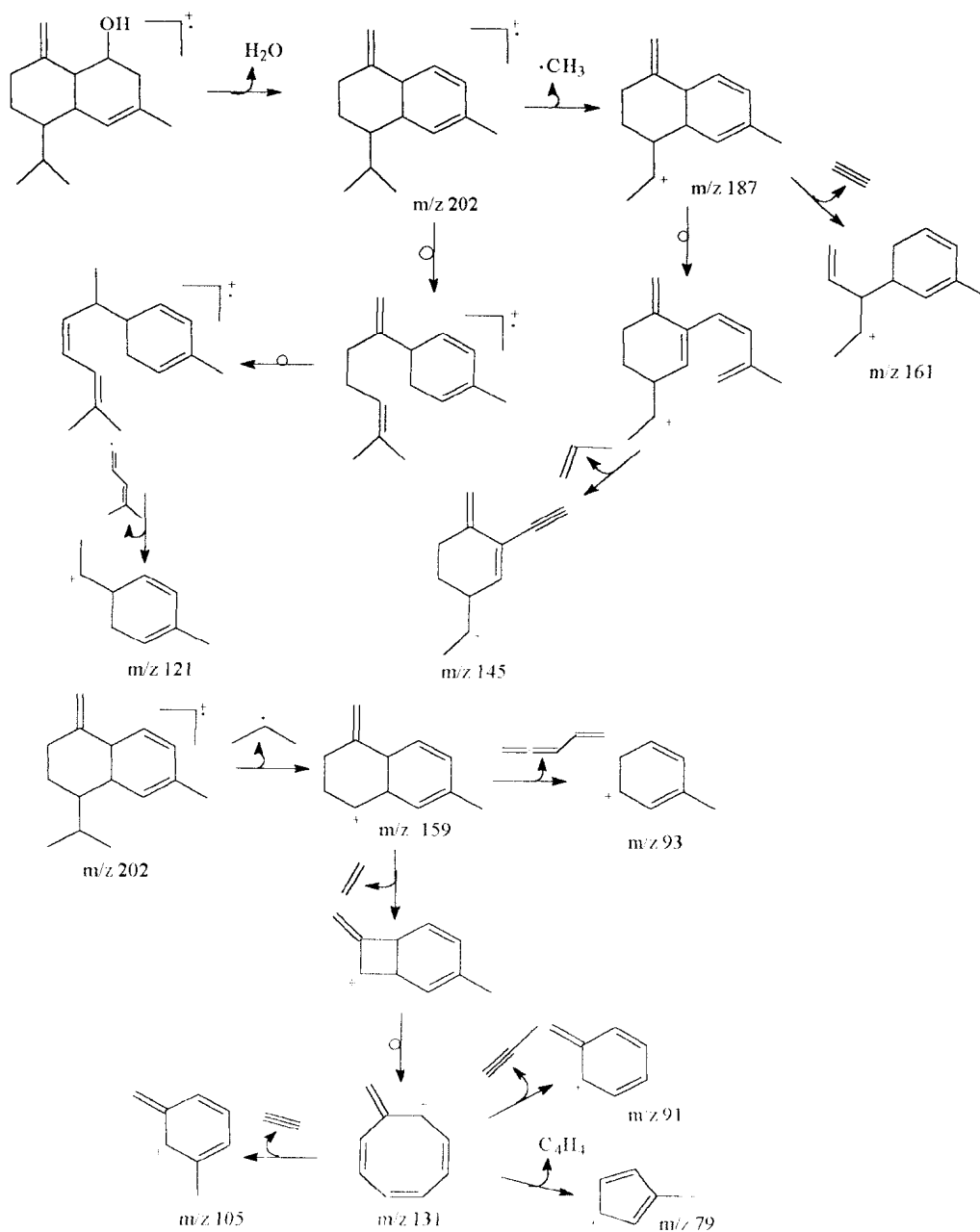


Figura 48 : Espectro de massas do juniper cânfora



Esquema 18 : Proposta de fragmentação para o khusinol

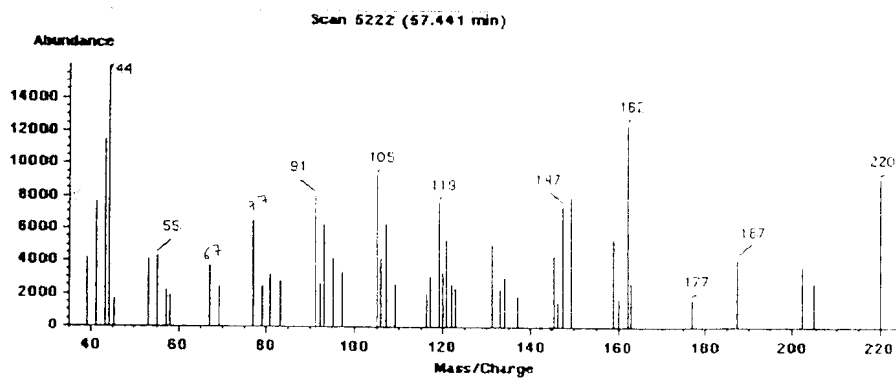
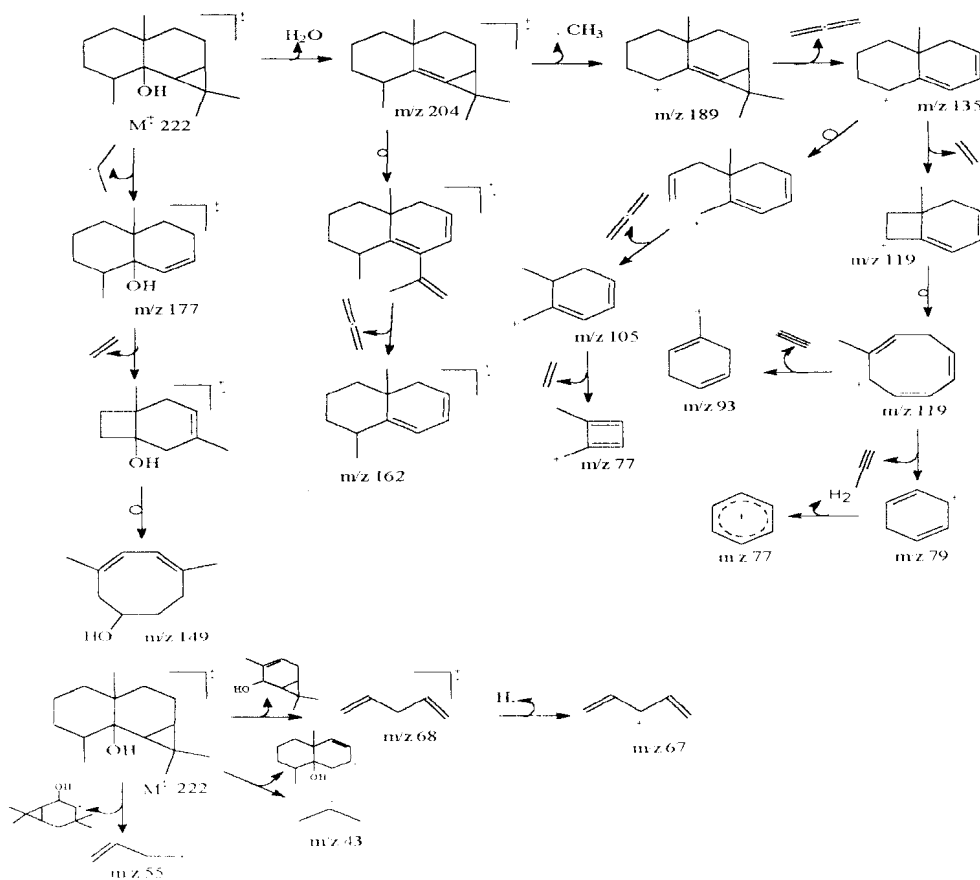


Figura 49 : Espectro de massas do ent-maalian-5-ol



Esquema 19 : Proposta de fragmentação para o ent-maalian-5-ol

As propostas de fragmentação apresentadas foram sugeridas por nós. Para verificar as propostas para os outros compostos identificados, verificar a referência 49.

PARTE II : DISCUSSÃO

3.3. Discussão dos Índices de Retenção

A identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais é um trabalho que requer, entre outras coisas, consultas exaustivas à literatura especializada. Estas consultas têm várias finalidades: a procura de índices de retenção em colunas de polaridade semelhante às utilizadas no trabalho experimental, para comparar os valores obtidos e publicados para uma dada substância e/ou a procura de registros de espectros de massas de substâncias que sejam semelhantes ou que possam sugerir uma estrutura química parecida com aquela que possui um espectro de massas discordante em pequenos pontos, como intensidade e abundância relativa de picos. Estas propostas são suportadas pelos estudos de fragmentação dos compostos.

Em relação a espectrometria de massas, a comparação entre espectros de massas de substâncias analisadas e conhecidas é feita através de publicações do tipo catálogos e livros específicos, além de artigos publicados em revistas científicas. Estas publicações trazem espectros de massas de um extenso número de compostos orgânicos e que sofrem atualizações periódicas para a inclusão de compostos recentes isolados de plantas ou sintetizados. O avanço da tecnologia aumentou o número de recursos disponíveis para esta análise, pois foram criados programas de computador contendo verdadeiras bibliotecas de espectros de massas, conhecidos como espectrotecas. A maioria destas espectrotecas está disponível em CD-ROM, como a NIST e a Wiley, estando esta acoplada ao espectromêtro de massas. Isto

permite uma comparação imediata do espectro de massas obtido com os existentes na espectroteca e sugestão de estruturas condizentes com os mesmos, com uma determinada percentagem de acerto para cada proposta.

A utilização dos Índices de Retenção (IR) na identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais é ainda uma ferramenta segura e confiável. Porém, quando consultamos uma série de trabalhos envolvendo a identificação de compostos orgânicos por índices de retenção, publicados em diversos periódicos, observamos diferenças nos valores dos índices de retenção para uma mesma substância eluída em colunas cromatográficas de fases estacionárias idênticas ou equivalentes.

Esta discrepância entre os valores de índices de retenção é menor para colunas de baixa polaridade. Observando a tabela 3, notamos uma variação pequena entre os valores, o que nos permitiu caracterizar as substâncias mostradas na tabela e a grande maioria dos compostos presentes no óleo essencial, por meio de seu índice de retenção calculado, situado dentro de uma faixa pequena de valores encontrados.

Tabela 3 : Compostos identificados no óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. e comparação com a literatura de seus índices de retenção calculados para coluna SE-54 (95% dimetipolisiloxano e 5% difenil).

Substância	Índice de Retenção calculado	Índice de Retenção da literatura ⁽¹⁵⁾	Índice de Retenção da literatura ⁽⁴⁵⁾
terpinoleno	1089	1088	1081
<i>E</i> -cariofileno	1417	1418	1426
δ -cadineno	1523	1524	1522
espatulenol	1576	1576	1574
γ -eudesmol	1631	1630	1627
β -eudesmol	1649	1649	1645

O que acontece nestes casos é que o principal fator a ser levado em consideração é o ponto de ebulição dos compostos analisados, que devem obedecer uma ordem de eluição. Esta ordem, como já foi observado^(17,27,28,30-33), depende do número de carbonos dos compostos e de incrementos relativos a grupos funcionais presentes na estrutura da molécula, bem como sua própria configuração e as diversas conformações que esta pode assumir. A fase estacionária da coluna cromatográfica não vai ser a principal responsável pela flutuação de valores. Por ser pouco polar, está livre das influências de atividade que existem para colunas polares. A maioria das fases estacionárias de baixa polaridade utilizada atualmente em CGAR constitui-se de dimetil polisiloxano, estando este no percentual de 100% (colunas não polares, como OV-1, OV-101, SE-30) ou são constituídas de 5% de difenil e 95% de dimetil polisiloxano (HP-5, BP-5, SE-54, Ultra-2, CP-Sil 8 CB). Estas fases possuem uma estrutura relativamente estável e são pouco afetadas por altas temperaturas ou analitos que possam causar danos maiores a sua composição.

As colunas de baixa polaridade, pela sua característica de boa estabilidade, vêm se tornando as mais indicadas para o estudo de óleos essenciais, pois proporcionam o cálculo de índices de retenção mais comparativos (próximos) com os da literatura. O inconveniente em relação a essas colunas é o fato de proporcionarem uma separação menos razoável se comparadas às colunas polares. O motivo disto está na constituição dos óleos essenciais, onde se encontram compostos funcionalizados (carbonílicos, alcoólicos, acetilados) que necessitam de uma maior interação com a fase para que possam se distinguir durante a eluição. Como exemplo, muitas das substâncias

identificadas neste trabalho, possuem índices de retenção coincidentes com os da literatura^(66,67), algumas vezes com a diferença de poucas unidades (tabela 4).

Tabela 4 : Índices de Retenção em coluna polar para alguns sesquiterpenos com funções oxigenadas encontrados no óleo essencial de *E. nitida* Camb.

Substância	Índice de Retenção calculado	Índice de retenção segundo a literatura
Espatulenol	2148	2153 ⁽⁶⁶⁾ , 2151 ⁽⁶¹⁾
β -eudesmol	2246	2246 ⁽⁶¹⁾ , 2248 ⁽⁶⁶⁾
α -cadinol	2216	2218 ⁽⁶⁰⁾ , 2224 ⁽⁶⁶⁾
juniper cânfora	2313	2319 ⁽⁷¹⁾

Para colunas polares, o problema se tornou mais grave á medida que fizemos comparações entre índices de retenção do mesmo composto em diferentes trabalhos que utilizam fases estacionárias de mesma composição. Um exemplo a ser citado é o do α -humuleno, encontrado no óleo essencial estudado. É um sesquiterpeno muito comum em óleos essenciais e que possui um espectro de massas bem característico, sendo por esta razão, fácil de identificar. Uma pesquisa que realizamos em 15 artigos para a obtenção dos valores de índices de retenção em diversas colunas polares com fase estacionária polietileno-glicol (CARBOWAX 20M, PEG 20M, Supelcowax 10, CP-WAX 52 CB, DB-WAX, INNOWAX) mostrou em 9 deles a existência de 13 valores diferentes para o α -humuleno, que situavam-se entre 1636⁽⁶⁴⁾ e 1719⁽⁶⁶⁾, passando pelos valores de 1667⁽⁶⁰⁾, 1675⁽⁵⁸⁾. Três valores diferentes para o índice de retenção também foram encontrados em um mesmo trabalho (m) sem que se tornasse explícita a razão de diferentes índices estarem sendo atribuídos ao mesmo composto. Torna-se curioso imaginar que critério o autor utilizou para identificar tal composto, haja visto

que, teoricamente, uma mesma substância deve possuir apenas um índice de retenção para uma dada fase estacionária.

Estão listados na tabela 7, 112 compostos orgânicos muito comuns em óleos essenciais e a diferença dos valores encontrados para seus índices de retenção, calculados a partir de colunas polares, em 15 artigos de diferentes periódicos. Esta tabela engloba, inclusive, alguns constituintes químicos encontrados no óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. Para outras substâncias encontradas neste estudo não encontramos registro na literatura para os seus índices de retenção em coluna polar.

É importante levar em consideração que, de acordo com as programações de temperatura utilizadas, pode-se ter maior ou menor interação da substância com a fase estacionária, influencia diretamente no tempo de retenção dos compostos e, em consequência, no seu índice de retenção. Tendo um raciocínio contrário ao que foi observado para colunas de baixa polaridade, as colunas que utilizam fases estacionárias polares são capazes de possuir atividade, ou seja, possuírem sítios ativos capazes de interagir com os compostos que estão sendo eluídos, causando variações no tempo de retenção dos mesmos. Esta atividade pode ser causada por impurezas presentes na amostra e/ou no gás carreador. Tal atividade das colunas polares é um parâmetro difícil de prever sem que seja efetuado um teste comprobatório para verificar o estado da coluna antes da análise.

Para avaliar o desempenho para colunas cromatográficas, Grob ⁽⁷³⁾, em 1978, aperfeiçoou um teste onde é injetado uma mistura de padrões contendo componentes ácidos, básicos, neutros, hidroxilados e carbonilados convenientemente selecionados, que permitiu avaliar a interação da coluna com diferentes grupos funcionais. Se ocorre

uma variação na intensidade do sinal de um destes componentes no cromatograma, ou inversão na ordem de eluição previamente estabelecida, é possível afirmar que existe algum fator na coluna que interage com o composto e causa tais distúrbios. Um exemplo disto seria a influência de um grupo básico na coluna, que afetaria diretamente os compostos que possuem grupos ácidos em sua estrutura. Por exemplo, entre os sesquiterpenos oxigenados encontrados no óleo essencial de *E.nitida* Camb., quase todos são álcoois terpênicos, o que lhes confere uma pequena característica de acidez, se comparada aos sesquiterpenos hidrocarbonetos.

O α -nol e o α - e β -eudesmol, são alguns exemplos de álcoois terciários encontrados. Como tais, possuem uma natureza ácida pequena. Assim, qualquer impureza que proporcione a formação de um sítio ativo básico vai afetar a eluição dos compostos, resultando num cromatograma com tempos de retenção diferentes do normal e os picos tenderão a uma resolução fraca e intensidade prejudicada ⁽¹²⁾.

No caso das colunas polares utilizadas na análise de óleos essenciais, a fase estacionária utilizada é o polietileno glicol impregnado ou ligado diretamente às paredes da coluna. Os oxigênios da estrutura são os responsáveis pela polaridade da coluna e por serem bases de Lewis, têm a característica de interagir com ácidos de Lewis. Se esse ácidos são fortes o suficiente para neutralizar a característica básica da coluna, vai haver a formação de um sítio ativo que não vai mais ser capaz de reter outros compostos menos básicos, que interagiriam com a fase de forma mais suave.

Logo, tendo em vista o que foi observado, sugerimos ser necessário fazer um teste de avaliação antes da análise para o caso das colunas polares. A presença de grupos que influenciem na eluição de compostos deve ser monitorada. Em especial,

quando se realizam análises qualitativas para óleos essenciais, que requerem sensibilidade acurada.

Segundo Jennings⁽⁷⁴⁾, que percebeu esta diferença de valores entre os índices de retenção, ocorre uma considerável variação na constante de McReynolds (fórmula 7) quando se utilizam colunas de fases estacionárias polares com velocidades de aquecimento lentas, geralmente maiores que 2°C/min. Neste caso, a taxa de aquecimento vai influenciar de modo significativo a eluição dos compostos, causando muitas vezes diferença na velocidade de eluição de algumas substâncias:

$$\Delta I = IR_p - IR_e$$

(7)

No entanto, vantagens são obtidas da análise cromatográfica utilizando colunas capilares polares, como a boa separação dos picos no cromatograma (fig 8, p.30). Na literatura mais recente, são encontrados cada vez menos trabalhos utilizando colunas polares na análise de óleos essenciais. No entanto, quando se deseja obter um cromatograma que mostre nitidamente a separação entre os picos dos componentes de um óleo essencial, é preferível o uso de uma coluna com fase estacionária polietileno-glicol.

Uma outra hipótese gerada a partir das consultas à literatura, nos leva a crer que o responsável pelas flutuações nos índices de retenção em colunas capilares de fases estacionárias polar e apolar pode ser a utilização da fórmula envolvida nos cálculos para a obtenção destes valores. Em pouquíssimas publicações, dentre as consultadas para a realização deste trabalho, encontramos menção à fórmula utilizada para o cálculo dos índices de retenção.

Em alguns trabalhos^(63,65,67,71), é citado explicitamente o uso do índice de retenção de Kováts (fórmula 3) na identificação dos componentes de diversos óleos essenciais. Como foi observado anteriormente, Kováts formulou o seu índice de retenção para análises cromatográficas gasosas realizadas sob condições isotérmicas.

$$IK = \left(\frac{\log t_{R' \text{ subst}} - \log t_{R' n}}{\log t_{R' n+1} - \log t_{R' n}} + n \right) \times 100$$

(3)

Estes trabalhos utilizam a fórmula de Kováts para uma análise feita sob condições de temperatura programada, como mostra a tabela 5.

Tabela 5 : Condições de análise de diversos óleos essenciais em colunas polares.

Espécie vegetal	Referência	Coluna	Temperatura inicial (°C)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura final (°C)
<i>Cananga odorata</i> Hook	63	Carbowax 20M WCOT	70	2	210
<i>Zhantoxylum simulans</i>	68	CP-WAX 52 CB	50 (10 min)	1,5	200 (10 min)
Diversas	67	Supelcowax-10	50 (2 min)	4	240 (10 min)
<i>Amyris balsamifera</i>	71	DB-WAX	50	4	238

Isto nos sugeriu que os autores podem estar utilizando fórmulas diferentes da de Kováts, muito embora assegurem na publicação estarem utilizando o índice de retenção de Kováts.

Podemos então, sugerir que o Índice de Retenção de Kováts é pouco adequado para este tipo de trabalho, se forem levadas em consideração a análise matemática da fórmula e a variação da taxa de aquecimento da coluna no decorrer do processo.

O Índice de Retenção de Kováts utiliza os logaritmos dos tempos de retenção tanto das n-parafinas da série homóloga quanto das substâncias analisadas no cromatograma. Isto se explica pelo fato de que, sob condições isotérmicas, os picos no cromatograma possuem uma separação cada vez maior entre si, como se estivessem seguindo uma escala logarítmica, o que é observado claramente no cromatograma da série homóloga.

Matematicamente, a aplicação dos logaritmos em fórmulas se deve a uma necessidade de diminuição das variações, para chegar a um valor preciso.

A fórmula de Van den Doole e Kratz leva em consideração a temperatura de retenção dos compostos sendo que os picos referentes a eles aparecem no cromatograma em escala linear, sem necessidade de logaritmização. Em uma análise onde as taxas de aquecimentos tendem a ser pequenas, a temperatura de retenção da substância é ignorada por ser proporcional ao tempo de retenção e passa a ser substituída pelo tempo de retenção do composto de acordo com a equação 5.

$$\text{IRTP} = \left(100z + 100 \times \frac{T_{R\text{subst}} - T_{Rn}}{T_{Rn+1} - T_{Rn}} \right)$$

(5)

Desta forma, a fórmula do índice de retenção passa a assumir um aspecto bem parecido com o da relação idealizada por Kováts.

No entanto, ao se pensar em taxa de aquecimento, é lembrada também a constante de Mc Reynolds, diretamente relacionada a ela. Se uma análise efetuada em temperatura programada usa uma taxa de aquecimento muito maior que 2 °C/min, observa-se que os valores dos índices de retenção tendem a se distanciar cada vez mais dos valores teoricamente corretos para o composto e, se a taxa aumenta muito, os resultados tendem a se tornar discrepantes, fornecendo valores muito além dos corretos e, conseqüentemente, levando a sérios erros na caracterização da substância.

No universo de dados obtidos, concordamos que a fórmula de Kováts pode ser perfeitamente adequada para uma análise com temperatura programada, desde que a taxa de aquecimento seja lenta para que não haja grandes diferenças nos valores dos índices. Logo, os valores são equivalentes aos valores calculados segundo a fórmula de Van den Doole e Kratz. Um novo rastreamento na literatura, mostra que os valores de índices de retenção que mais se distanciam dos demais são aqueles onde as taxas de aquecimento são muito maiores que 2°C / min.

Neste trabalho, se utiliza uma taxa de aquecimento de 4°C / min para ambas as colunas (polar e de baixa polaridade). Mesmo tendo realizado a análise sob condições de temperatura programada, foram calculados os índices de retenção em coluna polar

para alguns picos usando tanto a fórmula de Kováts quanto a de Van den Doole (substituindo a temperatura T da fórmula pelo tempo de eluição corrigido t_r , da substância já que a taxa de aquecimento era pequena), com o intuito de comparar os valores dos índices calculados pelos dois modos e perceber se havia diferenças significativas em relação aos resultados. Isto também explica o uso da taxa de aquecimento de $4^\circ\text{C}/\text{min}$, para verificar a existência desta mesma variação. Na tabela 6 mostramos os valores de índices de retenção para diversos picos no cromatograma de substâncias que possuem espectros de massas característicos, cuja comparação com a literatura não deixa dúvidas sobre a identidade das mesmas.

Tabela 6: Comparação dos índices de retenção calculados segundo as fórmulas de Kováts e de Van den Doole.

Substância	Índice de Retenção de Kováts	Índice de Retenção de Van den Doole
E- β -ocimeno	1265	1260
terpinoleno	1287	1284
α -humuleno	1650	1648
γ -elemeno	1641	1639
γ -muuroleno	1688	1687
α -bulneseno	1614	1615
β -selineno	1727	1726
α -cadinol	2137	2136
T-cadinol	2190	2189
T- muurolol	2207	2207
selin-11-en-4 α -ol	2199	2199
juniper cânfora	2313	2309

Segundo as condições de análise utilizadas neste trabalho, iniciamos a programação de aquecimento com uma temperatura de 70°C por 1 minuto. Após o primeiro minuto, a temperatura variou de 4°C / minuto até chegar à temperatura final de 210°C, na qual permaneceu por 20 minutos. Com isso, o tempo total de análise foi de 56 minutos. Os compostos que eluíram e foram registrados no cromatograma foram registrados entre 2 e 36 minutos de análise.

Pelo que é observado na tabela 6, a variação entre os valores de índice de retenção não foram muito elevados. Mesmo assim, alguns compostos apresentam variações de até cinco unidades, o que poderia se constituir em um obstáculo na comparação dos índices encontrados com os constantes na literatura e levando à identificação equivocada dos compostos.

Estes valores levam em consideração que, dentre todas as referências consultadas, foi usada a que continha o valor de índice de retenção mais próximo do valor calculado para um determinado pico.

O sesquiterpeno T-cadinol (ou epi- α -cadinol) caracteriza-se neste trabalho por possuir índices de retenção em coluna polar variando entre 2124 e 2188^(64,71). Na referência 64, é encontrado para o T-cadinol, o valor de 2124, quando se utiliza uma taxa de aquecimento de 2°C/minuto. Para a referência 71, cujo valor de índice de retenção é de 2188, a taxa de aquecimento varia 4°C/minuto, a mesma taxa utilizada nesta análise. Na referência 58, a taxa de aquecimento é de 3°C/minuto e o valor

encontrado para o índice é de 2161. Observa-se assim, um aumento nos valores de índices de retenção, á medida que se aumenta a taxa de aquecimento da programação. Porém, a disparidade entre os valores pode estar também associada a outros fatores, além da programação de aquecimento, como os já comentados, influenciando de maneira significativa a obtenção dos resultados.

Tabela 7 : Índices de Kováts e de Retenção à Temperatura Programada para 112 componentes de óleos essenciais em colunas polares (INNOWAX e similares : DB-WAX, SUPELCOWAX-10, CP-SIL 52 CB, CARBOWAX 20M, PEG 20M)

Substância	Ref.58	Ref. 59	Ref. 60	Ref. 61	Ref. 62	Ref. 63	Ref. 64	Ref. 65	Ref. 66	Ref. 67	Ref. 68	Ref. 69	Ref.70	Ref. 71	Ref. 72
α -pineno			1020		1021, 1012, 1014	1038		1017	1036, 1038		1036	1041		1024	1024
α -tujeno					1028				1023, 1038			1035		1027	
α -fencheno			1060						1071						
Camfeno			1065		1066, 1057			1057	1066, 1078, 1083		1078	1077		1067	
Mirceno		1158	1156		1158, 1163, 1169	1169		1153	1156, 1160, 1168		1166	1173			1167
β -pineno	1120		1105					1103	1120			1105		1111	1128
Sabineno	1128		1120		1115			1114	1130			1127		1123	1128
δ -3-careno									1141, 1156		1156	1169		1150	
α -felandreno	1167		1150		1165, 1158				1177, 1173			1179		1170	
Limoneno	1190	1188	1200		1195			1192	1187, 1206, 1210		1204	1202		1202	1205
α -terpineno		1177	1174		1172			1167	1188, 1189			1184		1182	1194
1,4-cineol									1185			1192			1185
β -felandreno	1208	1208	1204		1196, 1195				1201, 1216,1213			1217		1213	1215
p-cimeno	1268		1264		1268, 1269		1193	1258	1250, 1272		1268	1279		1274	1279
Z- β -ocimeno	1234	1230	1237					1228	1238, 1228			1251		1235	1226
E- β -ocimeno	1253	1258	1254		1261			1242	1257, 1250			1255		1252	1226
γ -terpineno		1231	1244		1249, 1240, 1241			1234	1247, 1251		1247	1246		1250	1253
Terpinoleno			1283		1280, 1289, 1281			1270	1279		1279	1293		1286	1293
1,8-cineol			1206			1216		1210	1223, 1228		1223				
α -cubebeno			1468		1458, 1451		1436		1481, 1458			1456			1455
δ -elemeno	1465		1479		1472,1464,							1470		1474	
α -copaeno					1485, 1492	1474	1466		1551, 1493, 1519			1490			

Substância	Ref.58	Ref.59	Ref.60	Ref.61	Ref.62	Ref.63	Ref.64	Ref.65	Ref. 66	Ref. 67	Ref. 68	Ref. 69	Ref. 70	Ref. 71	Ref. 72
β-cubebeno					1539	1514	1512		1560, 1541			1490			
Linalol	1554	1557	1453		1549	1520		1559	1506, 1555		1533	1503		1551	1513
Biciclo- elemeno			1484						1482						
α-ilangeno							1460		1491	1491					
α-gurjuneno			1527		1518, 1528				1529			1523			
Cis-sabineno hidrato												1550		1559	
β- bourboneno			1515		1519, 1531				1586, 1546, 1526	1526				1546	
β-elemeno			1585		1576, 1578		1573		1591, 1608			1562		1596	
β-cariofileno	1598		1594		1579, 1588	1577	1567	1642	1617, 1618			1606		1602	1611
Isobornil acetato									1584, 1623			1582			
Longifoleno							1534		1643	1574					
Bornil acetato									1599		1599				1599
Terpinen-4-ol			1603		1589, 1591			1610	1601, 1628, 1637		1601	1626		1610	
α-cedreno						1574			1640	1578					
β-copaeno									1626			1631			
Aromaden- dreno					1589				1650	1654		1618		1610	
Z-β- farneseno				1633	1670				1650	1654					
α-humuleno	1675		1667		1665, 1653	1655	1636	1648	1672, 1707, 1719	1672		1681			
α-amorfenno					1539	1670	1657		1691	1691					
γ-muuroleno					1675	1677			1692, 1695			1688			1691
Tujopsa- dieno				1650											
Trans-β- guaieno				1663					1667	1667					
Alloaroma- dendreno					1645					1648		1659			
α-guaieno									1651	1651					

Substância	Ref.58	Ref. 59	Ref. 60	Ref.61	Ref.62	Ref. 63	Ref. 64	Ref. 65	Ref. 66	Ref. 67	Ref. 68	Ref. 69	Ref. 70	Ref. 71	Ref. 72
Citronelil acetato									1645, 1662, 1671		1662	1643			
γ -elemeno					1819, 1805				1642					1644	
Epi- β -santaleno									1638	1638					
α -himachaleno									1649	1649					
Sabinol									1683			1683			
Selina-4(15),7(11),8(9)-trieno					1681										
γ -gurjuneno					1675, 1700										
(E)- β -farnese-no		1663							1671, 1668	1668					
(Z,Z)- α -farneseno									1697	1697					
Borneol									1698, 1735			1696			1694
Verbenona					1697				1733						
Lavandulol	1698								1662, 1707						
α -terpineol	1713	1718	1700			1672		1693		1685		1662		1705	1735
Viridifloreno			1695						1697	1697		1694			
α -muurolelo			1690		1714	1685	1692		1727, 1730	1727		1726			
α -bulneseno			1613						1729	1729					
β -himachaleno									1718	1718					
Germacre-no-D	1721				1696, 1707	1678	1679	1720	1712, 1718	1712		1708		1714	
γ -cadineno				1761	1714, 1724, 1823	1734			1766	1763		1765		1769	
α -selineno	1737		1725		1700, 1705, 1718				1753	1729					
β -selineno	1729		1720		1715, 1704		1684		1767	1727					

Substância	Ref.58	Ref. 59	Ref. 60	Ref. 61	Ref. 62	Ref. 63	Ref. 64	Ref. 65	Ref. 66	Ref.67	Ref. 68	Ref.69	Ref.70	Ref.71	Ref.72
β -bisaboleno									1745	1735			1734	1733	
Biciclogermacreno	1745		1732		1731, 1720				1738, 1744	1744		1741			1740
Valenceno					1711				1722, 1751	1722					
(E,E)- α -farne-seno		1739							1735, 1756	1753					
Geraniil acetato					1751	1734		1758	1754		1754	1733			
Nerol		1817				1761			1757, 1856			1755		1806	
δ -cadineno	1760		1758		1743, 1744, 1754	1730	1729	1773	1784, 1791	1763		1761		1766	
Citronelol		1772							1760, 1765		1754	1719		1773	
β -sesquifelandreno					1768				1776				1778		
7-epi- α -selineno									1775				1775		
ar-curcumeno				1774	1772				1777, 1787				1781		
Selina-3,7(11)-dieno				1793					1791						
Geraniol		1856	1836					1868	1842			1795		1855	
Germacreno B	1812											1839		1837	
Calameneno			1834		1826	1800	1797		1832, 1837	1837					
α -ionona												1839			
Safrol						1903									
β -ionona												1926			
Palustrol			1934												
E-nerolidol	2042				2043, 2056	2009	2007		2000, 2044			2003	2044		
Cariofileno óxido	1965		1983		1963, 2005		1934		2000, 1996			1981			
Cubenol					2084, 2085		2015								
α -calacoreno					1901, 1914		1877		1916, 1926	1916					
Epi- α -cubenol							2021		2037						
Elemol	2073							2098	2078				2089		

MATERIAIS E MÉTODOS

4- Material e Métodos

4.1 Coleta e identificação do material botânico e obtenção do óleo essencial

A espécie *Eugenia nitida* Camb. pertence ao gênero *Eugenia*, família Myrtaceae, segundo a Dra. Graziela Barroso, pesquisadora aposentada do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, que procedeu a identificação da planta.

Em outubro de 1995, foram coletadas 756 g de folhas frescas de *Eugenia nitida* Camb. em uma área de restinga situada entre os bairros da Barra da Tijuca e do Recreio dos Bandeirantes, à beira da Avenida das Américas, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Após a coleta, o material (746 g) foi imediatamente reunido para se fazer a extração por coação pelo método de arraste de vapor utilizando um aparelho do tipo Clevenger. A duração da extração foi de 4 horas e o rendimento do óleo essencial foi de 0,060%, obtendo-se uma quantidade de 0,45 g do mesmo. O óleo essencial foi acondicionado em frascos âmbar para evitar degradação por foto-oxidação do material e depois colocados em um freezer sob baixas temperaturas, para evitar maior perda dos compostos voláteis.

4.2 - Cálculo da Umidade

Para se verificar o teor de umidade das folhas de *Eugenia nitida* Camb. foi utilizado um aparelho do tipo Dean Stark. Empregou-se 10 g de material triturado e 75 ml de tolueno, como solvente, na operação que teve duração de 4 horas. O resultado indicou um percentual de 50 % de umidade nas folhas coletadas.

4.3 - Análise cromatográfica do óleo essencial

Para a identificação dos constituintes químicos do Óleo essencial, o mesmo foi submetido a análises por CGAR e CGAR-EM.

Na Cromatografia Gasosa de Alta Resolução utilizou-se um Cromatógrafo Gasoso modelo HP - 5890 Série II, de injetor com divisão de fluxo (Split) e detector por ionização de chama (FID). O integrador é modelo HP-3396.

Duas colunas cromatográficas capilares de diferentes polaridades foram usadas para a obtenção dos cromatogramas da série homóloga de hidrocarbonetos C₉ a C₂₆ e do Óleo essencial : uma com fase estacionária polar e outra de baixa polaridade.

A coluna de baixa polaridade utilizada foi a SE-54, que tem fase estacionária constituída de 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano, de dimensões 25m x 0,20 mm x 0,33 µm.

A coluna polar utilizada foi a INNOWAX, constituída de fase estacionária polietileno-glicol (100%) com dimensões de 30m x 0,32 mm x 0,50 µm.

Os hidrocarbonetos da série homóloga C_9 a C_{26} foram fornecidos pela Aldrich e injetados sob a forma de uma mistura homogênea. Esta série é utilizada para o cálculo dos índices de retenção, que requer os tempos de retenção dos hidrocarbonetos da série.

O óleo essencial e os padrões da série homóloga foram analisados em sequência por cromatografia gasosa nas seguintes condições:

Coluna SE-54 :

- Temperatura Inicial : 60°C por 1 minuto
- Velocidade de aquecimento : 4°C / minuto
- Temperatura final: 200°C por 32 minutos
- Gás de arraste utilizado : H_2
- Fluxo do gás de arraste : 2 mL / minuto
- Divisão de fluxo : 1/100
- Volume de injeção : 1 μ L
- Temperatura do injetor : 280°C
- Temperatura do detector : 300°C

A mesma metodologia foi empregada para a análise na coluna INNOWAX, sendo que a programação foi a seguinte:

- Temperatura inicial: 70°C por 1 minuto
- Velocidade de aquecimento : 4°C/minuto
- Temperatura final : 210°C por 10 minutos

- Fluxo do gás de arraste (H₂) : 1 mL / minuto
- Divisão de fluxo : 1/100
- Volume de injeção : 1 µL
- Temperatura do injetor : 280 °C
- Temperatura do detector : 300 °C

4.4 - Análise cromatográfica *acoplada* à espectrometria de massas do óleo essencial.

Para a análise em CGAR-EM, utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas computadorizado CGAR-EM-C modelo HP-5890 integrador HP-3396, MSBD 5970 com 7958 B e 70 eV quadrupolo.

Utilizou-se uma coluna cromatográfica capilar de fase estacionária 100% polietileno-glicol modificada (HP-FFAP) de dimensões 25m x 0,2 mm x 0,33µm.

A programação de análise para CGAR-EM foi a seguinte:

- Temperatura inicial: 70°C por 1 minuto.
- Taxa de aquecimento : 2°C/minuto.
- Temperatura final : 280 °C por 40 minutos.

- Temperatura do injetor : 250 °C.
- Temperatura da fonte : 300 °C.

Ao final da análise obteve-se um cromatograma de íons totais do óleo essencial, bem como os espectros de massas de cada um dos sinais relativos aos componentes individualmente.

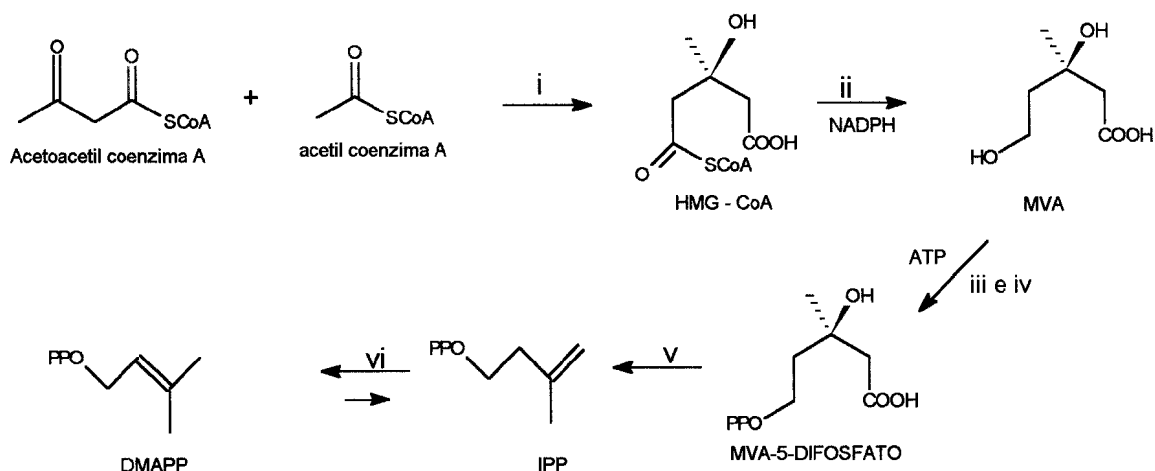
**BIOSSÍNTESE DOS CONSTITUINTES
QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE
EUGENIA NITIDA CAMB.**

5- Biossíntese dos constituintes químicos do óleo essencial de *E. nitida* Camb.

5.1 - Origem das unidades precursoras dos compostos terpênicos

O óleo essencial extraído das folhas de *Eugenia nitida* Camb. tem na sua composição química a predominância maciça de sesquiterpenos hidrocarbonetos e derivados oxigenados.

A grande maioria destes compostos identificados tem como origem o ácido mevalônico (MVA, ácido 3-metil-3,5-di-hidroxi-pentanóico), que é formado pela condensação de três moléculas de ácido acético e, posteriormente, dá origem às unidades isoméricas isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP), que são os precursores diretos da classe dos terpenos⁽⁷⁵⁾ (esquema 20). Essas reações são todas catalizadas por enzimas existentes nos sistemas vegetais com funções específicas e que vêm sofrendo tentativas de isolamento e caracterização, muitas vezes com sucesso, para a atribuição de suas funções no metabolismo secundário dos organismos vegetais.



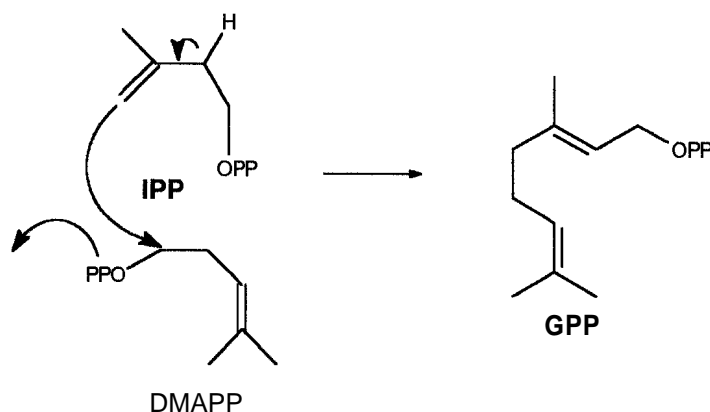
Reações:

- i - Condensação de acetil e acetoacetyl coenzima A por HMG-CoA sintase
- ii - Redução por meio de NADPH e HMG-CoA redutase
- iii e iv - Fosforilação do ácido mevalônico pelas enzimas mevalonato quinase e fosfomevaionato quinase em presença de ATP
- v - Descarboxilação e concomitante perda de água catalisada por mevalonato 5-difosfato descarboxilase
- vi - Isomerização de IPP a DMAPP pela enzima IPP isomerase

Esquema 20: Formação das unidades IPP e DMAPP a partir do MVA

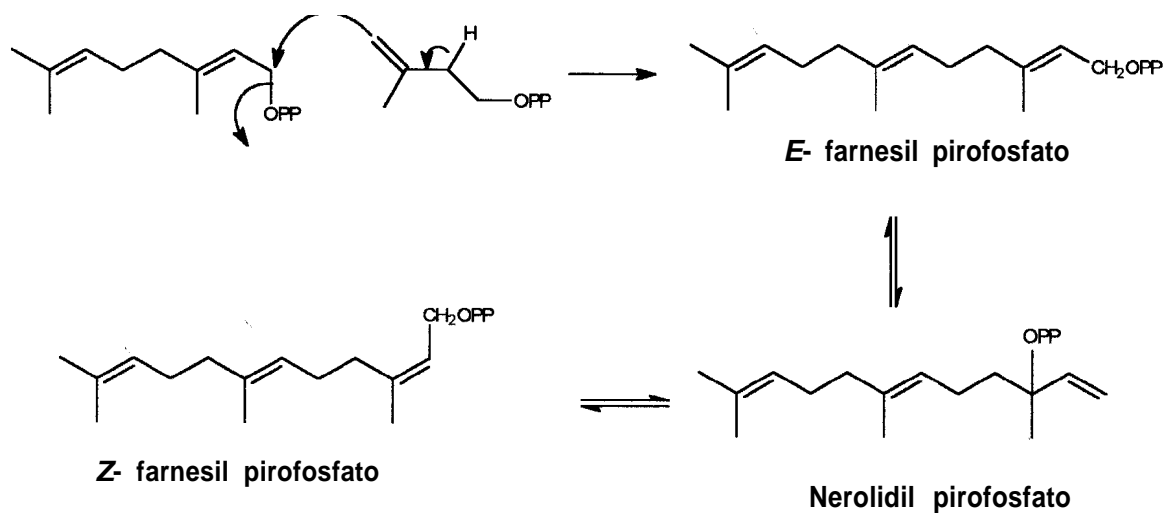
A condensação das unidades IPP e DMAPP entre si forma compostos de diferentes conformações que vão originar cadeias hidrocarbônicas que resultam em diversos grupos de compostos orgânicos terpênicos.

Para os monoterpenos, tem-se como principal precursor o geranyl pirofosfato (GPP), originado pela condensação de duas unidades de IPP via enzimas preniltransferases (esquema 21).



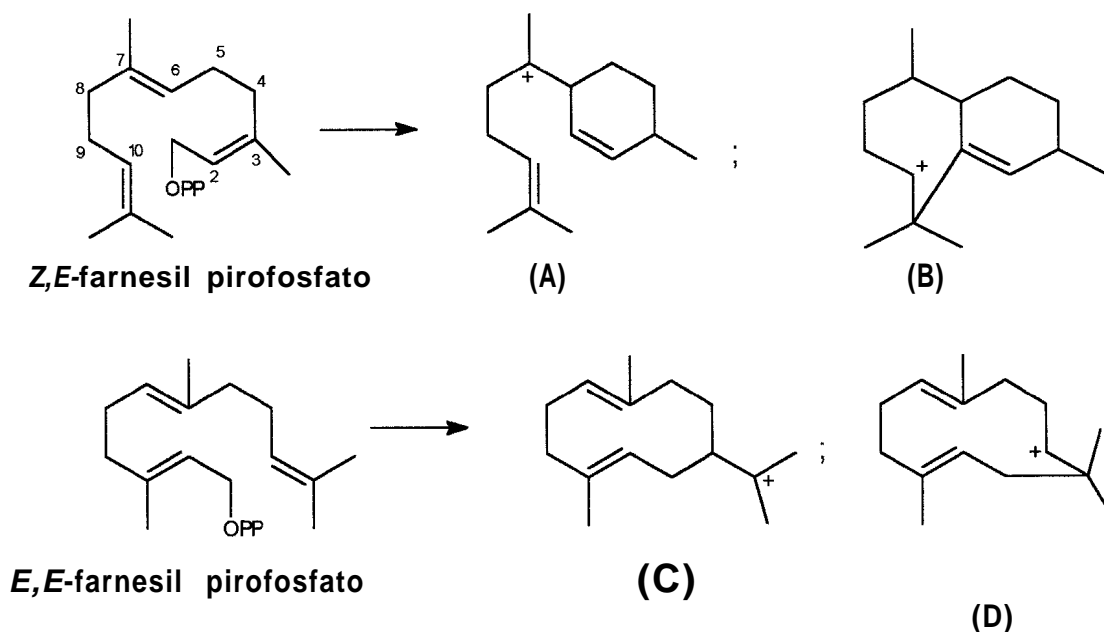
Esquema 21 : Formação do geranyl pirofosfato (GPP)

A reação de GPP com uma posterior unidade de IPP ou DMAPP origina o farnesil pirofosfato (FPP, ou farnesol), que é o precursor direto da classe dos sesquiterpenos. Por isomerização do *E*-farnesil pirofosfato, ocorre a formação do nerolidil pirofosfato (NPP ou nerolidol), que é o álcool terciário correspondente ao linalool. O nerolidol, por sua vez, sofre uma nova etapa de isomerização enzimática e forma o *Z*-farnesil pirofosfato. Estes três isômeros são responsáveis pela formação dos diversos esqueletos sesquiterpênicos já encontrados⁽⁷⁵⁾.



Esquema 22 : Formação do Farnesil pirofosfato e de seus isômeros

A partir da ciclização do farnesil pirofosfato é possível existir dois carbocátions intermediários, dependendo se o precursor é *Z,E* (A e B) ou *E,E*-farnesil pirofosfato (C e D) (esquema 23).

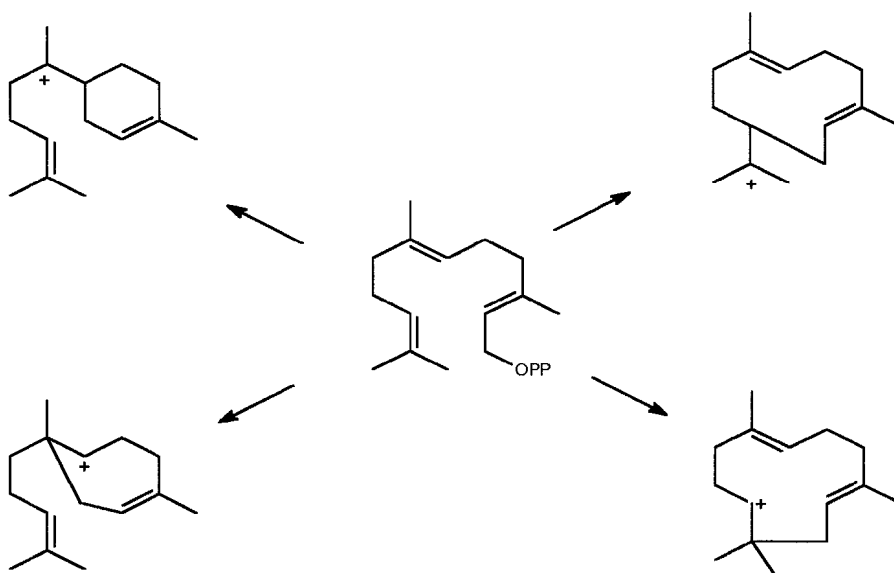


Esquema 23: Formação dos carbocátions a partir dos isômeros do FPP

5.2 - Propostas para a ciclização do FPP

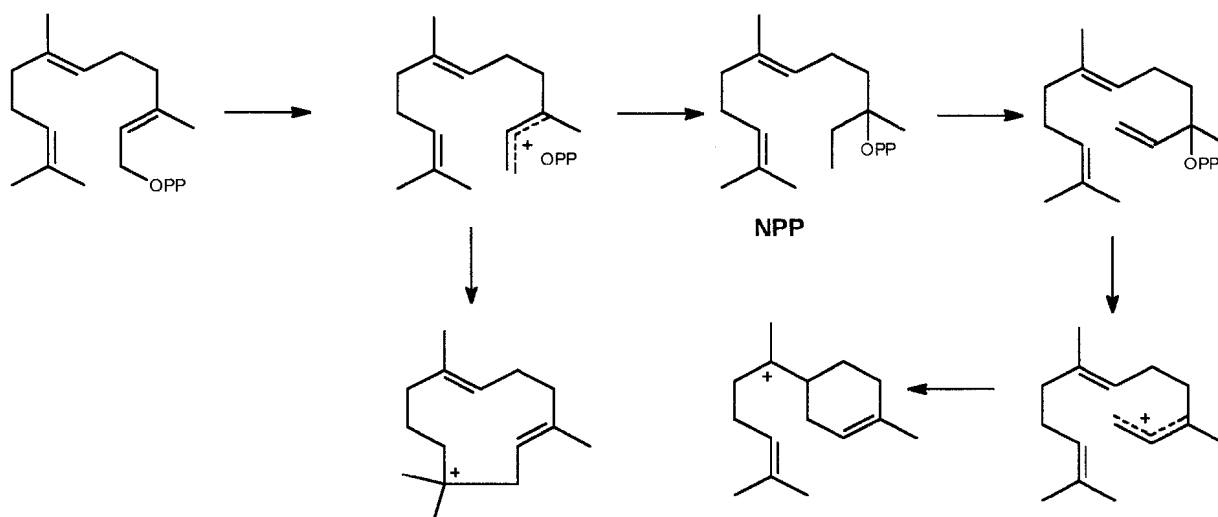
De acordo com a hipótese concebida por Ruzicka et al. e mais tarde aperfeiçoada por uma série de autores⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾, a formação de todos os sesquiterpenos cíclicos pode ser atribuída à ionização do farnesil pirofosfato e ataque nucleofílico do cátion alílico resultante à dupla ligação central ou distal, acompanhada de transformações catiônicas que envolvem ciclizações posteriores e rearranjos (esquema 24). Os rearranjos compreendem migrações de grupos

metila e deslocamentos de hidretos, culminando na extinção da carga positiva através da perda de um próton ou captura de um nucleófilo externo como a água, ou mesmo o ânion pirofosfato original⁽⁷⁹⁾.



Esquema 24 : Ciclização do FPP por vários caminhos

A barreira estereoquímica que direciona a ciclização do substrato *trans,trans* - farnesil pirofosfato é superada pela isomerização inicial ao composto terciário alílico correspondente, NPP, que possui a reatividade e flexibilidade conformacional adequados para permitir a formação dos produtos cíclicos⁽⁷⁹⁾ (esquema 25).



Esquema 25 : Formação e ciclização do NPP

Muitos esqueletos sesquiterpênicos podem derivar da ciclização dos isômeros do FPP. Algumas enzimas específicas catalizam a formação de produtos com estereoquímicas diferentes nos centros quirais possibilitando a distinção entre as várias formas derivadas do mesmo esqueleto.

Segundo Berry⁽⁸⁰⁾, a formação dos sesquiterpenos segue as seguintes regras:

1. O precursor geral dos sesquiterpenos, *E,E*-FPP é isomerizado ou para R-NPP ou para S-NPP por um rearranjo *syn* anti-alílico.
2. NPP sofre ciclização por ataque da dupla ligação 6,7 ou 10,11 em C-1 por um deslocamento anti-alílico do pirofosfato.
3. A conformação do enantiômero de NPP que cicliza determina a estereoquímica do produto.

Observação: O sistema de numeração da cadeia carbônica observado no esquema 23 e sugerido pela IUPAC para o FPP é mantido após a ciclização para

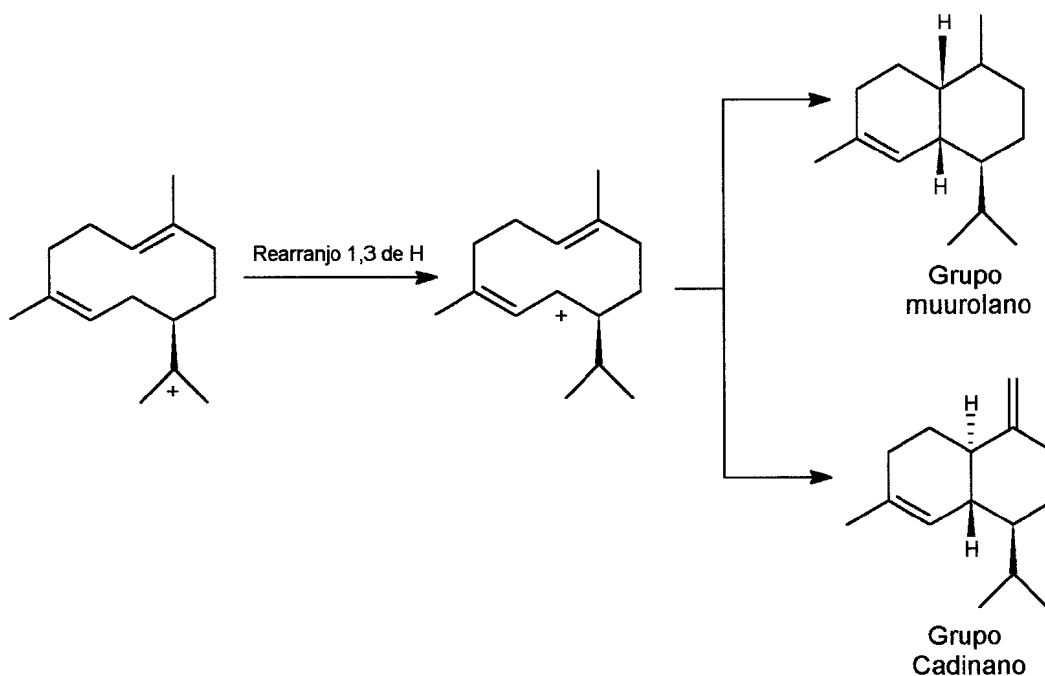
melhor visualização dos carbonos onde acontecem as reações. Na verdade, tal numeração é alterada quando os produtos finais são formados, embora a seqüência mude de acordo com cada esqueleto sesquiterpênico, muitas vezes explicando a origem da nomenclatura dos compostos, por mostrar a posição de um grupo funcional na estrutura da molécula.

Muitos estudos utilizando FPP marcado estão sendo realizados para verificar os mecanismos de ciclização e a formação dos diversos intermediários que originam os muitos esqueletos sesquiterpênicos⁽⁸¹⁻⁸³⁾

5.3 - Biossíntese dos derivados do *Z,E-farnesil* pirofosfato e do Nerolidil pirofosfato

Entre os grupos de sesquiterpenos encontrados no óleo essencial de *Eugenia nítida* Camb., poucos são derivados da ciclização direta do *Z,E-FPP* ou de seu isômero nerolidil pirofosfato a partir do *Z,E-FPP*. Como exemplos aparecem os cadinanos, representados pelo T-cadinol, α -cadinol e o δ -cadineno; os muurolanos γ -muuroleno e T-muurolol (epi- α -muurolol); o α -humuleno e o *E*-cariofileno.

Os cadinanos e muurolanos fazem parte do grupo dos cadinenos e são tidos como classes de substâncias derivadas do processo de ciclização do *Z,E-FPP* envolvendo um rearranjo 1,3 de hidrogênio para o carbocátion em C-12 do germacreno (esquema 26)⁽⁸⁴⁾.



Esquema 26: Formação dos grupos cadinano e muurolano

Em relação ao grupo dos muurolanos, existem duas alternativas para a biossíntese do T-muurolol e do γ -muuroleno (esquema 27). A primeira hipótese é a ciclização do FPP por meio do ataque eletrofílico de C-10 ao carbono C-1, que sustenta o grupo pirofosfato. A carga positiva, que se localiza em C-11 após a ciclização, migra para C-1 por intermédio de um rearranjo 1,3. Posteriormente, uma segunda ciclização eletrofílica proporciona a formação do sistema bicíclico e a localização da carga em C-7, resultando no cátion cadinanil. Perda de

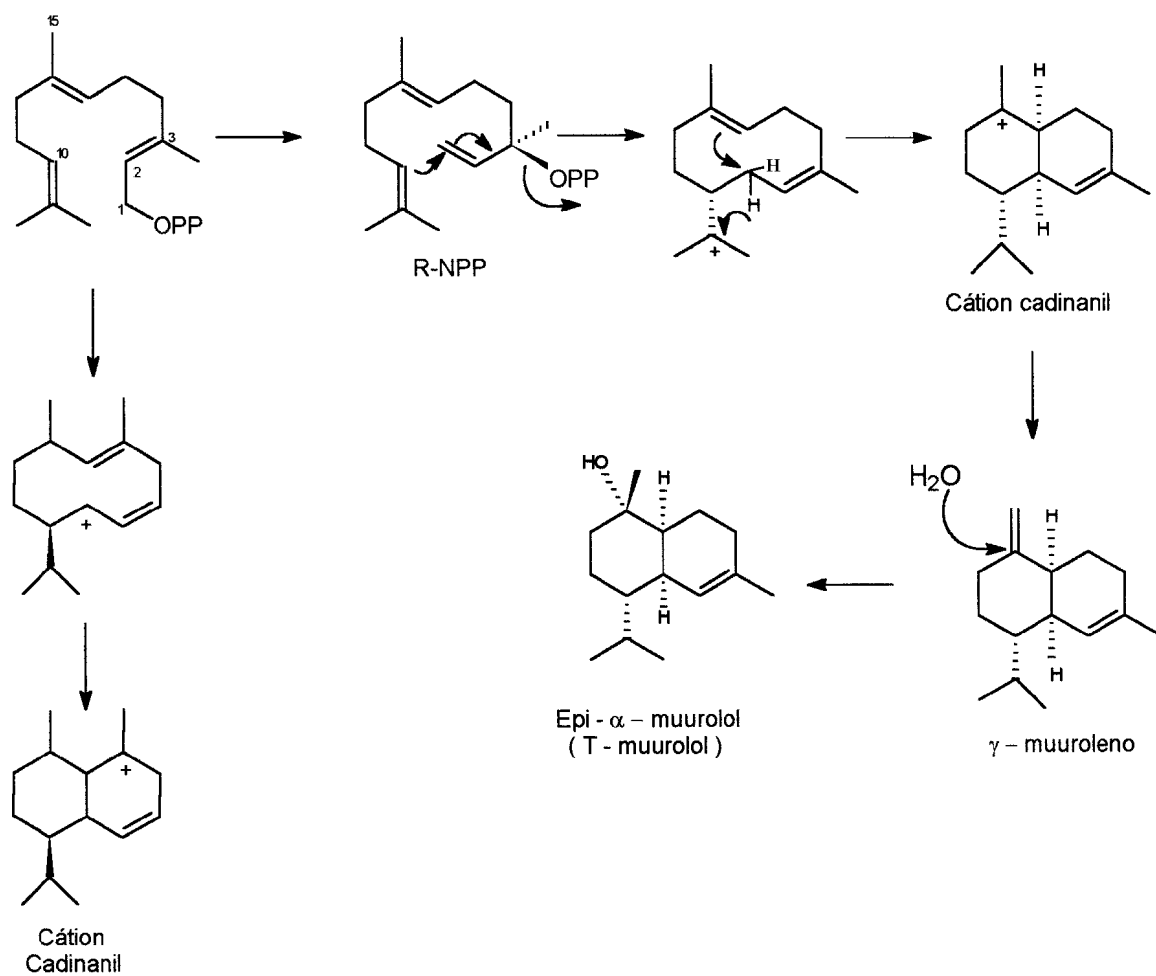
hidrogênio em C-15 vai levar à formação do γ -muuroleno e por um ataque *syn* da água ocorre a formação do T-muurolol.

A segunda proposta, defendida por Cane e Tandon (85), sugere que haja uma isomerização do Z,E-FPP a R-NPP para que ocorra a ionização e o ataque eletrofílico a C-10 da dupla ligação. A partir da formação do cátion cadinanil, a proposta para a formação dos dois muurolanos concorda com a primeira.

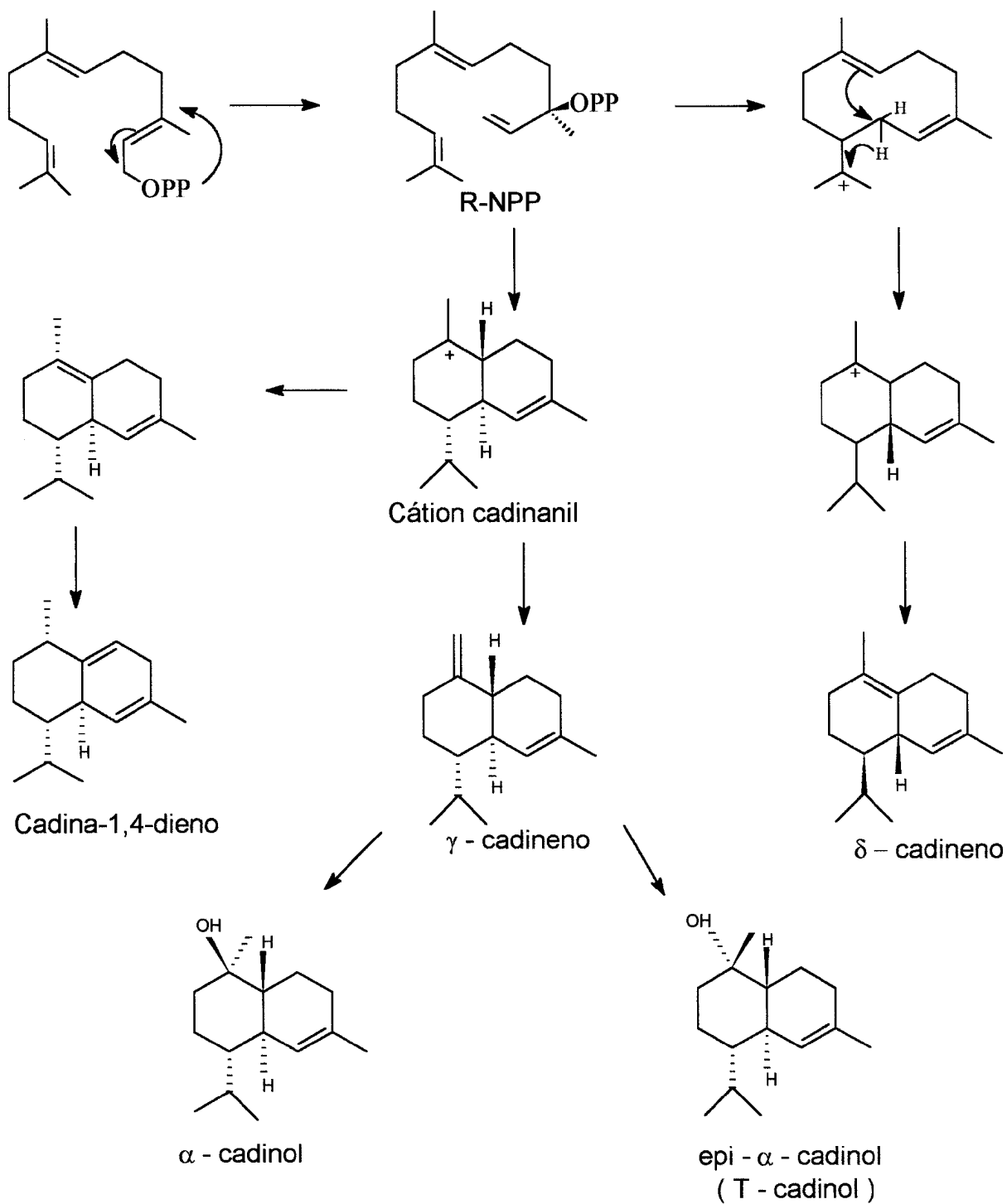
Para a biossíntese do grupo dos cadinanos (esquema 28), um dos grupos mais comuns de sesquiterpenos encontrados na natureza, também é aceita a proposta de ciclização do R-NPP com a formação do cátion cadinanil e posterior perda de hidrogênio e rearranjo 1,4 para a formação do cadina-1,4-dieno. O cátion cadinanil também pode sofrer perda de hidrogênio em C-15 para formar o γ -cadineno. Um ataque de modo *syn* pela água fornece a estereoquímica no qual é achado o epi- α -cadinol, enquanto que o ataque *anti* da molécula de água à dupla ligação Δ^7 produz o α -cadinol. O δ -cadineno é formado a partir de um diastereoisômero do cátion cadinanil que difere deste pela estereoquímica de C-1. Este isômero sofre perda de hidrogênio em C-6 e forma o δ -cadineno.

A formação do diastereoisômero do cátion cadinanil pode ser proveniente do segundo ataque eletrofílico, aquele que forma o biciclo. O rearranjo 1,3 de hidrogênio de C-1 para C-11 pode ocorrer com o hidrogênio equatorial de C-1 e não com o axial, que é o que rearranja na formação do cadinanil.

Ainda em relação aos δ -cadineno, uma enzima relacionada à ciclização do FPP para a formação deste composto foi isolada de *Xanthomons campestris* var *malvacearum* (Smith) Dye (X cm) (86).



Esquema 27 : Proposta de caminhos biossintéticos para os muurolanos



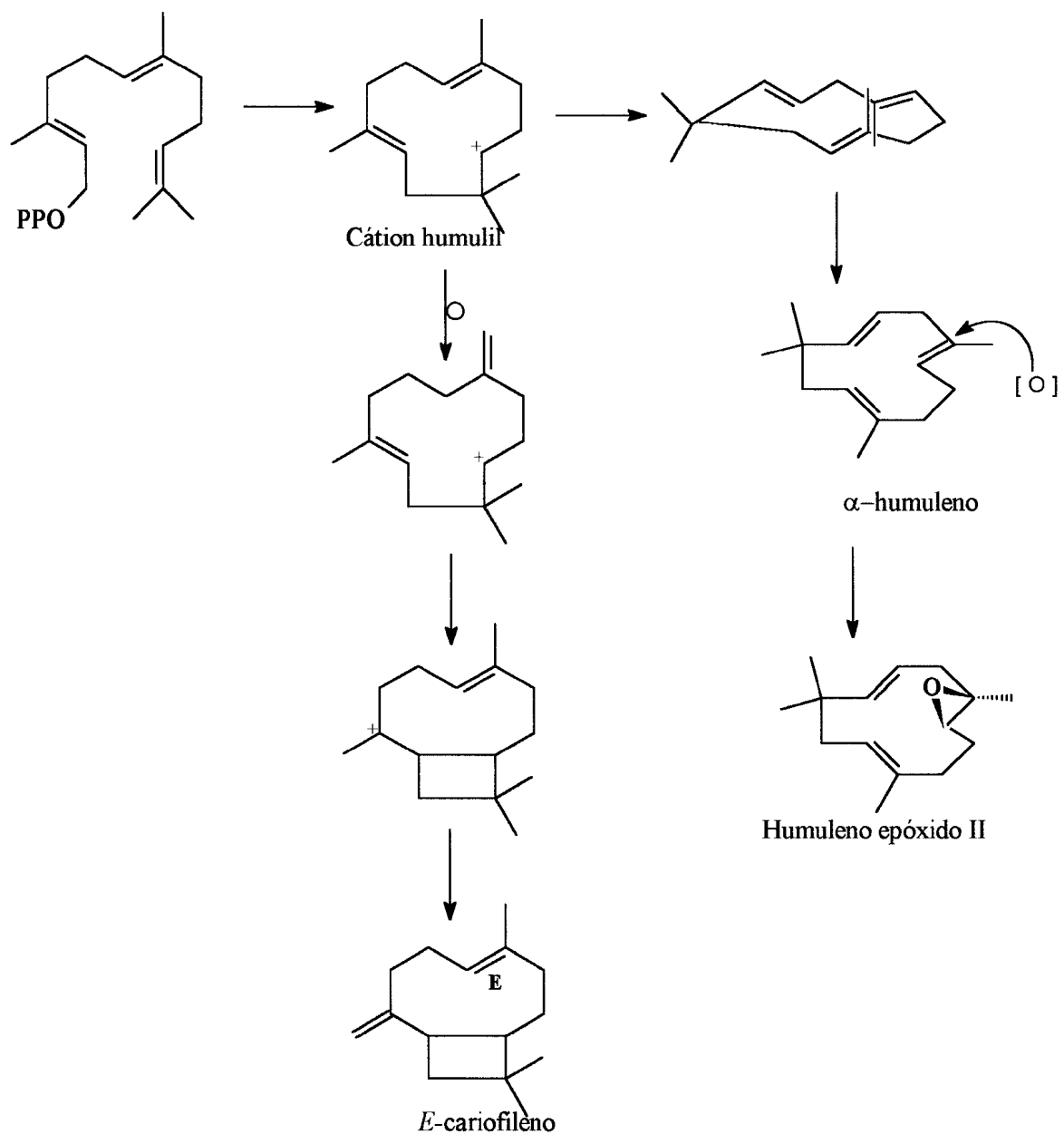
Esquema 28: Proposta de caminho biossintético para os cadinanos

Os sesquiterpenos α -humuleno e E-cariofileno chamam atenção por suas estereoquímicas singulares. São ambos formados a partir do cátion humulil, derivado da ciclização pelo ataque eletrofílico direto à dupla ligação 2,3 e consequente expulsão do grupo pirofosfato (esquema 29).

Um rearranjo 1,4 de hidrogênio no cátion humulil e posterior ciclização a formação de um carbocátion terciário, que por redução nas posições 7 e 11 vai produzir o E-cariofileno.

O α -humuleno tem uma rota biossintética mais simples, sendo formado simplesmente pela perda de hidrogênio de C-9, que gera a dupla ligação Δ^8 . Com a dormação do humuleno após tal processo, a epoxidação da dupla ligação Δ^6 dá origem ao humuleno epóxido II.

Existe uma teoria de que um sistema enzimático catalisa as reações de ciclização para o S-NPP para a formação do cátion humulil (rearranjo *syn* alílico e deslocamento *anti-alílico*)⁽⁷⁹⁾ e alguns grupos de químicos bioorgânicos realizam estudos com relação às enzimas utilizadas no processo de formação destes dois sesquiterpenos, bem como no estudo de conformações mais estáveis para ambos devido a sua grande flexibilidade estrutural⁽⁷⁸⁾.

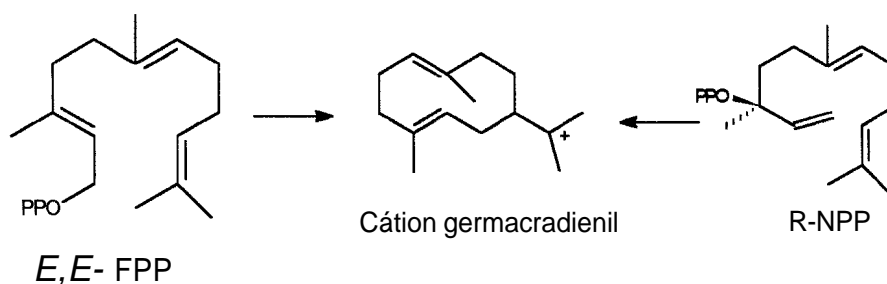


Esquema 29: Proposta de caminho biossintético para o α -humuleno, humuleno epóxido II e o *E*-cariofileno

5.4 - Biossíntese dos derivados do *E,E*-Farnesil Pirofosfato

A maior parte dos sesquiterpenos identificados no óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. tem sua origem atribuída à forma *E,E* do farnesil pirofosfato. Possuem estruturas diversas que são formadas a partir de processos envolvendo enzimas específicas.

Muitos destes grupos de compostos se originam de reações do cátion germacradienil, uma forma iônica gerada pelo ataque eletrofílico direto de C-10 à dupla ligação 2,3, com a característica de manter a carga positiva conseguinte no grupo isopropil ligado a C-10 (esquema 30). Segundo a proposta de Lorimer⁽⁸⁸⁾, no entanto, o cátion germacradienil é formado pela ciclização do R-NPP e não diretamente pelo *E,E*-FPP.

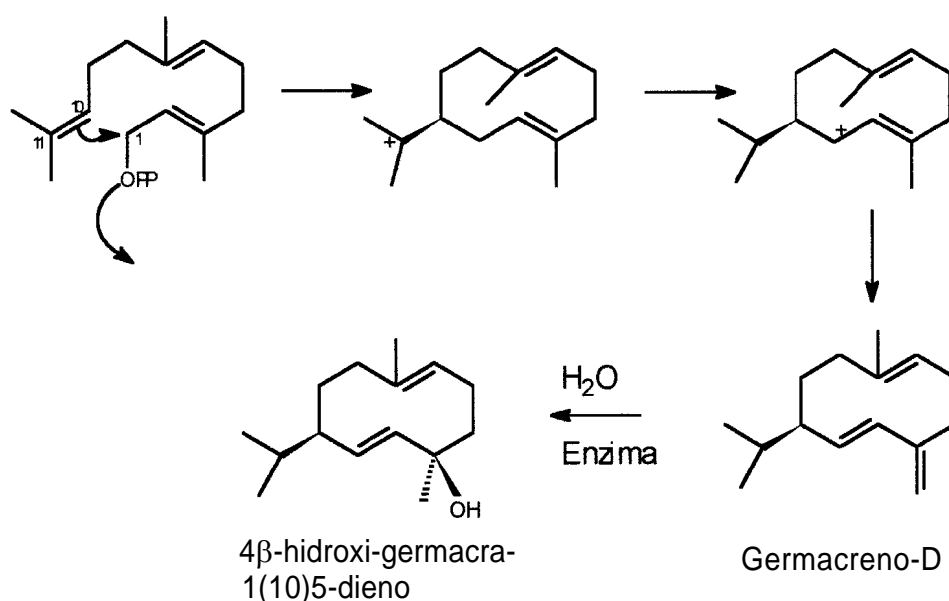


Esquema 30: Formação do cátion germacradienil

O cátion germacradienil também é o precursor de uma importante classe de sesquiterpenos, que é a dos germacranos, de onde possivelmente vem a origem do seu nome, já que forma diretamente os germacrenos.

Na biossíntese do germacreno D (87), verifica-se um rearranjo 1,4 de hidrogênio que localiza a carga em C-1 e posteriormente, um novo rearranjo 1,4 propicia a formação da dupla ligação Δ^2 . O germacreno D é formado pela perda de hidrogênio em C-15, que vai gerar uma dupla ligação (esquema 31).

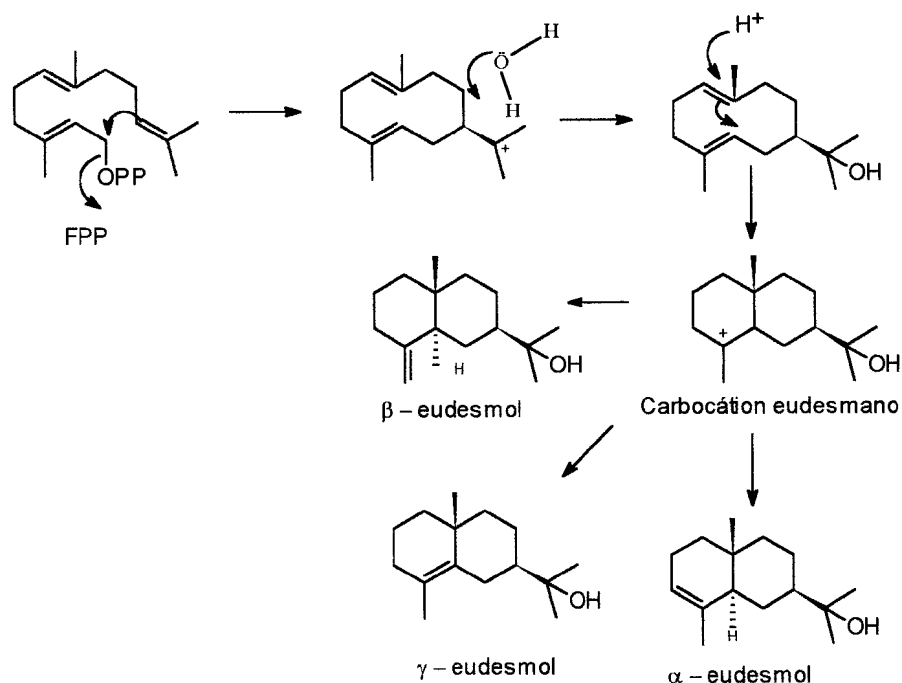
Ataque *anti* e H₂O ao germacreno D, catalizado por uma enzima hidrolase, leva ao produto 4 β -hidroxi-germacra-1(10)5-dieno.



Esquema 31: Proposta do caminho biossintético para os germacranos

Os eudesmanos também são um grupo de sesquiterpenos muito comuns em plantas. São formados pelo ataque nucleofílico da H₂O a C-11 que sustenta a carga positiva, formando o grupo isopropanol, característico nesta classe de substâncias. Pela captura subsequente de um hidrogênio catalisada por NADP, ocorre a formação do carbocátion eudesmano, que tem a carga positiva localizada em C-3. A remoção de um hidrogênio de qualquer das posições (C-2,

C-4 ou C-15), adjacentes a C-3 produz os sesquiterpenos α -eudesmol, γ -eudesmol e β -eudesmol, respectivamente⁽⁸¹⁾ (esquema 32).



Esquema 32: Proposta de caminho biossintético para o grupo dos eudesmanos

A biossíntese dos selinenos também tem sido explorada sob o ponto de vista de diversos autores^(6,13,14).

O α - e o β -selineno também são formados a partir do cátion germacradienil, que cicliza, perde um hidrogênio em C-12 para formar uma dupla ligação e, com a localização da carga em C-3, sofre nova perda de hidrogênio nas posições 2 e 15 para produzir os respectivos compostos.

Belingheri et al ⁽¹⁴⁾ descobriu que a enzima formadora do β -selineno, que cataliza os processos de perda de hidrogênio e ciclização, a β -selineno ciclase, isolada dos frutos de *Citrofortunella mitis* é dependente de metais divalentes como Mg^{+2} e de outras importantes propriedades estruturais para produzir o composto na estereoquímica adequada.

O sesquiterpeno δ -selineno é pouco encontrado em óleos essenciais e uma proposta de biossíntese é sugerida neste trabalho para esta substância. Ocorre um rearranjo 1,4 de hidrogênio que vai proporcionar, posteriormente, uma dupla ligação na posição 1,2 após a segunda ciclização.

O cátion germacradienil pode ainda sofrer ciclização para formar os anéis fundidos de seis membros e a carga positiva ser estabilizada em C-3. A saída de um dos hidrogênios de C-4 forma a dupla ligação Δ^3 e a perda de outro hidrogênio em uma etapa subsequente conduz à formação do selin-4(14),7(11)-dieno.

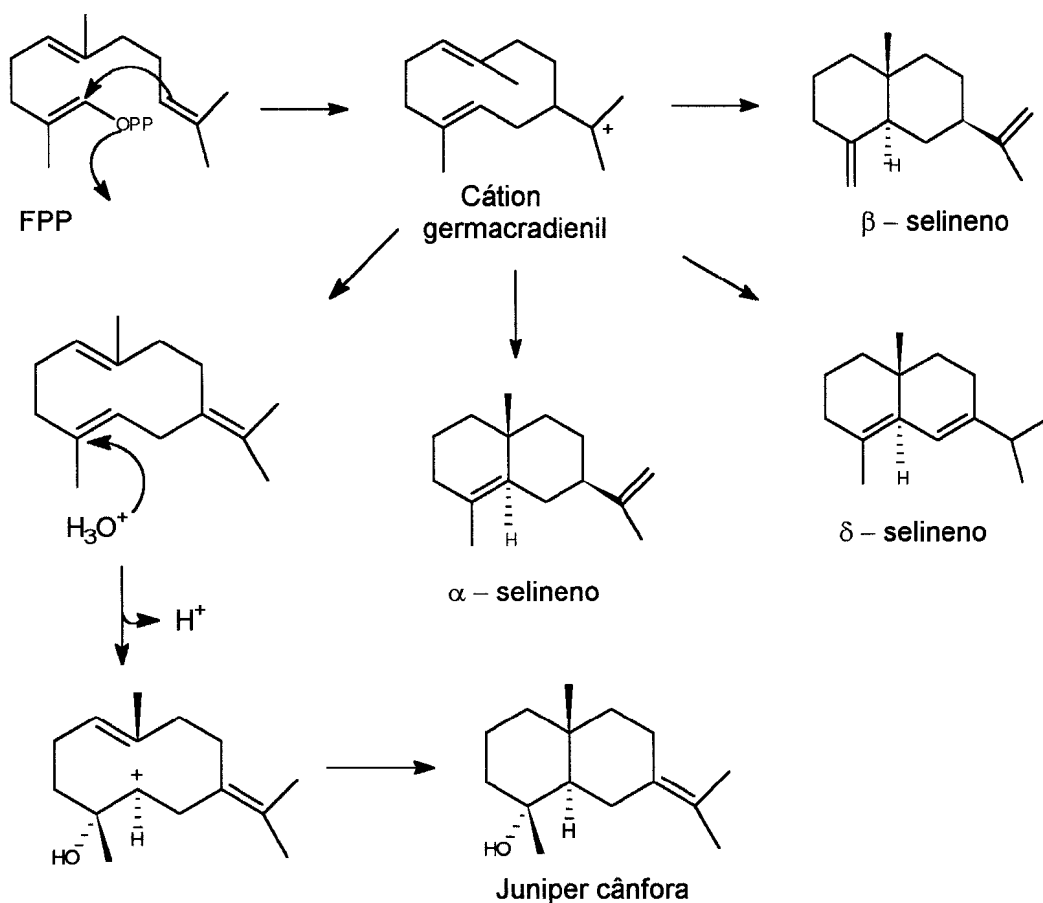
Um sesquiterpeno oxigenado, juniper cânfora, muito comum entre sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais, possui uma rota biossintética semelhante à dos selinenos. O cátion germacradienil perde hidrogênio em C-11 e forma a dupla ligação Δ^{10} . A carga positiva que se instala em C-2 após o ataque *syn* de H_2O migra para a posição 6 após o segundo ataque eletrofílico e a captura de um próton para sua estabilização vai fornecer o composto com a estereoquímica adequada.

O álcool terciário selin-11-en-4 α -ol surge a partir de um ataque *syn* de água a C-3 do cátion germacradienil, sendo que este captura um hidrogênio e

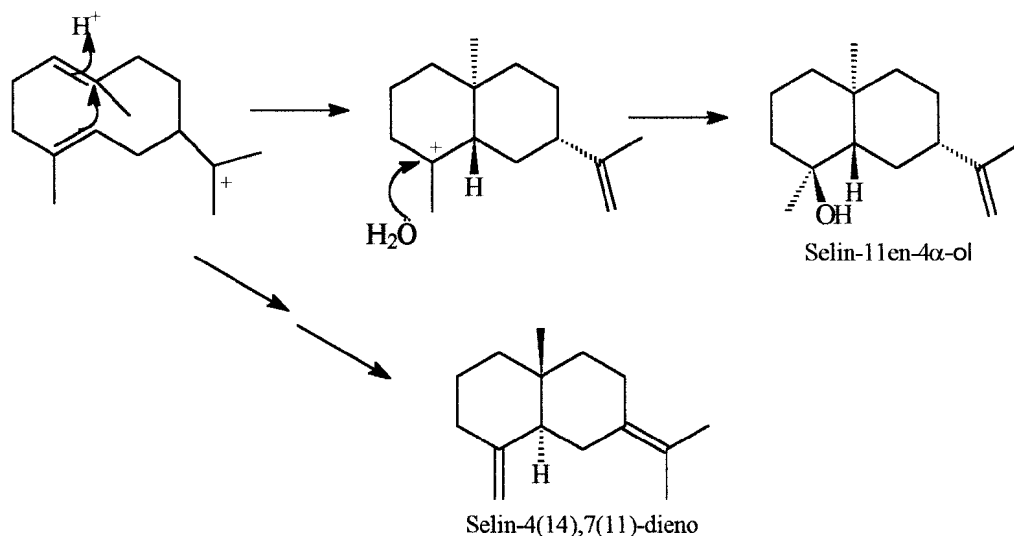
proporciona a segunda ciclização que vai dar origem ao sistema bicíclico.

Também ocorre formação da dupla ligação

O esquema 33 sugere uma rota biossintética tanto para os selinenos quanto para o juniper cânfora.



Esquema 33: Proposta de caminho biossintético para os selinenos e para o juniper cânfora



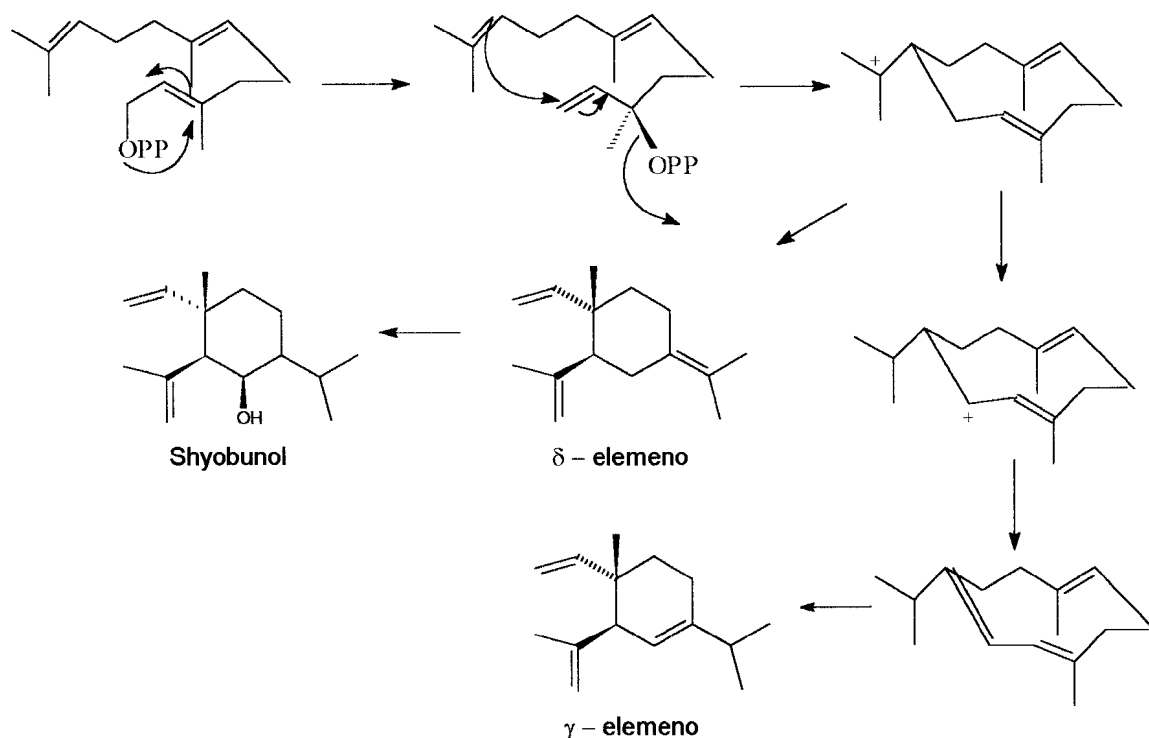
Esquema 33.1: Formação do selin-11-en-4 α -ol e do selin-4(14),7(11)-diene

O grupo dos elemanos, que compreende o γ -elemeno, o δ -elemeno e seus isômeros, encontrados neste estudo, tem uma origem semelhante à dos selinenos (esquema 34). Também acontece a ciclização do R-NPP com a carga positiva localizando-se em C-11. Conformações estruturais vão formar o δ -elemeno e por meio de um rearranjo 1,4 há a posterior formação da dupla ligação Δ^9 .

O shyobunol é formado pelo ataque nucleofílico de uma molécula de H_2O ao carbono 10 da dupla ligação. Outros isômeros do shyobunol são formados pelo mesmo ataque da água às posições 11 (formação do elemol) ou Δ^9 .

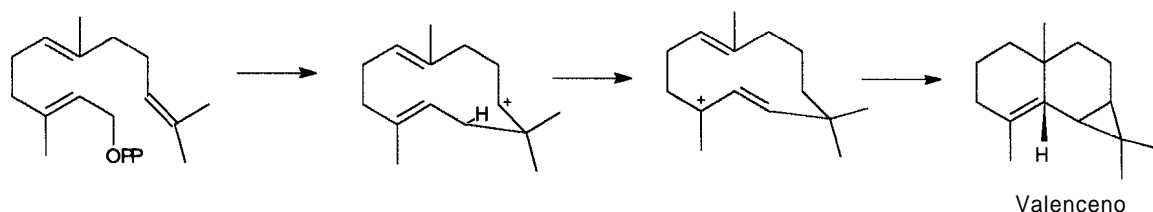
Diferentes enzimas catalisam o processo e a existência destas pode levar a novos estereoisômeros hipotéticos como os que possuem diferenças de configuração nos carbonos quirais C-1 e C-7. O próprio elemol pode ter diferenças de configuração nos centros quirais e possuir outros estereoisômeros.

O grupo dos elemanos também se caracteriza por conter apenas um anel cicloexânico em sua estrutura, ao contrário da maioria dos sesquiterpenos, que possui dois ou mais anéis, geralmente fundidos.



Esquema 34: Proposta de caminho biossintético para os elemanos

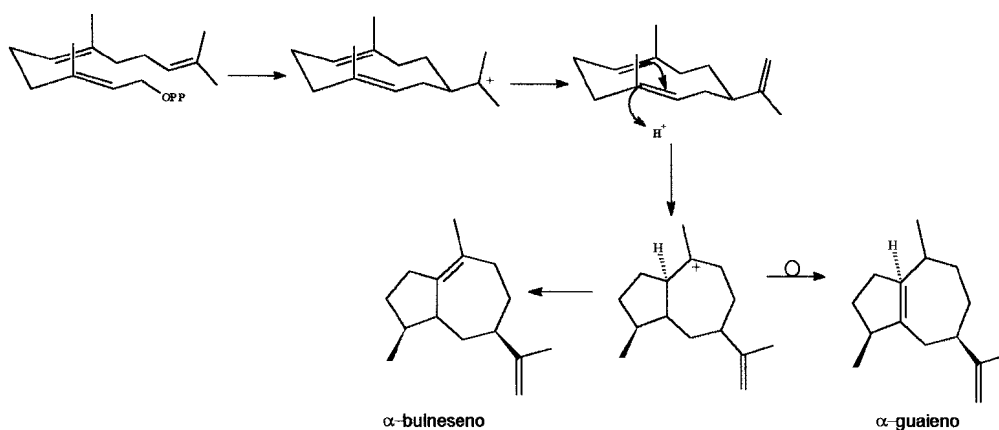
O valenceno é formado pela ciclização do *E,E*-FPP devido a um ataque eletrofílico de C-11 à dupla ligação. Rearranjo 1,4 de hidrogênio faz com que a dupla ligação se desloque para os carbonos 1,2 e a captura de um átomo de hidrogênio pelo carbono nucleofílico C-6 desencadeia a ciclização para dois anéis de seis membros e um anel de três membros fundidos entre si, o que é uma característica do composto (esquema 35).



Esquema 35: Proposta de caminho biossintético para o valenceno

A observação das características estruturais dos sesquiterpenos encontrados no óleo essencial de *Eugenia nítida* Camb. mostra a existência de alguns compostos que trazem em sua estrutura o sistema de anéis de 5 e 7 membros fundidos.

Cane ⁽⁵⁾, a partir das observações dos estudos de Croteau envolvendo enzimas específicas para uma série de biossínteses, propôs uma rota biossintética para alguns destes compostos. Tal rota pode ser estendida para a biossíntese de compostos com estruturas similares com diferenças em pequenos detalhes. Observa-se durante a etapa inicial de ciclização o papel importante da enzima patchoulol sintase que favorece a formação de sesquiterpenos como o α -bulneseno e o α -guaieno (esquema 36).

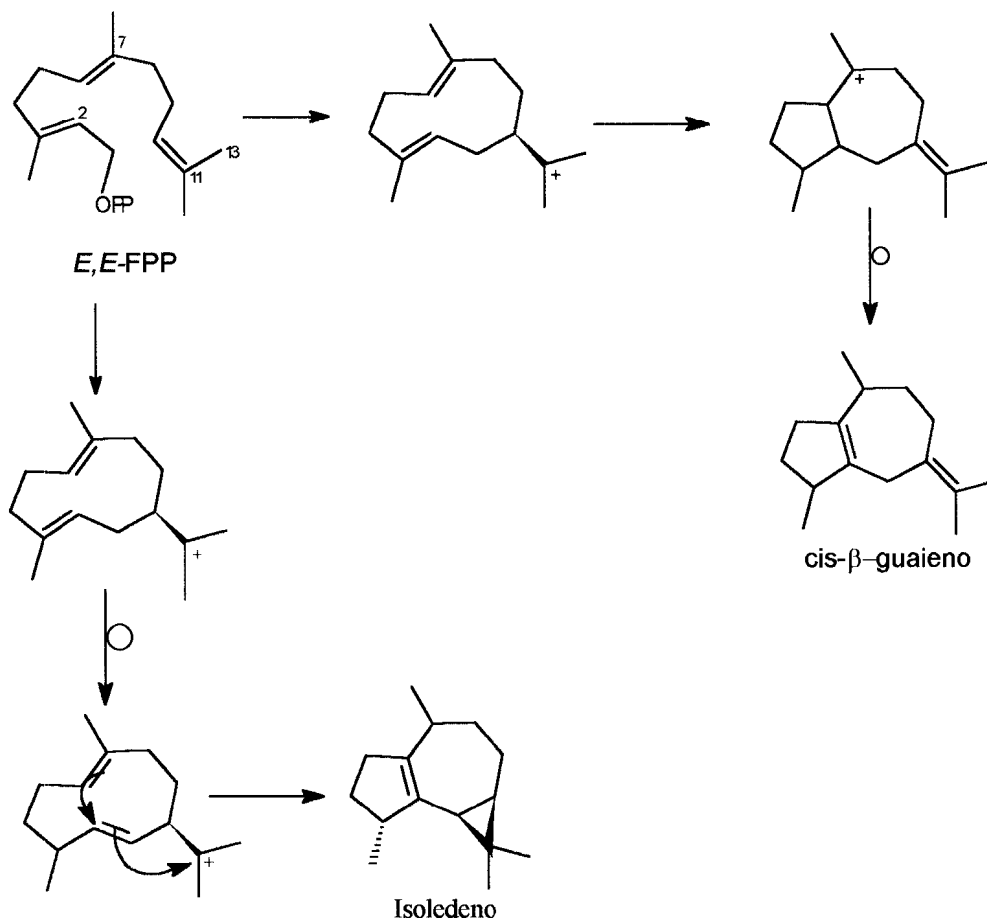


Esquema 36: Proposta de caminho biossintético para o α -guaieno e α -bulneseno

O isoleveno assemelha-se estruturalmente a estes compostos, em especial ao α -guaieno, pois também possui a dupla ligação na junção dos anéis. A diferença é observada na estereoquímica de C-3 e no anel ciclopropânico ligado ao ciclopteno da estrutura pelos carbonos 1 e 10. O anel é formado pelo rearranjo que se dá após a ciclização do *E,E*-FPP que situa a carga positiva do intermediário em C-11. Com o rearranjo, a dupla ligação 2,3 passa para a posição 1,2. O ataque nucleofílico da extremidade C-6 da dupla ligação Δ^6 a C-2 e de C-3 a C-11 leva à formação de uma estrutura que sustenta a carga em C-7. Rearranjos posteriores e perdas de hidrogênio conduzem à formação do isoleveno.

O *cis*- β -guaieno difere da formação do α -guaieno devido ao rearranjo 1,4 de hidrogênio após a segunda ciclização do *E,E*-FPP. Com este rearranjo, forma-se o carbocátion terciário C-2 e a saída de hidrogênio de C-6 forma o *cis*- β -guaieno.

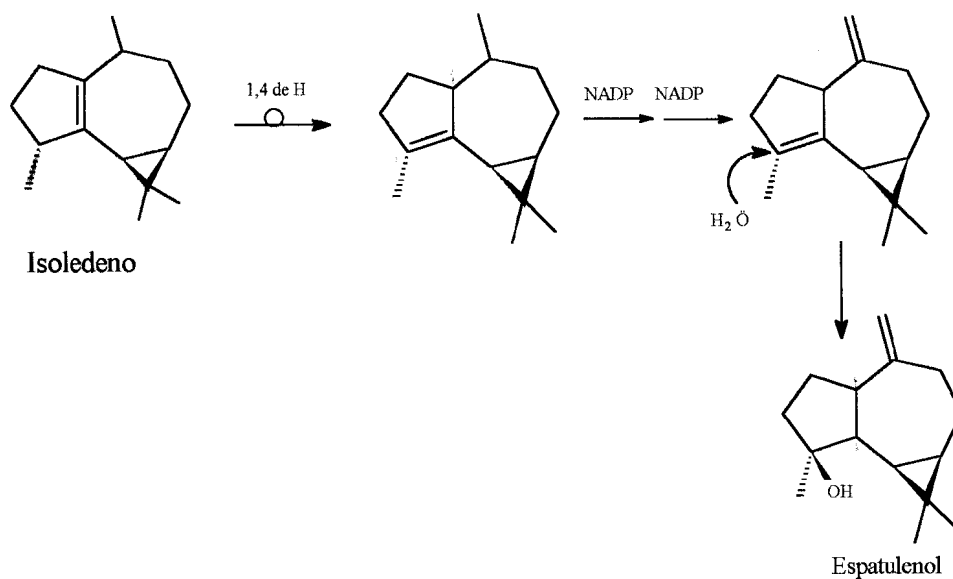
O esquema 37 apresenta uma proposta de biossíntese para estes dois sesquiterpenos, evidenciando sua origem comum.



Esquema 37: Proposta do caminho biossintético para o *cis-β-guaieno* e para o *isoleideno*

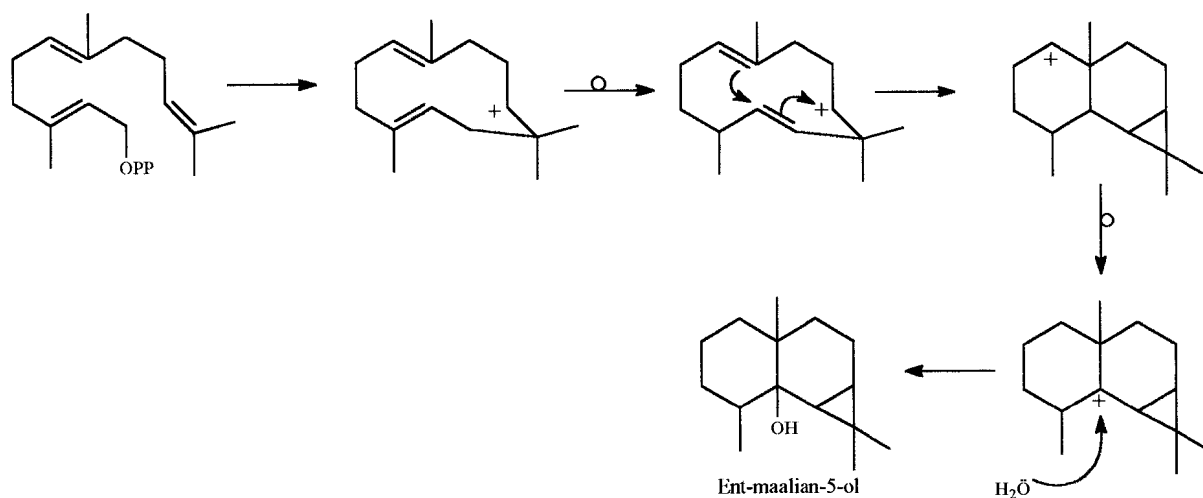
A proposta de biossíntese para o espatulenol acompanha a de formação do *isoleideno*, segundo o esquema 38. Neste caso, a dupla ligação 2,6 migra para os carbonos 2 e 3 por meio de rearranjo. Também ocorre perda sucessiva de hidrogênio por ação de NADP e assim há a formação da dupla ligação Δ^{14} . A etapa final é marcada pelo ataque *syn* da água para dar origem ao espatulenol.

Esta é uma proposta simplificada para a formação do espatulenol. Outras rotas podem ser utilizadas sugerindo outras explicações para a formação da dupla exógena Δ^{14} diferentes da ação repetida de NADP sobre a metila externa.



Esquema 38: Proposta de caminho biossintético para o espatulenol

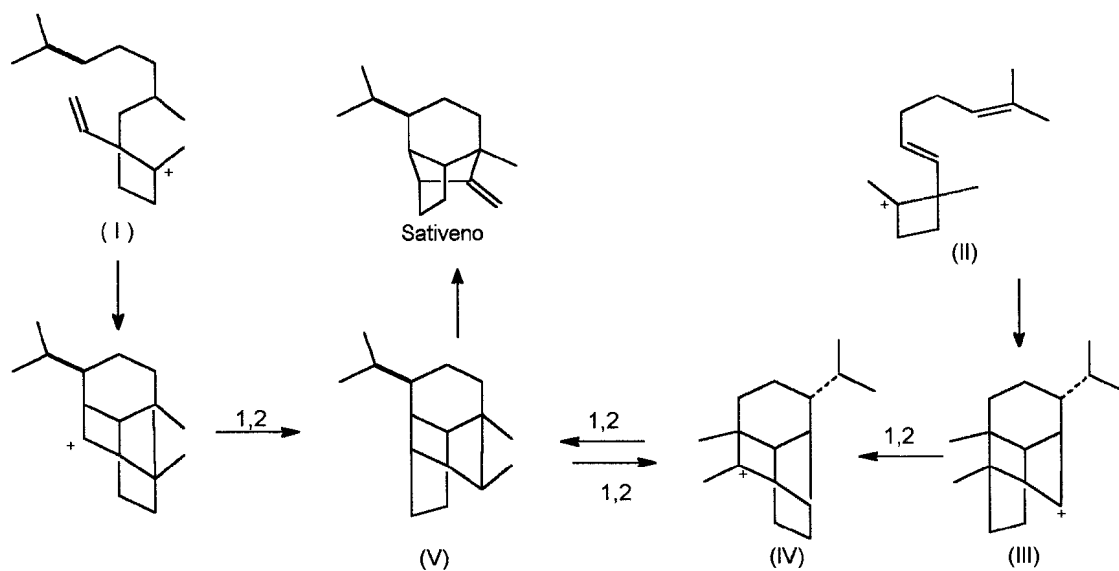
Entre os muitos sesquiterpenos oxigenados de origem terpenóide encontrados nos óleos essenciais em geral e neste estudo especificamente, encontra-se o *ent*-maalian-5-ol. Originário da ciclização do *E,E*-FPP pelo ataque de C-1 à extremidade C-11 da dupla ligação 10, 11 a estrutura sofre rearranjo da dupla ligação 2,3 que vai atacar a carga positiva localizada em C-10 e forma o anel ciclopropânico ligado ao sistema bicíclico. Ocorre migração da carga para C-2 para haver maior estabilidade e favorecer a entrada direta de água, formando assim o composto em definitivo (esquema 39).



Esquema 39: Proposta do caminho biossintético para o ent-maalian-5-ol

O sativeno tem uma biossíntese proposta por Arigoni⁽¹⁶⁾ a partir de precursores marcados e se caracteriza por ser proveniente de uma forma retorcida do *E,E*-FPP.

Ele é gerado a partir de intermediários obtidos pela ciclização da espécie hipotética I. No entanto, um dos íon intermediários também pode ser gerado de maneira plausível a partir de uma conformação antípoda do precursor via os íons tricíclicos III e II, que levam ao intermediário V por uma migração 1,2 da ponte de três carbonos (esquema 40).



Esquema 40: Proposta de caminho biossintético para o sativeno

Todas as rotas biossintéticas particulares para cada composto ou grupo de compostos foi proposta com base em dados da literatura. É necessário um estudo experimental mais aprofundado para afirmar com segurança quais são os processos enzimáticos que atuam no metabolismo vegetal, fornecendo a grande variedade de produtos do metabolismo secundário. Deve-se ressaltar a multiplicidade de enzimas encontradas nos sistemas vegetais e que levam à individualidade da formação das estruturas sesquiterpênicas.

CONCLUSÃO

6-Conclusão

A análise do óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. permitiu a identificação de 32 compostos (74% da constituição total), sendo o constituinte majoritário o sesquiterpeno alcoólico 4 β -hidróxi-germacra-1(10)5-dieno (9,81%), confirmado pela análise dos seus fragmentos de massas, seguido pelo sesquiterpeno hidrocarboneto γ -elemeno (7,8%). Os cromatogramas obtidos mostraram a predominância de sesquiterpenos na constituição do óleo essencial, perfazendo um total de 97% do mesmo, considerando os picos não identificados como sendo pertencentes à região dos sesquiterpenos. Os únicos monoterpenos identificados foram o terpinoleno e o E- β -ocimeno.

Os grupos de substâncias presentes em maior quantidade foram os selinenos (11%) e os elemenos (10%), sendo que estes vêm sendo utilizados, e com sucesso, no tratamento de tumores malignos do *cérebro*, sugerindo que o óleo essencial de *Eugenia nitida* Camb. pode ser uma fonte em potencial deste tipo de substâncias.

Observou-se que todas as substâncias encontradas possuíam um esqueleto terpênico, originado do geranil pirofosfato, no caso dos monoterpenos e do farnesil pirofosfato e nerolidil pirofosfato, no caso dos sesquiterpenos. No entanto, foram observadas as presenças de diversos grupos estruturais como sistemas bicíclicos de 6 membros e de anéis fundidos de 5 e 7 membros. Não se observou um caminho comum para a ciclização das unidades precursoras na

formação dos sesquiterpenos, podendo as substâncias serem originárias tanto da ciclização do *E,E*-FPP (farnesil pirofosfato) quanto do *E,Z*-FPP.

Os métodos de CG e CG-EM ainda são os melhores instrumentos para este tipo de análise, entretanto, a utilização do índice de Retenção deve obedecer a alguns critérios para que os resultados sejam confiáveis. A utilização de dados provenientes de análises em colunas polares mostra-se difícil, haja visto a grande variação de valores de índices de Retenção encontrados na literatura para a mesma fase estacionária, e que pode estar relacionada com atividades de grupos polares ligados à fase, ou com as taxas de aquecimento.

As colunas cromatográficas de baixa polaridade são as mais indicadas para se realizar o cálculo dos índices de Retenção já que não permitem grande variação de valores, pois leva em consideração principalmente o ponto de ebulição dos eluentes. Porém, para se observar melhor separação dos sinais no cromatograma, é preferível a utilização de uma coluna de fase estacionária polar.

Associando o caso estudado a outras análises cromatográficas gasosas, é aconselhável que a fórmula do índice de Retenção de Kováts deva ser usada apenas em análises que utilizem taxas de aquecimento lentas, pois a fórmula proposta foi idealizada para análises cromatográficas sob condições isotérmicas. A utilização da fórmula para análises realizadas com taxas de aquecimento muito elevadas pode levar a valores equivocados, tanto para colunas polares quanto para as de baixa polaridade.

A fórmula ideal para o cálculo de Índices de Retenção em temperatura programada com taxas de aquecimento superiores a 2°/min é a de Van Den Doole e Kratz, que não faz uso de logaritmos dos tempos de retenção dos sinais no cromatograma do óleo essencial e dos sinais relativos à série homóloga de hidrocarbonetos.

Enfim, é seguro caracterizar um constituinte de óleo essencial pelo índice de Retenção em coluna de baixa polaridade, pelo espectro de massas e pela fragmentação de massas do mesmo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - Referências bibliográficas

1. Craveiro, A.A. e Queiroz, D.C. de (1993) : *Química Nova*, **16** (3) , 224.
2. Magalhães, M.T. (1985): *1º Simpósio de Óleos Essenciais*, p. 21, Fundação Cargil, São Paulo-SP.
3. Gottlieb, O.R. (1985) : *1º Simpósio de Óleos Essenciais*, p. 175, Fundação Cargil, São Paulo-SP.
4. Torquillo, H. F. S. (1997) : Dissertação de Mestrado, IQ-UFRJ.
5. Clark, G.S. (1988) : *Perf. and Flavor.* , **13**, 37.
6. Kandem, P.D. ; Hanover, J. W. e Gage, D. A. (1993) : *J. Essent. Oil Res.* **5** (2), 117.
7. Potter, T. L. (1995) : *J. Essent. Oil Res.* **7** (4), 347.
8. Möllenbeck, S. et al (1997) : *Flav. and Fragr. Journ.* **12** (2), 63.
9. Pecsok, R.L. e Shields, L.D. (1968) : “*Modern Methods of Chemical Analysis*”, Wiley et al, NY-EUA
10. Dean, J.A. (1969): “*Chemical separation Methods*”, Van Nostrand, NJ-EUA
11. Lanças, F.M. e McNair, H.M. (1983) : *Química Nova*, **6** (10), 16..
12. Neto, F.R. de A. e Cardoso, J.N. (1985) : *Química Nova*, **8**, 272.
13. Neto, F.R. de A. e Cardoso, J.N. (1985): *Rev. Quim. Ind.* **54** (634), 14.
14. Ciola, R. (1985): *1º Simpósio de Óleos Essenciais*, p. 27, Fundação Cargill, São Paulo-SP.

15. Adams, R. P. (1995) : "*Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy*", Carol stream, Illinois, USA.
16. Ettre, L. S. (1963) : *J. Gas Chromatog.* **1** (2), 36.
17. Kovats, E. (1958): *Helv. Chim. Acta* **206**, 1915.
18. Ettre, L.S. (1964) : *Chromatographia* **7** (3), 141.
19. Sánchez, E.F. ; Domínguez, J.A.G.; Menéndez,V. e Santuiste,J.M. (1990) : *J. Chromatog.* , **459**, 1.
20. Van Den Dool, H. e Kratz, P.D. (1963) : *J. Chromatog.* **11**, 463.
21. Eveleigh, L.J. ; Ducauze,C.J. e Arpino,P.J. (1996) : *J. Chromatog. A* **725**, 343.
22. Erdey,L. ; Takács, J. e Szalansky,E. (1970) : *J. Chromatog.* **46**, 29.
23. Giddings, J.C. (1962) : "*Gas Chromatography*", Academic Press, NY-EUA.
24. Lee, J. e Taylor, D.R. (1982) : *Chromatographia* **16**, 286.
25. Curvers, J. ; Rijks, J. ; Cramers, C. ; Knaus, K. e Larson, P. (1985) : *J. High Resol. Chromatog. Chromatog. Commun.* **8**, 607.
26. Golovnya, R.V. e Uraletz, V.P. (1968) : *J. Chromatog.* **36**, 276.
27. Ettre, L.S. (1974) : *Chromatographia*, **7** (1), 39.
28. Ettre, L.S. e Billeb, C. (1967) : *J. Chromatog.* **30**, 12.
29. Buchman, O. ; Cao, G.Y. ; Peng, C.T. (1984) : *J. Chromatog.* **312**, 75.
30. Peng, C.T. ; Ding, S.F. ; Hua, S.L. e Yang, Z.C. (1988) : *J. Chromatog.* **436**, 137.
31. Peng, C.T. ; Ding, S.F. e Yang, Z.C. (1991) : *J. Chromatog.* **586**, 85.
32. Peng, C.T. ; Yang, Z.C. e Ding, S.F. (1992) : *J. Chromatog.* **589**, 231.

33. Peng, C.T. (1994) : *J. Chromatog. A* **678**, 189.
34. Simpson, G.I.C. ; Jackson Y.A. (1997) : *J. Chromatog A* **766**, 141.
35. Tucker, A.D. ; Maciarelo, M. J. e Landrum, L.R. (1995) : *J. Essent. Oil Res.* **7**,
(2), 187.
36. Henriques, A.T. ; Sobral, M. ; Bridi,R. et al (1997) : *J. Essent. Oil. Res.* **9**, 13
37. Brophy, J.J. et al (1996) : *Flavour and Fragr. Journ.* **11** (6), 361.
38. Brophy, J. J. ; Goldsack, R.J. e Forster, P.I. (1996) : *Flav. and Fragr. Journ.* **11**
(2), 133.
39. Weyerstahl, P. e Marshall, H. (1994) : *Flav. and Fragr. Journ.* **9** (6), 333.
40. Brophy, J. J. ; Forster, P.I. e Goldsack, R.J. (1997) : *Flav. and Fragr. Journ.* **12**
(2), 103.
41. Guimarães, F.A. et al (1982) : *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2** (2), 208
42. Henriques, A.T. ; Sobral,M.E. ; Cauduro,D. et al (1993) : *J. Essent. Oil Res.* **5**,
501.
43. Lee, P.E. ; Sewords, G. e Hunter, G.L.K (1975) : *J. Food. Sci.* **40**, 421.
44. Craveiro,A.A. et al (1983) : *J. Nat. Prod.* **46**, 591.
45. Vera, R.R. ; Laurent, S.J. e Fraisse, D.J. (1994) : *J. Essent. Oil. Res.* **6**, 155.
46. Mitscher, L.A. ; Wu, W.N. e Beal, J.L. (1973) : *Lloydia*, 422.
47. Dan, A.M.M.S. e Braz, F.R. (1983) : *Resumo da SBQ-QPN-57-D.2.5* , 540.
48. Painuly , P. e Tandon, J.S. (1983) : *Phytochemistry* **22** (1) , 243.
49. Duarte, A.A. (1997) : Dissertação de Mestrado, CPGQO-UFRRJ.
50. Legrand, C.D. e Klein, R.M. (1967-78) : Mirtáceas. In.: Reitz, P.R. e Klein,
R.M. *Flora Ilustrada Catarinense*, Itajaí, fasc. Myrt.

51. Correa, M.P. (1984) : *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, MA-IBDF, Rio de Janeiro- Brasil.
52. Nagahana, S. ; Tazaki, M. e Kobaiashi, H. (1995) : *J. Essent. Oil. Res.* **7**, 571.
53. Nagashima, F. et al (1995) : *J. Essent. Oil Res.* **7** (3), 342.
54. Ramaswami, S.K. ; Gargiullo, J. e Von Geldern, T. (1986) : *Flav. and Frag. Journ.* **9**,52.
55. Jusheng, H. (1994) : *Proc. Int. Cancer Congr.* , Free Paper Posters, 16th, Morduzzi Editora, Bolonha-Italia, **2**, 877.
56. Xinghui, X. (1994) : *Proc. Int. Cancer Congr.* , Free Paper Posters, 16th, Morduzzi Editora, Bolonha-Italia, **2**, 881.
57. Yamamura et al. (1971) : *Tetrahedron*, **27**, 5419.
58. Wong, K.C. e Chei, S.G. (1996) :*J. Essent. Oil Res.* **8**, 545
59. Wong, K.C. e Tie, D. Y. (1995) : *J. Essent. Oil Res.* **7**, 225.
60. Brophy, J.J. ; Goldsack, R.J. e Forster, P.I. (1997) : *Flav. and Fragr. Journ.* **12**, 103.
61. Noronha, R.G. e Abreu, P.M. (1997) : *Flav. and Fragr. Journ.* **12**, 79.
62. Jean, F.I. ; Loayza, I. ; Adryder, D. et al (1995) : *Phytochemistry* **38** (2), 381.
63. Gaydou, E. M. ; Randriamiharisoa, R. e Bianchini, J.P. (1986) : *J. Agri. Food Chem.* **34**, 481.
64. Oltra, H.J. ; Barrero, A.F. e Altarejos, J. (1993) : *Flav. and Frag. Journ.* **8**, 185.
65. Chyau, C-C ; Mau, J.L. e Wu, C.M. (1996) : *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1096.
66. Davies, N.W. (1990) : *J. Chromatogr.* **503**, 1.

67. Ramaswami, S.K. ; Briscese, P. et al (1986) : *Flavors and fragrance: a World Perspective. Proceedings of the 10th International Congress of Essential Oil, Fragrances and Flavors*, 551.
68. Sakai, T. ; Maarse, H. et al (1967) : *J. Agric. Food Chem.* **15** (6), 1070.
69. Farkas, P. ; Péry, J. et al (1995) : *Food Chem.* **54**, 73.
70. Beek, T.A.V. ; Kleis, R. et al (1989) : *Phytochemistry* **28** (7), 1909.
71. Sollman, C. e Schultz, W. (1995) : *J. Essent. Oil Res.* **7**, 117.
72. Sagriero-Nieves, L. e Bartley, J.P. (1996) : *Flav. and Fragr. Journ.* **11**, 49.
73. Grob Jr., K. ; Grob, G. e Grob, K. (1978) : *J. Chromatog.* **156**, 1.
74. Jennings, W.G. e Shibamoto, T. (1980) : *Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by Gas Chromatography*, Academic Press, NY - EUA.
75. Geissman, T.A. e Crout, D.H.G. (1969) : "Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism", Freeman, Cooper & Company, San Francisco, California, USA.
76. Hendrickson, J. (1959) : *Tetrahedron* **7**, 82.
77. Richards, J. e Hendrickson, J.B. (1964) : "The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins", W.A. Benjamin, New York, pp 225-239.
78. Parker, W. ; Roberts, J.S. ; Ramage, R. (1967) : *Rev. Chem. Soc.* **21**, 331
79. Cane, D. E. (1990) : *Chem. Rev.* **90** (7), 1089.
80. Berry, K.M.; Perry, N.B. e Weavers, R.T. (1985) : *Phytochemistry* **41** (4), 1047.
81. Dewick, P.M. (1995): *Nat. Prod. Rep.* **8**, 507.

82. Cane, D.E. e Tillman, A.M. (1983) : *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 122.
83. Harrison, P.N.M; Oliver, J.S. e Cane, D.E. (1988) : *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5922.
84. Bordoloi, M. ; Shukla, V.S. ; Nath, S.C.; Sharma, R. (1989) : *Phytochemistry* **28** (8), 2007.
85. Cane,D.E e Tandon,M. (1994) : *Tetrahedron Letters* **35** (30).
86. Davis, E.Mmm. et al (1996) : *Phytochemistry* **41** (4) , 1047.
87. Lorimer, S.D. (1987) : *Phytochemistry* **26** (12), 3207.
88. Belingheri, L.; Cartayrade, A. ; Pauly, G. e Gleizes, M. (1992) : *Plant science* **84**, 129.
89. Croteau, R. et al (1987): *Arch. Biochem and Byophys.* **256** (1), 56.
90. Arigoni, D. (1975) : *Pure and Appl. Chem.* **41**, 219.