



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ÔRGANICA E INORGÂNICA
BACHARELADO EM QUÍMICA

RAFAELA DE SOUSA BRITO

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM NOVO SISTEMA PARA COLETA
***IN SITU* DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE PLANTAS**

FORTALEZA

2015

RAFAELA DE SOUSA BRITO

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM NOVO SISTEMA PARA COLETA
IN SITU DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE PLANTAS**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Química Bacharelado, da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química com Habilitação Industrial. Local do estágio: Laboratório de Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Orientação Didática: Prof.^a Dra. Telma Leda Gomes de Lemos;

Orientação Profissional: Dr. Guilherme Julião Zocolo

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- B877d Brito, Rafaela de Sousa.
Desenvolvimento e otimização de um novo sistema para coleta *in situ* de compostos orgânicos voláteis de plantas / Rafaela de Sousa Brito. – 2015.
60 f. : il. color.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Curso de Química, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Telma Leda Gomes de Lemos.
Co-orientação: Dr. Guilherme Julião Zocolo.
1. Compostos orgânicos. 2. Ecologia química das plantas. I. Título.

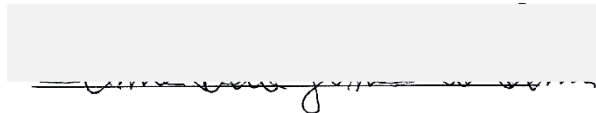
RAFAELA DE SOUSA BRITO

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM NOVO SISTEMA PARA COLETA
IN SITU DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE PLANTAS**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Química Bacharelado, da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

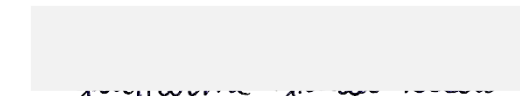
Aprovada em: 26/06/2015.

BANCA EXAMINADORA



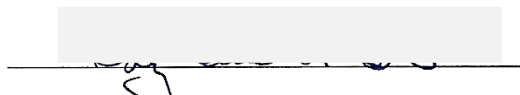
Prof.^a Dra. Telma Leda Gomes de Lemos

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Guilherme Julião Zocolo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)



Dr. Edy Sousa de Brito

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

*A Deus,
tudo que tenho e sou.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois se cheguei até aqui, foi por tê-lo sempre ao meu lado, confortando-me e guiando-me durante todo este caminho.

A minha professora orientadora, Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, por ter me acolhido com tanto carinho no LBPN (Laboratório de Produtos Naturais), pela grande profissional que é, por toda a paciência e compreensão dispensadas, por tudo, muito obrigada.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo por ter me aceito como orientanda. Tenho convicção que ter a possibilidade de vir a trabalhar ao seu lado foi um presente de Deus e que veio a amenizar em muito as dificuldades desse percalço. Por ser uma pessoa tão bondosa e de um espírito tão elevado, serei eternamente grata pela sua orientação.

A todos do Laboratório de Multiusuário de Química de Produtos Naturais, especialmente a Tigressa e Lorena pela ajuda inestimável por muitas vezes oferecida.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho: Daniele (Dane), Cleane, Gisele, Romézio, Danton, Iolanda, Bruna, Patrícia (Paty), Thalissa, Luciana Gregório (Greg), Anderson, Felipe e Juliana (Ju), por me acolherem com tanto carinho, pelos momentos de alegrias e tristezas em que estiveram ao meu lado. Tenham a certeza que a amizade de vocês tornou o LBPN um ambiente familiar e veio a minimizar todas as dificuldades.

A minha amiga Géssica Marques, pela amizade sincera e tão generosa, que tornou essa caminhada mais leve, mesmo nos momentos mais difíceis. Sua alegria e fé são exemplos inestimáveis que tento guardar sempre comigo.

Ao meu amigo e irmão em Deus, André (Pipoca), pelos 10 anos de verdadeira amizade. Muito obrigada por sempre que precisei você estar de prontidão para me ajudar.

A minha amiga Sabrina Matias. Sua amizade é um presente de Deus, obrigada pelas aventuras compartilhadas e pelo apoio desmedido. Você, a Géssica e o André me ensinaram que uma família não é apenas constituída por laços de sangue, uma família também é a que escolhemos em Deus. Obrigada por terem me aceito.

A Dona Cláudia e Sr. Valdísio (Seu Valdis) pelo carinho, amizade, confiança e pelos momentos de descontração tão importantes nessa jornada. Obrigada.

A minha mãe, Rita de Cássia, pelo carinho, dedicação, apoio incondicional, pelas incontáveis orações em meu nome e por ter acreditado em mim quando nem eu mesma acreditava. Obrigada, minha mãe.

A minha avó Aldenora (*in memorian*), pelo amor incondicional e por todos os ensinamentos oferecidos. Serei eternamente grata à senhora.

A toda minha família, em especial a minha Tia-mãe Marlene (*in memorian*) pelos conselhos e empatia tão rara. Obrigada.

Ao meu padrasto, Gilson, pela ajuda inestimável, pela grande pessoa que é e por me inspirar tanta admiração, muito obrigada.

A minha irmã, Liandra, que, apesar das constantes implicâncias, possui um lugar reservado em meu coração. Obrigada pela sua dedicação e companhia.

Ao meu namorado, Paulo Iury, meu “bêzinho”. Obrigado por ser meu anjo da guarda, meu melhor amigo, meu companheiro de todas as horas, meu cúmplice, meu porto seguro, meu saco de pancadas, meu exemplo, minha paixão, meu futuro, meu amor. Obrigado por nunca permitir que eu desista, por apoiar todos os meus sonhos, mesmo quando eles me mantêm longe de você. Meu amor, muito obrigada.

E por fim, mas não menos importantes, todos os meus amigos, companheiros e colegas da UECE, UFC e Ciências sem Fronteiras, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho. Alguns ficaram para trás e outros me acompanham até hoje. Todos vocês, meus amigos, são merecedores da minha mais sincera gratidão. Com vocês vivi momentos inesquecíveis que fizeram minha escolha valer a pena. Por não menos que tudo, muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvida uma nova metodologia para a coleta de compostos orgânicos voláteis (COV) tendo sua aplicação sido direcionada para estudos de ecologia química, sendo para tanto, realizados vários testes de otimização do método, fazendo uso de óleos essenciais de composição química conhecida como modelo. A identificação desses compostos foi feita em GC - MS. A metodologia consiste na utilização de cartuchos de poliestireno, empacotados com adsorvente Carboxen 569, acoplado a uma bomba de vácuo portátil usada para aspirar aos voláteis em estudo por meio de fluxo de ar para o interior do cartucho. As variáveis otimizadas neste estudo foram: tipo de adsorvente, tempo de coleta, massa de adsorvente, tempo de conservação da amostra, concentração da amostra, reuso e seletividade do cartucho. Os semioquímicos, que são as moléculas alvo desse estudo, apresentam baixa massa molecular e são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, sendo seu estudo de suma importância para a compreensão das interações entre as plantas e os outros seres vivos. Foram também realizados testes *in situ* das espécies de dendê africano *Elaeis guineensi* Jacq., e dendê americano *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés, e do híbrido interespecífico, resultante do cruzamento entre as duas espécies citadas, com o intuito de relacionar a atração de polinizadores com a liberação de substâncias específicas que podem estar em maior ou menor grau, dependendo da espécie. Além dessa aplicação também foi realizado o estudo de dinâmica circadiana da espécie *Ocimum basilicum* com o objetivo de validar o funcionamento do sistema. O resultado desse estudo demonstrou o comportamento de emissão de voláteis durante o período de 8:00 às 18:00 h com intervalo de coleta de amostras a cada duas horas. Os resultados gerais obtidos foram significativos, sendo identificado um total de 55 substâncias, o que corresponde a 75,34% das substâncias estudadas nos óleos essenciais. O método de análise *in situ* desenvolvido mostrou ampla aplicabilidade permitindo analisar o perfil de liberação desses semioquímicos nas espécies estudadas. Portanto, o trabalho realizado abre caminho para as mais diversas aplicações em estudos de ecologia química, principalmente no que se refere a estudos com plantas vivas, ou seja, tem-se uma abordagem mais fiel a realidade dos mecanismos metabólicos envolvidos nas relações planta – ambiente.

Palavras-chave: Semioquímicos, Ecologia Química, COV, Carboxen, GC - MS.

ABSTRACT

This work developed a new methodology for collection of volatile organic compounds (VOCs) having its application been directed at chemical ecology studies, and to do so, made several optimization tests of the method, making use of essential oils chemical composition known as model. The identification of these compounds was made in GC - MS. The methodology consists of the use of polystyrene cartridges, packed with adsorbent Carboxen 569 coupled to a portable vacuum pump used to suck the volatiles under study by means of air flow into the cartridge. The optimized variables in this study were: type of adsorbent collection time, mass of adsorbent, the sample retention time, sample concentration, and reuse cartridge selectivity. Semiochemicals, which are the target molecules of this study, have low molecular weight and are produced by the secondary metabolism of plants, and its study of paramount importance for the comprehension of the interactions between plants and other living things. Were also carried out tests in situ species of African palm *Elaeis guineensi* Jacq., And American *Elaeis oleifera* palm (Kunth) Cortés, and interspecific hybrid resulting from a cross between the two species mentioned, in order to relate the attraction of pollinators with the release of specific substances which may be greater or lesser degree, depending on the species. In addition to this application it was also performed the circadian dynamics study of *Ocimum basilicum* species in order to validate the operation of the system. The result of this study demonstrated the volatile emission behavior during the period from 8:00 to 18:00 with sample collection break every two hours. The overall results obtained were significant, with a total of 55 identified substances, which corresponds to 75.34% of the studied substances essential oils. The analysis method developed in situ showed broad applicability possible to analyze the release profile of these semiochemicals in the studied species. Therefore, the work paves the way for various applications in chemical ecology studies mainly with regard to studies with live plants, so, there is a more faithful approach the reality of the metabolic mechanisms involved in plant - environment relationships.

Keywords: Semiochemicals, Chemical Ecology, VOC, Carboxen, GC - MS.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Compostos Orgânicos Voláteis de plantas	14
2.1.1 Terpenos	15
2.2 Métodos para análise de compostos orgânicos voláteis	17
2.2.1 Técnicas utilizadas para coleta de compostos orgânicos voláteis	17
2.3 Adsorventes	19
2.4 A cultura do dendezeiro	20
2.4.1 Classificação Botânica	20
2.4.2 Dendezeiro	20
2.4.3 Caiaué	21
2.4.4 Híbrido Interespecífico	21
2.5 Importâncias Econômicas do Dendezeiro	22
2.6 Polinização e Odor Floral	23
3. METODOLOGIA	25
3.1 Otimização do método	25
3.1.1 Teste massa da adsorvente e tempo	26
3.1.2 Teste de eluição	26
3.1.3 Teste da quantidade de óleo essencial	26
3.1.4 Teste do reuso	26
3.1.5 Teste do armazenamento (Conservação da amostra)	27
3.1.6 Teste da seletividade	27
3.3 Coletas de voláteis	27
3.3.1 Áreas de coleta	27
3.3.2 EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL - Campo Experimental do Rio Urubu - CERU	28
3.3.3 EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL - LMQPN	28

3.3.3.1 Métodos de quantificação	29
3.4 Análises das amostras	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Otimização do método	30
4.1.1 Teste da relação massa de adsorvente e tempo	30
4.1.2 Teste da eluição.....	32
4.1.3 Teste da quantidade de óleo essencial	33
4.1.4 Teste da seletividade	35
4.1.5 Teste do armazenamento	41
4.1.6 Teste do reuso	41
4.2 Aplicações do método	43
4.2.1 Análise de compostos orgânicos voláteis do <i>Dendzeiro in vivo</i>	43
4.2.2 Análise de compostos orgânicos voláteis da espécie <i>Ocimum basilicum in vivo</i>	46
5. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS.....	53

1. INTRODUÇÃO

A busca por novas tecnologias e concepções inovadoras, que sejam menos agressivas ao meio ambiente e a saúde humana, tem crescido nos últimos anos. Isso por que a sociedade está cada vez mais envolvida com o desenvolvido sustentável de atividades produtivas. Nesse contexto, tem-se desenvolvido um grande interesse nos estudos de estratégias ecológicas e sustentáveis para o aperfeiçoamento de práticas agrícolas (ZARBIN *et al.*, 2013).

Dentre essas práticas agrícolas encontra-se a polinização. Um processo natural e de suma importância para perpetuação da espécie, que pode ser otimizado através de estratégias ecológicas que induzem o aumento da população de insetos polinizadores por meio de substâncias, denominadas de semioquímicos, responsáveis por atrair esses insetos.

A importância da polinização pode ser observada em plantações do dendê, planta do gênero *Elaeis*, que possui duas espécies de interesse agrônômico e econômico: *Elaeis guineensi* Jacq., denominado dendê ou palma africada e *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés, denominada caiaué ou palma americana (GOMES, 2011). O dendezeiro ou palma de óleo africana é a principal fonte mundial de óleo vegetal, tem importante papel na economia nacional e é também uma das melhores opções para produção de bioenergia nas condições agroecológicas da Amazônia (KRUG *et al.*, 2013). Com o intuito de melhorar as qualidades econômicas do dendê, foi criado um híbrido interespecífico resultante do cruzamento entre caiaué e o dendezeiro. Entretanto, esse híbrido, apesar de resistente a doenças, apresenta baixa taxa de fecundação, o que diminui a produção do óleo (MOURA *et al.*, 2013). A fecundação é uma consequência da polinização, portanto, a substância responsável por atrair insetos polinizadores deve, supostamente, ser produzida em baixas concentrações por esse híbrido interespecífico.

Para a planta, esses semioquímicos são compostos orgânicos voláteis produzidos naturalmente pelo metabolismo secundário da mesma e tem papéis importantes nas interações ecológicas entre as plantas e os outros seres vivos, podendo atuar muitas vezes como mecanismo de defesa (ZARBIN *et al.*, 2013).

Para melhor entender a ecologia e a biossíntese desses compostos é necessário realizar a coleta dessas substâncias por *headspace* e a análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, entretanto, este trabalho faz uso de uma nova metodologia que consiste na captura desses voláteis por adsorção, sendo para tanto, utilizado cartuchos de poliestireno preenchidos com adsorventes obtidos comercialmente e a dessorção

feita por meio de solvente hexano. Essa nova metodologia foi submetida a vários testes com o intuito de assegurar a confiabilidade no método.

O mecanismo da adsorção consiste na tendência das moléculas da fase fluida interagir com à interface de um sólido denominado adsorvente. Essas interações intermoleculares espontâneas estão diretamente relacionadas com a natureza do material precursor utilizado para a produção do adsorvente e suas características físico-químicas, assim como às características físico-químicas da fase fluida. (OLIVEIRA, 2014).

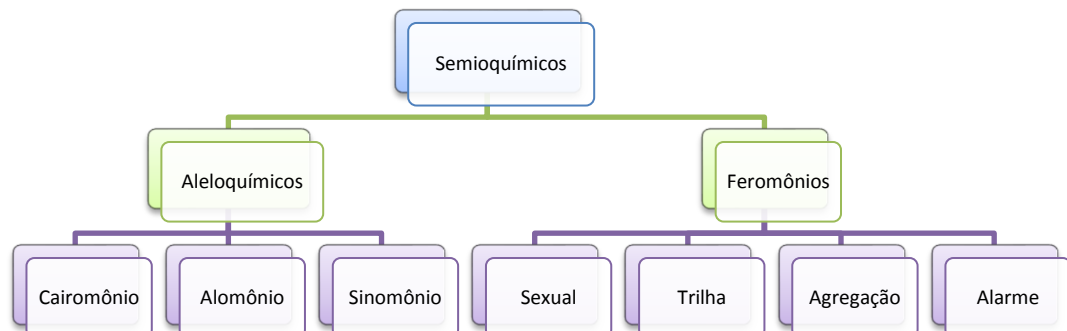
Neste contexto o presente trabalho objetivou desenvolver e otimizar um novo sistema de coleta *in situ* de compostos orgânicos voláteis e verificar a aplicação desse método em plantações do dendê, fazendo uma comparação entre as espécies e a sua possível relação com a atração de polinizadores através de substâncias específicas que podem estar em maior ou menor grau, dependendo da espécie e com isso apresentar baixos índices de fecundação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Compostos Orgânicos Voláteis de plantas

Os compostos orgânicos voláteis apresentam várias funções eco-fisiológicas na natureza, sendo que, para as plantas, esses compostos estão relacionados com o mecanismo de defesa e com o sistema de comunicação entre a planta e o meio ambiente (ZARBIN *et al*, 2013). As substâncias químicas utilizadas na intermediação de relações de seres vivos, em geral, são denominadas semioquímicos, o que significa “sinais químicos”, podendo ser estes aleloquímicos ou feromônios, dependendo da ação que provoquem. Os aleloquímicos são de ação interespecífica e os feromônios são substâncias químicas de ação intraespecífica. É através da detecção e emissão destes compostos que os insetos encontram parceiros para o acasalamento, alimento ou presa, escolhem local de ovoposição, se defendem contra predadores e organizam suas comunidades, no caso dos insetos sociais (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). A classificação dos semioquímicos está ilustrada na Figura 1.

Figura 1: Classificação dos semioquímicos



Fonte: Adaptado de ZARBIN; RODRIGUES; LIMA (2009)

Os feromônios fazem parte de um universo bastante amplo de comunicação química entre os insetos, sendo classificado de acordo com os comportamentos que estes compostos produzem no receptor da mensagem. Os comportamentos mais comuns mediados por feromônios são: a atração de indivíduos do sexo oposto para acasalamento, denominados de feromônios sexuais; a agregação de indivíduos de ambos os sexos para um local específico para alimentação e/ou de acasalamento, através de feromônios de agregação; a demarcação de espaço ou formação de trilhas, comportamento comum em formigas, através de feromônios classificados como de marcação ou trilha. Além destes, insetos sociais utilizam uma variedade de feromônios para organizar as atividades na colônia. Como os aleloquímicos são compostos

que estabelecem comunicação química entre indivíduos de espécies diferentes, a sua classificação está de acordo com quem se beneficia dessa interação podendo ser: cairomônios, quando o beneficiado é o indivíduo receptor; alomônios, quando o que se beneficia o emissor e de sinomônios quando os dois são beneficiados (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009).

2.1.1 Terpenos

Os terpenos pertencem a classe de substâncias que são mais comumente encontradas em voláteis de plantas. Abrangendo uma grande variedade de substâncias de origem vegetal, os terpenos são diferentes tanto em estrutura quanto em forma. Sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias formadas por unidades de isopreno. A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico (SIMÕES *et al.*, 2007).

Eles são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno condensadas presentes no seu esqueleto de carbono. Quando estes compostos contêm elementos adicionais, usualmente oxigênios, são denominados terpenóides (TOSCAN, 2010).

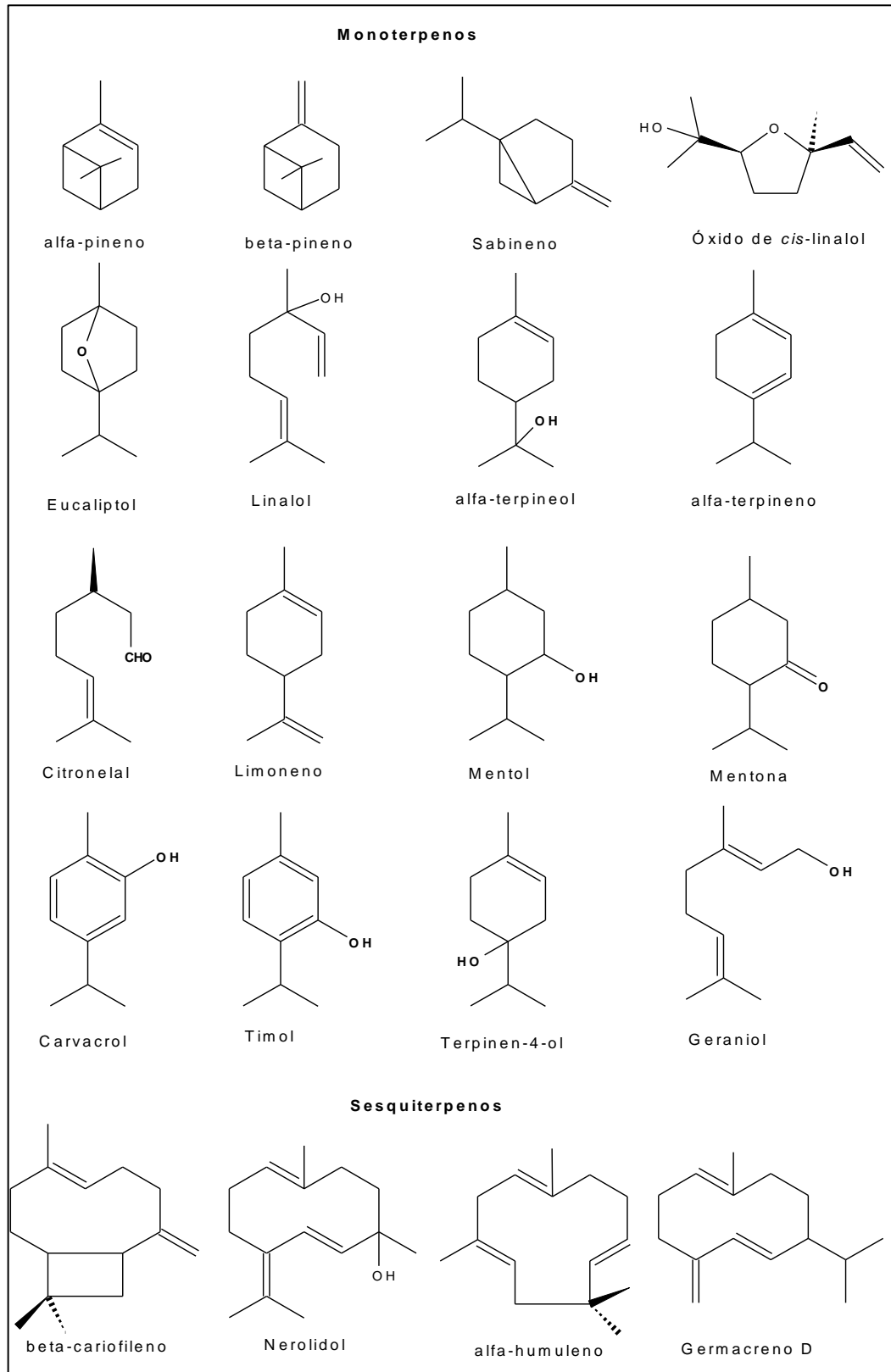
Tabela 1 – Classificação dos terpenos segundo o número de unidades isoprênicas

Nº de unidades isoprênicas	Nº de átomos de carbono	Nome ou classe
1	5	Isopreno
2	10	Monoterpeno
3	15	Sesquiterpeno
4	20	Diterpeno
5	25	Sesterpeno
6	30	Triterpeno
8	40	Tetraterpeno
N	n	Polisopreno

Fonte: Adaptada de SIMÕES *et al.* (2007)

Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos (Figura 2, p. 16), cerca de 90%, e os sesquiterpenos (SIMÕES *et al.*, 2007).

Figura 2 - Exemplos de compostos orgânicos voláteis de plantas.



Fonte: o autor.

2.2 Métodos para análise de compostos orgânicos voláteis

O crescente interesse científico das áreas de bioquímica, fisiologia, ecologia e química pelos compostos orgânicos voláteis têm levado ao desenvolvimento de uma variedade de sistemas para a coleta e análise desses compostos. Na última década, em especial, a análise de voláteis foi melhorada pela criação de instrumentos de bancada relativamente baratos, mas aplicáveis à técnica de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (THOLL *et al.*, 2006).

Os métodos de análise aplicados aos compostos orgânicos voláteis de plantas têm como objetivo identificar o perfil químico de misturas complexas de substâncias voláteis emitidas por espécies em resposta a determinados estímulos ambientais. No entanto, a escolha do sistema mais adequado empregado em experimento de coleta e análise de voláteis em plantas geralmente depende do material vegetal a ser investigado, se será a planta inteira ou partes da planta. Também precisa ser decidido se os voláteis devem ser analisados a partir de plantas cultivadas sob condições de laboratório ou em seu habitat natural. Outros requisitos que devem ser levados em consideração na escolha de um método para coleta e análise de compostos voláteis é a simplicidade, a portabilidade, sensibilidade, capacidade qualitativa e/ou quantitativa e o tempo de aplicação da técnica (THOLL *et al.*, 2006).

Para abordagens ecológicas ou fisiológicas relevantes em populações naturais, a coleta de compostos orgânicos voláteis em campo exige muitas vezes equipamentos simples, portátil e robusto. Em comparação, os sistemas de captura em laboratório podem incluir a coleta de amostras assistidas por computador e dispositivos adicionais que podem reduzir a contaminação e ainda controlar a temperatura, a intensidade da luz e a umidade relativa, fatores que podem interferir significativamente na análise desses compostos e que se controlados permitem a análise das amostras em resposta a uma única variável (THOLL *et al.*, 2006).

2.2.1 Técnicas utilizadas para coleta de compostos orgânicos voláteis

O papel dos compostos orgânicos voláteis nos mecanismos envolvendo interações planta – inseto tem despertado um crescente interesse e levado ao desenvolvimento de uma variedade de técnicas para a coleta e análise desses compostos (HARBORNE, 1998; MILLAR e SIMS, 1998). A escolha do sistema mais adequado para a coleta de compostos voláteis em plantas depende basicamente do problema biológico e do material vegetal a ser estudado (THOLL *et al.*, 2006). Práticas de coleta e análise de voláteis têm sido

desenvolvidas e utilizadas, técnicas como extração por solvente tem sido amplamente empregadas para coletar voláteis de plantas e para elucidação de sua atratividade potencial para várias espécies de mosquitos, com um único solvente (OTIENOBURU *et al.*, 2012) ou uma série de solventes (VARGO e FOSTER, 1982; JEPSON e HEALY, 1988) utilizados para extrair compostos florais de diferentes espécies de plantas.

A extração por solvente é vantajosa na medida em que é possível obter o perfil total de compostos orgânicos voláteis da planta através da variação do tipo de solvente utilizado. No entanto, este método apresenta uma grande limitação por não fornecer uma imagem realista do perfil químico volátil emitido originalmente, pois esse tipo de extração não é inteiramente seletivo, extraindo por vezes outros componentes além dos voláteis, portanto, essa limitação pode prejudicar a correta identificação de moléculas chave nas relações ecológicas, prejudicando assim a correta interpretação dos fenômenos envolvidos nas interações planta – inseto. Além disso, este método é susceptível de contaminação por impurezas presentes no solvente.

Outro método que tem sido empregado na coleta de volátil é o *headspace* estático (OTIENOBURU *et al.*, 2012). Em seu estudo, Otienoburu *et al.*, (2012) adicionou flores de *Asclepiasyriaca* em frasco de vidro e coletou os voláteis por meio da técnica de *headspace* seguida de microextração em fase sólida (HS – SPME). Tholl *et al.*, (2006), em trabalho de revisão, descreve uma variedade de fibras de SPME capazes de adsorver compostos orgânicos voláteis com ampla faixa de polaridade e com diferentes massas moleculares. O trabalho de revisão demonstra também que a quantidade de compostos adsorvidos depende da espessura do revestimento da fibra e da constante de distribuição em fase gasosa do analito. Este método é vantajoso na amostragem de compostos orgânicos voláteis de plantas que possuem baixos fatores de emissões, muitas vezes associados a baixas concentrações, outra vantagem dessa técnica é a eliminação do emprego de solventes que podem introduzir impurezas aos resultados. A principal desvantagem dessa técnica é que não se tem uma alta reprodutibilidade entre as injeções da amostra, a quantificação não é possível em alguns casos, principalmente quando se trata de uma amostra com vasta gama de compostos com diferentes constantes de distribuição. Outra desvantagem desse método ocorre em situações que levem ao acúmulo de umidade e calor no frasco de *headspace* que podem interferir na fisiologia da planta (THOLL *et al.*, 2006).

Healy e Jepson (1988) aplicaram a técnica *headspace* dinâmico, para coleta de voláteis em inflorescências recém-cortadas de *Achillea millefolium*, o sistema de amostragem consistia de um frasco de vidro acoplado a cartuchos empacotados com carvão ativado, sendo

as substâncias voláteis adsorvidas em tais cartuchos por filtragem do ar que foi capturado sobre as inflorescências através de matriz adsorvente (Carvão ativado). Método semelhante foi utilizado por Jhumur *et al.*, (2007, 2008) e Nyasembe *et al.*, 2014, para coletar os voláteis a partir de flores intactas de plantas sobre adsorvente tais como: Tenax-TA, Carbotrap e sobre a Super-Q *Traps* respectivamente. No entanto, ambos os estudos realizados por Healy e Jepson (1988) e Jhumur *et al.*, (2007, 2008) utilizaram diferentes configurações, sendo que o primeiro autor utilizou um sistema de adsorção em circuito fechado, enquanto que Nyasembe *et al.*, (2014) utilizou um sistema de sucção por deslocamento de ar. No primeiro sistema, os voláteis foram recolhidos através da circulação de ar contínuo no *headspace* dentro de uma câmara fechada, enquanto no segundo sistema o ar foi puxado sobre a amostra da planta através de um cartucho adsorvente ligado a uma bomba de vácuo.

No geral, a técnica de *headspace* dinâmico possui várias vantagens incluindo o fornecimento de quantidade suficiente de voláteis para detecção e elucidação da estrutura, sem aumento de temperatura, umidade e reduzida acumulação de produtos de degradação química (THOLL *et al.*, 2006). No entanto, este método de coleta é limitado por adsorção incompleta dos compostos orgânicos voláteis devido a diferenças entre os materiais adsorventes, pois os mesmos possuem afinidades específicas a diferentes classes de compostos orgânicos voláteis. Por exemplo, carvão ativado é menos eficiente na retenção de aldeídos aromáticos, enquanto Tenax-TA e Super-Q têm baixa afinidade para substâncias de reduzida massa molecular e compostos polares. Isso muitas vezes requer a combinação de duas ou mais matrizes adsorventes para aumentar a faixa de adsorção de compostos orgânicos voláteis a serem adsorvidos. Por exemplo, os trabalhos de Jhumur *et al.*, (2007, 2008), demonstraram características interessantes quanto a utilização de adsorventes tais como Tenax-TA que possui elevada afinidade para compostos lipofílicos e compostos orgânicos de média polaridade e Carbotrap que conta com ampla faixa de adsorção de compostos orgânicos, porém possui forte tendência de decomposição de terpenos.

2.3 Adsorventes

Como relatado, a adsorção em sólidos adsorventes tem despertado enorme interesse na área ambiental, por permitir a remoção de forma eficiente de poluentes orgânicos e inorgânicos, dissolvido em concentrações baixas, em fluxos gasosos e líquidos, sendo que a capacidade de remoção do poluente está vinculada, basicamente, com a área superficial disponível no sólido adsorvente (OLIVEIRA, 2014).

Existe uma variedade de materiais adsorventes disponíveis no mercado que podem ser usados na análise de compostos orgânicos voláteis, para tanto, é necessário que o adsorvente tenha, além de baixo custo e de uma elevada capacidade de adsorção, uma série de outras características favoráveis, tais como seletividade, resistência mecânica, estabilidade térmica, inércia química e reprodutibilidade. Os materiais adsorventes mais utilizados apresentam alto custo e sua aplicação é justificada pelo alto rendimento (OLIVEIRA, 2014).

Os materiais adsorventes podem ser classificados grosseiramente em três categorias: materiais inorgânicos, adsorventes com base de carbono, e polímeros orgânicos. Essa classificação leva em consideração o tipo de material de partida utilizado e o processo de fabricação adotado para a produção do adsorvente (DETTMER; ENGEWALD, 2002).

Os adsorventes com base de carbono podem ainda ser subdivididos em carbono ativado, peneiras moleculares de carbono e carbono grafitado. Neste trabalho foi utilizado o adsorvente Carboxen 569, que é um tipo de peneira molecular de carbono, onde a adsorção é baseada principalmente por interações não específicas como indução e dispersão (DETTMER; ENGEWALD, 2002).

2.4 A cultura do dendezeiro

2.4.1 Classificação Botânica

Sendo de distribuição tropical, o gênero *Elaeis* pertence à classe *Liliopsida* (*Monocotyledonea*), ordem *Arecales* (*Palmales*), família *Areaceae* (*Palmaceae*), subfamília *Arecoideae*, tribo *Cocoseae* (*Cocoinae*), subtribo *Elaeidinae* (CHIA, 2008). O gênero apresenta duas espécies que são de interesse agrônomo e econômico: *Elaeis guineensis* Jacq., denominado dendê ou palma africada e *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés, denominada caiaué ou palma americana. Existem ainda outras duas espécies: *Elaeis madagascariensis* Becc. e *Elaeis odora* Traill, mas sobre as quais pairam controvérsias quanto a classificação (GOMES, 2011).

2.4.2 Dendezeiro

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) é originário do continente africano, sua área de distribuição natural compreende toda costa Ocidental da África, desde Senegal até Angola. Pode ser encontrado também no interior do continente, em direção ao Congo, e no leste da África, incluindo a ilha de Madagascar (SANTOS, 2010). Quando introduzida na

Martinica, a palma africana foi classificada pelo botânico Jacquin como pertencente ao gênero *Elaeis*, palavra que deriva do grego *Elaion*, que significa óleo, ao passo que o nome específico *guineensis* mostra que Jacquin atribuía sua origem à costa da Guiné na África (SILVA, 2006).

É uma planta monóica com flores masculinas e femininas na mesma planta, mas separadas em inflorescências masculinas e femininas que são produzidas em seqüências unissexuais mais ou menos longas denominadas ciclos (GOMES, 2011). Como as inflorescências são emitidas em ciclos sucessivos, e o período de maturidade sexual de uma inflorescência não se sobrepõe ao de outra, a reprodução ocorre por fecundação cruzada (CHIA, 2008).

Para o dendezeiro há três tipos de formas básicas do fruto: o Dura, o Pisifera e o híbrido entre eles, o Tenera, que é o mais utilizado comercialmente, pois apresenta maior produtividade de óleo. Essa classificação leva em consideração a espessura do endocarpo do fruto. O Tenera tem casca de 0,5 a 4 mm de espessura, tamanho médio, com cerca de 50% de óleo e sua amêndoa bem desenvolvida. O fruto Tenera é menor que o Dura, porém tem maior rendimento e maior concentração de óleo na polpa (RAMOS; VEIGA; JÚNIOR, 2006).

2.4.3 Caiaué

O caiaué, *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés, é uma palmeira nativa da América Central e do norte da América do Sul, frequentemente encontrada em áreas ribeirinhas e geralmente ligada à presença do homem (MOURA *et al*, 2013). Pertencendo ao mesmo gênero do dendê nativo da África, o caiaué apresenta baixa taxa de crescimento anual de seu tronco em função principalmente do reduzido comprimento dos entre nós, o que lhe confere menor porte, aspecto que pode diminuir os custos de exploração, ou seja, retirada dos cachos (MOURA, 2008), também apresenta resistência a pragas e doenças, porém possui baixa produtividade de óleo se comparado com o dendê africano, tornando o seu plantio economicamente inviável (GOMES, 2011).

2.4.4 Híbrido Interespecífico

O híbrido interespecífico, obtido pelo Programa de melhoramento executado pela Embrapa Amazônia Ocidental onde foi realizado o cruzamento entre as espécies *E. oleifera* e *E. guineensis*, tem características superiores ao dendezeiro, que incluem: resistência a pragas e doenças, principalmente ao distúrbio denominado amarelecimento fatal (doença de etiologia

ainda desconhecida); elevada taxa de ácidos graxos insaturados, sendo mais fluído nas condições ambientais e apresentando-se mais apropriado ao consumo alimentar; e menor crescimento vertical do estipe, o que aumenta o período de exploração econômica (MOURA *et al*, 2013). Entretanto existe um fator limititante para a expansão do híbrido interespecífico em plantações comerciais que é a baixa produtividade de óleo se comparado com o que é obtido com a palma africana.

2.5 Importâncias Econômicas do Dendzeiro

O dendzeiro ou palma de óleo africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) é a principal fonte mundial de óleo vegetal. Sendo a mais eficiente opção para a crescente demanda mundial de óleo vegetal, estimada, para 2050, em 240 milhões de toneladas, já que, além do potencial produtivo da espécie, o custo de produção do óleo de dendê é inferior ao das outras principais oleaginosas (KRUG *et al*, 2013).

O período de exploração comercial do dendzeiro é de aproximadamente 25 anos, tendo o início de exploração comercial três anos após o plantio e atingindo a sua capacidade máxima entre seis e sete anos. O início do declínio da produção ocorre por volta dos 17 ou 18 anos de idade. No Pará, onde se concentra mais de 80% do plantio no país, plantios adequadamente manejados produzem em média de 4 a 6 toneladas de óleo/ha/ano (CHIA *et al*, 2009).

São extraídos do fruto do dendzeiro dois tipos de óleo: o da polpa ou óleo de palma e o da amêndoa ou óleo de palmiste. Esses dois produtos têm larga e reconhecida utilização na indústria de alimentação, entrando na produção de margarinas, cremes vegetais, maionese, óleo de cozinha, biscoitos, sorvetes, detergentes, vela de estearina e muitos outros produtos (MÜLLER *et al*, 2001). A torta de palmiste, resultante da extração do óleo da amêndoa, pode ser empregada na fabricação de rações para animais e na produção de adubo orgânico (MÜLLER; JÚNIOR; FILHO, 2006).

Além de ser a oleaginosa de maior produtividade, o dendzeiro é também uma das melhores opções para produção de bioenergia nas condições agroecológicas da Amazônia, pois o plantio é explorado por décadas sem necessidade de preparo do solo, favorecendo a estabilidade de sua estrutura, proporcionando cobertura permanente e evitando o impacto direto das intensas chuvas que provocam erosão e lixiviação; além disso, a cultura não necessita de período de estiagem para colheita ou secagem, como ocorre com os grãos. Possui, ainda, grande capacidade de fixação de carbono, alta eficiência na conversão

energética e gera também subprodutos com uso energético, como fibras, cachos vazios e cascas das amêndoas (LOPES *et al.*, 2008).

Socialmente a cultura do dendezeiro tem como vantagem contribuir para a geração de renda e emprego no campo, sendo uma excelente opção para a fixação do homem no campo (LOPES *et al.*, 2008).

2.6 Polinização e Odor Floral

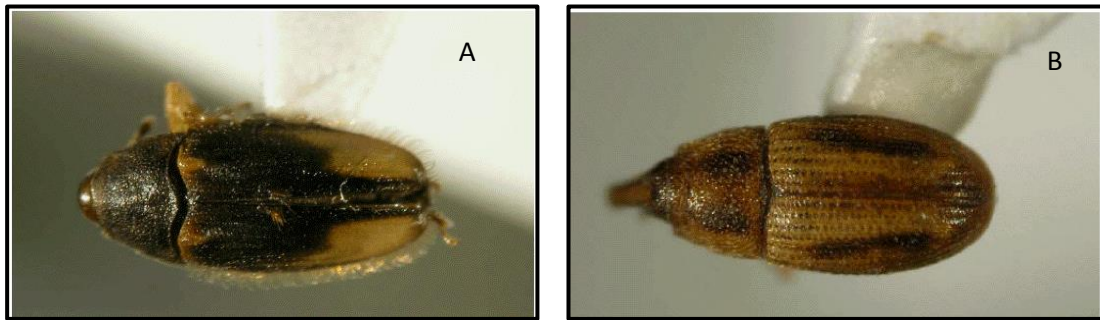
Como o gênero *Elaeis* é caracterizado por apresentar plantas monóicas, que produzem tanto flores masculinas como femininas, mas que apresentam períodos de maturação sexual separados, sendo necessária a polinização cruzada para a formação de frutos/sementes. Os insetos polinizadores e as flores do dendezeiro apresentam relação mutualística, mediada principalmente pelo cheiro e valor nutricional do pólen e inflorescência (KRUG *et al.*, 2013).

O dendezeiro teve a sua produção em outras regiões do mundo limitada em função do déficit de polinização, devido à não existência do polinizador *Elaeidobius kamerunicus* Faust (Figura 3A, pág 24), adaptado à espécie, nas regiões onde a planta estava sendo introduzida. Em 1981 foram feitas introduções de *E. kamerunicus* na Malásia, provenientes de Camarões e, entre 1984 e 1986, introduções dessa espécie foram realizadas na Colômbia, Brasil, Equador, Costa Rica e Honduras, todas com resultados altamente favoráveis, com aumento de produção (MOURA *et al.*, 2008).

Antes da introdução de *E. kamerunicus* na América Latina, os insetos polinizadores mais importantes associados ao dendezeiro pertenciam a família Nitidulidae (*Mystrops costaricensis* Gillogly) e Curculionidae (*Elaeidobius subvittatus* Faust). É possível que *E. subvittatus* (Figura 3B, pág 24) tenha sido introduzido no Brasil no século XVI, por ocasião do tráfego marítimo entre a África e o Brasil. Essa espécie distingue-se como polinizador mais eficiente que *M. costaricensis*, por apresentar maior capacidade de transportar pólen e ser mais ativo nos períodos de intensa luminosidade, embora sua atividade de polinização diminua em períodos de chuva (MOURA *et al.*, 2008).

Entretanto, com o lançamento do híbrido interespecífico entre a espécie africana e a americana, ressurgiu o problema com a polinização em plantios comerciais, uma vez que esse híbrido interespecífico produz pólen em pouca quantidade e de baixa viabilidade, e suas inflorescências são menos atrativas para *E. kamerunicus*, tornando obrigatória a realização da polinização assistida, o que eleva o custo de produção e adiciona uma atividade relativamente complexa ao manejo (KRUG *et al.*, 2013).

Figura 3: A - Vista dorsal do *E. kamerunicus*; B - Vista dorsal do *E. subvittatus*

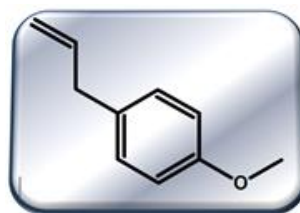


Fonte: Adaptado de LABARCA; NARVÁEZ (2009)

Os odores de flores são provavelmente efetivos a baixas concentrações, uma prova disso é a sensibilidade dos insetos a pequenas concentrações de substâncias químicas voláteis. São várias as substâncias aromáticas presentes nas flores, entre as quais citam-se álcoois alifáticos, acetonas e ésteres. Em alguns casos, um constituinte químico majoritário pode ser responsável pelo odor da flor, mas comumente é uma mistura de componentes a responsável pelo odor. Nesse caso, na produção do perfume da flor um componente pode reforçar a ação de outros componentes químicos, estimulando um determinado comportamento no receptor (HARBONE, 1982).

No caso do dendezeiro, a inflorescência masculina exala a substância conhecida como estragol (Figura 4). O odor forte das inflorescências lembra cheiro de anis que por sua vez exerce atração sobre espécimes de *Elaeidobius* (MOURA, 2008).

Figura 4 – Estrutura química do estragol



Fonte: o Autor

A estrutura da planta também pode influenciar na atração que as plantas exercem sobre os insetos. A largura e o comprimento das folhas, bem como a quantidade de ramificações, influenciam o microclima formado na planta, o qual por sua vez, influencia a vida dos insetos herbívoros (HORAS, 2009). Outros fatores também podem influenciar na polinização, como: vento, quantidade de pólen, número de inflorescência masculino e feminino e a interação entre as duas no período de antese, temperatura ambiental, período do dia, quantidade de substâncias liberadas pelas inflorescências e uso de inseticidas. Portanto é

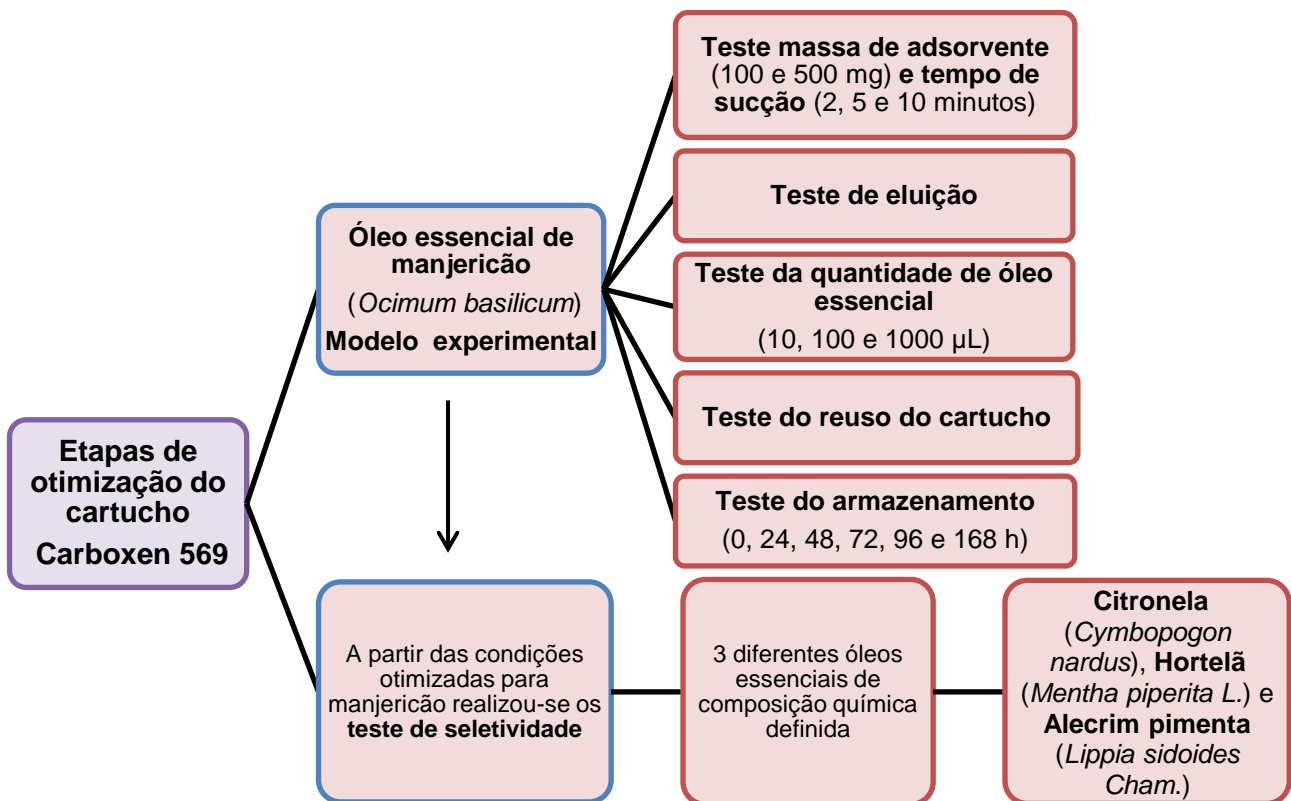
de suma importância haver metodologias capazes de identificar perfis de compostos orgânicos voláteis em espécies de interesse, para tanto, metodologias adequadas e robustas devem ser desenvolvidas para a correta interpretação das relações planta – ambiente.

3. METODOLOGIA

3.1 Otimização do método

A otimização de um método é um procedimento que avalia se o mesmo foi seletivo, preciso, exato e robusto. Sendo assim foram realizados no LMQPN (Laboratório de Multiusuário de Química de Produtos Naturais), vários testes com a finalidade de validar a metodologia utilizada na coleta dos voláteis, vide Esquema 1. Para esses testes fez-se uso do óleo essencial de *Ocimum basilicum*, popularmente conhecido como manjeriço, de composição química definida, por análises prévias realizadas por injeção direta em GC-MS (Dados apresentados na seção de Anexos), que foram comparadas aos resultados obtidos via captura dos voláteis do mesmo óleo realizada via adsorvente Carboxen 569 (20/45 mesh).

Esquema 1: Estratégia geral empregada na otimização de captura de voláteis realizada com o adsorvente Carboxen 569.



3.1.1 Teste massa da adsorvente e tempo

Para esse teste utilizou-se cartuchos de poliestireno, preenchidos com 100 ou 500 mg de adsorvente sólido Carboxen 569, acoplados a uma bomba de vácuo portátil, sendo feita a sucção dos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* durante 2, 5 e 10 minutos. O cartucho acoplado a bomba de vácuo foi posicionado próximo a um béquer de 10 mL contendo 1 mL do óleo essencial, a bomba foi acionada e os voláteis conduzidos para o interior do cartucho. Após a sucção dos voláteis, foi feita a eluição dos compostos utilizando 1 mL de solvente hexano e a solução obtida foi então analisada em GC – MS. Os resultados foram tratados e a melhor relação entre massa de adsorvente e tempo de sucção foi definida em função da concentração das substâncias e pelo número de substâncias detectadas, esses foram os parâmetros de decisão adotados nos experimentos.

3.1.2 Teste de eluição

O sistema de coleta de voláteis utilizado foi o mesmo já citado anteriormente, sendo que, na etapa de eluição do cartucho, foram feitas 10 eluições consecutivas cada qual com 1 mL de solvente hexano e coletando cada solução separadamente em alíquotas de 1 mL e em seguida cada uma delas foi analisada em GC - MS. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.3 Teste da quantidade de óleo essencial

Utilizaram-se três volumes diferentes de óleo essencial, que foram depositados em um bequer de 10 mL, sendo os volumes correspondentes a: 10, 100 e 1000 µL. A sucção dos voláteis foi feita pelo mesmo método já citado anteriormente. Foram feitas 10 eluições consecutivas, cada qual com 1 mL de solvente hexano, coletando a solução para análise em GC - MS. O volume que apresentou o melhor resultado foi definido como parâmetro para as próximas análises.

3.1.4 Teste do reuso

Para avaliar a reutilização do cartucho foram feitas coletas, eluições e análises consecutivas em um mesmo cartucho, sendo obtidas cinco amostras. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.5 Teste do armazenamento (Conservação da amostra)

Foi realizada a coleta dos compostos voláteis de acordo com a metodologia citada no item 3.1.1, sendo que a etapa de lavagem dos cartuchos e a análise das soluções foram realizadas em diferentes dias para testar a capacidade do adsorvente em manter os compostos voláteis. Os cartuchos foram armazenados em tubos de vidros com tampa metálica e septo de silicone, mantidos em uma caixa de isopor lacrada e sob temperatura de 20 °C. As análises foram realizadas após: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 168 h.

3.1.6 Teste da seletividade

Para esse teste foram utilizados, além do óleo essencial do manjeriço (*Ocimum basilicum*), mais três óleos essenciais de composição química conhecida. São eles: citronela (*Cymbopogon nardus*), hortelã (*Mentha piperita L.*) e alecrim pimenta (*Lippia sidoides Cham.*). A metodologia adotada foi a mesma e os resultados obtidos foram comparados com os da literatura. Objetivou-se detectar a maior gama possível de estruturas químicas.

3.3 Coletas de voláteis

3.3.1 Áreas de coleta

O trabalho foi realizado em duas localidades distintas. A primeira foi no campo experimental do Rio Urubu – CERU, pertencente a Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na cidade de Rio Preto da Eva/AM no Distrito Agropecuário da Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA). Foram selecionadas 58 amostras de plantas *in vivo* e *in situ* do gênero *Elaeis*, sendo: 8 da espécie *Elaeis guineensis* (4 masculinas e 4 femininas); 34 da espécie *Elaeis oleifera* (21 masculinas e 13 femininas); 12 do Híbrido interespecífico (6 masculinas e 6 femininas) e 4 controles. A coleta foi realizada em dezembro de 2014. A segunda parte do trabalho foi realizada no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais, pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical, localizada na cidade de Fortaleza/CE. No laboratório foram realizados experimentos com óleos essenciais e no horto da instituição foi realizado um experimento com uma planta *in vivo* e *in situ* da espécie *Ocimum basilicum*. A coleta foi realizada entre os meses de janeiro a maio de 2015.

3.3.2 EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL - Campo Experimental do Rio Urubu - CERU

Para a coleta dos voláteis foram utilizados dois tipos de adsorventes, Carboxen e Porapak, obtidas comercialmente. Eles foram analisados quanto a sua massa, sendo utilizadas nos experimentos massas de 100, 500 e 1000 mg de cada adsorvente.

O sistema utilizado consiste em cartuchos de poliestireno, empacotados com diferentes massas de adsorvente, acoplados a uma bomba de vácuo portátil ECO Vacuum Sealer usada para impulsionar um fluxo de ar levando para o interior do cartucho os voláteis das inflorescências das plantas. O tempo de coleta utilizado foi de 2 e 5 minutos. Os cartuchos com os voláteis adsorvidos foram então eluidos com 1 mL do solvente hexano e a solução analisada em GC - MS.

3.3.3 EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL - LMQPN

No laboratório foram realizados experimentos com óleos essenciais utilizando o mesmo sistema de coleta de voláteis citado anteriormente, entretanto, o tempo ótimo de aspiração dos compostos foi definido experimentalmente. O experimento no horto da instituição (Figura 5) foi executado ao longo de um dia, tendo início às 8 horas da manhã e terminando às 18 horas, sendo feita a coleta dos compostos voláteis a cada duas horas com posterior análise em GC - MS.

Figura 5 – Coleta de Voláteis da planta *in vivo* da espécie *Ocimum basilicum*



Fonte: o Autor

3.3.3.1 Métodos de quantificação

As substâncias identificadas no experimento realizado no horto da Embrapa/CE foram quantificadas por meio de padronização interna.

Para a avaliação do intervalo de linearidade do equipamento foram feitas curvas de calibração utilizando a padronização externa. Foram confeccionadas sete soluções-padrão de 3-octanol nas concentrações de 0,5; 2; 5; 10; 25; 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Essas soluções foram obtidas através de diluições de uma solução estoque de 3-octanol na concentração de 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses padrões foram analisados em GC - MS sob as mesmas condições das amostras já citadas anteriormente. Com as áreas obtidas em cada cromatograma foi construído um gráfico em função da concentração. Dessa forma podem-se avaliar as figuras de mérito do método tais como linearidade, limite de detecção, quantificação e reprodutibilidade.

A padronização interna foi realizada através da adição de um volume conhecido do padrão escolhido, no caso o 3-octanol, em cada uma das amostras eluídas à serem analisadas, tendo como concentração final do padrão 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4 Análises das amostras

As análises foram realizadas usando um cromatógrafo a gás Modelo 7890B GC System (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Espanha) acoplado ao espectrômetro de massa Modelo 5977A MSD (Agilent Technologies Spain, S.L., Madrid, Espanha) (Figura 6). Os compostos foram separados utilizando uma coluna capilar DB 5MS (Agilent J&W GC Columns, Santa Clara, CA, EUA) de 30 m x 250 μm x 0,25 μm . As amostras foram injetadas no modo splitless e o gás de arraste foi o Hélio com uma vazão de 1 mL min^{-1} . A temperatura do injetor foi de 240 $^{\circ}\text{C}$ e a temperatura de transição GC - MS de 280 $^{\circ}\text{C}$. O programa de temperatura utilizado foi isoterma durante 4 min a 40 $^{\circ}\text{C}$, aumentando para 80 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 2,5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, em seguida, aumentando para 110 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com posterior aumento para 220 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e por fim aumentando para 250 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sendo mantida nessa temperatura até o fim da corrida que totaliza um tempo de 45 min. Os espectros de massa foram obtidos utilizando um sistema de analisador quadrupolar com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massa com os contidos na biblioteca NIST 2.0, 2012 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Md, EUA). Os resultados foram fornecidos em percentual relativo de área.

Figura 6 – Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa modelo Agilent Technologies.



Fonte: o Autor

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do método

4.1.1 Teste da relação massa de adsorvente e tempo

Para realização deste e dos demais testes, um volume de 1000 μL do óleo essencial foi depositado em um béquer de 10 mL e exposto de tal forma que os gases provenientes da volatilização do óleo essencial foram succionados para o interior do cartucho adsorvente, o sistema de coleta de voláteis foi avaliado de acordo com a eficiência de retenção dessas substâncias que estavam em equilíbrio nas formas líquido – vapor. A partir da coleta do material volátil procederam-se as análises por GC - MS. Foram identificadas 17 substâncias voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum*, os resultados tiveram alta similaridade quanto ao número de compostos detectados em comparação a análise do óleo essencial bruto. As abundâncias relativas desses compostos, para cada condição estudada, estão apresentadas na Tabela 2. Foram considerados como picos cromatográficos os sinais que apresentavam área igual ou superior a 0,1% de intensidade relativa de área. Para efeito de identificação foram consideradas válidas as propostas estruturais com índices de kóvats similares a literatura e percentual de similaridade acima de 90 %, quando comparado a espectroteca NIST. Tais parâmetros foram adotados para todas as amostras estudadas. Neste

experimento foram testadas massas de adsorventes com 100 e 500 mg e tempos de sucção de amostra com 2, 5 e 10 minutos.

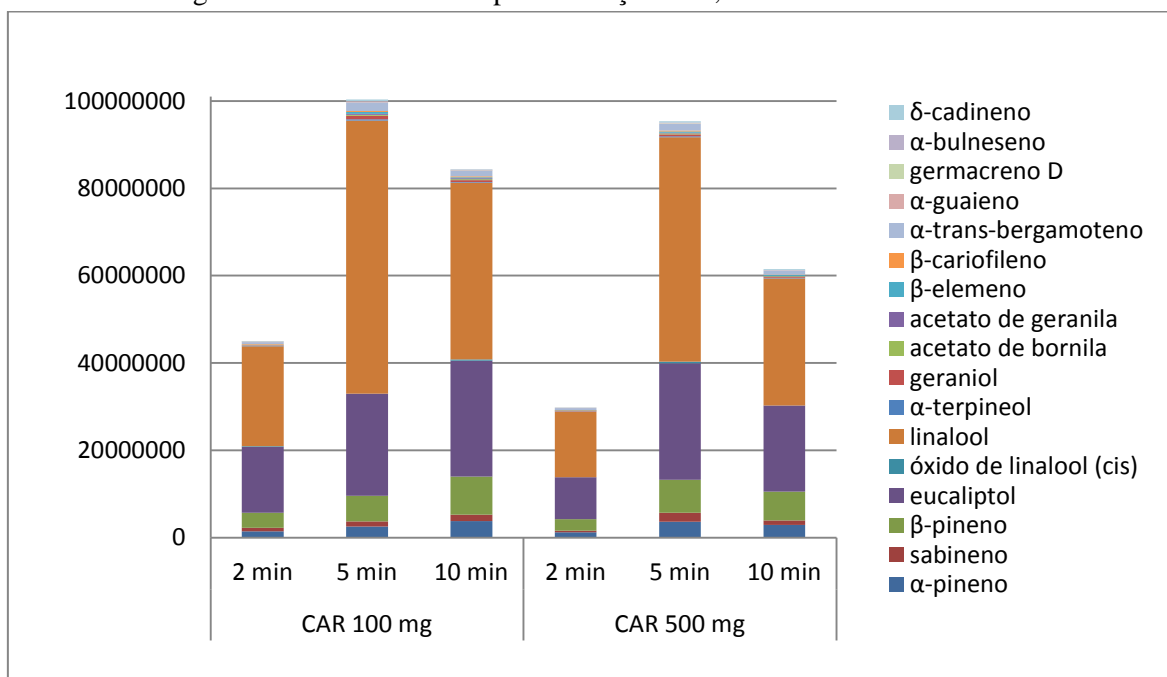
Observando-se os dados da Tabela 2 e do Gráfico 1, tem-se que as condições que alcançaram os melhores resultados foram aquelas que continham um empacotamento de 100 e 500 mg de Carboxen com um tempo de aspiração de 5 minutos. Nestas condições obteve-se o maior número de compostos adsorvidos com a melhor relação de área absoluta. Porém, decidiu-se trabalhar com a massa de 500 mg como um padrão, pois como iríamos aplicar o método na região Amazônica que possui uma alta umidade relativa do ar, optamos por trabalhar com uma maior massa, pois desse modo evitaríamos problemas relativos a saturação do cartucho por efeito da umidade.

Tabela 2 – Percentual relativo de área de compostos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* extraídos com 100 e 500 mg de adsorvente Carboxen e tempos de sucção de 2, 5 e 10 min.

Substâncias	IK _{LIT}	IK _{CAL}	Óleo bruto	CAR 100 mg			CAR 500 mg		
				2 min	5 min	10 min	2 min	5 min	10 min
<i>α-pineno</i>	933	936	0,17	3,28	2,51	4,51	4,04	3,86	4,72
<i>sabineno</i>	975	975	0,26	1,81	1,23	1,73	1,37	2,11	1,70
<i>β-pineno</i>	979	967	0,54	7,61	5,80	10,32	8,70	7,90	10,75
<i>eucaliptol</i>	1035	1031	5,64	33,64	23,29	31,48	32,27	28,01	31,97
<i>óxido de cis linalol</i>	1072	1056	0,26	0,30	-	0,35	-	0,37	-
<i>linalol</i>	1096	1098	73,81	50,95	62,34	48,02	50,53	53,93	47,43
<i>α-terpineol</i>	1188	1182	0,66	0,15	0,29	0,22	0,18	0,22	0,19
<i>geraniol</i>	1252	1236	7,85	0,14	0,79	0,56	0,15	0,44	0,31
<i>acetato de bornila</i>	1288	1281	0,31	0,19	0,25	0,23	0,33	0,24	0,31
<i>acetato de geranila</i>	1381	1385	1,36	0,10	0,23	0,21	0,12	0,19	0,15
<i>β-elemeno</i>	1390	1393	0,67	0,24	0,39	0,28	0,23	0,29	0,26
<i>β-cariofileno</i>	1424	1425	0,40	0,18	0,27	0,24	0,24	0,24	0,23
<i>α-trans-bergamoteno</i>	1434	1428	3,68	1,06	1,99	1,57	1,42	1,60	1,52
<i>α-guaieno</i>	1439	1433	0,15	0,07	0,16	0,10	0,14	0,11	0,14
<i>germacreno D</i>	1485	1485	0,41	0,03	-	0,04	-	0,05	-
<i>α-bulneseno</i>	1509	1513	0,29	0,06	0,09	0,12	-	0,12	-
<i>δ-cadineno</i>	1523	1522	1,21	0,17	0,37	0,03	0,29	0,33	0,33

Fonte: o Autor

Gráfico 1 – Área absoluta dos compostos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* adsorvidos em 100 e 500 mg de Carboxen e com tempos de sucção de 2, 5 e 10 min.



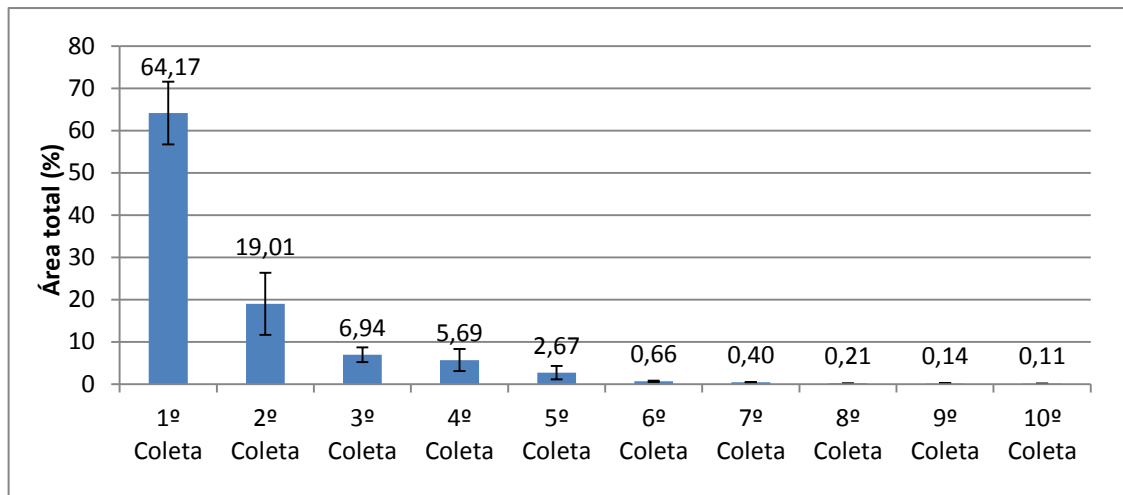
Fonte: o Autor

4.1.2 Teste da eluição

Por questões ambientais e de saúde ocupacional, optou-se trabalhar com o solvente de eluição hexano, tendo em vista que neste tipo de estudo são comuns o emprego de solventes orgânicos clorados, o hexano tornou-se o eluente que além de ser mais adequado que os clorados, também possuem seletividade compatível com as moléculas alvo. Estudos realizados por Jhumur *et al.*, (2007, 2008) e Nyasembe *et al.*, 2014, demonstram aplicações que atestam o emprego deste solvente. Os resultados obtidos são representados no Gráfico 2, cada coleta representa a passagem de 1 mL de hexano pelo cartucho, sendo recolhido em frações separadas que foram analisadas individualmente com o objetivo de avaliar o grau de desorção de cada molécula em função de fração obtida correspondente a 1 mL. Portanto, esse experimento definiu que a alíquota correspondente a primeira coleta (1 mL inicial) deveria ser suficiente para as análises por GC - MS, pois de acordo com o Gráfico 2, se somarmos as seis primeiras coletas teríamos 99,14 % da área total do cromatograma, porém teríamos também uma redução de resposta relativa de área que representaria um decréscimo de seis vezes, pois teríamos um volume final de 6 mL ao invés de 1 mL. Inferiu-se desse modo que os melhores resultados seriam obtidos em relação à primeira eluição, que representa 64,17 % em média das intensidades relativas de área do cromatograma. Ficou estabelecido também que após a eluição, o cartucho seria lavado com mais 6 mL do solvente, condição essa que validaria a

reutilização do mesmo em coletas subseqüentes. Vale também ressaltar, que em todos os experimentos foram realizados com suas respectivas amostras do branco e testemunha e em triplicata.

Gráfico 2 - Porcentagens relativas ao somatório das áreas dos compostos voláteis do óleo essencial de *Ocimum basilicum* obtidos em cada eluição.



Fonte: o Autor

4.1.3 Teste da quantidade de óleo essencial

O conhecimento relacionado ao grau de saturação do adsorvente e a capacidade mínima de captura de voláteis configura-se como uma informação de grande importância para o entendimento dos resultados de campo. As limitações da técnica no que concernem as faixas de concentrações ótimas de trabalho apresentam-se como um dos fatores de restrição no que tange a aplicação do método em populações de amostras que podem ter os mais diversos padrões de emissão de voláteis. A Tabela 3 e o Gráfico 3 mostram a comparação feita entre as três diferentes concentrações de óleo essencial do *Ocimum basilicum*.

Tabela 3 – Comparação entre as áreas absolutas dos compostos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* nos volumes de 1000, 100 e 10 μL .

<i>Substâncias</i>	<i>IK_{LIT}</i>	<i>IK_{CAL}</i>	<i>1000 μL</i>	<i>100 μL</i>	<i>10 μL</i>
<i>α-pineno</i>	933	936	1758595	5438971	2702382
<i>sabineno</i>	975	975	919645	2732878	1537868
<i>β-pineno</i>	979	967	4368223	11292055	5606512
<i>eucaliptol</i>	1035	1031	23115748	40225521	20960189
<i>óxido de linalol (cis)</i>	1072	1056	334070	154893	107330
<i>linalol</i>	1096	1098	40169194	36914821	19829583
<i>α-terpineol</i>	1188	1182	92909	63426	44194
<i>geraniol</i>	1252	1236	36431	23012	-
<i>acetato de bornila</i>	1288	1281	167029	126192	58480
<i>acetato de geranila</i>	1381	1385	38416	32197	18438
<i>β-elemeno</i>	1390	1393	163398	81326	39593
<i>β-cariofileno</i>	1424	1425	149792	88871	41157
<i>α-trans-bergamoteno</i>	1434	1428	800780	648292	262284
<i>α-guaiano</i>	1439	1433	71263	47453	32807
<i>germacreno D</i>	1485	1485	40423	9599	-
<i>α-bulneseno</i>	1509	1513	67256	30986	28367
<i>δ-cadineno</i>	1523	1522	140045	98843	42062
Total			72433217	98009336	51311246

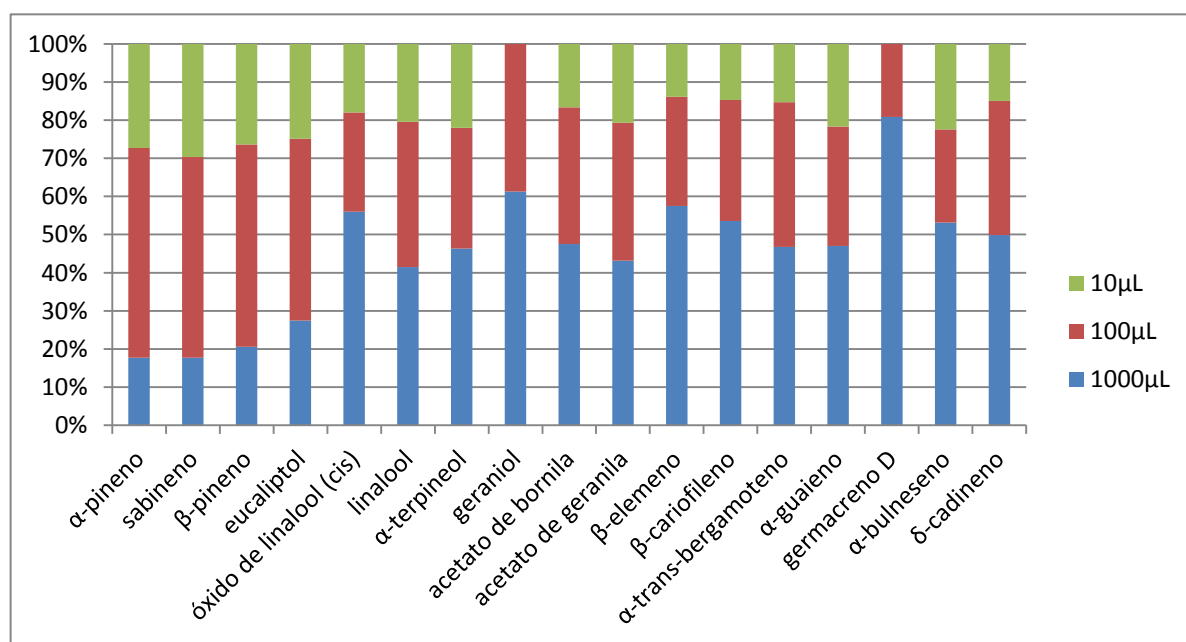
Fonte: o Autor

Os resultados demonstraram que, para as substâncias de maneira geral, existe um mecanismo de interação competitivo entre os analitos pela fase estacionária (Carboxen 569), de modo que de acordo com o Gráfico 3, pode-se notar que as substâncias α -pineno, sabineno, β -pineno e eucaliptol, tem um comportamento similar de adsorção, em se tratando das três concentrações estudadas. Estas moléculas possuem massas moleculares semelhantes, sendo os mesmos menores em volume molar em comparação com as demais substâncias em estudo, sabe-se que à medida que os valores dos índices de Kovats aumentam, um aumento das respectivas massas moleculares é esperado, haja vista que a coluna cromatográfica utilizada neste trabalho possui mecanismos de separação baseados em diferenças de temperatura de ebulição, ou seja, quanto maior for a temperatura de ebulição maior será a massa molar e conseqüentemente maior será o índice de Kovats. De forma geral, pode-se concluir que o adsorvente Carboxen 569, que é um tipo de peneira molecular de carbono, onde a adsorção é baseada principalmente por interações não específicas como indução e dispersão (DETTMER; ENGEWALD, 2002), retém preferencialmente moléculas de menor massa

molecular, porém sua aplicabilidade para estudos com monoterpenos se mostrou muito eficaz e abrangente. A maior parte das substâncias foi detectada sem maiores problemas, com exceção do geraniol e germacreno D que não foram detectadas na faixa de concentração de 10 μL . Tais moléculas aparentemente não apresentam uma boa afinidade com a fase estacionária.

Para a metodologia utilizada, deve-se levar em consideração que a maior parte das moléculas estudadas está em níveis de concentração muito baixos, variando muitas vezes na ordem de 0,1 a 2,0 % em percentual relativo de área, com exceção do linalol e do eucaliptol que possuem percentuais relativos de 78,81 e 5,65 % respectivamente. O método destaca-se também pela capacidade de exercer uma pré-concentração da amostra que melhora os limites de detecção da técnica, aumentando assim as chances de descoberta de moléculas de interesse. Os testes realizados com as três faixas de concentração de óleo essencial do *Ocimum basilicum* demonstraram a versatilidade de aplicação tanto em estudos de baixa, média quanto em altas concentrações.

Gráfico 3 – Análise percentual das áreas obtidas na 1ª coleta nos compostos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* para os volumes de 1000, 100 e 10 μL .



Fonte: o Autor

4.1.4 Teste da seletividade

O teste de seletividade foi realizado comparando os resultados obtidos pela análise do óleo essencial bruto (Material de referência - Dados apresentados nos Anexos de L

a O), em relação ao mesmo óleo que foi depositado em um béquer de 10 mL tendo sido os vapores do óleo coletados por sucção.

Foi possível identificar 80,95 % das substâncias detectadas no óleo essencial do manjeriço; 66,67 % do óleo essencial de citronela; 76,47 % do óleo essencial de alecrim pimenta e 72,22 % do óleo essencial de hortelã. Logo o adsorvente Carboxen 569 mostrou-se adequado, pois apresenta uma ampla faixa de adsorção de compostos orgânicos, sendo, portanto, eficiente na utilização da metodologia desenvolvida.

Deve-se levar em consideração que a constituição química geral dos óleos continha várias substâncias em baixíssimas concentrações, e de acordo com os dados contidos nas Tabelas de 4 a 7, pode-se notar que em muitos casos existe um fator de concentração quando se comparam os dados relacionados às moléculas de menor massa molecular (com menores índices de Kovats), a aquelas de maior massa molecular.

A comparação entre os dados obtidos da análise dos óleos de referência, com as amostras obtidas pela sucção dos voláteis que foram capturados pelo sistema de adsorção Carboxen 569 são demonstrados a seguir. Os resultados obtidos para o óleo essencial do *Ocimum basilicum* são apresentados na Tabela 4 e Gráfico 4; para o óleo essencial de Citronela na Tabela 5 e Gráfico 5; para o óleo essencial da Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) na Tabela 6 e Gráfico 6 e para o óleo essencial de Hortelã na Tabela 7 e Gráfico 7.

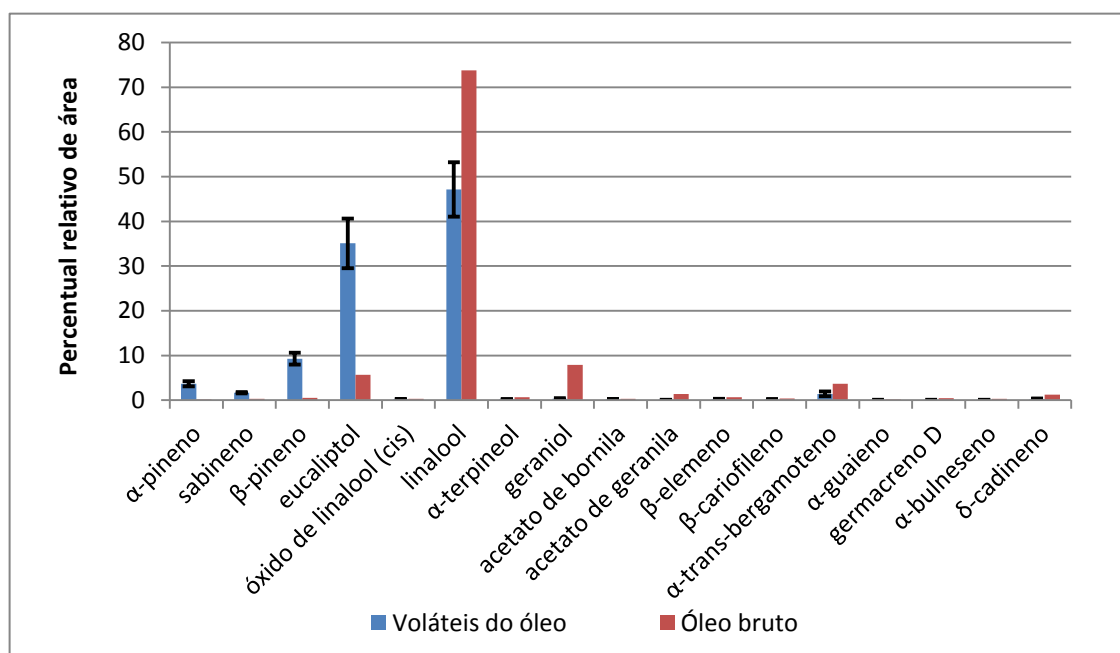
Tabela 4 – Percentual relativo de área dos compostos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* identificados.

<i>Substâncias</i>	<i>IK_{LIT}</i>	<i>IK_{CAL}</i>	<i>Óleo bruto</i>	<i>Voláteis do óleo</i>
<i>α-pineno</i>	939	936	0,17	3,65 ± 0,57
<i>Sabineno</i>	975	975	0,26	1,67 ± 0,15
<i>β-pineno</i>	979	967	0,55	9,26 ± 1,32
<i>Eucaliptol</i>	1035	1031	5,65	35,08 ± 5,53
<i>óxido de linalol (cis)</i>	1072	1056	0,27	0,20 ± 0,04
<i>óxido de linalol (trans)</i>	1086	-	0,29	NI*
<i>Linalol</i>	1096	1098	73,81	47,15 ± 6,09
<i>α-terpineol</i>	1188	1182	0,67	0,15 ± 0,05
<i>Geraniol</i>	1252	1236	7,86	0,27 ± 0,16
<i>acetato de bornila</i>	1288	1281	0,31	0,18 ± 0,06
<i>acetato de geranila</i>	1381	1385	1,36	0,08 ± 0,03
<i>β-elemeno</i>	1390	1393	0,68	0,24 ± 0,09
<i>β-cariofileno</i>	1424	1425	0,41	0,19 ± 0,07
<i>α-trans-bergamoteno</i>	1434	1428	3,68	1,41 ± 0,53
<i>α-guaieno</i>	1439	1433	0,16	0,08 ± 0,03
<i>germacreno D</i>	1485	1485	0,41	0,07 ± 0,03
<i>α-bulneseno</i>	1509	1513	0,30	0,08 ± 0,03
<i>δ-cadineno</i>	1523	1522	1,21	0,25 ± 0,11
<i>1, 10-di-epi-cubenol</i>	1619	-	0,30	NI*
<i>Epi-α-cadinol</i>	1640	-	1,47	NI*

NI* – Não Identificado

Fonte: o Autor

Gráfico 4 – Comparação do percentual relativo de área dos compostos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* extraídos por adsorção com o óleo essencial bruto.



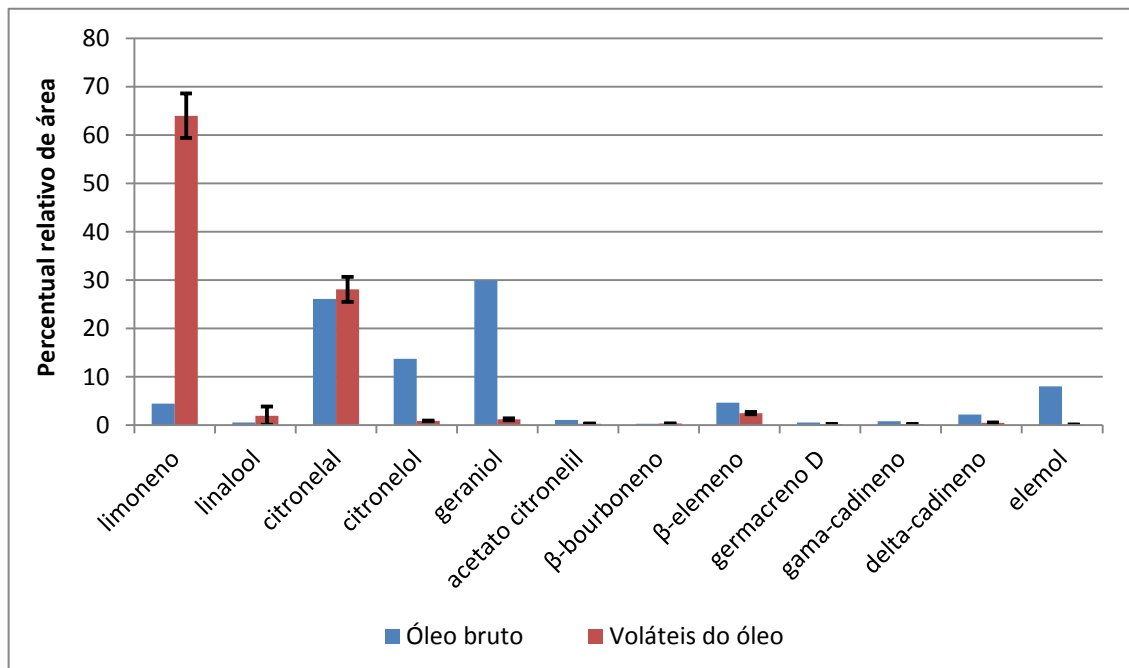
Fonte: o Autor

Tabela 5 – Percentual relativo de área dos compostos voláteis do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* identificados

Substâncias	IK_{LIT}	IK_{CAL}	Óleo bruto	Voláteis do óleo
<i>6-metil-2heptanona</i>	985	-	0,22	NI*
<i>Limoneno</i>	1029	1029	4,45	63,97 ± 4,59
<i>Linalol</i>	1096	1098	0,53	1,95 ± 1,87
<i>Citronelal</i>	1153	1158	26,08	28,09 ± 2,59
<i>Cis-isocitral</i>	1164	-	0,68	NI*
<i>Citronelol</i>	1225	1235	13,70	0,88 ± 0,07
<i>Geraniol</i>	1252	1236	29,93	1,20 ± 0,20
<i>Acetato citronelil</i>	1352	1343	1,05	0,28 ± 0,06
<i>Eugenol</i>	1359	-	0,42	NI*
<i>Geraniol acetato</i>	1381	-	1,15	NI*
<i>β-bourboneno</i>	1388	1385	0,28	0,30 ± 0,02
<i>β-elemeno</i>	1390	1393	4,65	2,48 ± 0,22
<i>germacreno D</i>	1484	1506	0,56	0,17 ± 0,06
<i>gama-cadineno</i>	1513	1522	0,80	0,17 ± 0,03
<i>delta-cadineno</i>	1523	1531	2,21	0,47 ± 0,05
<i>Elemol</i>	1549	1552	8,04	0,05 ± 0,05
<i>Germacreno d-4-ol</i>	1575	-	1,82	NI*
<i>α-cadinol</i>	1654	-	1,44	NI*

NI* – Não Identificado.

Fonte: o Autor

Gráfico 5 – Comparação do percentual relativo de área dos compostos voláteis do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* extraídos por adsorção com o óleo essencial bruto.

Fonte: o Autor

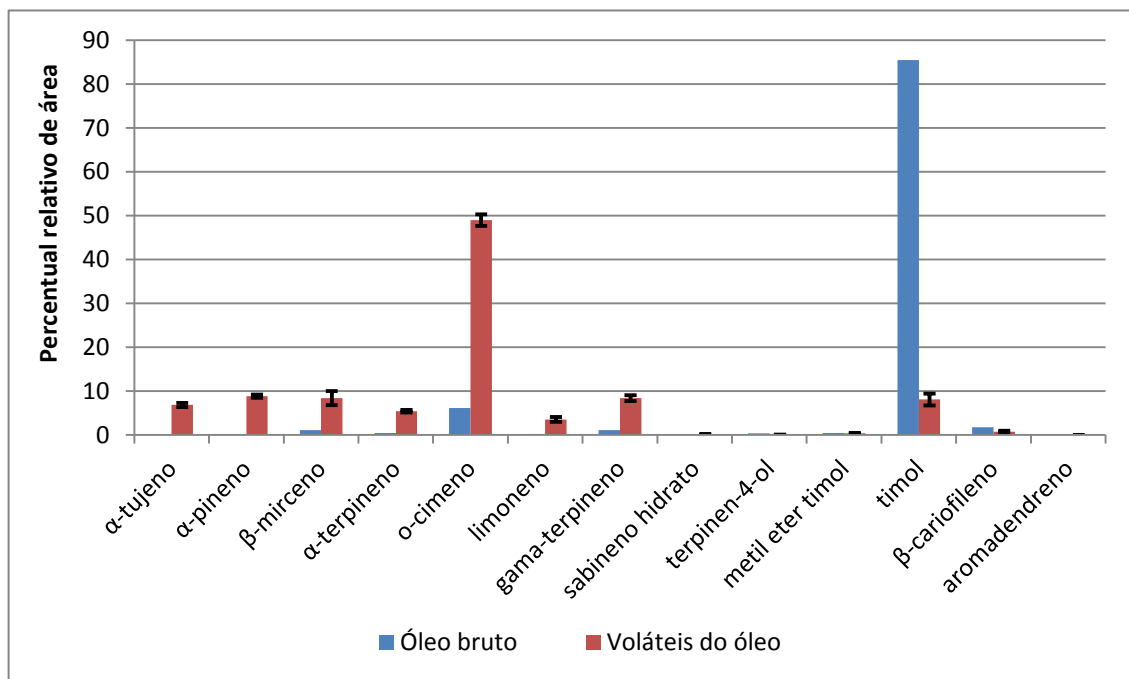
Tabela 6 – Percentual relativo de área dos compostos voláteis do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. identificados

<i>Substâncias</i>	<i>IK_{LIT}</i>	<i>IK_{CAL}</i>	<i>Óleo bruto</i>	<i>Voláteis do óleo</i>
<i>α-tujeno</i>	930	931	0,21	6,85 ± 0,50
<i>α-pineno</i>	939	936	0,20	8,88 ± 0,36
<i>β-mirceno</i>	990	990	1,16	8,39 ± 1,60
<i>α-terpineno</i>	1017	1016	0,49	5,44 ± 0,30
<i>o-cimeno</i>	1026	1025	6,16	48,97 ± 1,33
<i>Limoneno</i>	1029	1029	0,21	3,55 ± 0,53
<i>gama-terpineno</i>	1059	1061	1,09	8,42 ± 0,63
<i>Sabineno hidratado</i>	1070	1072	0,11	0,09 ± 0,16
<i>Ipsdienol</i>	1145	-	0,23	NI*
<i>Umbelulona</i>	1171	-	0,27	NI*
<i>terpinen-4-ol</i>	1177	1161	0,38	0,06 ± 0,01
<i>Metil eter timol</i>	1235	1241	0,50	0,38 ± 0,09
<i>Timol</i>	1290	1289	85,45	8,12 ± 1,35
<i>Carvacrol</i>	1299	-	0,31	NI*
<i>β-cariofileno</i>	1424	1425	1,81	0,79 ± 0,19
<i>Aromadendreno</i>	1441	1434	0,19	0,05 ± 0,01
<i>Óxido de cariofileno</i>	1583	-	0,58	NI*

NI* – Não Identificado

Fonte: o Autor

Gráfico 6 – Comparação do percentual relativo de área dos compostos voláteis do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham. extraídos por adsorção com o óleo essencial bruto.



Fonte: o Autor

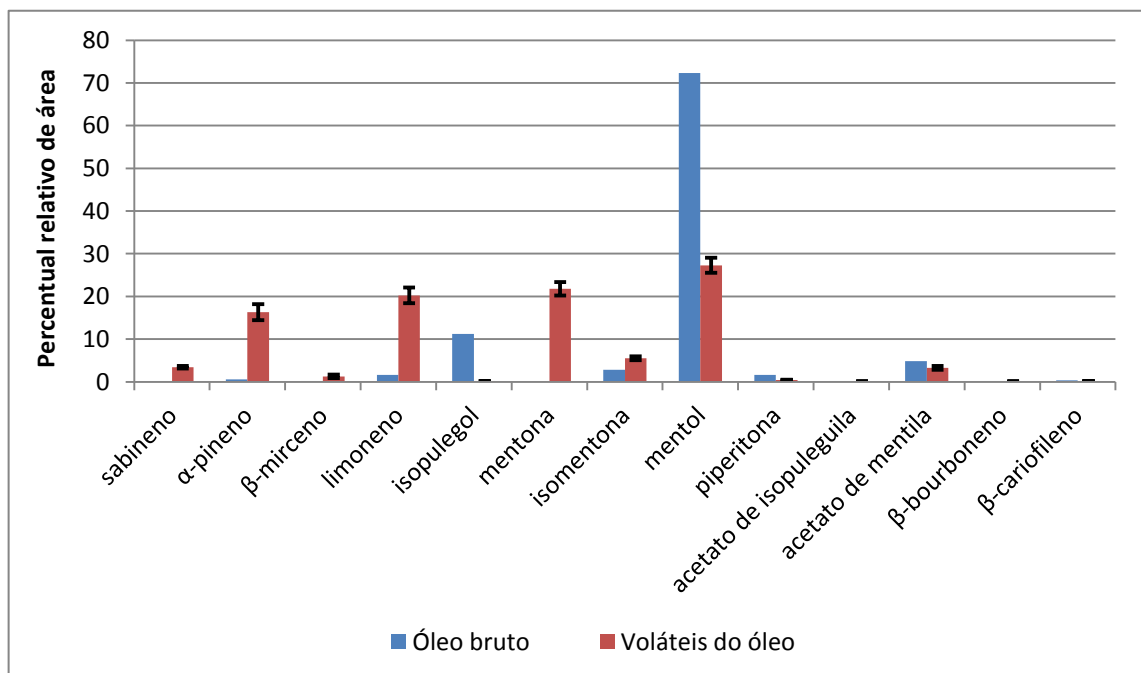
Tabela 7 – Percentual relativo de área dos compostos voláteis do óleo essencial de *Mentha piperita* L. identificados.

<i>Substâncias</i>	<i>IK_{LIT}</i>	<i>IK_{CAL}</i>	<i>Óleo bruto</i>	<i>Voláteis do óleo</i>
<i>Sabineno</i>	975	966	0,21	3,45 ± 0,30
<i>α-pineno</i>	979	967	0,60	16,32 ± 1,85
<i>β-mirceno</i>	990	990	0,16	1,28 ± 0,40
<i>Limoneno</i>	1029	1029	1,64	20,24 ± 1,81
<i>Neo-isopulegol</i>	-	-	0,50	NI*
<i>Isopulegol</i>	1149	1147	11,21	0,17 ± 0,03
<i>Mentona</i>	1152	1156	0,12	21,77 ± 1,58
<i>Isomentona</i>	1162	1165	2,84	5,52 ± 0,46
<i>Neo-mentol</i>	1165	-	1,42	NI*
<i>Mentol</i>	1171	1155	72,34	27,29 ± 1,77
<i>Ácido butanóico</i>	772	-	0,17	NI*
<i>Pulegona</i>	1237	-	0,23	NI*
<i>Piperitona</i>	1249	1233	1,64	0,42 ± 0,08
<i>Acetato de isopuleguila</i>	1275	1267	0,17	0,08 ± 0,02
<i>Acetato de mentila</i>	1295	1292	4,84	3,25 ± 0,45
<i>β-bourboneno</i>	1388	1385	0,22	0,09 ± 0,02
<i>β-cariofileno</i>	1424	1425	0,35	0,14 ± 0,04
<i>Óxido de cariofileno</i>	1583	-	0,42	NI*

NI* – Não Identificado

Fonte: o Autor

Gráfico 7 – Comparação do percentual relativo de área dos compostos voláteis do óleo essencial de *Mentha piperita* L. extraídos por adsorção com o óleo essencial bruto.



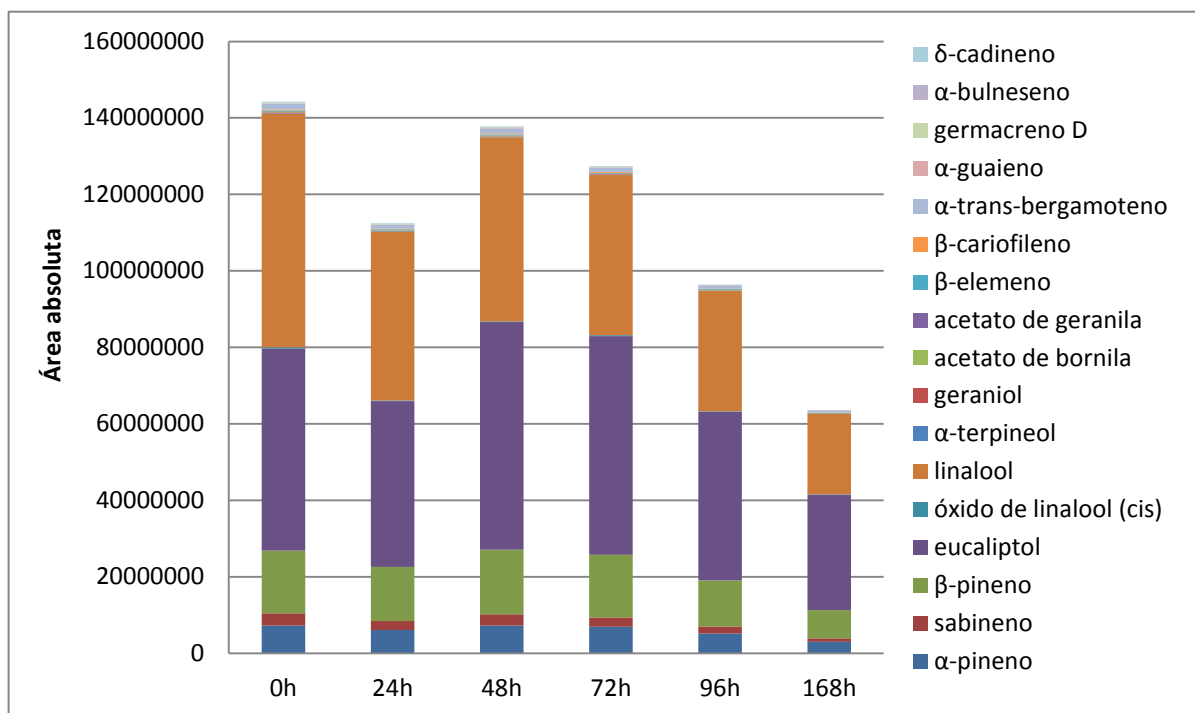
Fonte: o Autor

4.1.5 Teste do armazenamento

Levando-se em conta que os estudos em ecologia química serão conduzidos em campos experimentais da Embrapa em todo o país decidiu-se realizar testes de armazenamento ou conservação da amostra após a coleta da mesma, pois se estima que o tempo de entrega dessas amostras possa ocorrer em até 7 dias.

O Gráfico 8 apresenta os resultados obtidos e mostra que, existem perdas durante os 7 dias de armazenado, porém a proporção entre as diferentes moléculas não é alterada e os limites de detecção são contemplados, sendo que nenhuma molécula deixou de ser identificada. Portanto, o cartucho preenchido com adsorvente Carboxen 569 sofre perdas de compostos ao longo do tempo, sendo que essas perdas aceitáveis considerando-se os propósitos do estudo.

Gráfico 8 – Área absoluta dos compostos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* analisados após diferentes dias de extração.



Fonte: o Autor

4.1.6 Teste do reuso

Observou-se que os cartuchos podem ser reutilizados após a extração de compostos voláteis se devidamente lavados. Pois os resultados obtidos mostram que os cartuchos mantêm sua eficiência quase que constante em análises consecutivas, apresentando valores significativos e repetitivos para a metodologia aplicada, conferindo precisão ao

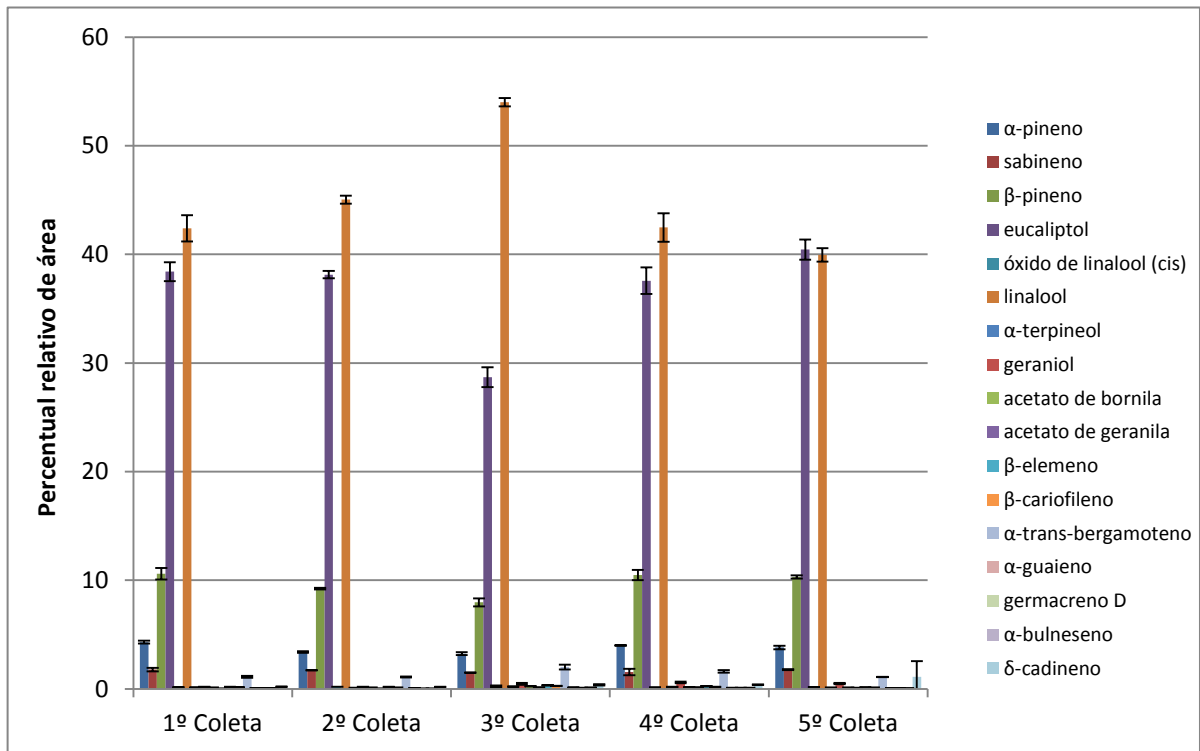
método. Apesar de ocorrer variações nas extrações, esses erros não são significativos para a análise. A Tabela 8 e o Gráfico 9 sumarizam esses resultados.

Tabela 8 – Compostos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* extraídos repetidas vezes com o mesmo cartucho.

Substâncias	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	4ª Coleta	5ª Coleta
<i>α-pineno</i>	4,30 ± 0,13	3,41 ± 0,07	3,24 ± 0,13	4,01 ± 0,03	3,82 ± 0,16
<i>Sabineno</i>	1,79 ± 0,16	1,72 ± 0,02	1,49 ± 0,03	1,56 ± 0,29	1,77 ± 0,04
<i>β-pineno</i>	10,60 ± 0,53	9,22 ± 0,07	7,96 ± 0,36	10,48 ± 0,46	10,30 ± 0,15
<i>Eucaliptol</i>	38,41 ± 0,87	38,14 ± 0,33	28,69 ± 0,91	37,58 ± 1,23	40,44 ± 0,92
<i>Óxido de linalol (cis)</i>	0,16 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,09	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,01
<i>Linalol</i>	42,40 ± 1,22	45,04 ± 0,37	54,01 ± 0,39	42,47 ± 1,31	39,94 ± 0,63
<i>α-terpineol</i>	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,14 ± 0,01
<i>Geraniol</i>	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,46 ± 0,09	0,59 ± 0,08	0,49 ± 0,06
<i>Acetato de bornila</i>	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0	0,24 ± 0,01	0,15 ± 0	0,14 ± 0
<i>Acetato de geranila</i>	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01
<i>β-elemeno</i>	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,18 ± 0
<i>β-cariofileno</i>	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0	0,27 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,14 ± 0
<i>α-trans-bergamoteno</i>	1,11 ± 0,08	1,10 ± 0,06	2,01 ± 0,21	1,60 ± 0,12	1,10 ± 0,01
<i>α-guaieno</i>	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0	0,07 ± 0
<i>Germacreno D</i>	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0	0,06 ± 0,01
<i>α-bulneseno</i>	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0	0,08 ± 0
<i>δ-cadineno</i>	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,38 ± 0,07	0,40 ± 0,02	1,10 ± 1,44

Fonte: o Autor

Gráfico 9 – Percentual relativo de área para os compostos voláteis do óleo essencial do *Ocimum basilicum* extraídos em um mesmo cartucho repetidas vezes.



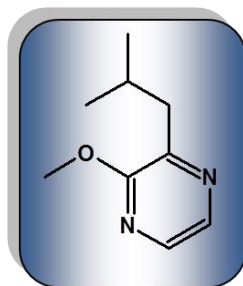
Fonte: o Autor

4.2 Aplicações do método

4.2.1 Análise de compostos orgânicos voláteis do Dendzeiro in vivo

A análise das inflorescências das espécies de *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera* e do Híbrido mostraram que além do estragol, substância responsável pela atração de polinizadores específicos do dendzeiro, uma substância de pirazina metoxilada também foi identificada. Essa substância, conhecida como 2-metóxi pirazina (Figura 7, pág 44), também está relacionada com a polinização (CUTRI, 2013), podendo ser a responsável pela atração de insetos polinizadores das espécies do dendê, assim como o estragol.

Figura 7 - Estrutura da 2-metóxi pirazina



Fonte: o Autor

Utilizando o adsorvente Carboxen 569, observa-se que as inflorescências do Tenara, Caiaué e do Híbrido apresentaram o estragol, entretanto, essa substância só pode ser observada em amostras cuja análise foi realizada com 500 mg de adsorvente e com tempo de coleta de 2 minutos, sendo mais freqüente em inflorescências masculinas da espécie *Elaeis oleifera*. Todavia a amostra que apresentou o maior teor de estragol foi da espécie *Elaeis guineensis*.

Com o mesmo adsorvente a substância 2-metóxi pirazina mostrou-se mais freqüente, sendo observada em um número maior de amostras se comparada com o estragol. A substância foi predominante em amostras da espécie *Elaeis oleifera* e em inflorescências masculinas, embora amostras de inflorescências femininas e do híbrido também tenham apresentado a substância. Com relação à massa de adsorvente, a 2-metóxi pirazina pode ser coletada em cartuchos empacotados com 100 e 500 mg de Carboxen e com tempo de 2 e 5 minutos de extração.

Testou-se também o adsorvente Porapak, observa-se que das substâncias de interesse apenas o estragol pode ser coletado e ainda assim em poucas amostras. Contudo essa substância pode ser extraída de inflorescências masculinas e femininas da espécie *Elaeis guineensis* e do Híbrido, sendo predominante na primeira. Para o tempo de coleta, a análise se mostrou eficiente para o tempo de 2 minutos. A utilização do adsorvente Porapak foi descartada, pois este adsorvente não apresentou resultados promissores no estudo em questão.

Os resultados obtidos nos experimentos e sob as condições de análise estabelecidas na metodologia estão sumarizados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Coleta de voláteis em palma de óleo utilizando o adsorvente Carboxen 569.

Inflorescência	Espécie	Dados da planta	Tempo (min)	Massa	Estragol/Área	2-metóxi pirazina /Área
Masculina	<i>Elaeis guineensis</i>	A25 L59 P9	2	500 mg	0	0
Masculina	<i>Elaeis guineensis</i>	A25 L59 P4	2	500 mg	5913653	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	1 gr	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	100 mg	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	5	100 mg	0	70783
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	500 mg	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	500 mg	86254	31929
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	5	500 mg	0	41335
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	5	500 mg	0	43814
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P9	2	500 mg	39174	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	100 mg	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	100 mg	0	24475
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	500 mg	0	23713
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	500 mg	0	17041
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	500 mg	112074	14765
Masculina	Híbrido	A53 L5 P12	2	500 mg	0	0
Masculina	Híbrido	A53 L5 P13	2	500 mg	0	0
Masculina	Híbrido	A53 L33 P25	2	500 mg	61086	8046
Feminina	<i>Elaeis guineensis</i>	A25 L15 P25	2	500 mg	0	0
Feminina	<i>Elaeis guineensis</i>	A25 L15 P25	2	500 mg	0	0
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P22	2	500 mg	0	0
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P23	2	500 mg	0	5071
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P25	5	500 mg	0	0
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P26	5	500 mg	0	26976
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P27	2	1 gr	0	0
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P28	2	100 mg	0	18184
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P29	5	100 mg	0	24813
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P8	2	500 mg	803877	30214
Feminina	Híbrido	A53 L6 P4	2	500 mg	0	0
Feminina	Híbrido	A53 L14 P2	2	500 mg	0	0
Feminina	Híbrido	A53 L27 P20	2	500 mg	0	0
Controle	-	Área 53	2	100 mg	0	0
Controle	-	Área 31	2	500 mg	9160	0

Fonte: o Autor

Tabela 10- Coleta de voláteis em palma de óleo utilizando o adsorvente Porapak

Inflorescência	Espécie	Dados da planta	Tempo (min)	Massa	Estragol/Área	2-metóxi pirazina /Área
Masculina	<i>Elaeis guineensis</i>	A25 L59 P9	2	-	541733	0
Masculina	<i>Elaeis guineensis</i>	A25 L59 P4	2	-	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	-	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	-	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	5	-	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	5	-	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P9	2	-	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	-	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	-	0	0
Masculina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P6	2	-	0	0
Masculina	Híbrido	A53 L5 P12	2	-	0	0
Masculina	Híbrido	A53 L5 P13	2	-	0	0
Masculina	Híbrido	A53 L33 P25	2	-	562225	0
Feminina	<i>Elaeis guineensis</i>	A25 L15 P25	2	-	2494222	0
Feminina	<i>Elaeis guineensis</i>	A25 L15 P25	2	-	1090536	0
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P31	2	-	0	0
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P32	2	-	0	0
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P33	5	-	0	0
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L32 P34	5	-	0	0
Feminina	<i>Elaeis oleifera</i>	A31 L31 P8	2	-	0	0
Feminina	Híbrido	A53 L6 P5	2	-	7848	0
Feminina	Híbrido	A53 L14 P2	2	-	0	0
Feminina	Híbrido	A53 L27 P20	2	-	0	0
Controle	-	Área 31	2	-	0	0
Controle	-	Área 53	2	-	0	0

Fonte: o Autor

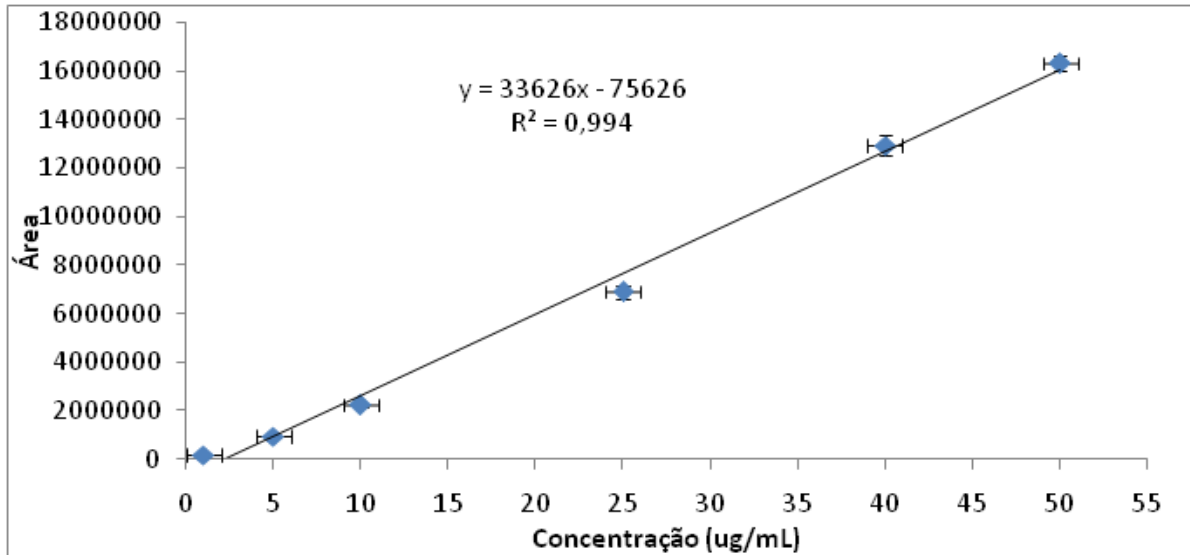
4.2.2 Análise de compostos orgânicos voláteis da espécie *Ocimum basilicum* in vivo

As coletas de amostras foram feitas no período de 8:00 às 18:00 h no horto da Embrapa Agroindústria tropical. Foi possível identificar apenas duas substâncias, linalol e eucaliptol, sendo elas, como já foi visto anteriormente, constituintes majoritários nas plantas da espécie *Ocimum basilicum*.

O Gráfico 10 representa a curva de calibração obtida por padronização externa da solução padrão de 3-octanol que, por regressão linear, apresentou o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9947$ e equação da reta igual a $y = 336265 x - 756266$. A concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi considerada como limite de detecção e a de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi estabelecida como o limite de quantificação. A padronização externa foi realizada para que se tivesse o conhecimento do

intervalo de linearidade do método, sendo assim, a incerteza relativa à quantificação por padronização interna foi resolvida.

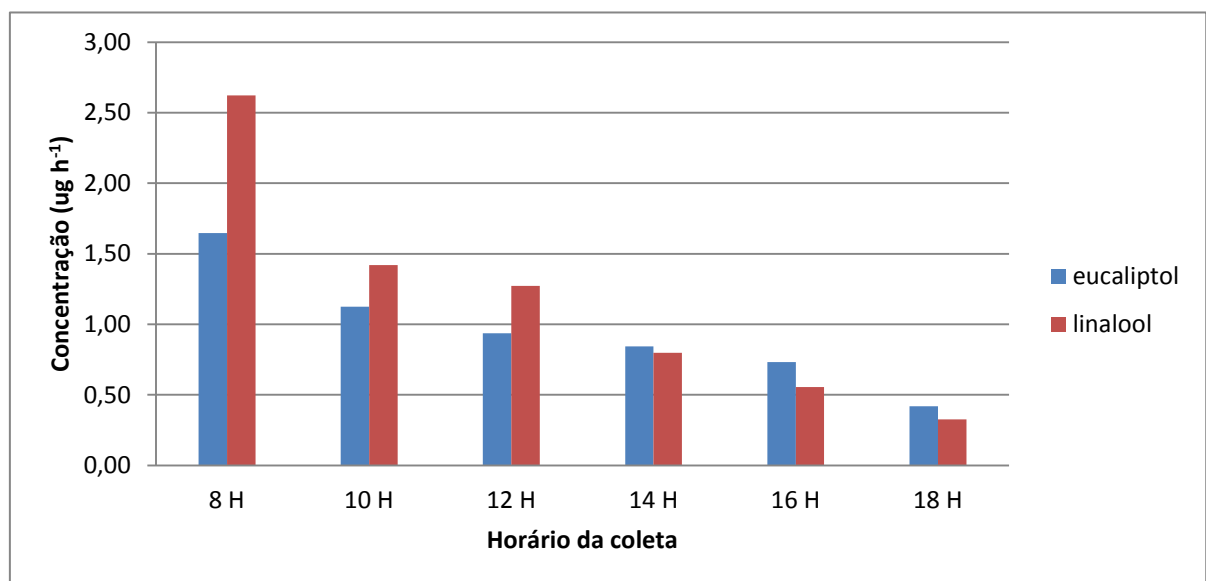
Gráfico 10 – Curva de calibração externa do padrão 3-octanol.



Fonte: o Autor

Observou-se que ocorreu um decréscimo na concentração dessas substâncias ao longo do dia conforme mostra o Gráfico 11. Para a construção desse gráfico foi considerada a concentração obtida por equivalência proporcionada pela padronização interna.

Gráfico 11 – Concentração de linalol e eucaliptol em diferentes horários de coleta de COVs da espécie *Ocimum basilicum*.



Fonte: o Autor

As concentrações de linalol e eucaliptol podem ser observadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Concentração em $\mu\text{g h}^{-1}$ de linalol e eucaliptol obtidas por padrão interno.

<i>Horário (h)</i>	$\mu\text{g h}^{-1}$	
	<i>Eucaliptol</i>	<i>Linalol</i>
8	1,65	2,62
10	1,12	1,42
12	0,94	1,27
14	0,84	0,80
16	0,73	0,55
18	0,42	0,33

Fonte: o Autor

Os resultados demonstrados para dinâmica circadiana do *Ocimum basilicum* estão de acordo com a literatura. Em artigo de revisão, publicado por Gobbo e Lopes, 2007, os autores descrevem a respeito de pesquisas que apontam que a intensidade de luz é um fator que também influencia a concentração e a composição de diferentes classes de moléculas, como terpenóides. Foi corroborado, que o manjeriço (*Ocimum basilicum*) e o tomilho (*Thymus vulgaris*), tinham o completo desenvolvimento de tricomas glandulares, local onde os óleos essenciais são armazenados, sob condições de dependência da intensidade de luz. Em nosso estudo houve um decréscimo de emissão de voláteis ao longo do dia o que pode estar ligado a variações de intensidade solar. Seria esse fator apenas um indicativo, mais estudos deverão ser conduzidos para que se tenha total controle das variáveis, somente assim poderemos inferir com segurança os fatores que influenciam a produção desses metabólitos secundários.

5. CONCLUSÃO

Com este trabalho, foi possível otimização de uma metodologia para a coleta de compostos orgânicos voláteis liberados pelas plantas que são de fundamental importância para a compreensão do complexo sistema de interações entre as plantas e outros seres vivos. Para a metodologia fez-se uso dos adsorventes Carboxen 569 e Porapak, já conhecidos experimentalmente pela sua capacidade de capturar substâncias orgânicas de baixo peso molecular.

Utilizando apenas o adsorvente Carboxen 569 nos experimentos para a validação do método, verificou-se que a metodologia aplicada é eficiente, pois apresentou resultados satisfatórios para os testes de seletividade, onde foi identificado um total de 55 substâncias, o que corresponde a 75,34% das substâncias estudadas nos óleos essenciais. Além de possuir precisão de até 96 horas após a coleta, como observado no teste de armazenamento, apresentar repetitividade nas análises e ser sensível a concentrações relativamente baixas do analito.

Para as análises feitas em campo, observa-se que os cartuchos contendo adsorvente Carboxen 569 foi mais eficiente na captura de substâncias, estragol e 2-metóxi pirazina, responsáveis por atrair polinizadores do dendezeiro, Caiapé e do Híbrido, fornecendo, dessa forma, mais informações sobre a liberação dessas substâncias pelas espécies *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera* e do Híbrido podem ser adquiridas, permitindo uma comparação entre as espécies. Já para o experimento realizado no horto da Embrapa Agroindústria Tropical, com a planta da espécie *Ocimum basilicum*, foi possível comprovar que a concentração dos constituintes majoritários dessa espécie decresce ao longo do dia e assim criar um perfil de liberação para a planta, reafirmando a eficiência da metodologia para a análise de semioquímicos de plantas *in vivo* e *in situ*.

Vários fatores podem interferir na captura de compostos voláteis, sendo assim, este trabalho deixa a oportunidade para estudos mais aprofundados sobre a otimização do método e a sua aplicação do mesmo na análise de semioquímicos de plantas e a sua relação ecológica.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. IL/EUA: Allured Pub Corp, 2007.

ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. **Agricultura tropical: Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. 1. ed.v. 1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

CHIA, G. S. **Repetibilidade da produção de cachos, anomalias florais e germinação de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Área de concentração em Agricultura no Trópico Úmido, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. DA; ROCHA, R. N. C. DA; LOPES, M. T. G. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. *Acta Amazonica*, v. 39, n. 2, p. 249-254, 2009.

CUTRI, L. **O aroma das flores de *Passiflora* spp na atração de polinizadores: Uma abordagem bioquímica e molecular**. 2013. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

DETTMER, K.; ENGEWALD, W. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 373, n. 6, p. 490-500, 2002.

GOBBO-NETO, L.; Lopes, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GOMES, S. M. S. **Polinizadores e semioquímicos do Dendezeiro híbrido (*elaeis oleifera* (H. B. K.) Cortés x *elaeis guineensis* Jacq).** Tese (*Doctor Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2011.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. 3ed. Chapman and Hall, London, UK, 1998.

HEALY, T., JEPSON, P. The location of floral nectar sources by mosquitoes: the long-range responses of *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae) to *Achillea millefolium* flowers and isolated floral odour. *Bulletin of Entomological Research*, v. 78, n. 4, p. 651-657, 1988.

HORAS, V. R. ***Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae): Resposta olfativa aos voláteis da soja e comportamento de acasalamento**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Área de concentração em Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

JEPSON, P., HEALY, T. The location of floral nectar sources by mosquitoes: an advanced bioassay for volatile plant odours and initial studies with *Aedes aegypti*

(L.) (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 78, n. 4, p. 641–650, 1988.

JHUMUR, U. S.; DÖTTERL, S.; JÜRGENS, A. Electrophysiological and behavioural responses of mosquitoes to volatiles of *Silene otites* (Caryophyllaceae). **Arthropod-Plant Interactions**, v. 1, n. 4, p. 245–254, 2007.

JHUMUR, U. S.; DÖTTERL, S.; JÜRGENS, A. Floral odors of *Silene otites*: their variability and attractiveness to mosquitoes. **Journal of chemical ecology**, v. 34, n. 1, p. 14–25, 2008.

KRUG, C., *et al.* **Plano Estratégico da Embrapa Amazônia Ocidental para a Cultura do Dendezeiro**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013.

LABARCA, M. V.; NARVÁEZ, Z. Identificación y fluctuación poblacional de insectos polinizadores en palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacquin) en el sur del lago de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 26, n. 3, p. 305–324, 2009.

MILLAR, J.G., SIMS, J.J. Preparation, cleanup, and preliminary fractionation of extracts. In: Miller, J.G., Haynes, K.F. (Eds.), **Methods in Chemical Ecology**. Kluwer Academic Publishers, Boston, p. 1–37, 1998.

MOURA, J. I. L. **Polinização do dendezeiro por *elaeidobius subvittatus faust* e *elaeidobius kamerunicus faust* (Coleoptera, Curculionidae) no sul do estado da Bahia**. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MOURA, J. I. L.; CIVIDANES, F. J.; DOS SANTOS FILHO, L. P.; VALLE, R. R. Polinização do dendezeiro por besouros no Sul da Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 3, p. 289–294, 2008.

MOURA, J. I. L.; SANTOS, L. P. DOS; BITTENCOURT, M. A. L.; KRUG, C. Preferência do bicudo-das-palmeiras por dendezeiro, caiaué e por seu híbrido interespecífico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 454–456, 2013.

MULLER, A. A.; JÚNIOR, J. F.; FILHO, P. C. A. **Embrapa Amazonia Oriental e o Agronegócio do dendê no Pará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006.

NYASEMBE, VINCENT O.; TORTO, BALDWIN. Volatile phytochemicals as mosquito semiochemicals. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 196–201, maio 2014.

OLIVEIRA, M. S. C. **Utilização de carvão ativado na adsorção de lactose e proteínas do soro do leite**. Dissertação (Mestrado) - Área de concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2014.

OTIENOBURU, P. E.; EBRAHIMI, B.; PHELAN, P. L.; FOSTER, W. A. Analysis and optimization of a synthetic milkweed floral attractant for mosquitoes. **Journal of chemical ecology**, v. 38, n. 7, p. 873–81, 2012.

RAMOS, E. J. A.; VEIGA, A. S.; JÚNIOR, J. F. **Potencial Produtivo de Híbridos Interespecíficos entre Dendezeiro e Caiauezeiro nas Condições do Nordeste Paraense.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006.

SANTOS, E. A. **Caracterização de Dendezeiros subespontâneos com base na produção de frutos e cachos.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

SILVA, J. S. O. **Productividade de óleo de palma na cultura do dendê na Amazônia Oriental: Influência do clima e do material genético.** Dissertação (*Magister Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SIMÕES, C. M. O., *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010.

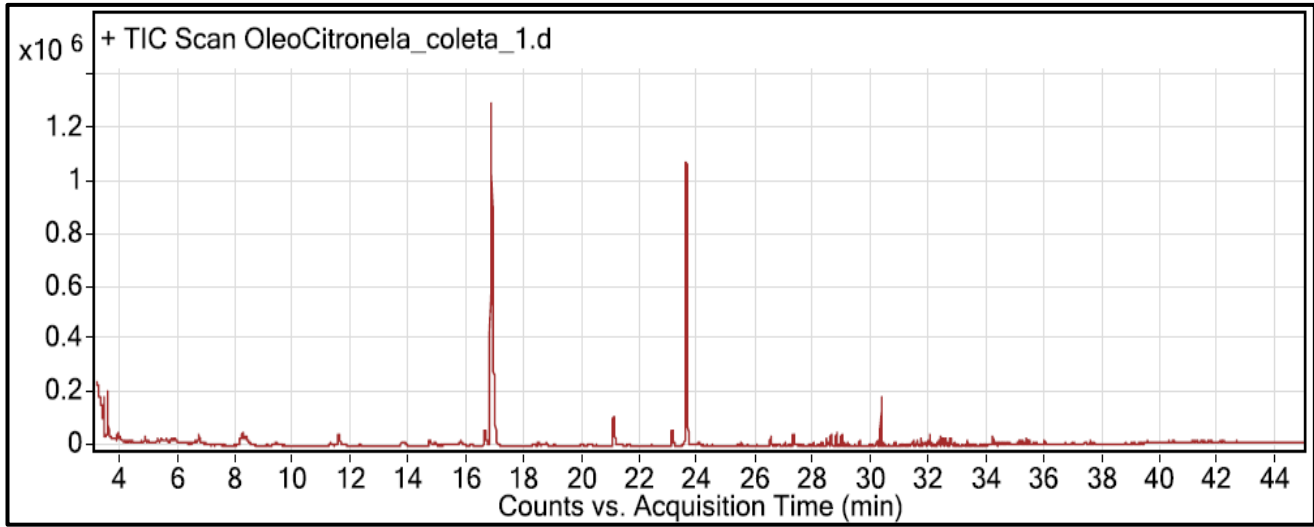
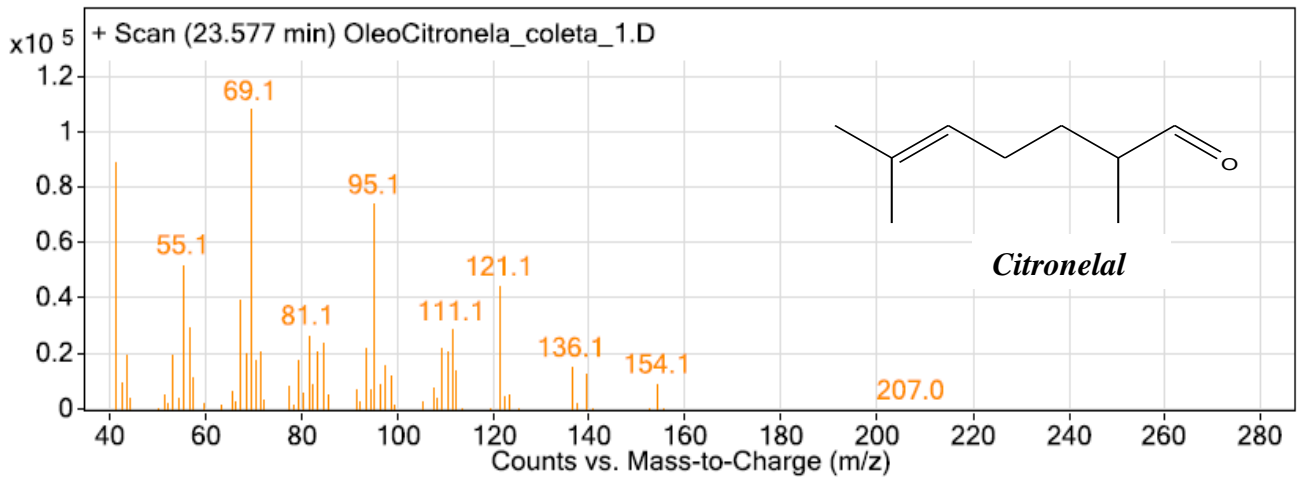
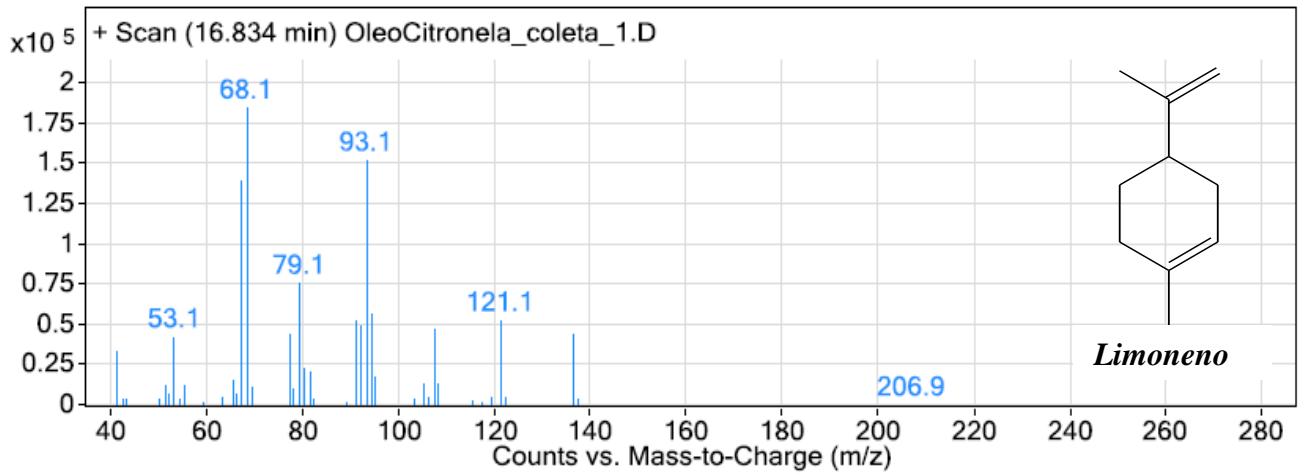
THOLL, D.; *et al.* Practical approaches to plant volatile analysis. **The Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 540–560, 2006.

VARGO, A.M., FOSTER, W.A. Responsiveness of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to flower extracts. **Journal of Medical Entomology**, v. 19, n. 6, p. 710–718, 1982.

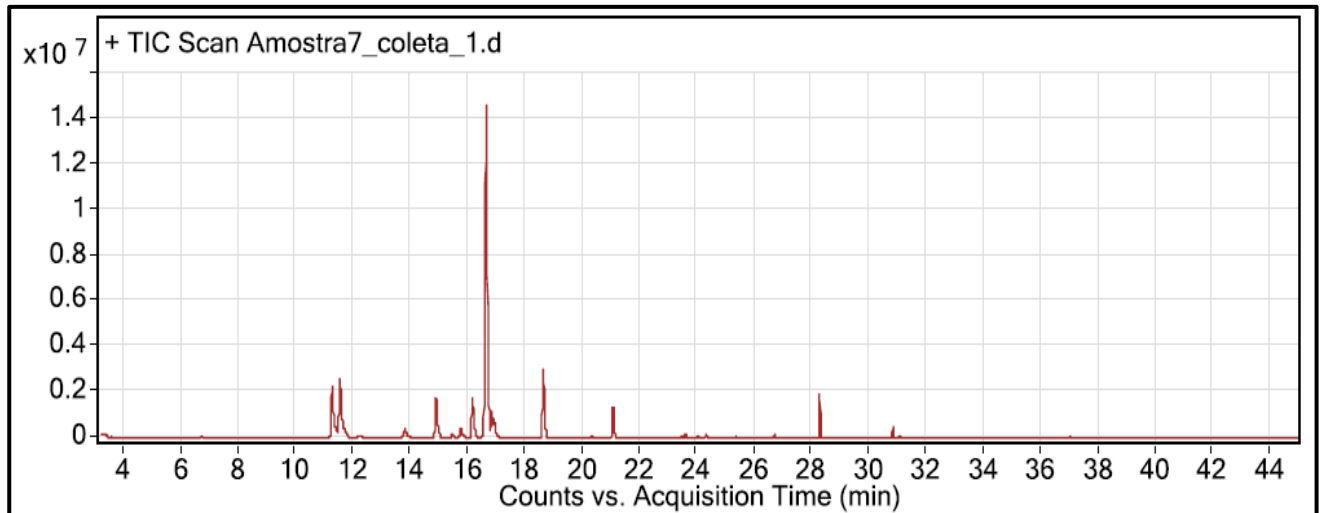
ZARBIN, P. H. G., *et al.* Compostos Orgânicos Voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. Revisão. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395–1405, 2013.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M. Feromônios de insetos: Tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722–731, 2009.

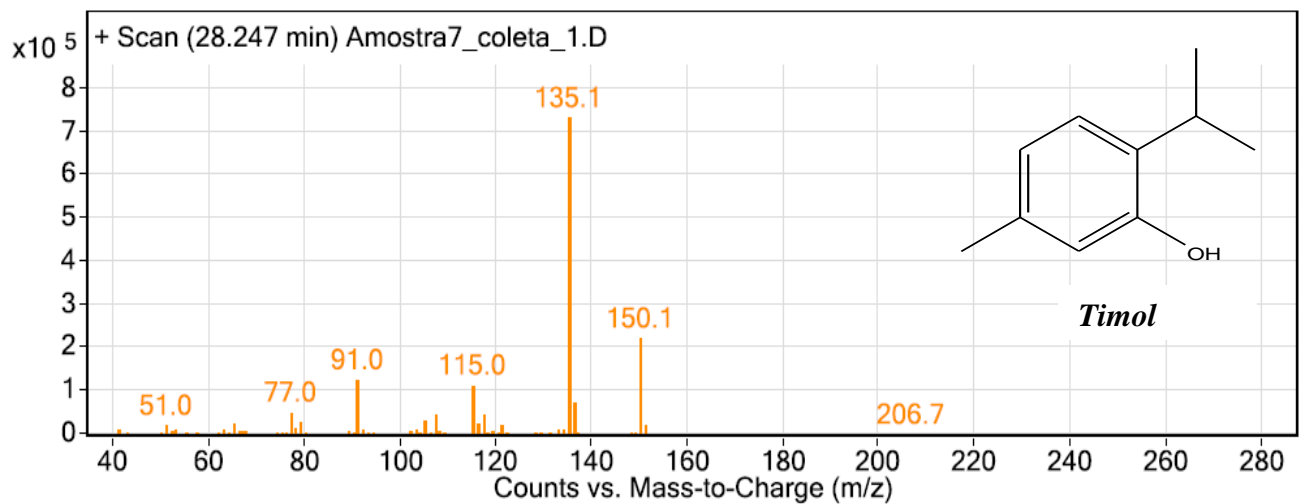
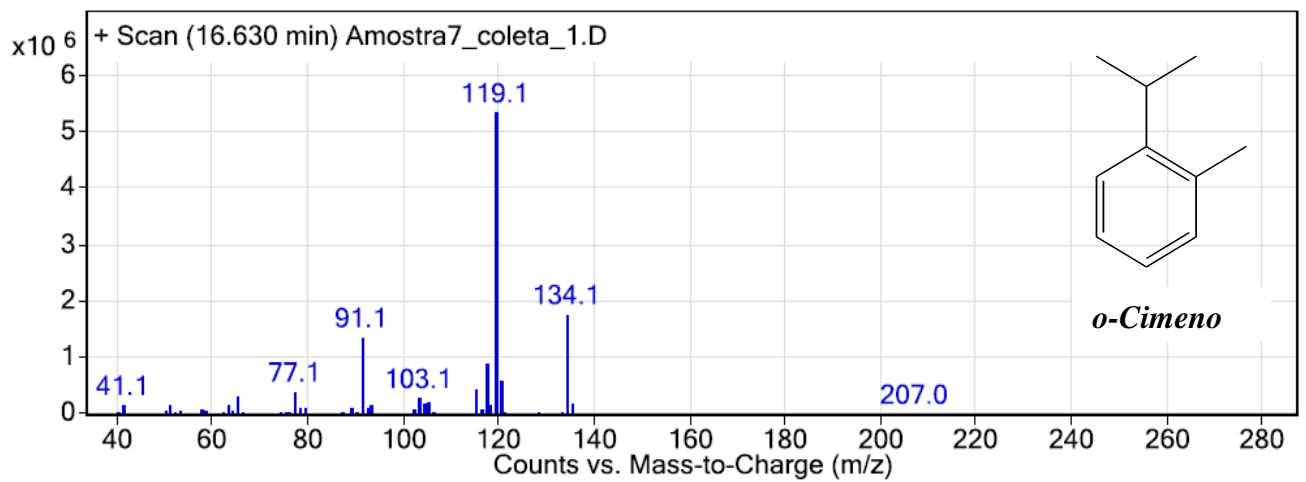
ANEXOS

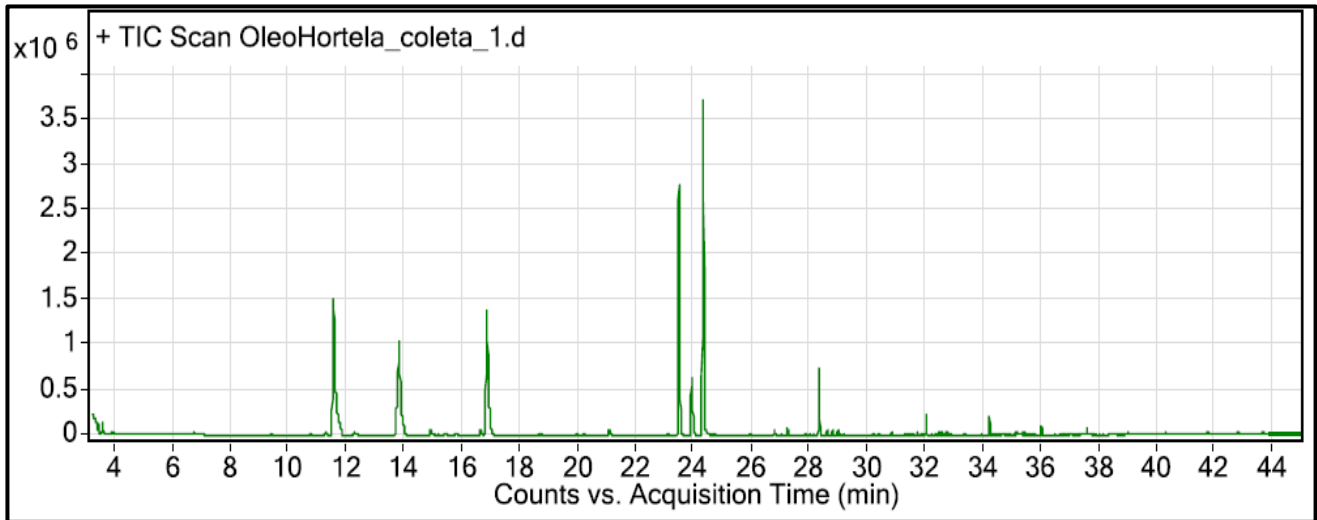
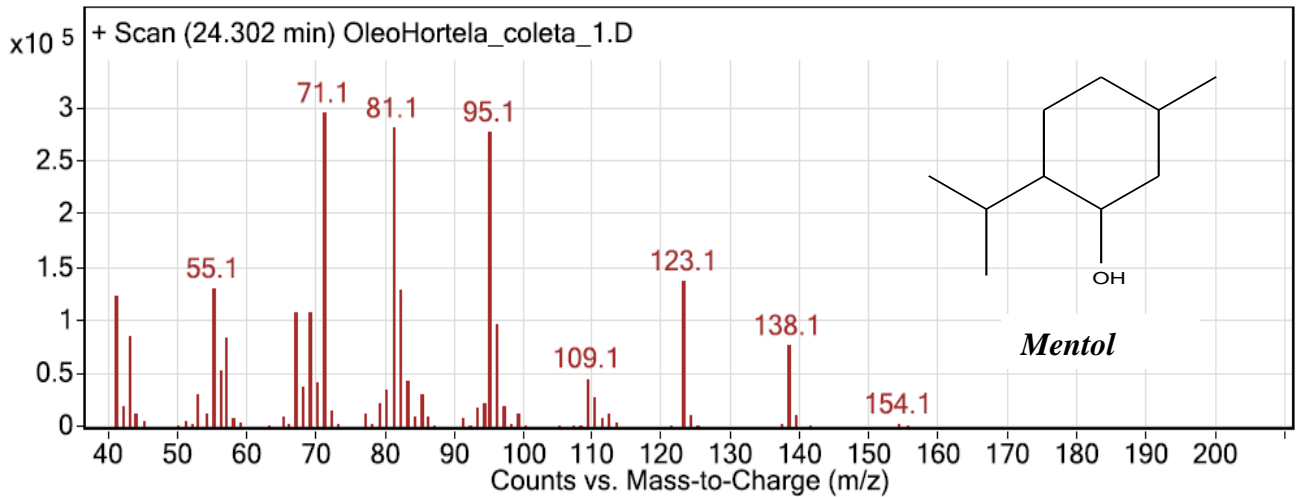
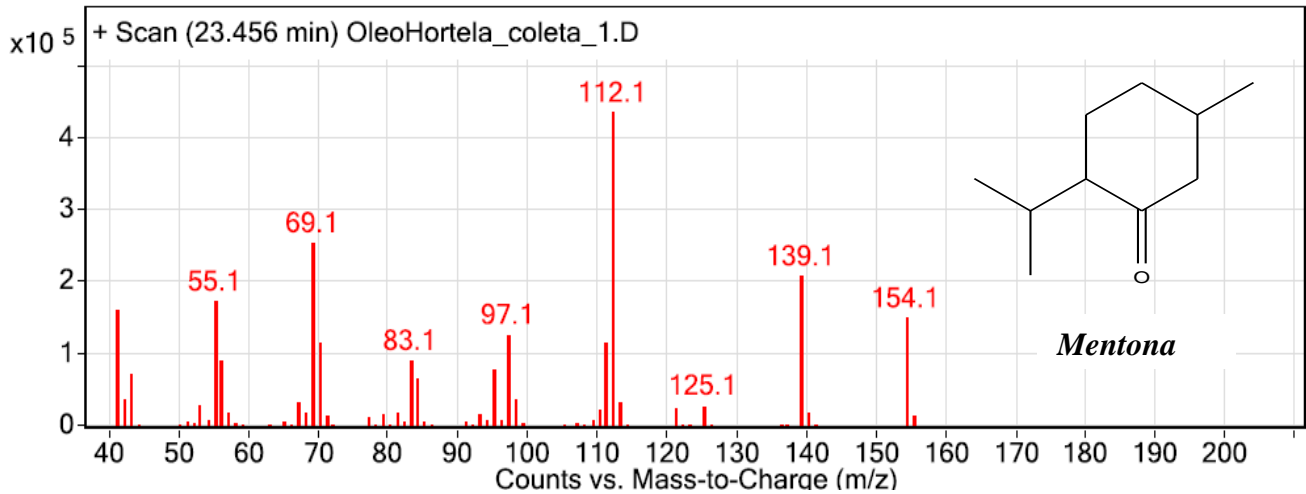
ANEXO A - Cromatograma do óleo essencial de *Cymbopogon nardus*.ANEXO B – Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon nardus*.

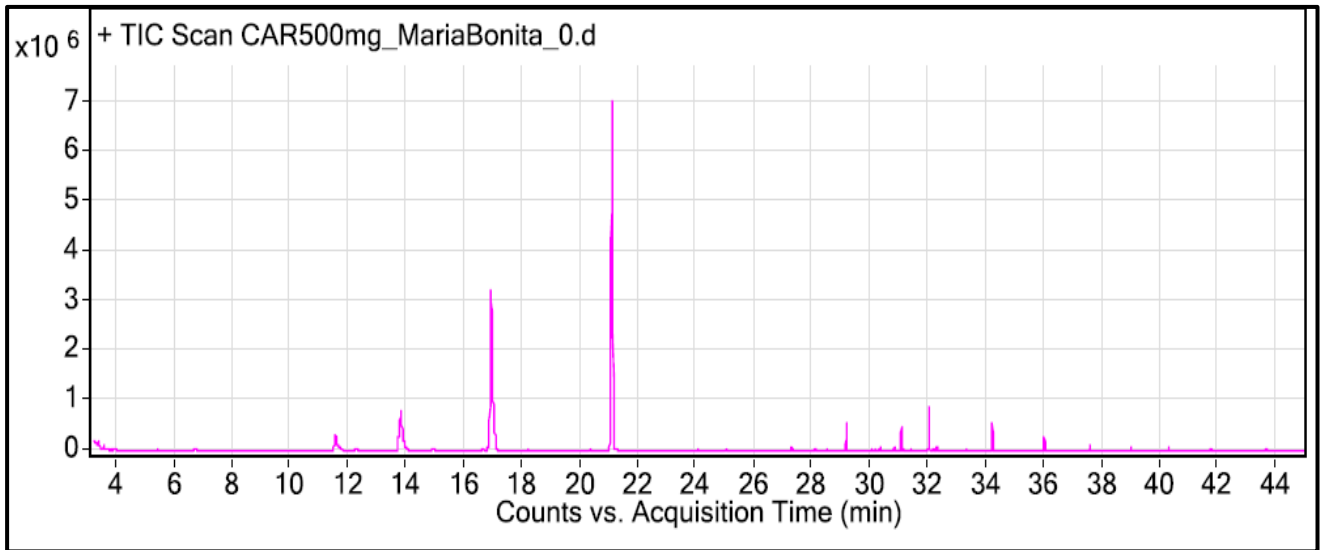
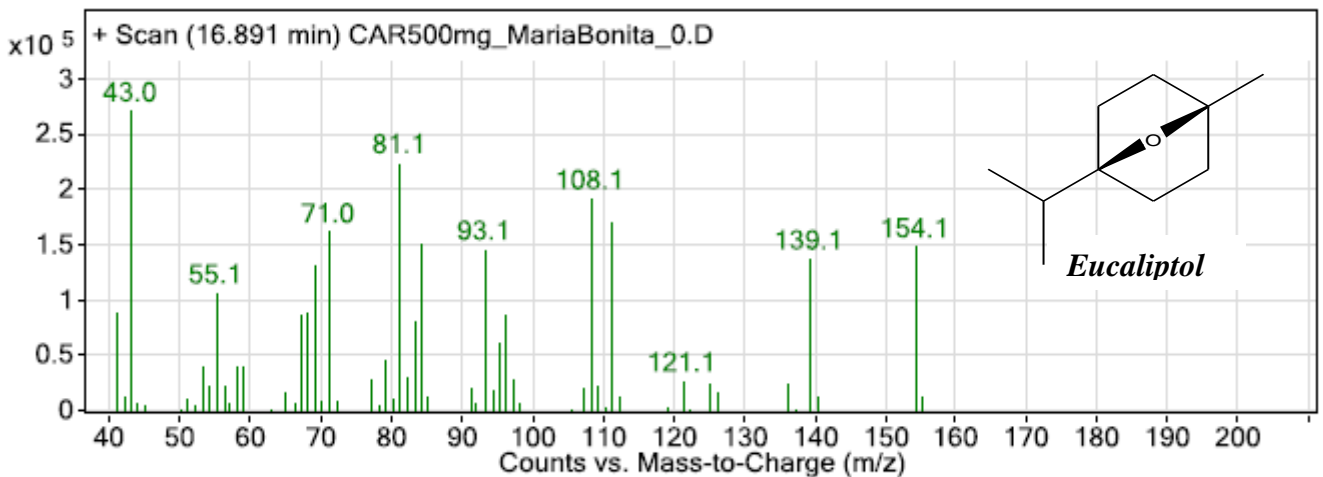
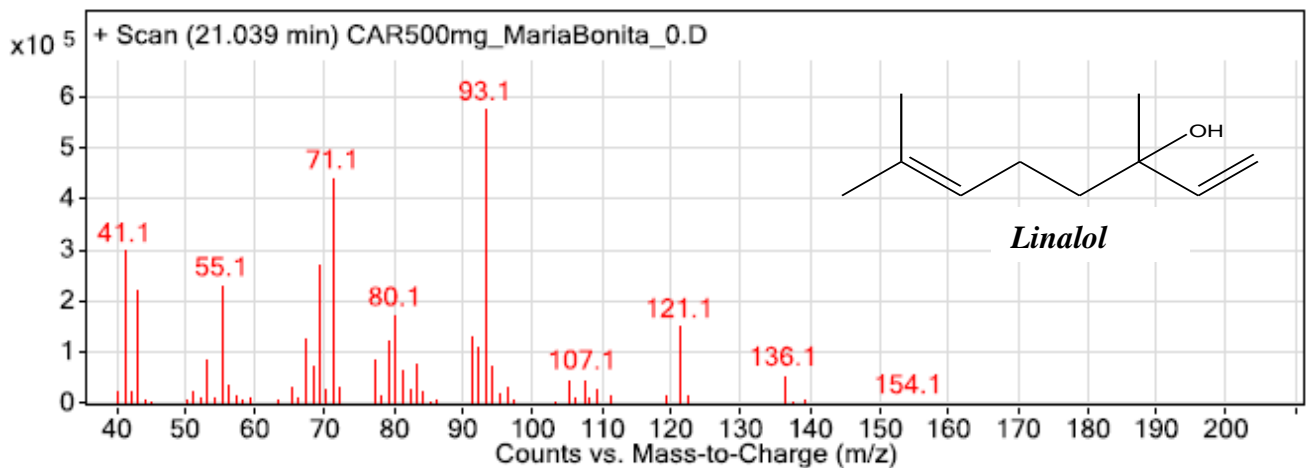
ANEXO C - Cromatograma do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.

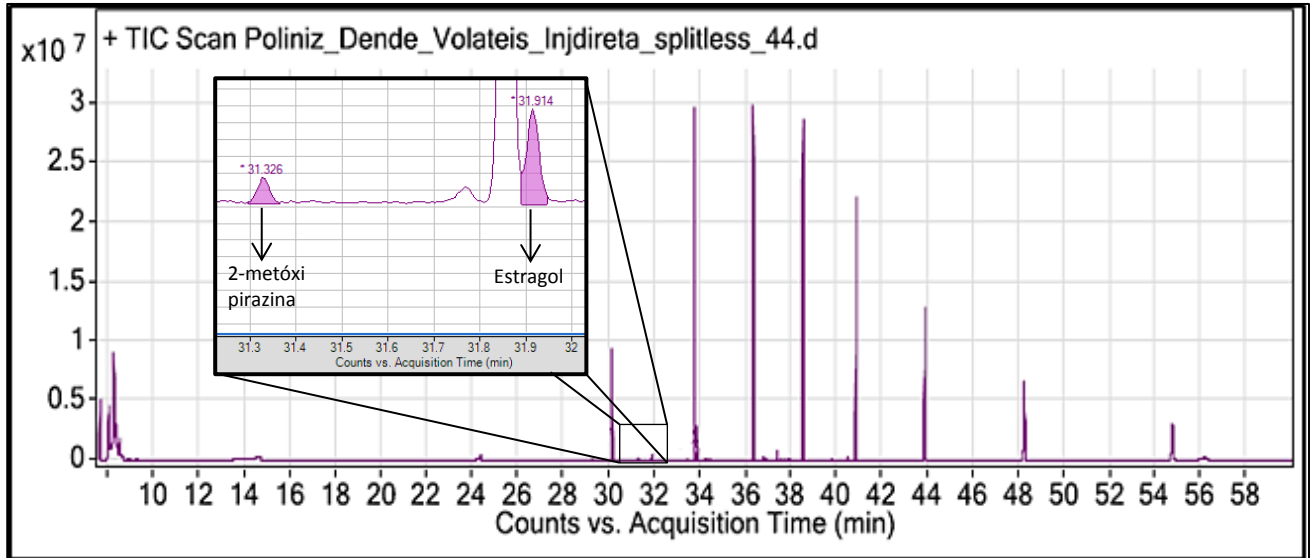


ANEXO D - Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.

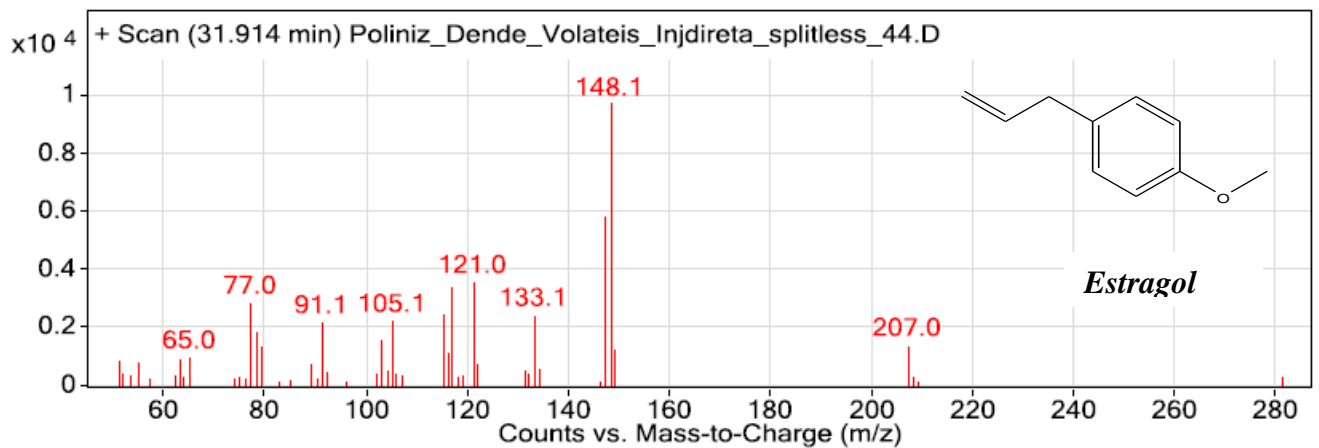
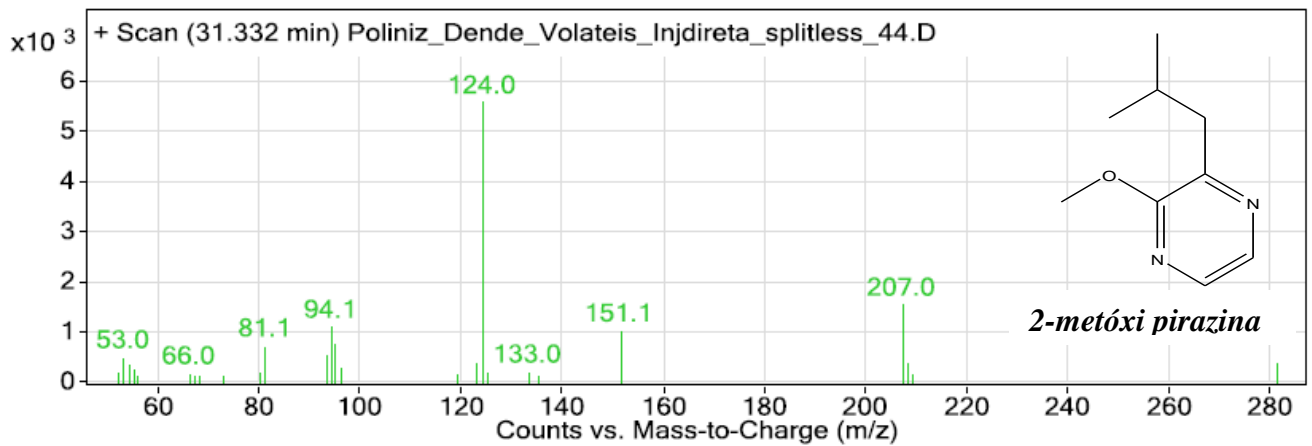


ANEXO E - Cromatograma do óleo essencial de *Mentha piperita* L.ANEXO F - Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial de *Mentha piperita* L.

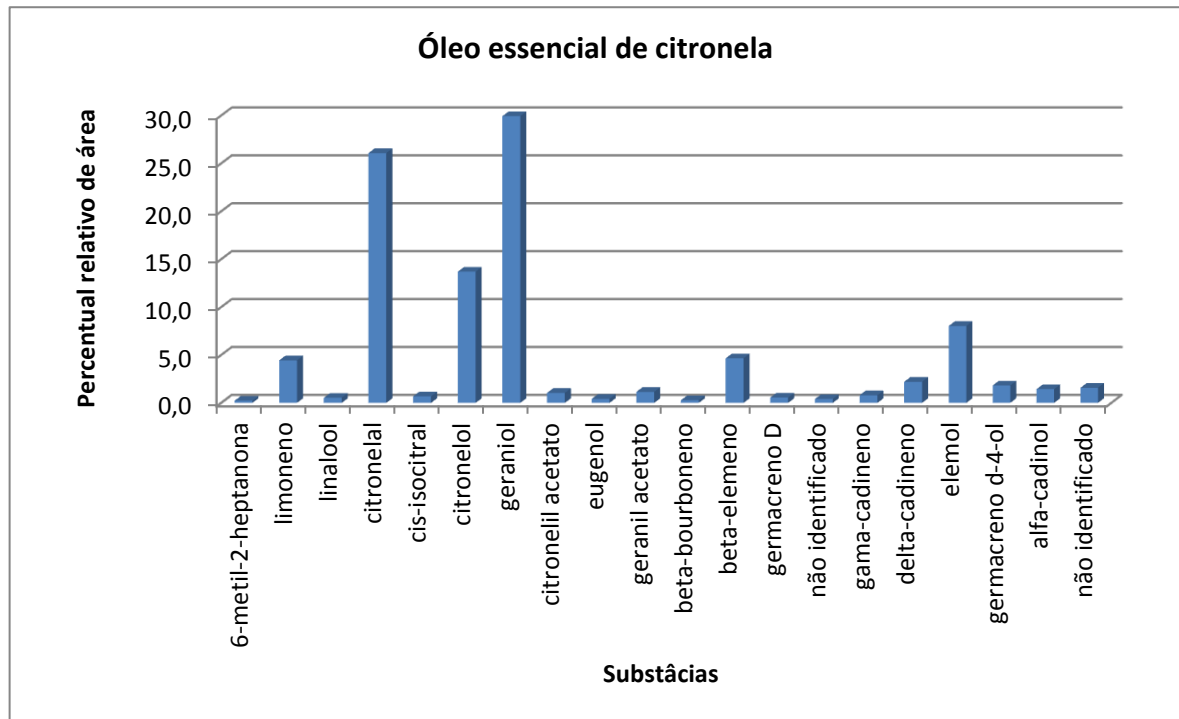
ANEXO G - Cromatograma do óleo essencial do *Ocimum basilicum*.ANEXO H - Espectros de massas dos compostos majoritários do óleo essencial do *Ocimum basilicum*

ANEXO I - Cromatograma dos Compostos Voláteis extraídos da espécie *E. oleifera*.

ANEXO J - - Espectros de massas das substâncias 2-metóxi pirazina e Estragol.

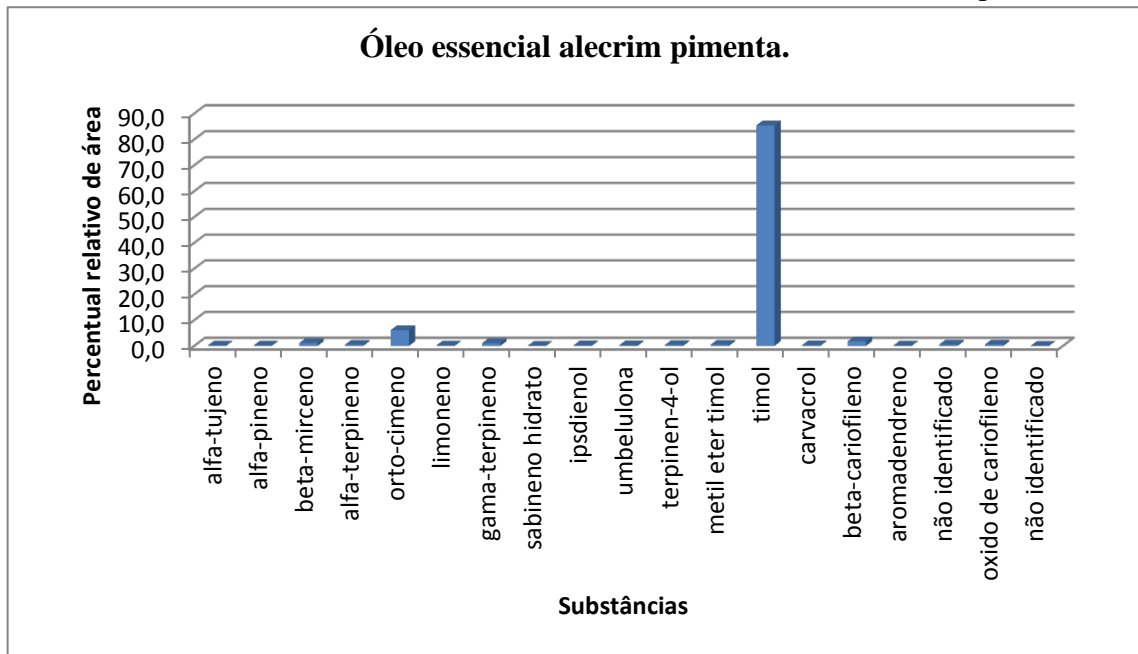


ANEXO L - Percentuais relativos de área do óleo essencial de citronela.



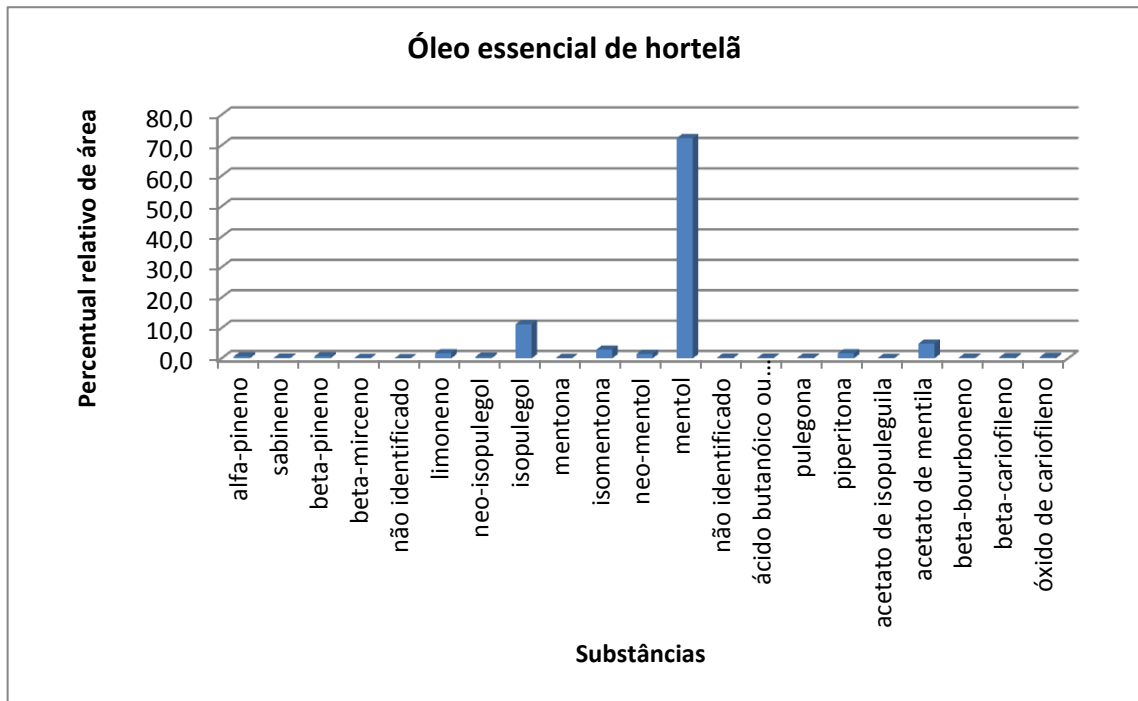
Substâncias	Percentual relativo de área
6-metil-2-heptanona	0,22
limoneno	4,44
linalol	0,53
citronelal	26,08
cis-isocitral	0,67
citronelol	13,69
geraniol	29,93
citronelil acetato	1,05
eugenol	0,42
geranil acetato	1,15
beta-bourboneno	0,28
beta-elemeno	4,65
germacreno D	0,55
não identificado	0,40
gama-cadineno	0,80
delta-cadineno	2,20
elemol	8,03
germacreno d-4-ol	1,82
alfa-cadinol	1,43
não identificado	1,58

ANEXO M - Percentuais relativos de área do óleo essencial de alecrim pimenta.



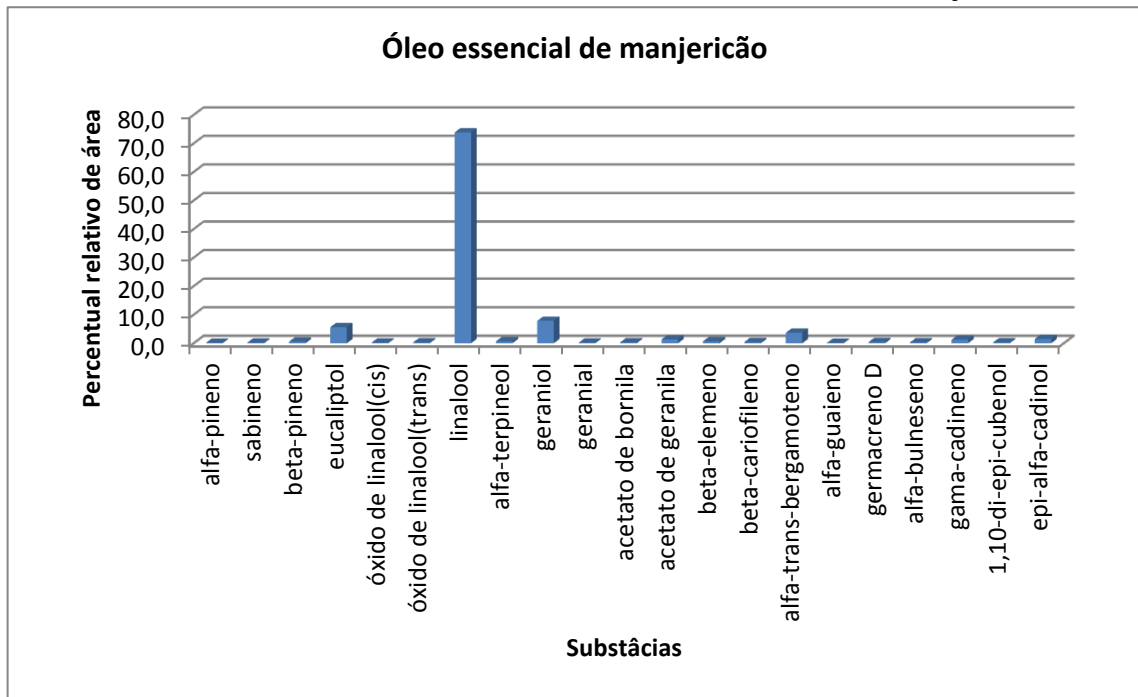
Substâncias	Percentual relativo de área
alfa-tujeno	0,20
alfa-pineno	0,20
beta-mirceno	1,15
alfa-terpineno	0,49
orto-cimeno	6,15
limoneno	0,21
gama-terpineno	1,09
sabineno hidrato	0,10
ipsdienol	0,22
umbelulona	0,27
terpinen-4-ol	0,38
metil eter timol	0,49
timol	85,44
carvacrol	0,31
beta-cariofileno	1,81
aromadendreno	0,19
não identificado	0,56
oxido de cariofileno	0,57
não identificado	0,08

ANEXO N - Percentuais relativos de área do óleo essencial de hortelã.



Substâncias	Percentual relativo de área
sabineno	0,21
beta-pineno	0,60
beta-mirceno	0,16
não identificado	0,08
limoneno	1,63
neo-isopulegol	0,50
isopulegol	11,21
mentona	0,12
isomentona	2,83
neo-mentol	1,42
mentol	72,33
não identificado	0,18
ácido butanóico ou isovalérico	0,17
pulegona	0,23
piperitona	1,64
acetato de isopuleguila	0,17
acetato de mentila	4,83
beta-bourboneno	0,21
beta-cariofileno	0,35
óxido de cariofileno	0,42

ANEXO O – Percentuais relativos de área do óleo essencial de manjeriço.



Substâncias	Percentual relativo de área
alfa-pineno	0,17
sabineno	0,26
beta-pineno	0,54
eucaliptol	5,64
óxido de linalol(cis)	0,26
óxido de linalol(trans)	0,28
linalol	73,81
alfa-terpineol	0,66
geraniol	7,85
geranial	0,20
acetato de bornila	0,31
acetato de geranila	1,36
beta-elemeno	0,67
beta-cariofileno	0,40
alfa-trans-bergamoteno	3,68
alfa-guaieno	0,15
germacreno D	0,41
alfa-bulneseno	0,29
gama-cadineno	1,21
1,10-di-epi-cubenol	0,30
epi-alfa-cadinol	1,46