

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
EXTRATOS DE CINCO VARIEDADES DA ESPÉCIE *Aniba
rosaeodora* Ducke (*Lauraceae*)**

ORLANDO AMAZONAS DA ROCHA LOUREIRO PAES

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ORLANDO AMAZONAS DA ROCHA LOUREIRO PAES

**ANÁLISE COMPARATIVA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
EXTRATOS DE CINCO VARIEDADES DA ESPÉCIE *Aniba
rosaeodora* Ducke (*Lauraceae*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, na área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Coorientadora: Cláudia Cândida Silva

MANAUS

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P126a Paes, Orlando Amazonas da Rocha Loureiro
Análise comparativa de óleos essenciais e extratos de cinco variedades da espécie *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae) / Orlando Amazonas da Rocha Loureiro Paes. 2016
113 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior
Coorientadora: Cláudia Cândida Silva
Dissertação (Mestrado em Química - Orgânica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. cromatografia a gás. 2. espectrometria de massas. 3. quimiometria. 4. diferenciação química. I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

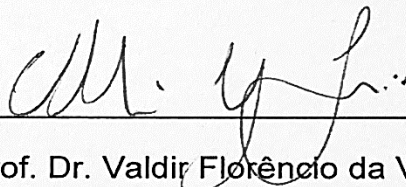
**“ANÁLISE COMPARATIVA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
EXTRATOS DE CINCO VARIEDADES DA ESPÉCIE *Aniba
rosaeodora (Lauraceae)*”**

Orlando Amazonas da Rocha Loureiro Paes

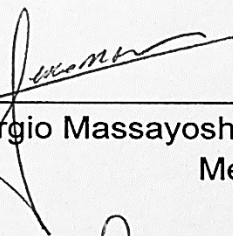
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado em 22 de Fevereiro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof. Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura
Membro INPA



Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio
Membro INPA

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 22 de Fevereiro de 2016.

"Aos meus pais que se preocupam incondicionalmente comigo. As suas vidas são para mim exemplos de perseverança e dedicação"

Amo vocês!

"Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conduzir em toda esta jornada maravilhosa da minha vida. Sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço a minha família por todo apoio e auxílio sempre que precisei. Obrigado por me suportar nos dias ruins e se alegrar comigo nos dias bons.

Carlos Anibal Ferreira Pinto Loureiro Paes e Flávia da Rocha Loureiro Paes, obrigado por serem os pais mais amorosos e atenciosos que eu poderia ter. Vocês são muito importantes para mim.

Carolina da Rocha Loureiro Paes, você é essencial na minha vida. Apesar da distância, eu sempre penso em você. Amo-te irmã!

À minha namorada Bruna Caroline Miranda Maciel por sempre me incentivar, ajudar, tentar me levantar quando eu caia, sendo companheira e algumas vezes até lavando vidrarias para mim. Isso que é amor. rs

Ao meu pai científico, orientador, prof. Dr. Valdir Veiga por todo o apoio, conselhos, oportunidades e por me receber nesta família que é o Q-BiomA.

Agradeço aos meus amigos de mestrado Adriana Cavalcante, Bruna Ribeiro, Elzalina Soares, Fabiana Greyce, Jésika Aroucha, Renan Feitosa, Samirimi Silva e Sidney Azevedo que sofreram e se alegraram comigo em vários momentos dessa aventura chamada de mestrado. Companheirismo e amizade definem muito bem a relação que permeou o nosso convívio.

À família Q-BiomA que de forma descontraída me ajudou e alegrou sempre que eu precisei.

À minha co-orientadora Dra. Cláudia Cândida por me aconselhar e colaborar com a realização de etapas fundamentais na execução deste projeto de pesquisa.

Agradeço à Dra. Klenicy Yamagushi, doutorando Pedro Krainovic e Dr. Valdir Veiga que se dispuseram à me ajudar nas coletas em Maués.

À empresa Magaldi por autorizar o uso de seus materiais botânicos e por auxiliar na coleta dos mesmos.

Sou muito grato ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e a Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual do Amazonas (UEA) por autorizar a realização das análises cromatográficas. Agradeço também a Central Analítica da Química onde as análises de espectrometria de massas foram realizadas.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas na pessoa dos funcionários que contribuíram de forma direta e indireta.

Agradeço à FAPEAM, CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro cedido para realização de projetos de pesquisa.

Análise comparativa de óleos essenciais e extratos de cinco variedades de *Aniba rosaeodora* Ducke (*Lauraceae*)

RESUMO

A compreensão das diferenças taxonômicas de espécies é de suma importância para diversas áreas da ciência. Apesar de muito eficiente, a avaliação morfológica de espécies muitas vezes não é eficaz para a diferenciação das espécies do gênero *Aniba*. Por estarem filogeneticamente próximas, certas espécies de plantas apresentam diferenças morfológicas ínfimas e de difícil percepção, causando conflito na nomenclatura dos espécimes. Uma destas complexas famílias é a *Lauraceae*, que se divide em 50 gêneros. Dentre estes gêneros, *Aniba* se destaca por possuir 44 espécies subdivididas em dois grupos: *affinis* e *guianensis*, sendo este último ainda separado em quatro subgrupos. O subgrupo *panurensis* merece destaque por sua importância econômica e por englobar espécies com maior dificuldade na identificação botânica para este gênero. Este estudo se propôs a realizar uma diferenciação química entre cinco variedades de *Aniba rosaeodora* Ducke (“pau-rosa”), tendo em vista a grande dificuldade taxonômica, o risco de extinção e o contínuo uso desta espécie pela indústria de perfumes. Para tal, foram selecionadas cinco variedades de pau-rosa de um plantio comercial no município de Maués-AM. Foram obtidos perfis das análises de extratos etanólicos e hidroalcoólicos de folhas, galhos e cascas e frações alcaloídicas de folhas e galhos por espectrometria de massas (EM-IES) e da composição dos óleos essenciais de folhas e galhos por cromatografia em fase gasosa (CG-EM e CG-DIC). As correlações entre os dados dos extratos obtidos por meio das análises estatísticas (PCA e HCA) permitiram a classificação das amostras em três grupos. A variedade imbaúba representa o grupo um, a louro o grupo dois e tucuribá, abacate e preciosa o grupo três. As análises dos óleos essenciais também permitiram a classificação das amostras em três grupos, as variedades imbaúba, tucuribá, abacate e preciosa representaram o primeiro grupo e a variedade louro foi dividida em dois grupos. Este estudo permitiu inferir que todas as variedades, exceto a louro, possuem composição química semelhante e abre caminho para o desenvolvimento de metodologias de identificação e certificação de pau-rosa.

Palavras-chave: cromatografia a gás, espectrometria de massas, quimiometria, diferenciação química.

Comparative analysis of essential oils and extracts of five varieties of *Aniba rosaeodora* Ducke (*Lauraceae*)

ABSTRACT

Understanding the taxonomic differences of species is of paramount importance for many areas of science. Although very effective, the morphological evaluation of species is often not effective for the differentiation of species of the *Aniba* genus. Certain plant species have (because of the closest phylogenetic) small morphological differences causing conflict in the botanic identification of specimens. One of these complex families is the *Lauraceae* which is divided into 50 genera. Among these genera, *Aniba* stands out for having 44 species divided into two groups: *affinis* and *guianensis*, the latter being further separated into four subgroups. The *panurensis* subgroup is remarkable for its economic importance and include species with greater difficulty in botanical identification for this genus. This study aimed to carry out a chemical differentiation among the five varieties of *Aniba rosaeodora* Ducke (“rosewood”), aiming the great difficulty taxonomic, the risk of extinction and the continued use of this species by the perfume industry. Five varieties of rosewood were selected from a commercial plantation in the Maués-AM city. The profile of the ethanolic and hydroalcoholic extracts of leaves, twigs and barks and the alkaloid fractions of leaves and twigs were obtained by mass spectrometry (ESI-MS) and the composition of essential oils from leaves and twigs by gas chromatography (GC-MS and GC-FID). The correlations among the data of the extracts obtained by the statistical analyzes (PCA and HCA) allowed the classification of samples into three groups. The imbaúba variety represents the group one, the louro represents the group two and tucuribá, abacate and preciosa represent the group three. The analyzes of essential oils also allowed grouping the samples into three groups, imbaúba, tucuribá, abacate and preciosa varieties were the group one and the louro variety was divided into two groups. This study allows us to infer that all the varieties, except the louro are chemically similar and paves the way for the development of identification and certification methods of rosewood.

Keywords: gas chromatography, mass spectrometry, chemometrics, chemical differentiation.

Lista de acrônimos

[M-H]⁻	modo negativo
[M+H]⁺	modo positivo
CC	corrente contínua
CG	cromatografia gasosa
CH₂Cl₂	diclorometano
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CV	coeficiente de variação
DIC	detector de ionização com chamas
DV	desvio padrão
EM	espectrometria de massas
HCA	do inglês: “ <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> ” (Análise de Agrupamento Hierárquico)
IES	ionização por <i>electrospray</i>
IV	infravermelho
IE	impacto de elétrons
<i>m/z</i>	razão massa/carga
Na₂SO₄	sulfato de sódio
NH₄OH	hidróxido de amônio
PCA	do inglês: “ <i>Principal Components Analysis</i> ” (Análise de Componentes Principais)
R	resolução
RF	rádio frequência

Lista de quadros

Quadro 1 – Subdivisões das espécies pertencentes ao gênero <i>Aniba</i>	29
Quadro 2 – Pironas encontradas em espécies do subgrupo <i>panurensis</i>	32
Quadro 3 – Informações geográficas da primeira coleta	41
Quadro 4 – Informações geográficas da segunda coleta	42

Lista de tabelas

Tabela 1 – Rendimento (em %) dos óleos essenciais de folhas frescas, secas e galhos da primeira coleta	54
Tabela 2 – Rendimento (valor médio da duplicata, em %) das amostras dos óleos essenciais de folhas e galhos, ambos secos, da segunda coleta	64
Tabela 3 – Massas dos perfis de extratos etanólicos das folhas	69
Tabela 4 – Rendimento (valor médio da duplicata, em %) das amostras dos óleos essenciais de folhas secas, da segunda coleta	85
Tabela 5 – Rendimento (valor médio da triplicata, em %) das amostras dos extratos etanólicos de folhas secas, da segunda coleta	91

Lista de figuras

Figura 1 – Distribuição Geográfica da Família <i>Lauraceae</i>	24
Figura 2 – Algumas estruturas de neolignananas encontradas em espécies do gênero <i>Aniba</i>	27
Figura 3 – Algumas estruturas de pironas encontradas em espécies do gênero <i>Aniba</i>	27
Figura 4 – Rota metabólica das classes de compostos encontrados em espécies de <i>Aniba</i>	28
Figura 5 – Esqueletos de pironas encontradas em espécies do subgrupo <i>panurensis</i>	31
Figura 6 – Fluxograma das etapas realizadas no preparo de amostra de óleos essenciais até as análises cromatográficas e tratamento estatístico	43
Figura 7 – Fluxograma das etapas realizadas no preparo de amostra de extratos etanólicos, hidroalcoólicos e alcaloídicos até a análise espectrométrica e tratamento estatístico	44
Figura 8 – Cromatogramas de CG-DIC das amostras de óleos essenciais de folhas frescas das cinco variedades de pau-rosa da primeira coleta, sendo P1) imbaúba, P2) louro, P3) tucuribá, P4) abacate e P5) preciosa	56
Figura 9 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de óleos essenciais de folhas frescas, da primeira coleta	57
Figura 10 – Cromatogramas de CG-DIC das amostras de óleos essenciais de folhas secas das cinco variedades de pau-rosa da primeira coleta, sendo P1) imbaúba, P2) louro, P3) tucuribá, P4) abacate e P5) preciosa	59
Figura 11 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de óleos essenciais de folhas secas, da primeira coleta	60
Figura 12 – Cromatogramas de CG-DIC das amostras de óleos essenciais de galhos secos das cinco variedades de pau-rosa da primeira coleta, sendo P1) imbaúba, P2) louro, P3) tucuribá, P4) abacate e P5) preciosa	62

Figura 13 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de óleos essenciais de galhos secos, da primeira coleta	63
Figura 14 – Perfis espectrométricos das folhas extraídas com etanol das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa	67
Figura 15 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de folha extraídas com etanol absoluto, da primeira coleta	68
Figura 16 – Perfis espectrométricos das folhas extraídas com etanol e água (7:3) das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa	70
Figura 17 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de galho extraídas com mistura de água e etanol, da primeira coleta	71
Figura 18 – Perfis espectrométricos dos galhos extraídos com etanol das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa	72
Figura 19 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de galho extraídas com etanol absoluto, da primeira coleta	73
Figura 20 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de galho extraídas com mistura de água e etanol, da primeira coleta	74
Figura 21 – Perfis espectrométricos dos galhos extraídos com etanol e água (7:3) das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa	75
Figura 22 – Perfis espectrométricos das cascas extraídas com etanol das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa	77
Figura 23 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de casca extraídas com etanol absoluto, da primeira coleta	78
Figura 24 – Perfis espectrométricos das cascas extraídas com etanol:água (7:3) das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa	79
Figura 25 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de casca extraídas com a mistura de água e etanol, da primeira coleta	80

Figura 26 – Perfis espectrométricos de frações alcaloídicas das folhas pertencentes às cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa	82
Figura 27 – Perfis espectrométricos de frações alcaloídicas dos galhos pertencentes às cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa	83
Figura 28 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de óleos essenciais de folhas secas, da segunda coleta	87
Figura 29 – HCA das amostras, em duplicata, de óleos essenciais de folhas secas de pau-rosa imbaúba (P1), pau-rosa louro (P2), pau-rosaa tucuribá (P3), pau-rosa abacate (P4) e pau-rosa preciosa (P5), da segunda coleta	88
Figura 30 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de óleos essenciais de folhas secas, com exclusão da substância linalol, da segunda coleta	89
Figura 31 – PCA, em três dimensões, de <i>loadings</i> e <i>scores</i> das amostras de folhas secas extraídas com etanol absoluto, da segunda coleta	92
Figura 32 – HCA das amostras, em triplicata, de folhas secas de pau-rosa imbaúba (P1) e pau-rosa louro (P2) extraídas com etanol absoluto, da segunda coleta	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 Família <i>Lauraceae</i> Jussieu	24
3.1.1 O gênero <i>Aniba</i> Aublet	26
3.1.2 Subgrupo <i>panurensis</i> e suas características químicas	29
3.1.2.1 Pironas	31
3.1.2.2 Alcaloides	32
3.1.2.3 Flavonoides	33
3.1.2.4 Benzofenonas	33
3.2 Análise instrumental	34
3.2.1 Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC) ...	34
3.2.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	35
3.2.3 Espectrometria de massas (EM) com fonte de ionização <i>electrospray</i> (IES)	36
3.3 Análise estatística para correlação de perfis	37
4 PARTE EXPERIMENTAL	41
4.1 Coleta do material vegetal	41
4.2 Métodos de extração	45

4.2.1 Extração de óleos essenciais	45
4.2.2 Extração por sonicação	46
4.2.3 Extração das frações alcalóidicas	47
4.3 Análises Instrumentais	48
4.3.1 Espectrometria de massas. A técnica EM-IES	48
4.3.2 Análises cromatográficas	49
4.3.2.1 Cromatografia gasosa (CG) com detector de ionização com chama (DIC) ..	49
4.3.2.2 Cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massas (EM-IES)	49
4.4 Análises estatísticas	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Visão geral de trabalho	52
5.2 A primeira coleta. Análise preliminar	53
5.2.1 Óleos essenciais	53
5.2.1.1 Análise de rendimentos	54
5.2.1.2 Análise dos perfis cromatográficos de folhas frescas	55
5.2.1.3 Análise dos perfis cromatográficos de folhas secas	58
5.2.1.4 Análise dos perfis cromatográficos de galhos secos	61
5.2.2 Extratos etanólicos e hidroalcoólicos	64
5.2.2.1 Análise de rendimentos	64
5.2.2.2 Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos das folhas	66
5.2.2.3 Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos hidroalcoólicos das folhas	69
5.2.2.4 Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos dos galhos	71

5.2.2.5	Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos hidroalcoólicos dos galhos	74
5.2.2.6	Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos das cascas	76
5.2.2.7	Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos hidroalcoólicos das cascas	78
5.2.2.8	Principais informações obtidas nas extrações etanólicas e hidroalcoólicas .	80
5.2.3	Análise comparativa dos perfis espectrométricos das frações alcalóidicas de folhas e galhos	80
5.3	A segunda coleta. Validação	84
5.3.1	Análise de rendimentos dos óleos essenciais	84
5.3.2	Análise estatística dos perfis cromatográficos dos óleos essenciais das folhas	86
5.3.3	Avaliação de coesão dos resultados obtidos na comparação dos perfis cromatográficos dos óleos essenciais com exclusão da substância majoritária linalol	88
5.3.4	Análise de rendimentos dos extratos etanólicos das folhas secas	90
5.3.5	Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos das folhas secas	92
6	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICE A	101
	APÊNDICE B	102
	APÊNDICE C	103
	APÊNDICE D	104
	APÊNDICE E	105
	APÊNDICE F	106
	APÊNDICE G	107
	APÊNDICE H	108

APÊNDICE I	109
APÊNDICE J	110
APÊNDICE K	111
APÊNDICE L	112
APÊNDICE M	113

1 INTRODUÇÃO

A família *Lauraceae* encontra-se dividida em aproximadamente 50 gêneros e possui de 2500 a 3000 espécies que são majoritariamente árvores de grande e pequeno porte (SOUZA, 2008). Geograficamente, apresentam ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais do planeta (WERFF & RICHTER, 1996). É considerada uma das famílias botânicas de maior destaque, pois além de integrar a composição florística de grande parte das florestas brasileiras, também tem intensa representatividade quanto ao número de espécies, especialmente na Mata Atlântica e florestas da região sul do país. Nas Américas, ocorrem aproximadamente 29 gêneros e 900 espécies com grande ocorrência em terras baixas da Amazônia e América Central (ROHWER, 1993). As espécies pertencentes a esta família além de se destacarem por aspectos geográficos, também são conhecidas por suas importâncias econômicas (MARQUES, 2001), pois algumas delas têm sido utilizadas pelas indústrias de cosméticos e perfumes, nacionais e internacionais para a fabricação de diversos produtos. Além de serem ainda utilizadas pelas indústrias de alimentos, movelaria e farmacêutica (MARQUES, 2001).

Dentre os gêneros integrantes da família *Lauraceae*, destaca-se o *Aniba* por comportar espécies com grande variedade metabólica e aplicações principalmente na indústria de perfumes (ex. *Aniba rosaeodora* e *Aniba canelilla* H. B. K.). Segundo Gottlieb & Kubitzki (1981a), alcalóides benziltetrahydroisoquinólicos, tais como a (R)-reticulina, têm sido encontrados presentes em todas as espécies deste gênero, sendo considerados como marcadores. Este gênero compreende 44 espécies que foram classificadas quimiotaxonomicamente por fitoquímica clássica e taxonomicamente por intermédio de diversas características morfológicas, principalmente pela estrutura dos estames. Como resultado, houve a criação do

grupo *affinis*, agregando 15 espécies, e *guianensis*, com 26 espécies. A análise química destas espécies constatou que o grupo *affinis* se caracteriza pela produção de neolignanais, enquanto o grupo *guianensis* produz pironas (GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981a; KUBITZKI & RENNER, 1982). O agrupamento *guianensis* classificado por Kubitzki & Renner (1982), foi em seguida subdividido em 4 subgrupos, sendo eles *riparia* (4 espécies), *hypoglauca* (4 espécies), *panurensis* (14 espécies) e *canelilla* (2 espécies). A atenção é voltada ao subgrupo *panurensis*, que agrega espécies com os maiores problemas de identificação taxonômicas deste gênero. Em alguns casos, como na espécie *Aniba panurensis* (Mess) Mez, há recorrente sobreposição da morfologia floral, impossibilitando a análise taxonômica (GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981a; GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981b).

Quimicamente, encontram-se descritos para as espécies do subgrupo *panurensis* diferentes classes de metabólitos secundários encontrados nas folhas e galhos, como pironas (MORS *et al.*, 1957; GOTTLIEB & MORS, 1959; REZENDE *et al.*, 1971) alcaloides piridínicos (MORS *et al.*, 1957), alcaloides indolizidínicos (KLAUSMEYER *et al.*, 2004), alcaloides isoquinolínicos (BRAVO *et al.*, 1996), flavonoides (MORS *et al.*, 1960; COMBES *et al.*, 1970; ALELUIA *et al.*, 1978), entre outros. Estudos da composição dos óleos essenciais de folhas e galhos também são conhecidos e demonstram a existência de linalol, benzoato de benzila, salicilato de benzila, benzoato de feniletila, eugenol, metileugenol, estirilpironas, monoterpenos, e sesquiterpenos, como principais constituintes (DIAZ *et al.*, 1977; MORAIS *et al.*, 1972; REZENDE *et al.*, 1971).

Muitos estudos químicos e botânicos abordando isoladamente espécies do gênero *Aniba* podem ser encontrados nas plataformas científicas de busca *online*, assim como, revistas, jornais e livros científicos. Todavia poucos estudos de quimiometria e correlação de perfis entre as espécies deste gênero podem ser encontrados. A espécie *Aniba rosaeodora* Duck se destaca

por ser de grande importância industrial, e a falta de conhecimento quimiométrico que compare as variedades botânicas desta espécie pode reduzir a qualidade e conseqüentemente o valor comercial de seus óleos essenciais. Além disso, alguns cuidados devem ser observados, tais como, sazonalidade, área de coleta, estudos quimiométricos de amostras fixas e voláteis de diferentes partes destas plantas. Esta falta de coesão impede que conclusões sobre as diferenças dos perfis químicos das variedades de pau-rosa sejam correlacionadas, inviabilizando a diferenciação e agrupamento por meio de ferramentas estatísticas.

Considerando a necessidade de dados químicos que contribuam para um melhor entendimento das variedades botânicas pertencentes à espécie *Aniba rosaeodora* Ducke, bem como a urgência em estudar espécies vegetais em perigo de extinção e a importância na qualidade dos óleos essenciais utilizados pela indústria. Este trabalho tem por objetivo realizar estudos quimiométricos de cinco variedades botânicas de pau-rosa encontradas no município de Maués-AM. O estudo foi dividido em duas coletas. A primeira teve como intuito comparar estatisticamente os perfis químicos (*fingerprint*) de extratos etanólicos e hidroalcoólicos de folhas, galhos e cascas e frações alcaloídicas de folhas e galhos por espectrometria de massas (EM), assim como, os perfis gerados pela cromatografia gasosa (CG) dos óleos essenciais de folhas e galhos de cinco espécimes, cada um pertencente a uma variedade de pau-rosa. Na segunda coleta foi realizado um aumento no número de espécimes de cada variedade e foi feito um direcionamento para os métodos de extração e técnicas de análise mais eficientes para sua diferenciação quimiométrica por PCA e HCA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar diferenciação química de cinco variedades de *Aniba rosaeodora* Ducke, por meio da análise comparativa dos perfis cromatográfico e espectrométrico de espécimes empregados comercialmente na extração de óleos essenciais.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Selecionar espécimes e materiais botânicos em plantio comercial (Magaldi, Maués-AM);
- ✓ Determinar o melhor método de extração para a obtenção de óleos essenciais e extratos de folhas, galhos e cascas;
- ✓ Obter perfis químicos de óleos essenciais e extratos por meio de técnicas cromatográficas (CG-DIC e CG-EM) e espectrométricas (IES-EM), respectivamente;
- ✓ Utilizar técnicas estatísticas (HCA e PCA) para investigar as diferenças químicas entre as amostras.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Família *Lauraceae* Jussieu

A família *Lauraceae* é constituída majoritariamente por árvores de grande e pequeno porte, com exceção apenas da herbácea parasita *Cassytha*. Esta vasta família encontra-se dividida em 50 gêneros e possui de 2500 a 3000 espécies, as quais têm distribuição pantropical sendo representadas no sul e norte das Américas, leste da Ásia, Austrália, Madagascar e sul da África, podendo estar presentes excepcionalmente em zonas temperadas como o Chile e sul do Canadá (GOTTLIEB, 1972; ROHWER, 1993; WERFF & RICHTER, 1996; CHANDERBALL *et al.*, 2001; SOUZA, 2008). Apesar desta família ser encontrada frequentemente em florestas tropicais, algumas espécies também podem habitar áreas com grandes altitudes, contudo sua maior diversidade ocorre em terras baixas da Amazônia e América Central (ver **Figura 1**) (KUBITZKI & RENNER, 1982; ROHWER, 1993).

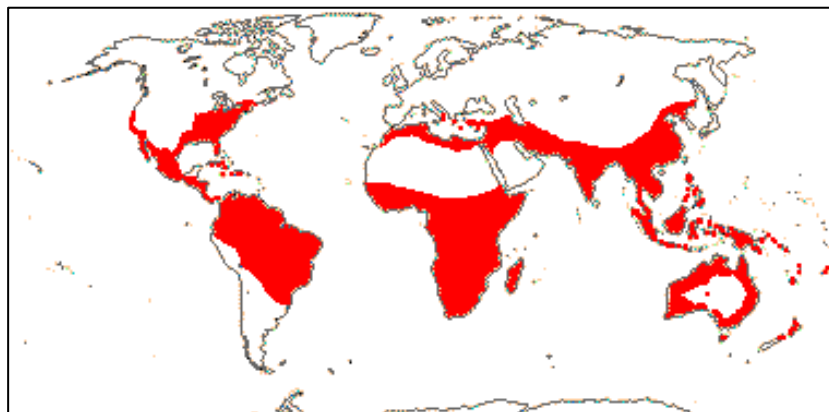


Figura 1 – Distribuição Geográfica da Família *Lauraceae*
FONTE: *Missouri Botanical Garden*

No Brasil são encontrados 25 gêneros e 400 espécies distribuídas por todo o território, sendo na floresta Amazônica uma família muito comum (SOUZA, 2008). Historicamente, é reconhecida como uma das famílias de Angiospermas mais difíceis de trabalhar do ponto de vista taxonômico (VAN DER WERFF, 1991), principalmente pela similaridade morfológica existente entre os táxons (CASTIGLIONI *apud* COUTINHO, 2006).

Muitas das espécies desta família possuem raízes, folhas, madeira e frutas aromáticas (SIMIÉ *et al.*, 2004). Espécies produtoras de óleos essenciais como o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), casca preciosa (*Aniba canelilla*) e sassafrás (*Ocotea odorifera*) são amplamente utilizadas na manufatura de produtos em indústrias de cosméticos e perfumes, nacionais e internacionais. Contudo após séculos de exploração desordenada, espécies como as citadas anteriormente estão em extinção ou próximas dela (ALCÂNTARA, 2010; FIDELIS, 2012).

Além do elevado valor agregado aos óleos essenciais, outras espécies da família *Lauraceae* também se destacam por serem amplamente utilizadas para as mais diversas finalidades. Dentre as várias aplicações, podemos citar o louro (*Laurus nobilis*) e a canela (*Cinnamomun zeylanicum* Nees) utilizados como temperos; a madeira de itaúba (*Mezilaurus itauba* (Meissn.) Taub.) na marcenaria e construção de embarcações; frutos comestíveis como o abacate (*Persea americana* Miller); gordura de sementes para produção de manteigas (*Litsea sebifera* Pers.f.); e preparo de fármacos como a cânfora (*Cinnamomun camphora* Sieb.) (GOTTLIEB, 1972; MARQUES, 2001; SIMIÉ *et al.*, 2004).

As espécies desta família possuem grande relevância quando adentramos na esfera química de seus metabólitos por serem produtoras de uma vasta gama de metabólitos secundários com atividades biológicas comprovadas (SOUZA *et al.* 2005; YAMAGUCHI *et al.* 2012; DIAZ *et al.*, 1980). Esta família tem sido reconhecida como fonte de alcaloides isoquinolínicos, indólicos e piridínicos, assim como aporfínicos, presentes na maioria das

espécies. Também relata-se a presença de lignanas, neolignanas, flavonoides, compostos nitro derivados, benzoil ésteres, pironas, benzofenonas, ácidos graxos, monoterpenos e sesquiterpenos (GOTTLIEB *et al.*, 1959; GOTTLIEB, 1972; HAYASHI & KOMAE, 1978; ANDRADE *et al.*, 1980; TREVISAN *et al.*, 1984; BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987; ROSSI *et al.*, 1997; SIMIÉ *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2008).

3.1.1 O gênero *Aniba* Aublet

As espécies pertencentes ao gênero *Aniba* estão principalmente distribuídas em áreas de terras baixas com centro de diversidade na Amazônia Central e Guiana. No entanto, elas estendem-se aos Andes, montanhas ao norte da Venezuela, pequenas Antilhas, e leste e sul do Brasil (GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981b).

O gênero *Aniba* compreende 44 espécies entre arbustos e árvores. Sua classificação taxonômica foi realizada por intermédio de caracterizações morfológicas, onde se levou em consideração principalmente a estrutura dos estames. Como resultado, houve a criação dos grupos *affinis*, agregando 15 espécies, e *guianensis*, com 26 espécies. Além de aspectos morfológicos, estes dois grupos também podem ser diferenciados por sua capacidade de produzir metabólitos secundários, pois o grupo *affinis* é caracterizado pela produção de neolignanas (**Figura 2**), enquanto o grupo *guianensis* produz pironas (**Figura 3**) (GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981a; KUBITZKI & RENNER, 1982). Portanto, observa-se o importante papel da quimiotaxonomia na classificação deste gênero.

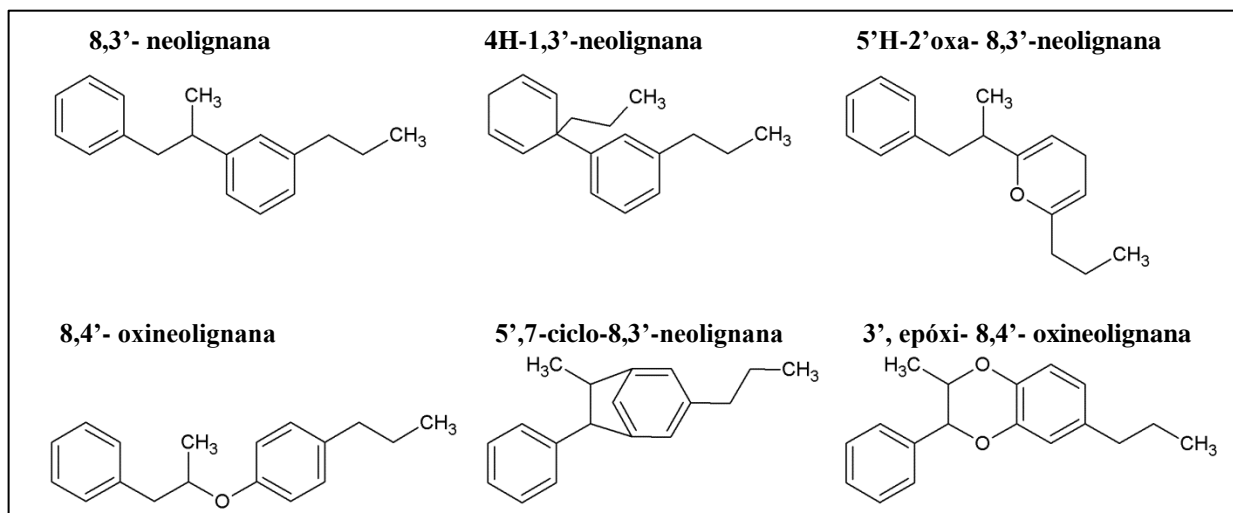


Figura 2 – Algumas estruturas de neolignanas encontradas em espécies do gênero *Aniba*
 FONTE: Adaptado de GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981a

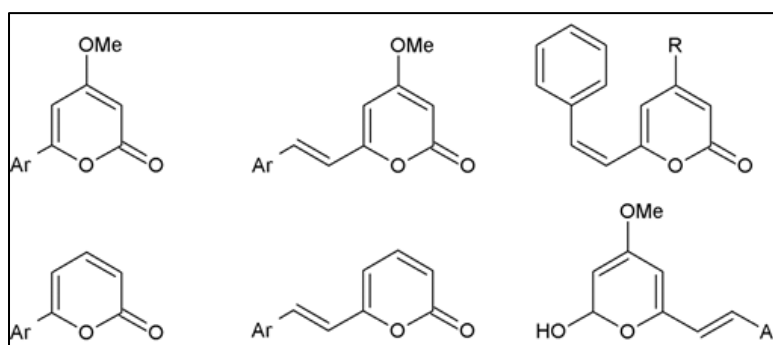


Figura 3 – Algumas estruturas de pironas encontradas em espécies do gênero *Aniba*
 FONTE: Adaptado de GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981a

Segundo Gottlieb & Kubitzki (1981a), a rota biosintética do chiquimato que leva a formação dos compostos benziltetrahidroisoquinolínicos e benzil benzoatos são ubíquos no gênero *Aniba*. O ácido cinâmico 3,4-dioxigenado (**Figura 4**), entretanto, constitui um ponto de bifurcação nas reações derivadas do ácido chiquímico, podendo levar, tanto a produção de neolignanas pela via propenil e alilfenóis, quanto pironas, benzofenonas e flavonoides pela condensação com unidades de acetato (**Figura 4**).

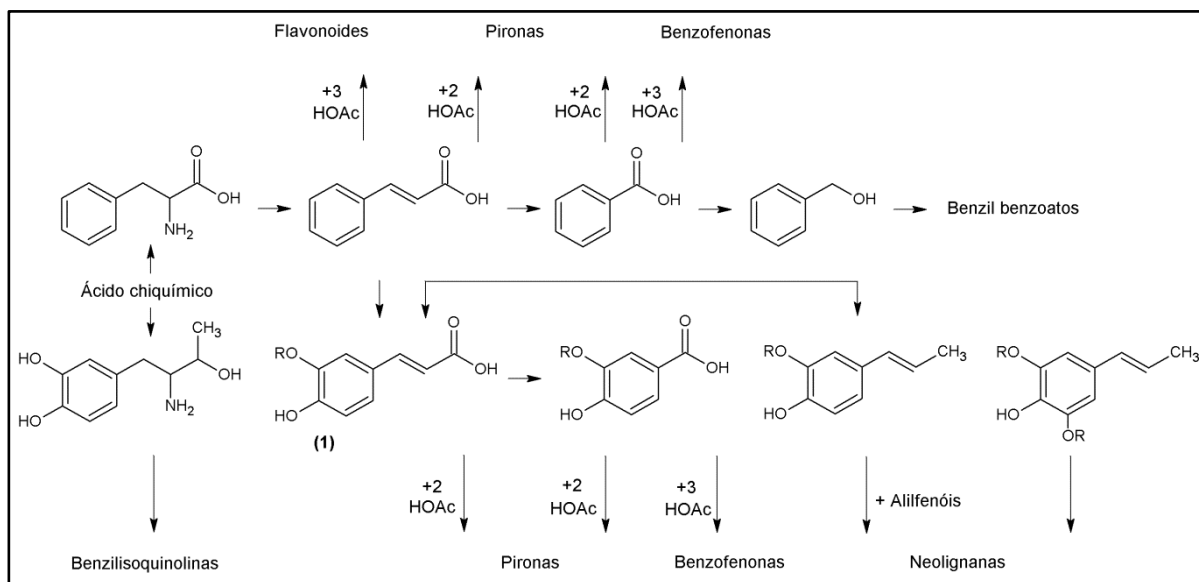


Figura 4 – Rota metabólica das classes de compostos encontrados em espécies de *Aniba*
 FONTE: Adaptado de GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981a

O agrupamento *guianensis*, classificado por Kubitzki & Renner (1982), foi em seguida subdividido em 04 subgrupos, sendo eles: *riparia*, *hypoglauca*, *panurensis* e *canelilla* (**Quadro 1**). Entretanto, a problemática é encontrada quando se começa a analisar as espécies do subgrupo *panurensis*.

Grupo <i>affinis</i>	Grupo <i>guianensis</i>
<i>A. affinis</i> (Meisn.) Mez	<i>A. guianensis</i> Aubl.
<i>A. citrifolia</i> (Nees) Mez	<i>A. megaphylla</i> Mez
<i>A. burchellii</i> Kosterm.	<i>A. pedicellata</i> Kosterm.
<i>A. lancifolia</i> Kubitzki & W. Rodrigues	<i>A. ramageana</i> Mez
<i>A. terminalis</i> Ducke	
<i>A. taubertiana</i> Mez	Subgrupo <i>riparia</i>
<i>A. excelsa</i> Kosterm.	<i>A. venezuelana</i> Mez
<i>A. ferruginea</i> Kubitzki	<i>A. riparia</i> (Nees) Mez
<i>A. williamsii</i> O.C. Schmidt	<i>A. kappleri</i> Mez
<i>A. bracteata</i> (Nees) Mez	<i>A. puchury-minor</i> (Mart.) Mez
<i>A. hostmanniana</i> (Nees) Mez	
<i>A. desertorum</i> (Nees) Mez	Subgrupo <i>hypoglauca</i>
<i>A. robusta</i> (Klotzsch & H. Karst.) Mez	<i>A. hypoglauca</i> Sandwith
<i>A. intermedia</i> (Meisn.) Mez	<i>A. vaupesiana</i> Kubitzki
<i>A. jenmanii</i> Mez	<i>A. perutilis</i> Hemsl.
<i>A. vulcanicola</i> van der Werff	<i>A. santalodora</i> Ducke
	Subgrupo <i>panurensis</i>
	<i>A. panurensis</i> (Meisn.) Mez
	<i>A. rosaeodora</i> Ducke
	<i>A. percoriacea</i> C.K. Allen
	<i>A. muca</i> (Ruiz & Pav.) Mez
	<i>A. cinnamomiflora</i> C.K. Allen
	<i>A. parviflora</i> (Meisn.) Mez
	<i>A. novo-granatensis</i> Kubitzki
	<i>A. cylindriflora</i> Kosterm.
	<i>A. permollis</i> (Nees) Mez
	<i>A. heringeri</i> Vattimo-Gil
	<i>A. firmula</i> (Nees & Mart.) Mez
	<i>A. coto</i> (Rusby) Kosterm.
	<i>A. pilosa</i> van der Werff
	<i>A. heterotepala</i> van der Werff
	Subgrupo <i>canelilla</i>
	<i>A. canelilla</i> (Kunth) Mez
	<i>A. ferrea</i> Kubitzki

Quadro 1 – Subdivisões das espécies pertencentes ao gênero *Aniba*
 FONTE: Segundo GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981a

3.1.2 Subgrupo *panurensis* e suas características químicas

O subgrupo *panurensis* é constituído por 14 espécies (**Quadro 1**). A delimitação destas espécies não está clara, principalmente entre *Aniba panurensis* (Meisn.) Mez, *Aniba firmula* (Nees & Mart.) Mez, *Aniba parviflora* (Meisn.) Mez, *Aniba rosaeodora* Ducke, *Aniba*

cylindriflora Kosterm, *Aniba heringeri* Vattimo-Gil e *Aniba coto* (Rusby) Kosterm. Morfologicamente, essas espécies podem ser diferenciadas por características das flores, bem como ocasionalmente pelos frutos. Entretanto, a recorrente sobreposição da morfologia floral em alguns casos impossibilita a análise taxonômica (GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981a). Desta maneira, inúmeros indivíduos ficam sem identificação, são identificados de forma equivocada ou até mesmo classificados como novas espécies. Estas dificuldades taxonômicas muitas vezes tendem a gerar uma enorme desconfiança quanto à veracidade da identificação botânica de indivíduos utilizados em trabalhos científicos publicados até hoje.

Aniba panurensis é corriqueiramente confundida com outras espécies, tais como *Aniba firmula* e *Aniba cylindriflora*, pois além da grande sobreposição de caracteres é muito difícil separar material estéril e diferenciar os frutos (KOSTERMANS, 1938). *Aniba panurensis* já foi empregada com sinônimo de *Aniba firmula* e apesar de já terem sido morfologicamente divididas como espécies diferentes (KUBITZKI & RENNER, 1982), uma ainda continua sendo empregada como sinônimo da outra (www.tropicos.org, acessado em fevereiro de 2014).

A dificuldade taxonômica abrange as demais espécies do complexo. *Aniba rosaeodora* apresenta variação morfológica interligada com a distribuição geográfica, estando descritas *Aniba rosaeodora* var. *amazonica* e *Aniba duckei* Kosterm, consideradas sinônimos de *Aniba rosaeodora* (www.tropicos.org, acessado em fevereiro de 2014; KUBITZKI & RENNER, 1982).

3.1.2.1 Pironas

As espécies pertencentes a este subgrupo são comumente caracterizadas por serem produtoras de pironas. Como pode ser observado na **Figura 5**, as moléculas conhecidas como 2-pironas (ou α -pironas) são constituídas basicamente por um anel pirano, possuindo no carbono vizinho ao oxigênio heteroátomo uma dupla ligação com um átomo de oxigênio, podendo estar associado com os substituintes aril ou estiril e também a presença ou ausência de um grupo metoxil (GOTTLIEB, 1972).

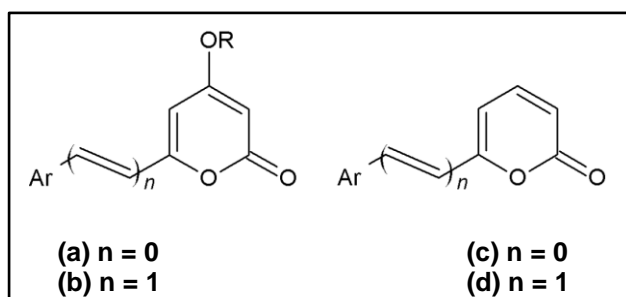


Figura 5 – Esqueletos de pironas encontradas em espécies do subgrupo *panurensis*
FONTE: Adaptado de GOTTLIEB, 1972

De acordo com Gottlieb (1972), os principais esqueletos encontrados nestas espécies de *Aniba* estão exemplificados na **Figura 5**, sendo exclusivas para este gênero as estruturas (a), (c) e (d). Diversos trabalhos sobre o isolamento fitoquímico desta variedade de metabólito secundário já foram relatadas na literatura e os nomes de algumas moléculas bem como a referência aos autores encontram-se descritas no **Quadro 2**.

Moléculas	Autores
4-metóxi-6-pireronil- α -pirona	MORS <i>et al.</i> , 1957
4-metóxi-6-(β -estiril)- α -pirona	GOTTLIEB & MORS, 1959
4-metóxi-6-piperonil- α -pirona	MORS <i>et al.</i> , 1957; GOTTLIEB & MORS, 1959
4-metóxi-6-fenil- α -pirona	GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1959
6-estiril- α -pirona	
6-(4'-hidróxi-3'-metóxiestiril)- α -pirona	GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1964
6-(3',4'-metilenodióxiestiril)- α -pirona	
6-(4'-hidróxiestiril)- α -pirona	
6-(3',4'-dihidróxiestiril)- α -pirona	REZENDE <i>et al.</i> , 1971
<i>cis</i> -6-estiril- α -pirona	
6-(4'-hidróxi- <i>trans</i> -estiril)- α -pirona	
6-(3',4'-dihidróxi- <i>trans</i> -estiril)- α -pirona	REZENDE <i>et al.</i> , 1971

Quadro 2 – Pironas encontradas em espécies do subgrupo *panurensis*

3.1.2.2 Alcaloides

Os alcaloides constituem um grande grupo com mais de 15.000 metabólitos secundários nitrogenados, encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas vasculares. São sintetizados a partir de um ou poucos aminoácidos comuns (sobretudo a lisina, tirosina e triptofano) (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Dewick (2002) mostra que a classificação desses compostos pode ocorrer de acordo com a sua origem biossintética, ou seja, de acordo com a estrutura que contém nitrogênio em pirrolidino, piperidino, quinolino, indol, etc., embora a complexidade estrutural de alguns rapidamente expanda o número de subdivisões.

Dentre os alcaloides que já foram encontrados e descritos nestas espécies estão os benziltetrahidroisoquinolínicos como a (R)-reticulina (GOTTLIEB & KUBITZKI, 1981b), piranozídicos como a 4-metóxi-6-(3'-piril)- α -pirona, conhecida como anibina (MORS *et al.*,

1957), além de alcaloides indólicos como a 6,8-dideca-(1Z)-enil-5,7-dimetil-2,3-dihidro-1H-indolizidínico (KLAUSMEYER *et al.*, 2004).

3.1.2.3 Flavonoides

Os flavonoides compreendem uma classe de metabólitos secundários de baixo peso molecular, largamente distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores de plantas. Nas plantas, essas substâncias têm a função de proteção contra radiação ultravioleta, contra a ação de patógenos e herbivoria (HEIM *et al.*, 2002). Dentre as moléculas que já foram isoladas para as espécies pertencentes ao subgrupo *panurensis*, podemos citar a rubranina (COMBES *et al.*, 1970; MONTERO & WINTERNITZ, 1972), (-)-rubranina (ALELUIA *et al.*, 1978) e pinocembrina (GOTTLIEB & MORS, 1959).

3.1.2.4 Benzofenonas

Outra classe de metabólitos identificados no subgrupo *panurensis* são as benzofenonas, sendo exemplos delas a 2,6,4-trihidróxi-4-metóxi-benzofenona (GOTTLIEB & MORS, 1959) e a 2,6-dihidróxi-4-metóxi-benzofenona (JOBST & HESSE, 1879).

3.2 Análise instrumental

3.2.1 Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC)

A cromatografia em fase gasosa é uma técnica que permite a separação de substâncias volatilizáveis para sua posterior identificação por meio das informações de tempos de retenção de cada substância eluída ou de outras características. As substâncias separadas são observadas com detectores em espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de infravermelho (IV). Esta separação baseia-se na distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária sólida ou líquida e uma fase móvel gasosa. O princípio deste equipamento baseia-se na eluição de uma amostra vaporizada que é inserida rapidamente na corrente de gás, sendo arrastada por meio da coluna. Na cromatografia gás-sólido, a fase estacionária é um sólido com uma grande área superficial que ao interagir com a amostra separa as substâncias por adsorção. Após as substâncias separadas chegarem ao detector, um sinal é enviado para o sistema de registro e tratamento dos dados (AQUINO NETO *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).

O princípio da detecção pelo detector de ionização com chama (DIC) é o de que a mistura do efluente da coluna, juntamente com o hidrogênio é queimado ao ar, produzindo uma chama de 2.100 °C, com energia suficiente para ionizar as moléculas do soluto que tenham potenciais de ionização baixos, formando um plasma. As espécies iônicas são coletadas por eletrodos e geram uma corrente (iônica) elétrica da ordem de 10^{-14} A. A corrente é ampliada e enviada para o sistema de registro que tem o papel de converter a corrente em linha de base do detector. O detector DIC é considerado quase universal na cromatografia em fase gasosa de

compostos orgânicos e vasta aplicabilidade devido à sua elevada sensibilidade, alta estabilidade e resposta rápida (AQUINO NETO *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).

3.2.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

O CG-EM é constituído por um cromatógrafo, usualmente com coluna capilar, uma interface para ligação dos dois sistemas, uma câmara de ionização onde os íons são formados, uma câmara mantida sob vácuo onde ocorre a separação destes e um sistema para a detecção dos íons, acoplado a um sistema de registro com um programa para a interpretação dos dados obtidos (COLLINS *et al.*, 2006).

A maioria dos sistemas CG-EM “de bancada”, são constituídas por um analisador de massa quadrupolar que tipicamente tem um limite de m/z entre 0 a 1.000. Este analisador é composto de quatro barras sólidas paralelas na direção do feixe de íons. As barras devem ter seção transversal hiperbólica, embora seja possível utilizar barras cilíndricas. Uma voltagem de corrente contínua (CC) e uma radiofrequência (RF) são aplicadas às barras. Dependendo da razão entre a amplitude da RF e a voltagem CC, os íons oscilam nesse campo eletrostático. Íons de m/z pequena demais ou grande demais passam por uma oscilação estável de amplitude constante e pelos eixos do quadrupolo com uma trajetória do tipo “saca-rolhas” e são direcionados ao analisador para chegar ao detector. O detector de um típico espectrômetro de massas é composto de um contador que produz uma corrente proporcional ao número de íons que o atingem. Espectrômetros de massa de quadrupolo são instrumentos de baixa resolução ($R \sim 3.000$), incapazes de produzir uma composição elementar exata da amostra. O analisador

quadrupolar de massa com armadilha de íons opera de modo semelhante ao quadrupolo linear e é com frequência encontrado em instrumentos CG-EM, pois enquanto no quadrupolo linear, íons com diferentes valores de m/z podem atravessar o quadrupolo, um de cada vez, na armadilha de íons, os íons de todos os valores m/z estão na armadilha ao mesmo tempo. Analisadores de massa com armadilha de íons são mais sensíveis que instrumentos de quadrupolo lineares, mas tem capacidade de resolução semelhantes (PAVIA *et al.*, 2010).

3.2.3 Espectrometria de massas (EM) com fonte de ionização *electrospray* (IES)

De maneira geral, os espectrômetros de massa possuem cinco componentes estruturais. O primeiro componente é a unidade de entrada da amostra, que conduz a amostra do ambiente laboratorial (1 atm) para um ambiente de pressão mais baixa dentro do equipamento. As pressões dentro do espectrômetro de massa vão de alguns poucos milímetros de mercúrio em uma fonte de ionização química até alguns micrometros de mercúrio nas regiões do analisador de massa e do detector do instrumento. A unidade de entrada da amostra conduz à fonte de íons, onde as moléculas são convertidas em íons em forma de gás e são acelerados por um campo eletromagnético. Em seguida, o analisador de massa separa os íons da amostra tendo como base sua razão massa/carga (m/z). Os íons são, então, contados pelo detector e o sinal é registrado e processado pelo sistema de dados, em geral um computador. O produto do sistema de dados é o espectro de massa – um gráfico do número de íons detectados como uma função de sua m/z (PAVIA *et al.*, 2010)

Na técnica de impacto de elétrons (IE) um espectrômetro de massas bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado como

um espectro de íons separados na base da m/z . Grande parte dos íons formados possui carga unitária. O espectro de massa de uma amostra é visualizado por meio de um gráfico de abundância produzido por computador (intensidade dos picos verticais) *versus os íons* (SILVESTEIN & WEBSTER, 2000).

3.3 Análise estatística para correlação de perfis

A estatística multivariada aplicada à química é usualmente empregada no tratamento de dados analíticos, permitindo a obtenção de mais informações de técnicas instrumentais quando comparada com os procedimentos univariados que são comumente empregados (SHARAF *et al.*, 1986; BEEBE *et al.*, 1997). Esta área da quimiometria é responsável pelo desenvolvimento de ferramentas computacionais que viabilizem a exploração dos resultados obtidos por meio de análises químicas, com o intuito de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química (CORREIA & FERREIRA, 2007).

Dentre estas técnicas estatísticas, pode-se destacar a análise por agrupamento hierárquico (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) e a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Partial Components Analysis*). Por meio delas é possível realizar a análise gráfica de todo o conjunto de dados, ainda que a quantidade de amostras e variáveis seja elevada. O objetivo principal da aplicação destes algoritmos é aumentar o entendimento acerca de um conjunto de dados, constatando a presença ou ausência de agrupamentos naturais entre amostras. Tanto as técnicas de HCA quanto PCA são classificadas como exploratórias ou não

supervisionadas, tendo em vista que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração (SHARAF *et al.*, 1986).

A visualização dos resultados experimentais na forma de gráficos facilita a interpretação dos dados, tendo em vista que o ser humano é portador de um potente sistema visual de reconhecimento de padrões. Por esta razão, a identificação de grupos de amostras com características semelhantes é quase imediata quando se utiliza HCA e PCA. Além disso, também é possível constatar quais dos parâmetros analisados são os principais responsáveis pela formação dos grupos de amostras (CORREIA & FERREIRA, 2007).

Tradicionalmente etapas podem ser executadas para conduzir as análises estatísticas. Algumas delas são: definir o problema, organizar os dados, verificar a validade dos dados, transformações/pré-processamento dos dados, análise exploratória, criação do modelo, examinar os resultados, validar o modelo, entre outras (BEEBE *et al.*, 1998; BRERETON, 2009).

A etapa de definição do problema é onde as perguntas iniciais são feitas e o problema em questão é sedimentado. A leitura e pesquisa de estudos similares já realizados na literatura contribui para a escolha correta das técnicas experimentais a serem utilizadas, bem como métodos de análise e o tipo de dados que devem ser coletados.

A organização dos dados é uma etapa fundamental no reconhecimento e análise dos dados pelo *software*. Nesta etapa surgem questionamentos sobre as unidades de medida dos valores, se os dados pertencem a um único instrumento, entre outras.

De modo geral, tem-se que cada amostra corresponde a uma linha na matriz de dados e seus elementos são os valores das variáveis medidas (ver **Equação 1**).

$$\mathbf{x}_i^T = [x_{i1} \ x_{i2} \ x_{i3} \ \dots \ x_{ij}] \quad (1)$$

Cada coluna \mathbf{x}^j corresponde a uma variável independente, ou seja, uma medida j realizada para todas as amostras (ver **Equação 2**).

$$\mathbf{x}^j = \begin{bmatrix} x_{1j} \\ x_{2j} \\ x_{3j} \\ \dots \\ x_{lj} \end{bmatrix} \quad (2)$$

Para a realização das análises estatísticas no *software*, o operador deve selecionar o conjunto de métodos de análise. Inicia-se selecionando os algoritmos desejados, podendo ser PCA, HCA, KNN, PCR, PLS etc. Em seguida, edita-se os parâmetros do algoritmo escolhido (pré-processamento e rotação, no caso de PCA), aplica-se transformações aos valores tabelados caso necessário, como primeira e segunda derivada, correção da linha de base, logaritmo de base 10, normalização, alisamento (*smooth*) etc. Em cromatografia, a normalização é empregada para correção de efeitos da variação dos volumes de injeção das amostras (HOWE *et al.*, 1981).

Por meio da análise estatística de PCA é possível observar as substâncias (*loadings*) responsáveis pelos agrupamentos de cada amostra (*scores*) analisada. Os gráficos são delimitados por três eixos, onde cada um está descrito como um fator, sendo os eixos $x =$ fator 1, $y =$ fator 2 e $z =$ fator 3. A tendência com que cada substância tem de se deslocar no sentido de um fator está diretamente ligada com a abundância desta substância em relação às demais. Já o deslocamento das amostras no sentido dos fatores está interligado com a influência que cada uma das substâncias tem sobre elas. Desta maneira quanto mais as substâncias se encontram próximas umas das outras nos gráficos de *loadings*, mais semelhantes são suas influências sobre as amostras nos gráficos de *scores*.

De maneira complementar os HCA avalia a distância entre todas as amostras e apresenta essas informações na forma de um gráfico em duas dimensões, conhecido como dendrograma (BEEBE *et al.*, 1998).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Coleta do material vegetal

Os materiais vegetais de folhas, galhos e cascas dos espécimes de pau-rosa foram gentilmente cedidos pela empresa de extração de óleos essenciais Magaldi, a qual encontra-se situada em Maués, município do interior do estado do Amazonas (Brasil).

As coletas foram realizadas em duas etapas. A primeira foi realizada em julho de 2014, na qual foram coletados folhas, galhos e cascas de cinco espécimes de pau-rosa, cada um pertencente a uma variedade como mostra o **Quadro 3**.

Nome popular	Códigos de Identificação	Localização (GPS)
<i>Pau-rosa imbaúba</i>	P1	S03°24.323' W057°42.140'
<i>Pau-rosa louro</i>	P2	S03°24.307' W057°42.116'
<i>Pau-rosa tucuribá</i>	P3	S03°24.295' W057°42.179'
<i>Pau-rosa abacate</i>	P4	S03°24.343' W057°42.190'
<i>Pau-rosa preciosa</i>	P5	S03°24.237' W057°42.278'

Quadro 3 – Informações geográficas da primeira coleta

Todo material desta coleta foi limpo e uma parte do material de folhas foi armazenado em *freezer* convencional para se manter fresco. Os galhos, cascas e a outra parte das folhas foram secos à temperatura ambiente até massa constante e, em seguida, triturados em moinho

de seis facas contendo peneira, armazenados em sacos de papel que foram envoltos por um saco plástico e acondicionados em *freezer* convencional.

A segunda coleta foi realizada em novembro de 2014, na qual foram obtidos folhas e galhos de cinco espécimes de cada variedade (incluindo os cinco espécimes obtidos na primeira coleta) totalizando vinte e cinco árvores (ver **Quadro 4**).

Nome popular	Códigos de Identificação	Localização (GPS)	
<i>Pau-rosa imbaúba</i>	P1 – I	S03°24.323'	W057°42.140'
	P1 – II	S03°24.315'	W057°42.128'
	P1 - III	S03°24.371'	W057°42.104'
	P1 - IV	S03°24.353'	W057°42.093'
	P1 – V	S03°24.328'	W057°42.136'
<i>Pau-rosa louro</i>	P2 – I	S03°24.307'	W057°42.116'
	P2 – II	S03°24.285'	W057°42.279'
	P2 - III	S03°24.295'	W057°42.055'
	P2 - IV	S03°24.295'	W057°42.064'
	P2 – V	S03°24.285'	W057°42.280'
<i>Pau-rosa tucuribá</i>	P3 – I	S03°24.295'	W057°42.179'
	P3 - II	S03°24.297'	W057°42.183'
	P3 - III	S03°24.284'	W057°42.167'
	P3 - IV	S03°24.301'	W057°42.190'
	P3 - V	S03°24.287'	W057°42.192'
<i>Pau-rosa abacate</i>	P4 – I	S03°24.343'	W057°42.190'
	P4 - II	S03°24.340'	W057°42.185'
	P4 - III	S03°24.351'	W057°42.184'
	P4 - IV	S03°24.350'	W057°42.184'
	P4 - V	S03°24.361'	W057°42.175'
<i>Pau-rosa preciosa</i>	P5 – I	S03°24.237'	W057°42.278'
	P5 - II	S03°24.227'	W057°42.274'
	P5 - III	S03°24.228'	W057°42.263'
	P5 - IV	S03°24.229'	W057°42.260'
	P5 - V	S03°24.258'	W057°42.293'

Quadro 4 – Informações geográficas da segunda coleta

Os materiais vegetais de folhas e galhos obtidos na segunda coleta foram destinados apenas para a obtenção de amostras secas, seguindo o mesmo procedimento de limpeza, secagem, trituração e armazenagem descritos para as amostras da primeira coleta.

A primeira parte desta pesquisa foi o estudo comparativo dos perfis cromatográficos e composições dos óleos essenciais de folhas e galhos, portanto procedimentos de extrações diferentes foram aplicados para cada grupo de materiais conforme a coleta e a especificidade da análise. A **Figura 6** representa um fluxograma envolvendo as etapas pelas quais as amostras da primeira e segunda coletas foram submetidas para a obtenção dos óleos essenciais.

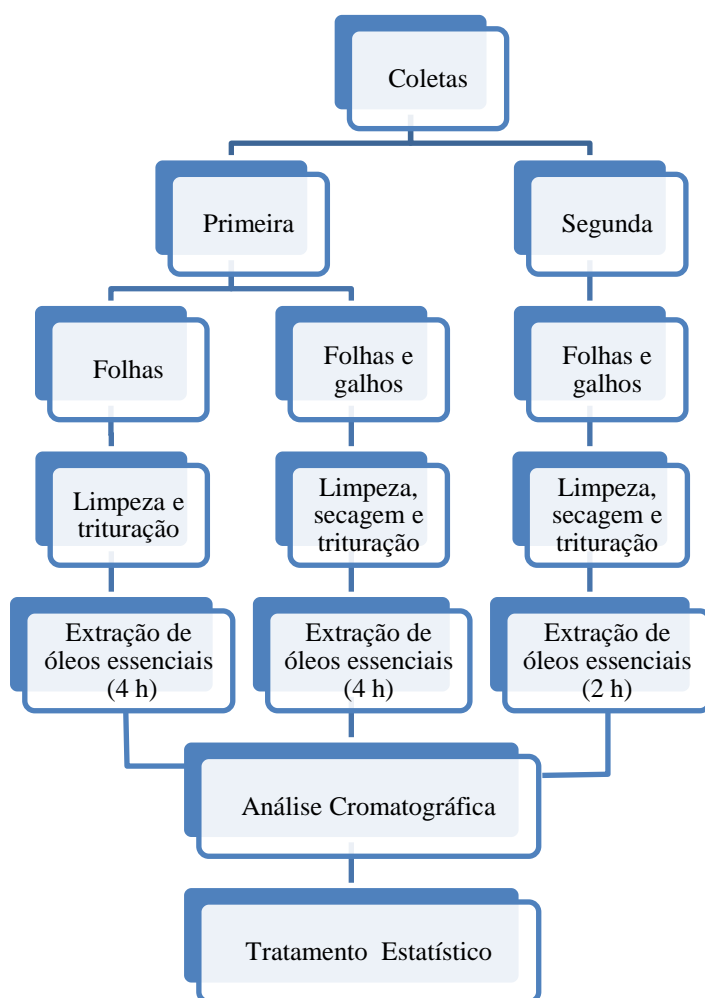


Figura 6 – Fluxograma das etapas realizadas no preparo de amostra de óleos essenciais até as análises cromatográficas e tratamento estatístico

A segunda parte desta pesquisa foi o estudo comparativo dos perfis espectrométricos dos extratos de folhas galhos e cascas. A **Figura 7** representa um fluxograma envolvendo todas as etapas metodológicas pelas quais os materiais vegetais de folhas, galhos e cascas obtidos na primeira e segunda coleta foram submetidos.

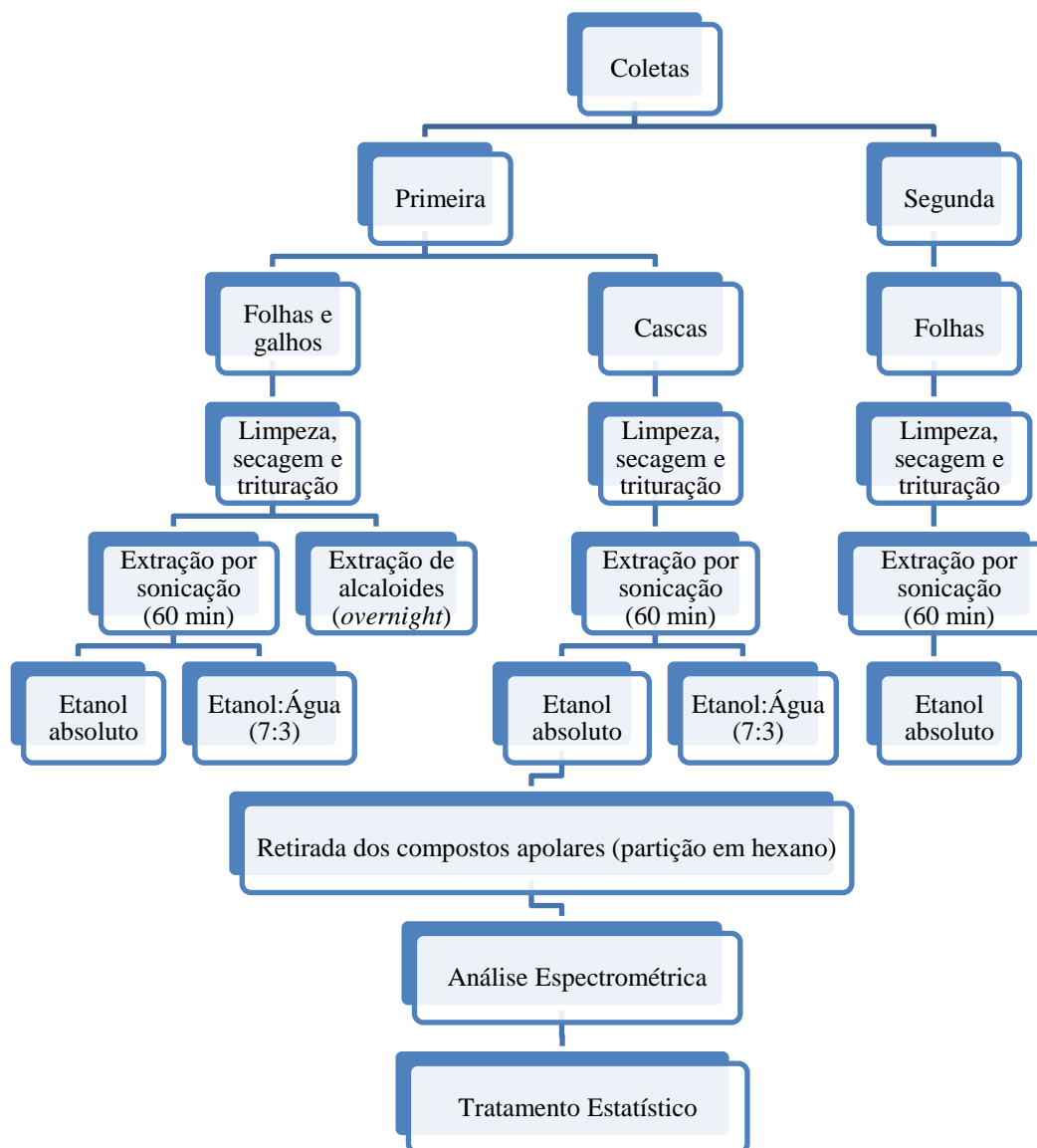


Figura 7 – Fluxograma das etapas realizadas no preparo de amostra de extratos etanólicos, hidroalcoólicos e alcaloídicos até a análise espectrométrica e tratamento estatístico

4.2 Métodos de extração

Foram utilizados quatro métodos de extração: sonicação (ultrassom) com etanol e etanol:água 7:3, extração específica para alcaloides (SOARES *et al.*, 2015) para obtenção de amostras fixas e extração de óleo essencial por hidrodestilação com aparelho Clevenger para obtenção de amostras voláteis. Estes quatro métodos foram aplicados aos materiais de folhas e galhos da primeira coleta, contudo as cascas desta coleta foram submetidas apenas aos dois métodos de sonicação. Para os materiais de folhas e galhos obtidos na segunda coleta foram aplicados o método de extração por sonicação em etanol e o método de extração de óleo essencial.

4.2.1 Extração de óleos essenciais

Em um balão com fundo redondo de 1 L foram adicionados aproximadamente 30 mg de material vegetal triturado, pedras de porcelana e 500 mL de água destilada. Em seguida, o balão foi colocado em uma manta de aquecimento adequada para o volume do mesmo. O Clevenger foi encaixado no balão e, com auxílio de garras e um suporte universal, o sistema foi nivelado e fixado. O suficiente de água destilada foi adicionado, com auxílio de um pissete, pela entrada lateral do Clevenger e, simultaneamente, a torneira foi ajustada de modo que o líquido adicionado pudesse preencher o canal de conexão entre entrada e saída do Clevenger. Em seguida, o sistema foi arrefecido com o auxílio de um sistema de refrigeração, no qual foi conectado ao condensador do Clevenger. A potência da manta foi ajustada até a temperatura do ponto de ebulição da água (100 °C) e o tempo de duração da extração foi contado a partir da

queda da primeira gota de líquido ebulido. Para os materiais da primeira coleta, a extração durou 4 h, contudo, para os materiais da segunda coleta, o tempo de duração foi reduzido para 2 h. Apenas as extrações dos óleos essenciais da segunda coleta foram realizadas em duplicata. Ao término do procedimento, o óleo foi separado do hidrolato, seco com Na₂SO₄ (anidro), pesado e armazenado em *freezer* convencional até o momento da análise.

4.2.2 Extração por sonicação

Para realização deste método, a proporção de 1:10_(m/v) foi empregada como padrão nas extrações etanólicas e hidroalcoólicas. As extrações concernentes à primeira coleta foram realizadas em frasco âmbar com capacidade para 100 mL, sendo adicionados aproximadamente 5 g do material vegetal e, em seguida, 50 mL de etanol. O frasco foi tampado com papel alumínio e permaneceu em aparelho de ultrassom (sonicador) por 60 min com intervalos a cada 20 min para filtragem e adição de 50 mL de etanol. Após os três intervalos foi obtido um extrato com 150 mL, o qual foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, deixado em capela para secagem do solvente residual e tendo sua massa final aferida para o cálculo de rendimento. A extração utilizando a mistura dos solventes etanol e água, na proporção 7:3_(v/v), em substituição ao etanol absoluto, seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente, contudo, após sua permanência na capela, o extrato foi deixado em dessecador até a eliminação da água presente e teve sua massa aferida. Em seguida, foi realizada a etapa de desengraxe das amostras. Aproximadamente 1 mg de cada extrato foi dissolvido em 5 mL de uma mistura de metanol e água na proporção 8:2_(v/v) e foi submetido a partição com 5 mL de hexano por três vezes em tubos de ensaio de 25 mL. A agitação foi realizada com auxílio de um *vortex* e após

cada partição a fase hexânica foi retirada com auxílio de pipetas de Pasteur. Ao término foram obtidos extratos em metanol: água e em hexano com 15 mL cada. Todos os extratos foram secos em evaporador rotatório, posteriormente em dessecador e por fim as massas das frações foram aferidas.

As extrações etanólicas das folhas da segunda coleta foram realizadas seguindo as etapas de sonicação, filtração, concentração, desengraxe e secagem descritos anteriormente, contudo, os extratos foram produzidos em escala reduzida para tubos de ensaio de 25 mL. Desta maneira, a massa utilizada foi de 500 mg e o volume de solvente foi de 5 mL, mantendo a proporção de 1:10_(m/v). Como produto dessa etapa foi obtido um extrato etanólico com volume de 15 mL.

4.2.3 Extração das frações alcaloídicas

A extração do material vegetal triturado de folhas e galhos foi realizado utilizando a metodologia adaptada de Soares *et al* (2015). Foram pesados aproximadamente 5 g de material vegetal de folhas e galhos, os quais foram submetidos à maceração (*overnight*) com 30 mL de NH₄OH 10 % e 50 mL de CH₂Cl₂. A fase orgânica foi transferida para um funil de separação e extraída duas vezes com solução de ácido acético 10 %, correspondendo a duas partições com 15 mL. Em seguida o pH da fase aquosa ácida obtida foi ajustado com NH₄OH (concentrado) até pH 10 e extraída com 50 mL de CH₂Cl₂. Após a eliminação do solvente por meio de um evaporador rotatório as frações alcaloídicas tiveram suas massas aferidas.

4.3. Análises Instrumentais

4.3.1 Espectrometria de Massas. A técnica EM-IES

As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas situado na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massas (Thermo, modelo LCQ-*Fleet*), com fonte de ionização *electrospray* (IES) e detector do tipo *Ion-Trap* (IT). O preparo de amostra foi realizado solubilizando a amostra em metanol (grau CLAE) e diluídos a uma concentração de 10 ppm. As amostras foram injetadas em espectrômetro de massas com uma taxa de fluxo de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$. As avaliações do perfil químico dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos foram executadas no modo negativo de ionização ($[\text{M}-\text{H}]^{-}$) e os espectros foram obtidos na faixa de m/z 100 a 1000, com voltagem da fonte de 4,9 kV, temperatura do capilar de 280 °C e voltagem do capilar de 26 V. Para a avaliação do perfil químico das frações alcaloídicas, foram realizados os mesmos procedimentos descritos acima, entretanto, as análises foram executadas no modo positivo de ionização ($[\text{M}+\text{H}]^{+}$). Para as fragmentações dos íons, as condições utilizadas foram as mesmas descritas acima, apenas com variação de energia de colisões para cada íon.

4.3.2 Análises Cromatográficas

4.3.2.1 Cromatografia gasosa (CG) com detector de ionização com chama (DIC)

Os óleos essenciais de folhas frescas, folhas secas e galhos secos, tanto da primeira coleta quanto da segunda coleta, foram pesados em torno de 4 mg e q.s.p. 1 mL com acetato de etila (grau CLAE). As análises foram realizadas por meio do cromatógrafo à gás (CG), marca Shimadzu[®], modelo GC-2010, coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com detector de ionização em chama (DIC), no qual o gás hélio foi empregado como gás de arraste em fluxo de 1 mL min⁻¹. A injeção foi em modo *Split* (1:20), temperatura do injetor à 250 °C, e o forno programado à temperatura de 60 °C até 180 °C, com incremento de 3 °C min⁻¹ e, em seguida, de 180 °C até 250 °C, com incremento de 20 °C min⁻¹ (43,5 min de análise por amostra). Os padrões externos utilizados para a obtenção dos índices de retenção foram uma mistura de hidrocarbonetos lineares, injetados nas mesmas condições operacionais do equipamento.

4.3.2.2 Cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massas (EM-ESI)

Foram submetidas à esta análise três amostras de perfis diferenciais, onde foi pesado aproximadamente 1 mg de cada óleo essencial e q.s.p. 1 mL com acetato de etila (grau CLAE). As análises foram realizadas por meio de cromatógrafo à gás (CG) acoplado a um espectrômetro de massas (EM), marca Shimadzu[®], modelo GCMS-QP 2010 plus, coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), no qual o gás hélio foi empregado como gás de arraste em fluxo de 2 mL

min⁻¹. A injeção foi em modo *Split* (1:10), temperatura do injetor à 200 °C, e o forno programado à temperatura de 60 °C até 180 °C, com incremento de 3 °C min⁻¹ e, em seguida, de 180 °C até 250 °C, com incremento de 8 °C min⁻¹. Os padrões externos utilizados para a obtenção dos índices de retenção foram uma mistura de hidrocarbonetos lineares, injetados nas mesmas condições operacionais do equipamento. Os cálculos dos índices aritméticos foram realizados com auxílio do Adams (2001).

4.4 Análises estatísticas

Os cromatogramas gerados pelas análises por cromatografia em fase gasosa foram transpostos para tabelas, onde foram listados todos os tempos de retenção dos compostos de cada amostra, bem como a presença, ausência destes e principalmente as áreas e porcentagens de área de cada composto. O limite de 0,1000 % foi utilizado como valor de corte, assim compostos com porcentagens de área inferiores foram excluídos e valores superiores ou iguais ao limite foram considerados.

Os espectros de massa obtidos dos extratos e frações alcaloídicas foram convertidos em tabelas, onde foram consideradas as abundancias relativas iguais ou superiores a 100. As tabelas consistiam das informações da *m/z* dos íons *versus* as abundâncias relativas correspondente. As tabelas geradas foram utilizadas para os cálculos estatísticos.

As correlações estatísticas foram realizadas utilizando o software Pirouette® versão 4.5, disponibilizado gentilmente pela professora Dra. Cláudia Cândida Silva da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Foram empregadas as técnicas exploratórias multivariadas de HCA e PCA. Foram testados os pré-processamentos das amostras do tipo normalização,

variação de peso, alisamento da curva e correção da linha de base. Contudo os parâmetros relevantes para a geração dos modelos para a análise de HCA e PCA foram na normalização e alisamento. Para o pré-processamento das variáveis foram realizados o autoescalamento, a distância métrica euclidiana e método de ligação simples. A orientação do dendograma foi em relação as amostras. Os parâmetros para PCA foram realizados com fator máximo de 10 e também foram testados todos os pré-processamentos descritos para HCA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Visão geral de trabalho

A aquisição de material e conseqüentemente a coleta dos dados foi dividida em duas etapas, representadas por duas coletas. Os estudos foram realizados para componentes voláteis existentes nos óleos essenciais e também para componentes fixos presentes nos extratos etanólicos, hidroalcoólicos e frações alcaloídicas.

A primeira coleta foi realizada de maneira a observar quantas variedades de pau-rosa (possivelmente variedades botânicas de *Aniba rosaeodora* Ducke) existiam na área de plantio da empresa, adquirir amostras de folhas, galhos e cascas de um espécime de cada variedade, realizar extrações e avaliar as diferenças estatisticamente. As diferenças eram esperadas em decorrência dos tipos de mudas que são adquiridos pela empresa. Grande parte das mudas são compradas, enquanto as demais são produzidas pela empresa. Devido às características botânicas serem muito similares entre as mudas, as plantações ao se desenvolverem acabam apresentando pequenas diferenças morfológicas, como tamanho das folhas, entre outras.

Os materiais de folhas frescas (Ff), folhas secas (Fs) e galhos secos (G) da primeira coleta foram submetidos a extração de óleos essenciais, sendo posteriormente analisados por CG-DIC e CG-EM. Os materiais de folhas, galhos e cascas secos obtidos nesta coleta foram também submetidos a extrações por sonicação em etanol e uma mistura de etanol/água 7:3, que foram posteriormente, submetidos a partições com hexano, permitindo a retirada das substâncias mais apolares e facilitando a visualização dos perfis cromatográficos. Utilizando ainda os materiais de folhas e galhos secos, foram realizadas extrações de alcaloides. As

análises de extratos e frações alcaloídicas foram realizadas por EM-IES. Todos os dados das análises espectrométricas foram tratados estatisticamente, resultando em uma avaliação preliminar dos espécimes, direcionando os estudos da segunda coleta.

A segunda coleta objetivou a validação dos métodos de análise por meio do aumento de espécimes de cada variedade e extrações de óleos essenciais em duplicatas e extratos etanólicos em triplicata. Foram adquiridos folhas e galhos de vinte e cinco espécimes, constituídas pelos cinco espécimes estudados na primeira coleta e mais quatro espécimes de cada variedade. As amostras recoletadas serviram como controle, pois já haviam sido estudadas. Os resultados obtidos dos óleos essenciais e extratos das folhas foram tabelados e os dados dos cromatogramas foram submetidos à mesma análise multivariada aplicada para os dados da primeira coleta.

5.2 A primeira coleta: análise preliminar

A primeira coleta foi realizada com o intuito de constatar se ocorreria agrupamento entre as cinco variedades com base nas diferenças e similaridades encontradas nos perfis cromatográficos de óleos essenciais e nos perfis espectrométricos em extratos e frações alcaloídicas. Estas informações serviram como parâmetro para a realização dos procedimentos e análises estatísticas da segunda coleta das amostras.

5.2.1 Óleos essenciais

A presença de linalol nos óleos essenciais de pau-rosa, os caracteriza e valora. A análise dos óleos essenciais foi o ponto de partida do projeto.

5.2.1.1 Análise de rendimentos

Os rendimentos obtidos nas extrações dos óleos das amostras de folhas frescas, folhas secas e galhos secos dos espécimes de pau-rosa imbaúba (P1), pau-rosa louro (P2), pau-rosa tucuribá (P3), pau-rosa abacate (P4) e pau-rosa preciosa (P5) constam na **Tabela 1**.

<i>amostra</i>	<i>folhas frescas</i>	<i>folhas secas</i>	<i>galhos secos</i>
P1	2,02	2,57	0,35
P2	0,70	1,24	0,13
P3	1,67	0,99	0,48
P4	1,39	2,17	0,29
P5	1,31	2,09	0,56

Tabela 1 – Rendimento (em %) dos óleos essenciais de folhas frescas, secas e galhos da primeira coleta

A amostra P1 apresentou os maiores rendimentos para folhas frescas e secas, respectivamente 2,02% e 2,57%. Ao passo que a amostra P5 apresentou o maior rendimento para galhos, equivalente a 0,56%. Quando avaliados em termos de menor rendimento, a amostra P2 apresentou para folhas frescas 0,7%; a amostra P3 para folhas secas 0,99% e, por fim, a amostra P2 para galhos 0,13%.

Os rendimentos obtidos para as amostras de folhas secas se mostraram superiores aos encontrados para folhas frescas, com exceção da amostra P3 que apresentou uma diminuição quando comparada com o seu rendimento para folhas frescas. Esta diminuição no rendimento em P3 pode ter relação com a manipulação e secagem do óleo essencial, podendo ter ocorrido perdas decorrentes da coleta do óleo essencial após extração em clevenger e até mesmo impregnação do óleo no sulfato de sódio.

A comparação entre os rendimentos das extrações de materiais vegetais frescos e secos permitiu observar que (como esperado) quando secos estes materiais possibilitaram os maiores rendimentos de óleos essenciais. Portanto, antes de realizar extrações de óleos essenciais sugere-se que os materiais vegetais sejam previamente secos até peso constante, para um melhor aproveitamento da matéria-prima.

5.2.1.2 Análise dos perfis cromatográficos de folhas frescas

Os perfis cromatográficos obtidos por CG-DIC das cinco variedades de pau-rosa podem ser visualizados na **Figura 8**, onde cada cromatograma possui um código (canto superior direito), referente as variedades de pau-rosa descritas na tabela de rendimentos do item **5.2.1.1**.

Ao todo, 60 substâncias foram encontradas nos óleos de folhas frescas. O conjunto de substâncias (picos) eluídas em todos os cromatogramas foi organizado de acordo com os seus tempos de retenção, permitindo a detecção de cada substância nos diferentes cromatogramas. Segundo a sequência de eluição, foram denominadas de S01 a S60 (ver **APÊNDICE A**), sendo o linalol (t.r 12,02, i.a. 1095) a S09 e o benzoato de benzila a S55 (t.r 38,67, i.a 17,59).

A substância majoritária em todas as amostras foi o monoterpene linalol, metabólito este que foi encontrado em altas concentrações, o que era esperado, considerando a ocorrência natural de linalol na espécie *Aniba rosaeodora* Ducke.

A exceção foi a variedade louro (P2) que, além de possuir linalol como substância majoritária, apresentou, também, quantidades elevadas de benzoato de benzila. Estas duas substâncias são consideradas não apenas majoritárias como também diferenciais na análise comparativa destas amostras.

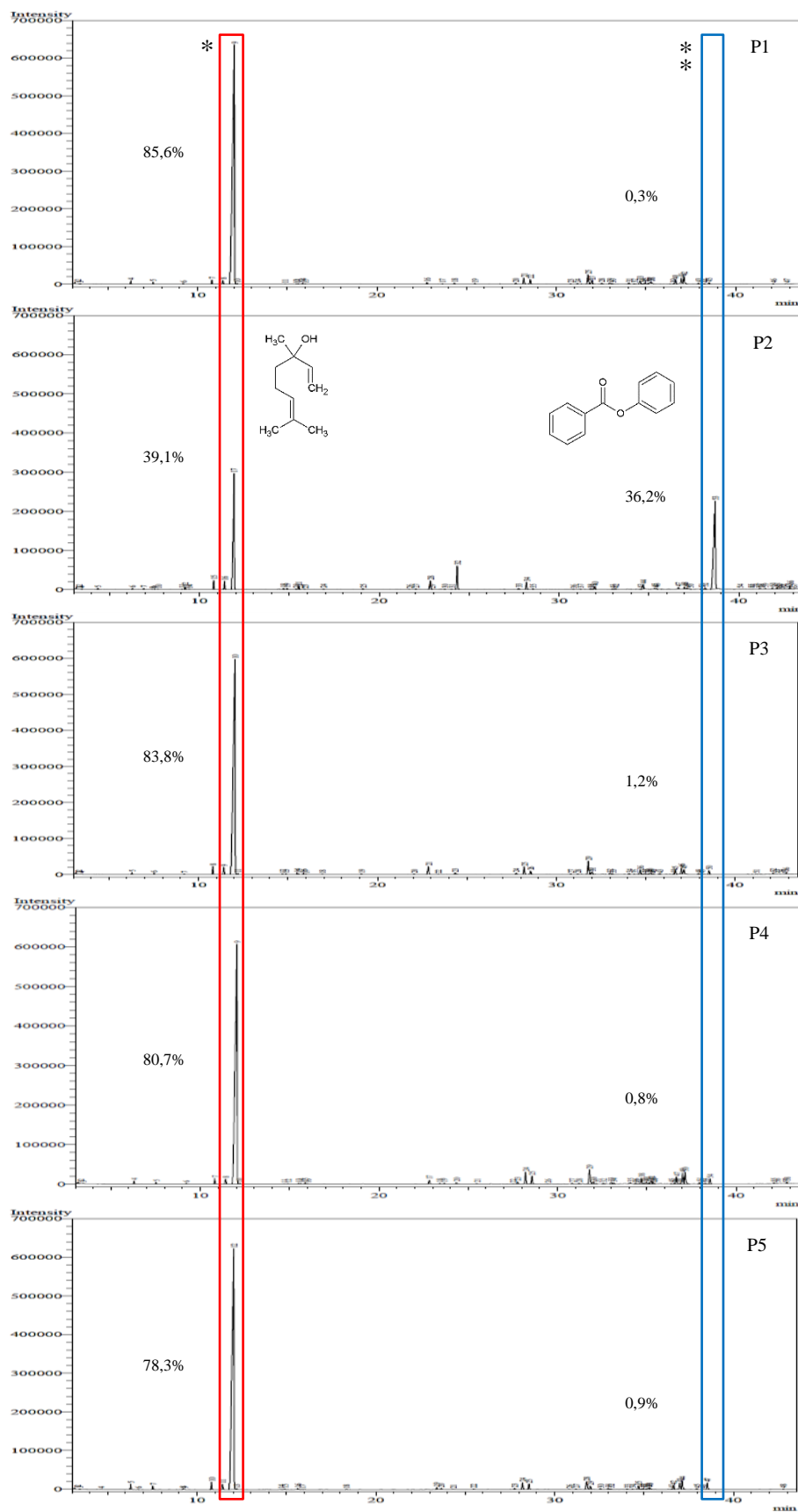


Figura 8 – Cromatogramas de CG-DIC das amostras de óleos essenciais de folhas frescas das cinco variedades de pau-rosa da primeira coleta, sendo P1) imbaúba, P2) louro, P3) tucuribá, P4) abacate e P5) preciosa.

*Região de localização do pico do linalol, com menor concentração em P2, 39,1%.

**Região de localização do pico de benzoato de benzila, com maior concentração em P2, 36,2%.

Os percentuais de linalol nas folhas frescas variaram de 85,6% até 39,1%, onde a variedade imbaúba (P1) apresentou 85,6%, seguida por tucuribá (P3) 83,8%, abacate (P4) 80,7%, preciosa (P5) 78,3% e louro (P2) 39,1%. Já os percentuais de benzoato de benzila tiveram variação de 36,2% até 0,3%, onde a variedade louro (P2) apresentou 36,2%, seguido por tucuribá (P3) 1,2%, preciosa (P5) 0,9%, abacate (P4) 0,8% e imbaúba (P1) 0,3%.

O tratamento das análises cromatográficas no *software* do equipamento foi realizado de maneira a integrar um número maior de substâncias minoritárias existentes nas amostras. Desta maneira, os percentuais esperados para as substâncias majoritárias sofreram uma pequena redução, decorrente do aumento do número de substâncias minoritárias. A análise por PCA dos perfis cromatográficos de cada variedade pode ser observada na **Figura 9**.

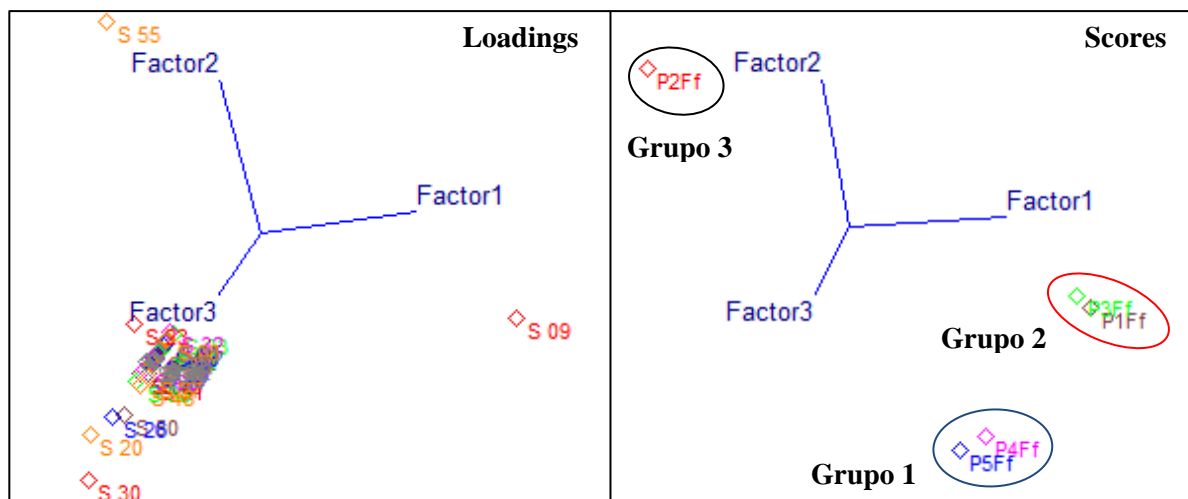


Figura 9 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de óleos essenciais de folhas frescas, da primeira coleta

Baseado nas influências das substâncias majoritárias (linalol e benzoato de benzila), os resultados de PCA em três dimensões (3D) dividiram as amostras das cinco variedades em três grupos: o primeiro grupo foi composto pelas variedades de pau-rosa preciosa (P5) e abacate

(P4); o segundo grupo por pau-rosa tucuribá (P3) e imbaúba (P1); o terceiro grupo apenas pela variedade de pau-rosa louro (P2).

O grupo 1 (delimitado pelo círculo azul) possui influência significativa tanto de linalol (S09) quanto das demais substâncias minoritárias das amostras, localizadas entre os fatores 2 e 3. O grupo 2 (delimitado por um círculo vermelho) possui influência direta de linalol e, desta forma, os componentes deste grupo se encontram localizados na mesma região do gráfico de *scores*. O grupo 3, delimitado pela cor preta, possui alta influência do benzoato de benzila (S55).

5.2.1.3 Análise dos perfis cromatográficos de folhas secas

Os perfis cromatográficos obtidos por CG-DIC das cinco variedades de pau-rosa podem ser visualizados na **Figura 10**, onde cada cromatograma possui um código (canto superior direito) referente às variedades de pau-rosa, conforme a legenda.

Ao todo, 55 substâncias foram encontradas nos óleos essenciais (ver **APÊNDICE B**). A substância majoritária em todas as amostras foi o monoterpene linalol, metabólito este que foi encontrado em altas concentrações tanto em folhas secas como frescas. A exceção foi observada na variedade louro que, além de possuir linalol como substância majoritária, apresentou, também, quantidades equiparáveis de benzoato de benzila. Fato este que foi observado também nos óleos essenciais de folhas frescas.

Os percentuais de linalol variaram de 84,4% até 40,3%, onde a variedade imbaúba (P1) apresentou 84,4%, seguida por tucuribá (P3) 82,2%, preciosa (P5) 80,2%, abacate (P4) 79,4% e louro (P2) com 40,3 %.

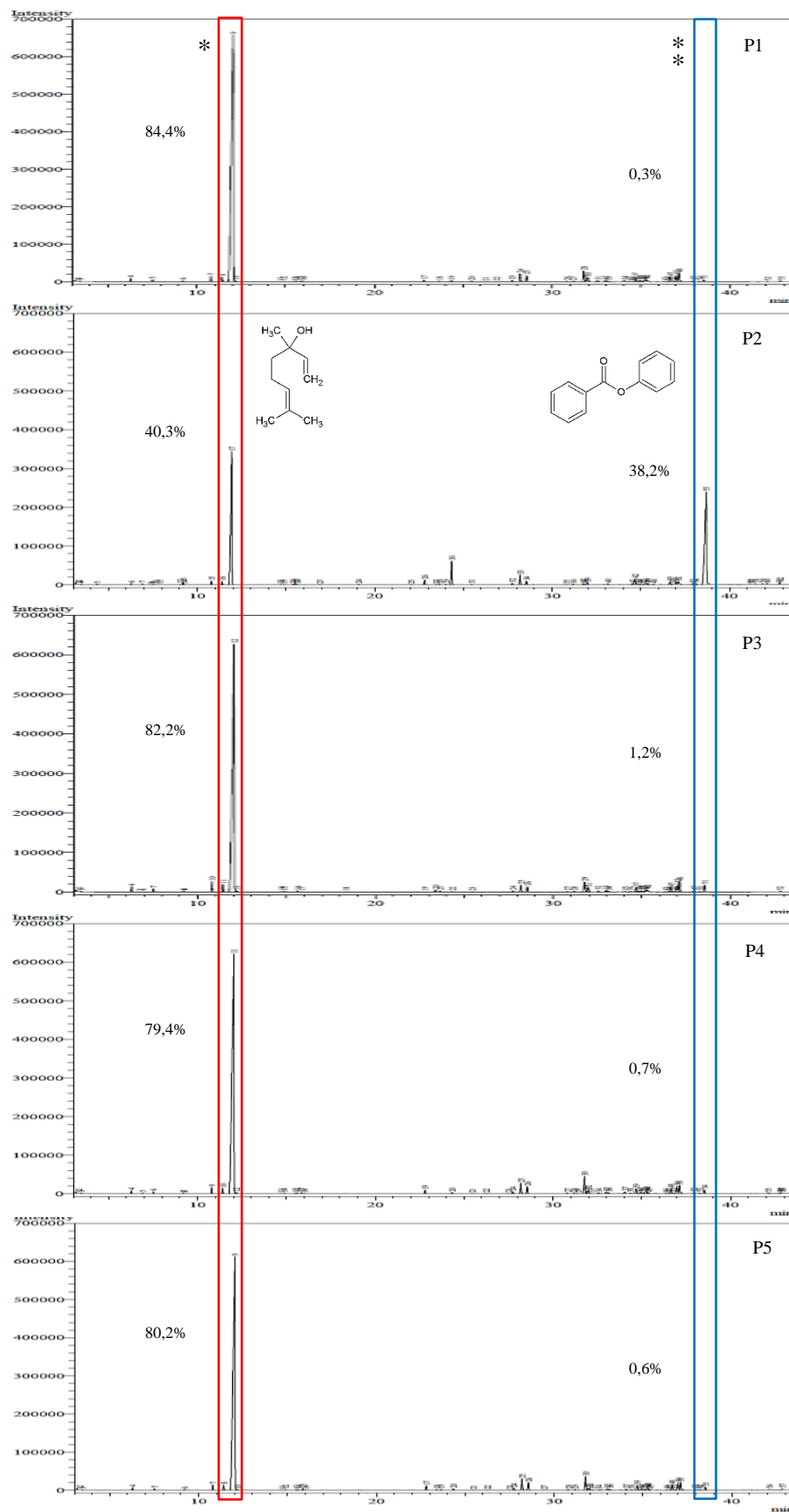


Figura 10 – Cromatogramas de CG-DIC das amostras de óleos essenciais de folhas secas das cinco variedades de pau-rosa da primeira coleta, sendo P1) imbaúba, P2) louro, P3) tucuribá, P4) abacate e P5) preciosa
 *Região de localização do pico do linalol, com menor concentração em P2, 40,3%.
 **Região de localização do pico de benzoato de benzila, com maior concentração em P2, 38,2%.

Os percentuais de benzoato de benzila tiveram variação de 38,2% até 0,3%, onde a variedade louro (P2) apresentou 38,2%, seguido por tucuribá (P3) 1,2%, abacate (P4) 0,7%, preciosa (P5) 0,6% e imbaúba (P1) 0,3%.

A análise por PCA dos perfis cromatográficos de cada variedade pode ser observada na **Figura 11**, onde vemos os agrupamentos das substâncias (*loadings*), amostras (*scores*) e as tendências delas em relação aos fatores.

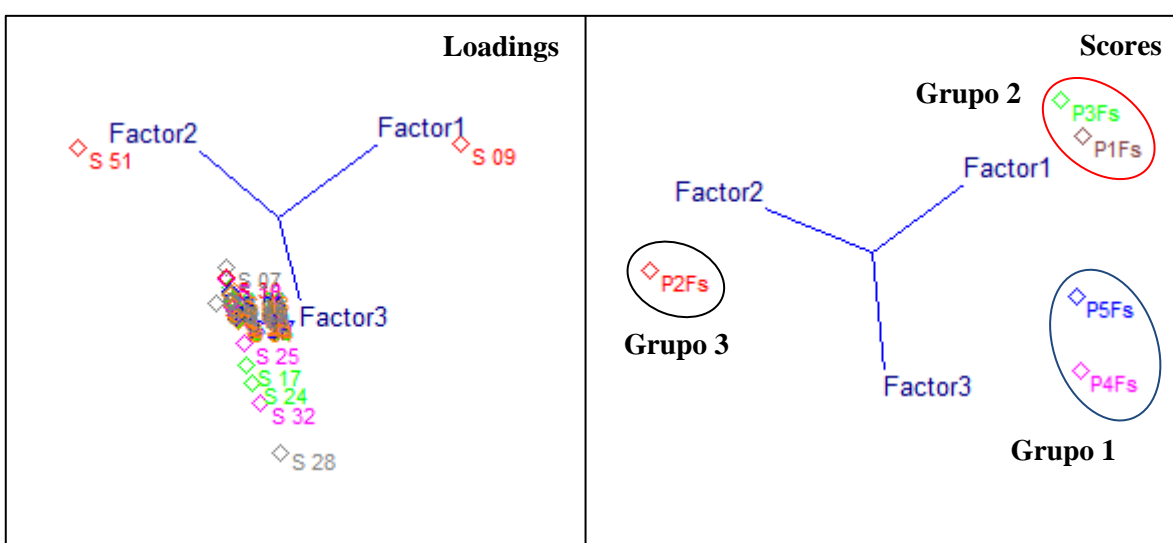


Figura 11 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de óleos essenciais de folhas secas, da primeira coleta

A PCA de *loadings* e *scores* decorrentes da comparação das substâncias presentes nos perfis cromatográficos das cinco variedades resultou em agrupamentos iguais aos descritos anteriormente para as folhas frescas, onde foi possível observar a formação de três grupos definidos.

Por meio do tratamento estatístico foi possível visualizar as variedades de pau-rosa abacate (P4) e preciosa (P5) como pertencentes ao grupo 1, imbaúba (P1) e tucuribá (P3) ao grupo 2 e louro (P2) grupo 3. Nestas amostras as substâncias mais significativas foram a S09 e

S51, são elas linalol e benzoato de benzila, respectivamente. Estas duas substâncias já haviam sido consideradas como diferenciais nas análises dos perfis cromatográficos de folhas frescas.

5.2.1.4 Análise dos perfis cromatográficos de galhos secos

Os perfis cromatográficos obtidos por CG-DIC das cinco variedades de pau-rosa podem ser visualizados na **Figura 12**. Cada cromatograma possui um código (canto superior direito), responsável pela identificação das variedades de pau-rosa, conforme a legenda da figura.

Os perfis cromatográficos das amostras de galhos apresentaram diferenças visíveis quando comparados com os perfis de folhas frescas e secas. Sessenta e oito substâncias foram observadas nestes óleos essenciais (ver **APÊNDICE C**). Estes perfis apresentaram como substância majoritária apenas o linalol (S11).

Os percentuais de linalol variaram de 81,8% até 53,4%. A variedade imbaúba (P1) apresentou 81,8%, seguida por tucuribá (P3) 78,1%, preciosa (P5) 67,5%, abacate (P4) 63,7% e louro (P2) 53,4%. Observou-se também a ausência da substância benzoato de benzila como uma das substâncias majoritárias na composição do óleo essencial dos galhos da variedade louro.

Considerando o resultado dos percentuais de linalol encontrados nas amostras de folhas frescas, folhas secas e galhos secos foi possível constatar que a concentração desta substância segue um padrão existente para os materiais vegetais utilizados. A sequência de percentuais de linalol observada é imbaúba > tucuribá > abacate > preciosa > louro, apresentando para folhas secas apenas uma inversão entre abacate e preciosa.

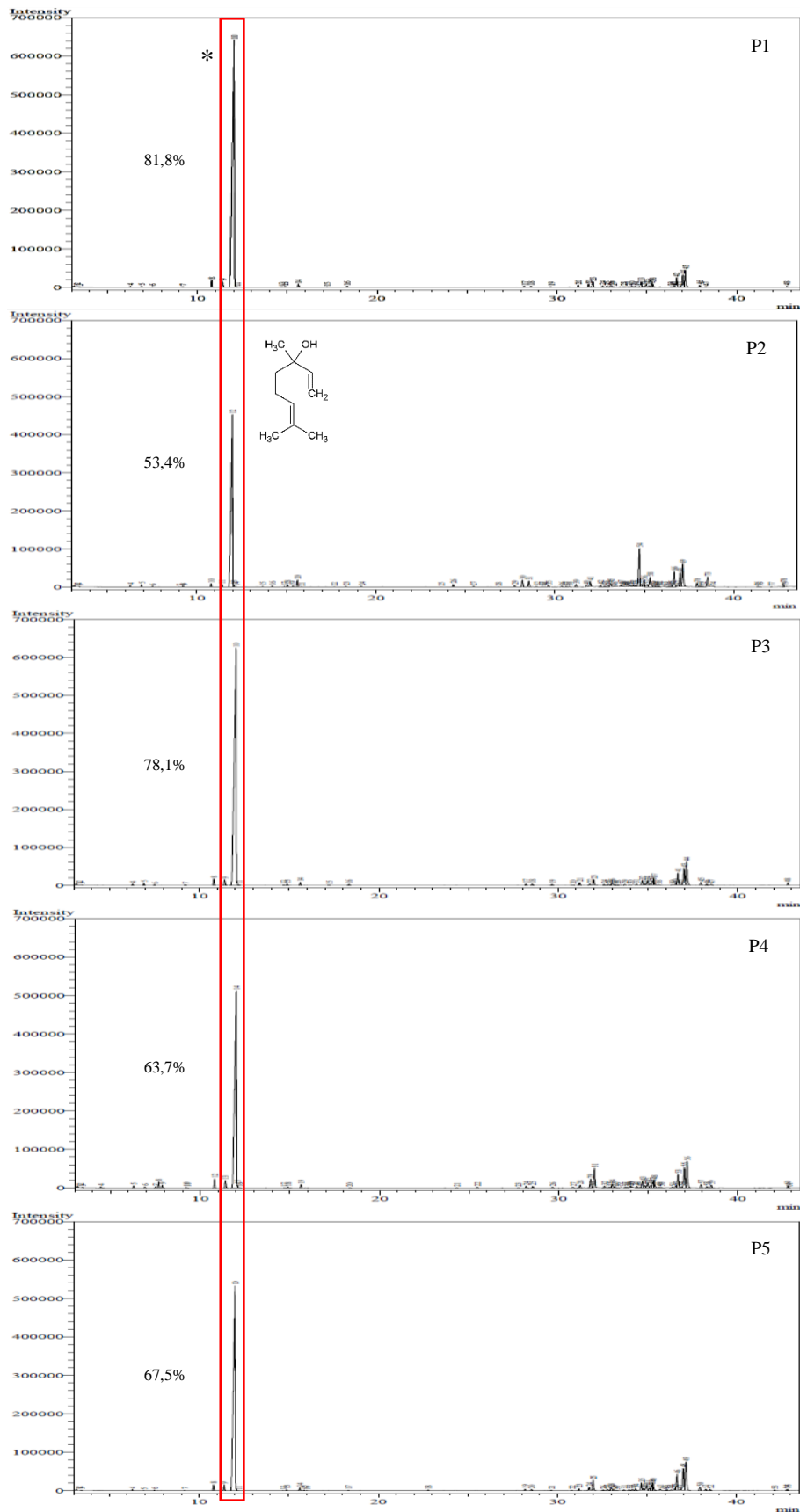


Figura 12 – Cromatogramas de CG-DIC das amostras de óleos essenciais de galhos secos das cinco variedades de pau-rosa da primeira coleta, sendo P1) imbaúba, P2) louro, P3) tucuribá, P4) abacate e P5) preciosa *Região de localização do pico do linalol, com menor concentração em P2, 53,4%.

A análise estatística por PCA dos galhos secos (**Figura 13**) mostra correlações semelhantes aos resultados obtidos para folhas frescas e folhas secas. Os mesmos números de agrupamentos foram observados e as amostras foram inseridas em cada grupo de maneira similar ao encontrado anteriormente. As substâncias S11 e S47, apesar de apresentarem números diferentes das substâncias representativas das análises anteriores, são exatamente as mesmas substâncias linalol e benzoato de benzila, respectivamente.

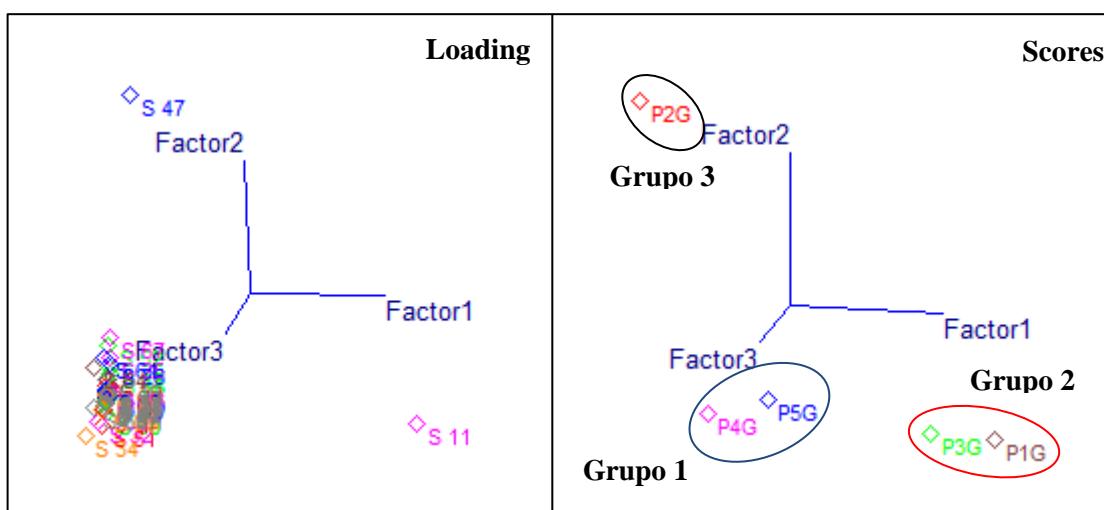


Figura 13 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de óleos essenciais de galhos secos, da primeira coleta

Os mesmos componentes diferenciais puderam ser encontrados em todas as análises estatísticas de folhas frescas, folhas e galhos secos. Os compostos linalol e benzoato de benzila são os mais representativos quando avaliadas as composições dos óleos essenciais.

Foi possível considerar a extração de óleos essenciais de folhas frescas, folhas e galhos secos como método eficiente na caracterização das cinco variedades de pau-rosa em grupos bem definidos. Os três materiais vegetais utilizados nessa análise se mostraram promissores para a validação na segunda coleta. Portanto, outros critérios tiveram que ser considerados para a seleção do material vegetal que seria utilizado posteriormente, como logística no transporte

dos materiais via barco recreio e a dificuldade de manter frescos os materiais coletados. Deste modo, os materiais de folhas secas foram selecionados para dar continuidade às análises na segunda coleta.

5.2.2 Extratos etanólicos e hidroalcoólicos

Os rendimentos foram calculados após a obtenção dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos. Foram obtidos os perfis (*full scan*) de todas as amostras por espectrometria de massa e cada íon encontrado foi listado e submetido a análises estatística comparativa por PCA.

5.2.2.1 Análise de rendimentos

Os valores de rendimento dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos das variedades imbaúba (P1), louro (P2), tucuribá (P3), abacate (P4) e preciosa (P5), encontram-se descritos na **Tabela 2**, bem como os valores médios e desvios padrões entre amostras.

<i>solução extratora</i>	<i>Matriz</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>	<i>P5</i>	<i>P</i> (valor médio)	σ
etanol	Folhas	9,32	6,74	7,84	8,92	8,69	8,30	1,03
	Galhos	3,93	2,34	4,6	4,36	2,94	3,63	0,96
	Cascas	6,79	6,95	6,57	5,28	6,34	6,39	0,66
etanol/água 7:3 (m/v)	Folhas	17,1	14,04	20,62	19,07	20,25	18,22	2,7
	Galhos	4,41	6,65	5,92	6,8	4,64	5,68	1,11
	Cascas	6,82	10,52	8,36	9,25	8,31	8,65	1,36

Tabela 2 - Rendimento (valor médio, em %) das amostras dos extratos de folhas e galhos, ambos secos, da primeira coleta

Os rendimentos dos extratos etanólicos das folhas tiveram valor médio de 8,30% enquanto que as extrações hidroalcoólicas da mesma matriz vegetal apresentaram 18,22%, representando mais que o dobro do valor encontrado em etanol.

As extrações etanólicas de galhos e cascas apresentaram rendimentos médios de 3,63% e 6,39%, enquanto que as extrações hidroalcoólicas das mesmas matrizes vegetais tiveram valores médios de 5,68% e 8,65%, respectivamente.

As extrações hidroalcoólicas apresentaram os maiores rendimentos quando comparadas com os valores dos extratos etanólicos, principalmente nas folhas. A existência de um quantitativo maior de substâncias com elevada polaridade foi determinante na eficiência do método de extração com a solução hidroalcoólica.

A avaliação individual dos rendimentos de cada variedade de pau-rosa apresentou para os extratos etanólicos, valores máximos de 9,32% para folhas de pau-rosa imbaúba (P1), 4,60% para galhos de pau rosa tucuribá (P3) e 6,95% para cascas de pau-rosa louro (P2). Já os menores rendimentos foram 6,74% para folhas e 2,34% para galhos, ambos de pau-rosa louro (P2) e 5,28% para cascas de pau-rosa abacate (P4).

Os extratos hidroalcoólicos apresentaram rendimentos máximos de 20,62% em folhas de pau-rosa tucuribá (P3), 6,80% em galhos de pau-rosa abacate (P4) e 10,52% em cascas de pau-rosa louro (P2). Os menores rendimentos foram de 14,04% em folhas de pau-rosa louro (P2), 4,41% em galhos e 6,82%, ambos, em cascas de pau-rosa imbaúba (P1).

5.2.2.2 Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos das folhas

As impressões digitais (ou “*fingerprints*”) das folhas, por EM-IES no modo negativo ($[M+H]^-$), encontram-se expressas na **Figura 14**. Nela, podemos observar os cinco espécimes de pau-rosa, onde (A) representa a variedade imbaúba, (B) louro, (C) tucuribá, (D) abacate e (E) preciosa. Uma vez analisados com mais cautela eles evidenciam diferenças claras, permitindo a classificação dos cinco espécimes em três grupos nas análises por PCA da **Figura 15**. Similarmente ao adotado nos cromatogramas, onde os picos foram ordenados por tempo de retenção e denominados como substâncias S01 a S0X, nas análises por espectrometria de massas os íons foram organizados em ordem crescente e denominados íon 01 a íon 56 (ver **APÊNDICE D**).

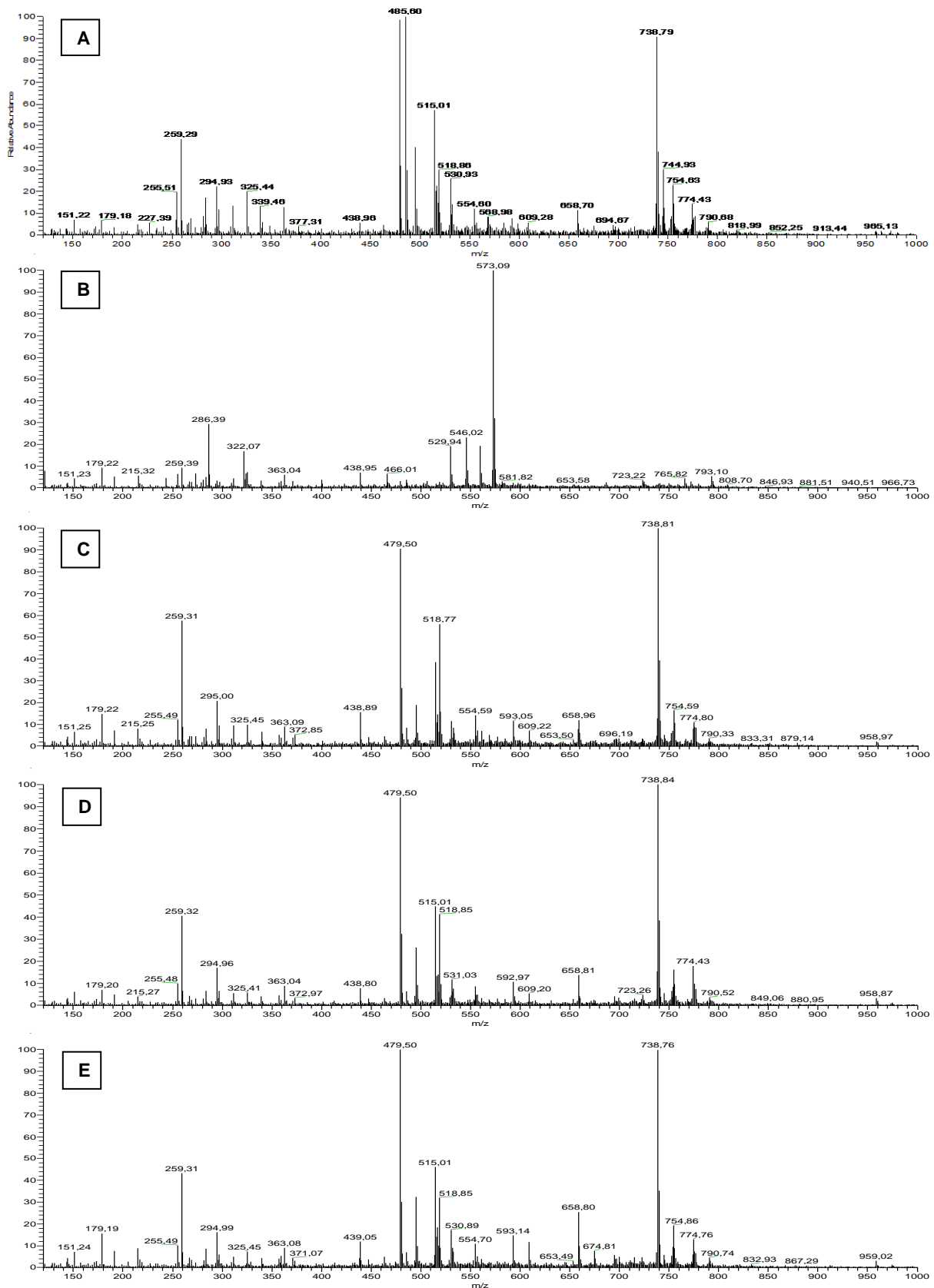


Figura 14 – Perfis espectrométricos das folhas extraídas com etanol das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa

O primeiro grupo, marcado com um círculo azul (**Figura 15**), foi constituído pelas amostras P3 (C), P4 (D) e P5 (E) em decorrência da similaridade relacionada aos íons majoritários, são eles os de m/z 259, 295, 479, 515, 518, 738, 754 e 739, com alteração apenas nas intensidades de ionização. Como pode ser observado no PCA de *loadings* e *scores*, estas amostras sofreram influência direta dos íons de m/z 479 (íon 19) e 738 (íon 47), sendo observados na extremidade do fator 1.

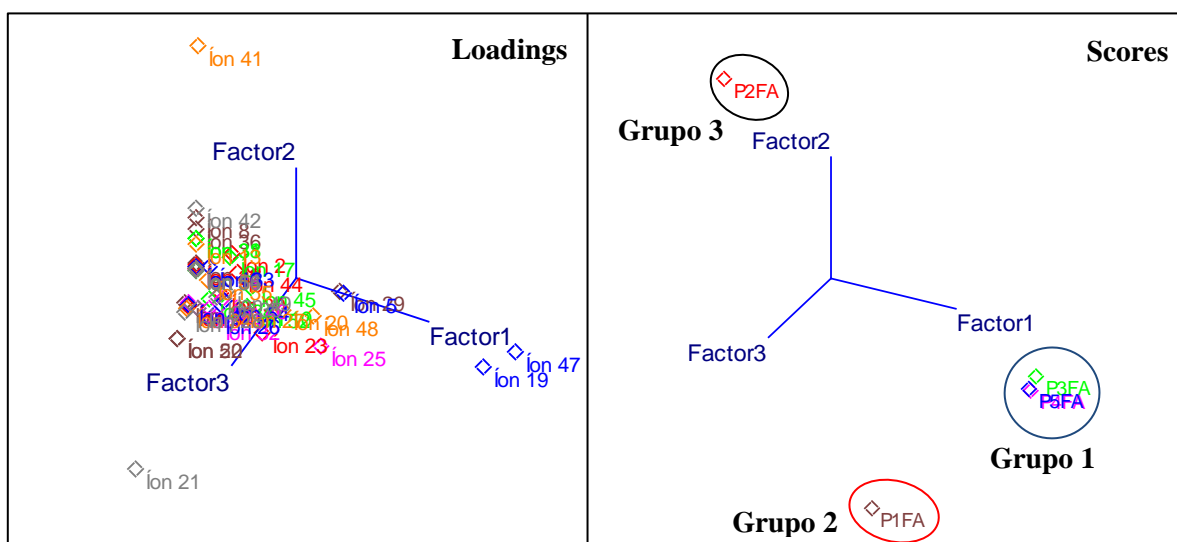


Figura 15 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de folha extraídas com etanol absoluto, da primeira coleta

O segundo grupo, marcado com um círculo vermelho (**Figura 15**), teve como integrante único a amostra P1 (A). Nesta amostra foi possível identificar como íons majoritários os de m/z 259, 479, 485, 495, 515, 518, 738, 739 e 744. Esta mesma amostra apresentou diversos íons em comum quando comparado com as demais amostras, contudo o íon de m/z 485 (íon 21) foi determinante na classificação desta amostra no primeiro grupo.

A amostra P2 (B), marcada com um círculo preto (**Figura 15**), possui o perfil espectrométrico mais diferente dentre as demais amostras (**Figura 14B**). O perfil é composto

por quatro íons majoritários. São eles os íons de m/z 286, 259, 546 e 573, sendo este último o mais intenso. Como observado no PCA (**Figura 15**) o íon com m/z 573 (íon 41) foi o mais representativo na classificação desta amostra no grupo três. Além disso este íon diferencial não foi encontrado em nenhuma das outras quatro amostras.

A **Tabela 3** sumariza os íons com m/z mais significativos, em cada amostra.

<i>grupo</i>	<i>amostra</i>	$[M+H]^+$ (m/z)
I	P1	255; 259; 294; 325; 479; 485; 495; 515; 518; 530; 738; 739; 744; 754; 774
II	P2	259; 286; 294; 322; 438; 529; 546; 350; 529; 546; 573
	P3	259; 295; 479; 515; 518; 738; 754; 739
III	P4	259; 295; 479; 515; 518; 738; 754; 739
	P5	259; 295; 479; 515; 518; 738; 754; 739

Tabela 3 – íons principais nos extratos etanólicos das folhas analisados por espectrometria de massas (EM-IES)

5.2.2.3 Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos hidroalcoólicos das folhas

Os espectros resultantes deste método de extração podem ser encontrados na **Figura 16**. Os perfis espectrométricos das amostras P1 (A), P3 (C), P4 (D) e P5 (E), mostraram-se bem semelhantes, considerando os íons majoritários presentes. A lista de íons e intensidades relativas podem ser encontrados no **APÊNDICE E**. Foi possível destacar íons majoritários com m/z 179, 191, 259, 363, 371, 479, 514, 593, 609 e 738. Algumas variações nas intensidades dos íons foram visualizadas, contudo as similaridades entre as quatro amostras permitiram sua classificação como sendo apenas um grupo. Como observado no PCA (**Figura 17**) o íon com m/z 479 (íon 14) foi o íon determinante no agrupamento das quatro amostras do grupo 1.

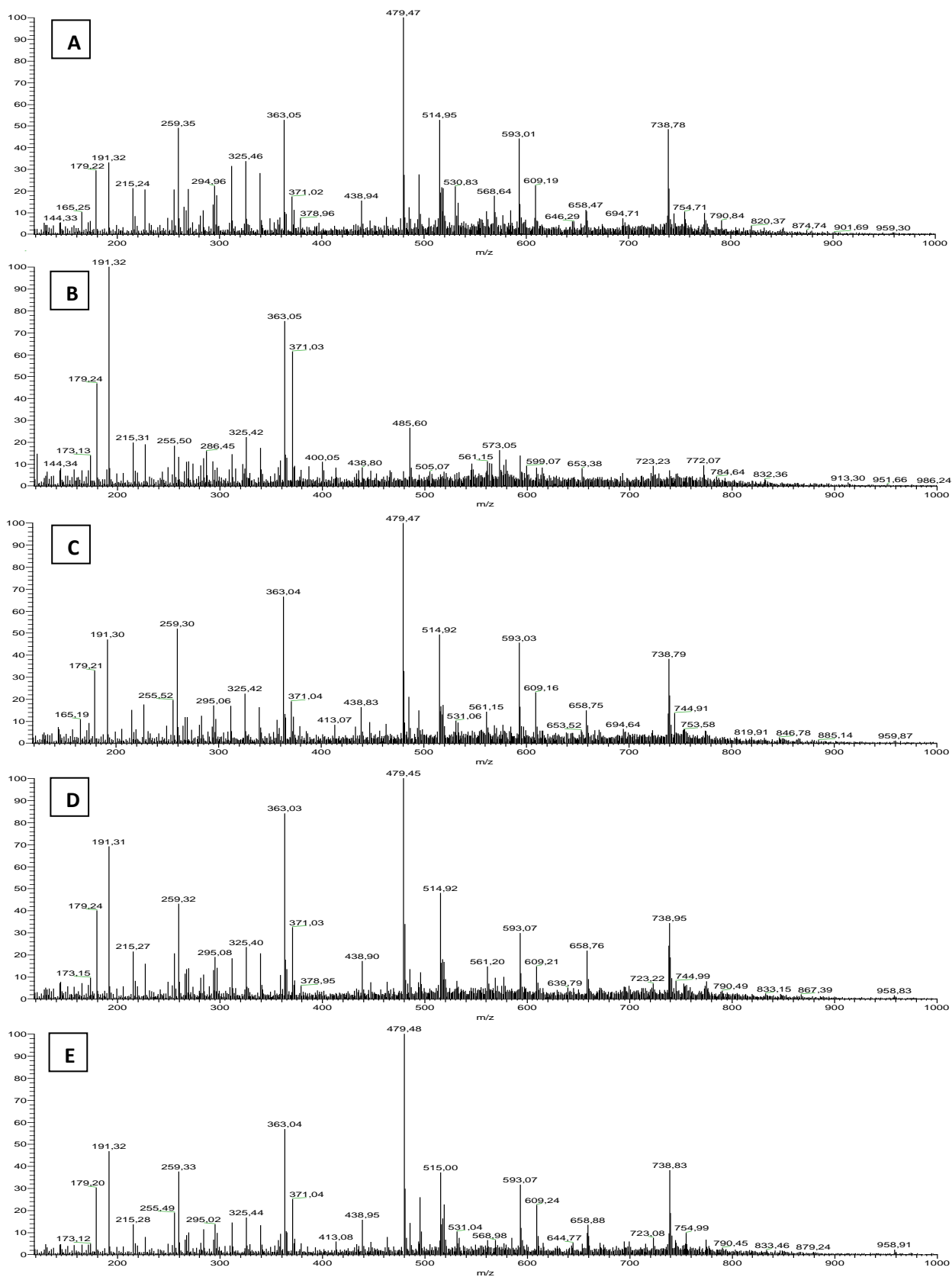


Figura 16 – Perfis espectrométricos das folhas extraídas com etanol e água (7:3) das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa

Analisando o espectro de massa da amostra P2 (B) é possível considerar como majoritários os íons com m/z 179, 191, 363, 371 e 485. Quando observada a PCA de *loadings* nota-se uma contribuição de vários íons de maneira heterogênea. A amostra P2 (B) possui um perfil diferente dos demais espécimes devido principalmente às grandes variações nas intensidades destes íons, sendo, portanto, classificada no grupo dois.

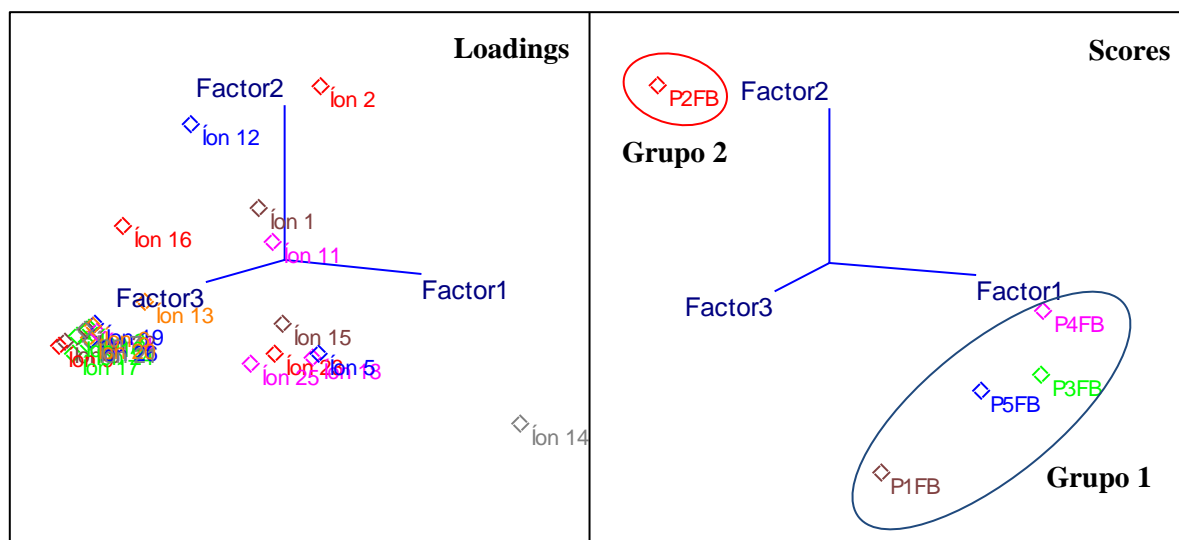


Figura 17 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de folha extraídas com mistura de água e etanol, da primeira coleta

Apesar deste método não ter sido eficiente conforme o esperado para os agrupamentos, foi possível observar a formação de dois grupos bem definidos.

5.2.2.4 Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos dos galhos

Os perfis espectrométricos das cinco amostras de galhos extraídos por este método podem ser observados nos espectros da **Figura 18**.

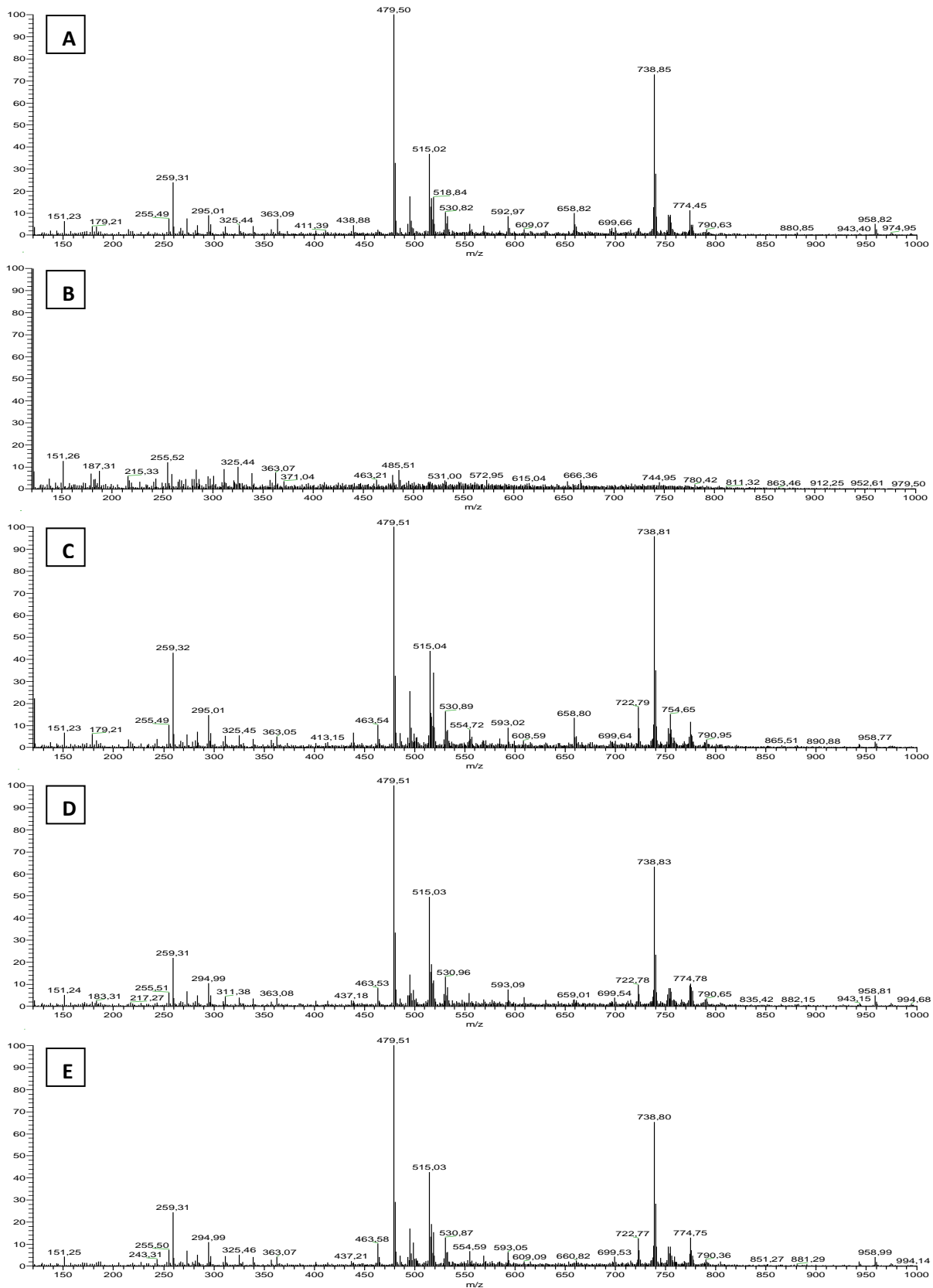


Figura 18 – Perfis espectrométricos dos galhos extraídos com etanol das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa

A tabela com o número de íons e as respectivas m/z podem ser encontrados no **APÊNDICE F**. Os perfis das amostras P1 (A), P3 (C), P4 (D) e P5 (E) apresentaram, majoritariamente, os íons com m/z 259, 479, 481, 515, 518 e 738 em intensidades variadas. Nota-se a ausência do íon com m/z 463 na amostra P1, quando comparado com os demais perfis. A análise por PCA de *loadings* e *scores* agrupa essas quatro variedades como sendo o primeiro grupo (**Figura 19**). Foi possível observar também uma maior contribuição dos íons com m/z 479 (íon 9), 515 (íon 17) e 738 (íon 32).

A amostra P2 (ver **Figura 15B**) apresentou um perfil com íons em intensidades muito baixas. Apesar de possuir similaridade, como os íons de m/z 151, 255, 295, 325, 363 e 463 observados nas outras amostras, ele apresenta os íons diferenciais de m/z 121, 485, 531, 572, 615 e 666. Esta amostra continua apresentando perfil espectrométrico diferente das demais amostras, sendo, portanto, classificado de maneira similar ao observado na análise das folhas (ver itens 5.5.1 e 5.5.2). A análise por PCA (**Figura 19**) mostra uma maior contribuição do íon com m/z 121 (íon 1) na direção oposta às amostras do primeiro grupo.

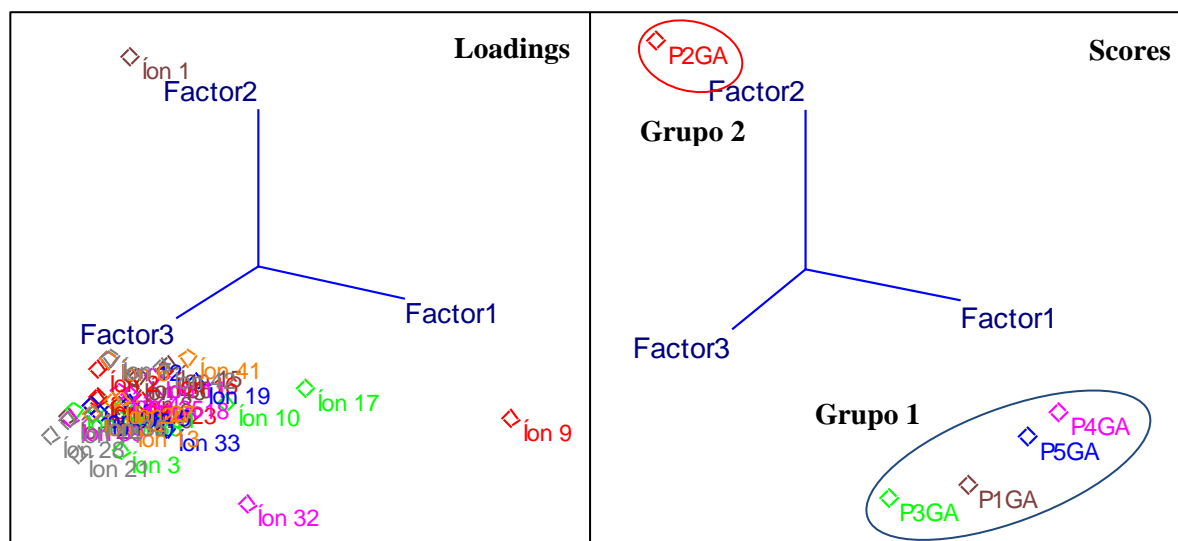


Figura 19 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de galho extraídas com etanol absoluto, da primeira coleta

5.2.2.5 Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos hidroalcoólicos dos galhos

Os perfis espectrométricos das cinco variedades estão apresentados na **Figura 21**. Os íons, majoritários foram os de m/z 259, 363, 479, 480, 515 e 738. Esta composição se assemelha aos perfis observados para os extratos etanólicos dos galhos. Os gráficos de PCA (**Figura 20**) nos mostram que o íon mais representativo foi o de m/z 479 (íon 14), ocasionando o agrupamento dessas quatro variedades no primeiro grupo. A lista de íons e m/z encontram-se no **APÊNDICE G**.

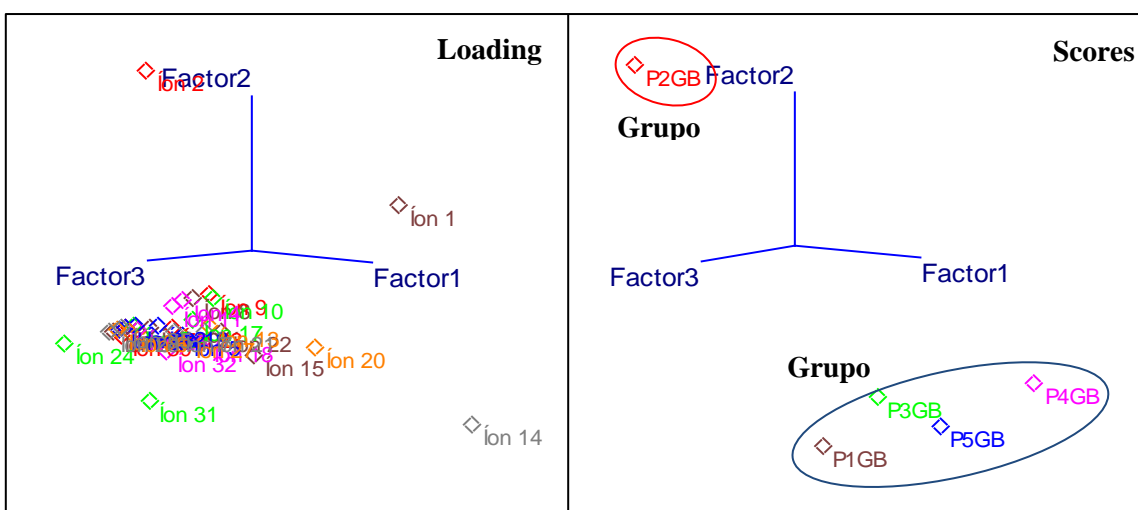


Figura 20 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de galho extraídas com mistura de água e etanol, da primeira coleta

O segundo grupo foi composto pela amostra P2 (**Figura 21B**), a qual apresentou um perfil com baixa intensidade de íons, da mesma forma observada para os extratos etanólicos dos galhos. Destaca-se como íon majoritário apenas o íon de m/z 363. Além deste, foram encontrados os íons de m/z 259, 479 e 515, os quais também estão presentes em todas as amostras aqui discutidas. Foi observada a ausência dos íons de m/z 386 e 438 e a presença exclusiva do íon de m/z 411.

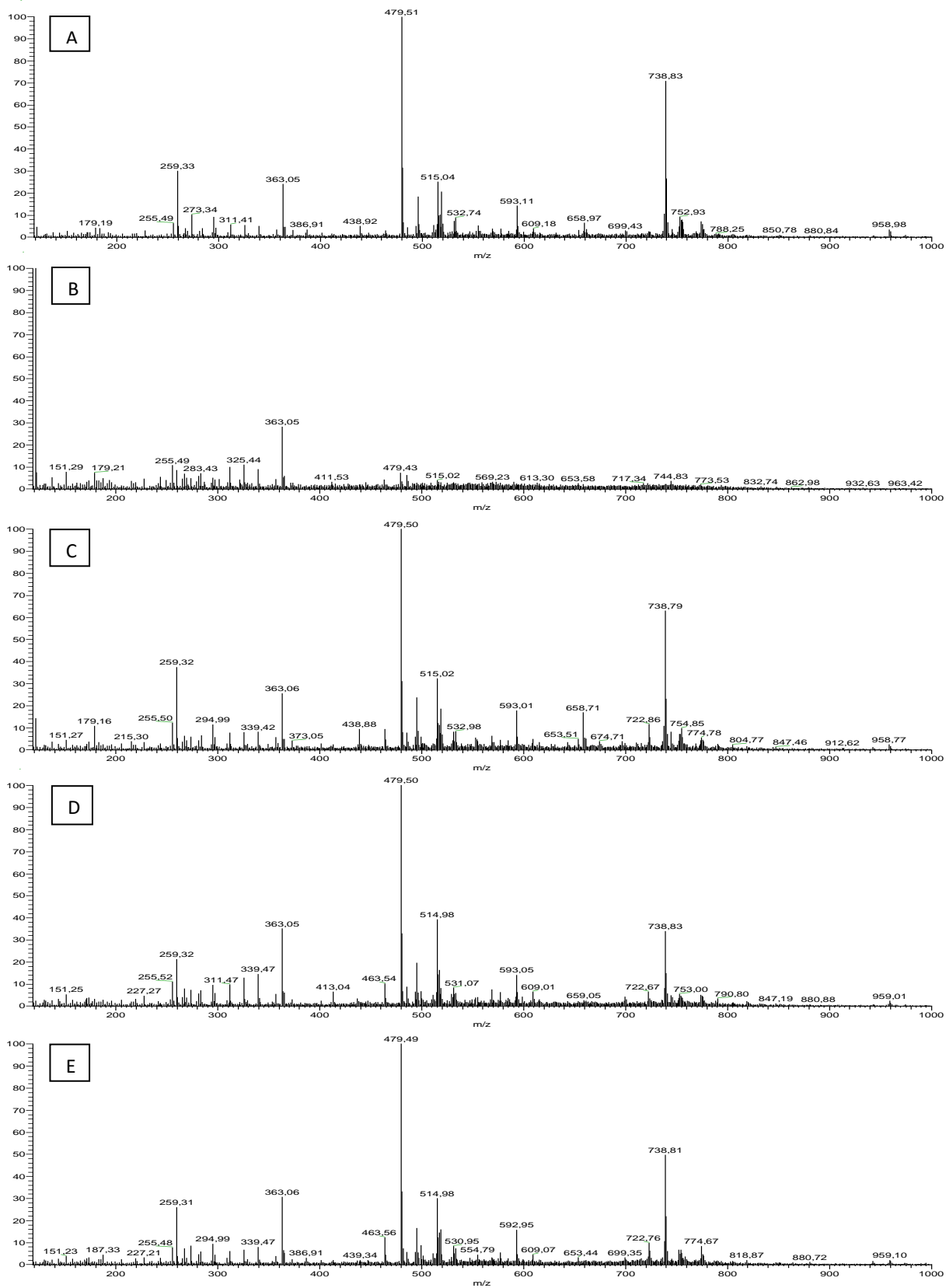


Figura 21 – Perfis espectrométricos dos galhos extraídos com etanol e água (7:3) das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa

Apesar desta análise comparativa levar à formação de apenas dois grupos distintivos, tendo em vista que esta metodologia de extração para galhos não permitiu uma classificação eficiente entre as amostras P1, P3, P4 e P5, ela mantém o mesmo perfil observado nos espectros das folhas, corroborando com a integridade da espécie.

5.2.2.6 Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos das cascas

Através da análise comparativa dos espectros de massa contidos na **Figura 22**, foi possível observar similaridade entre as amostras P1 (A), P3 (B), P4 (C) e P5 (D). Estes quatro espécimes que compõem o primeiro grupo, apresentaram, como picos principais, os íons de m/z 259, 363, 463, 479, 485, 514, 722, 738, 744, contudo ocorreram variações de intensidade consideráveis nos íons de m/z 259, 463 e 722. Como observado nas análises por PCA (**Figura 23**), estas características não foram suficientes para viabilizar a diferenciação entre essas quatro amostras e, logo, não puderam ser classificadas em grupos diferenciados como aqueles propostos com êxito para as análises realizadas nas folhas (ver itens **5.5.1** e **5.5.2**). O PCA de *loadings* mostra que o íon de m/z 479 (íon 15) foi o mais influente no agrupamento das variedades no primeiro grupo. A lista de íons e m/z encontram-se no **APÊNDICE H**.

A análise por espectrometria de massas da amostra P2 (B) gerou um perfil com poucos íons e apresentou majoritariamente o íon de m/z 485 (íon 17). Este íon também foi encontrado com intensidades semelhantes nos demais espectros analisados nesta discussão. O PCA mostra que a amostra P2 pertencente ao grupo 2 é influenciada tanto pelo íon 17 quanto pelos demais íons minoritários.

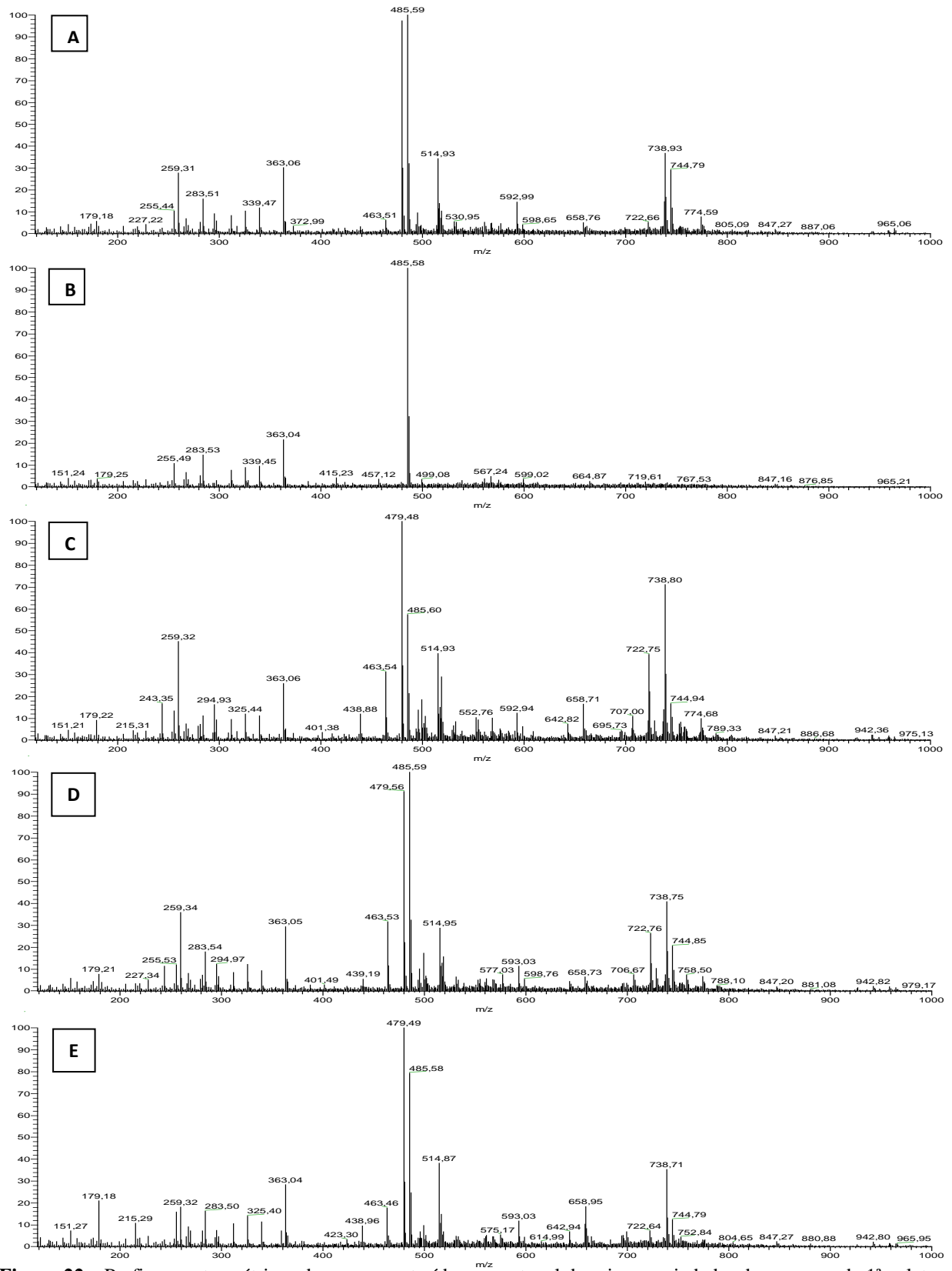


Figura 22 – Perfis espectrométricos das cascas extraídas com etanol das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa

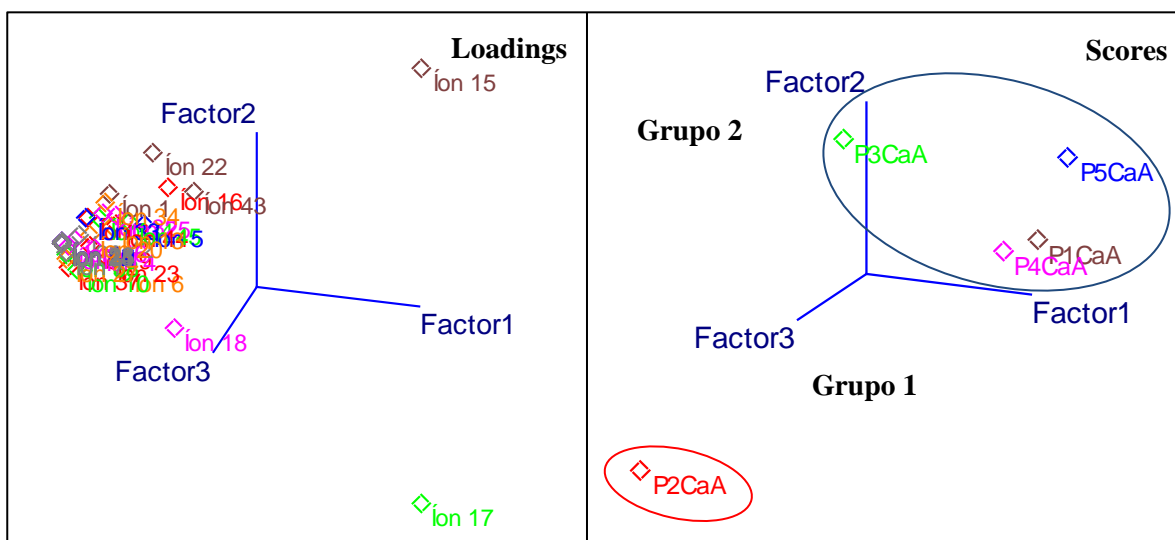


Figura 23 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de casca extraídas com etanol absoluto, da primeira coleta

5.2.2.7 Análise comparativa dos perfis espectrométricos dos extratos hidroalcoólicos das cascas

Os dados dos perfis espectrométricos apresentados na **Figura 24**, após serem tratados estatisticamente (**Figura 25**), permitiram a classificação das cinco amostras em dois grupos distintos. O primeiro grupo foi constituído pelas amostras P1 (A), P3 (C), P4 (D) e P5 (E), as quais foram marcadas pela presença de íons majoritários de m/z 479, 485, 486 e 514. Os íons de m/z 722, 738 e 744, pouco intensos nestas quatro amostras, apresentaram variações de intensidades, onde o íon de m/z 722 foi ausente em P1 e P5. Esta ausência não representou variação significativa devido a intensidade deste íon ser baixa nas demais amostras deste grupo.

O segundo grupo foi constituído pela amostra P2 (B), a qual apresentou como íon majoritário o de m/z 485 (íon 1), sugerindo que a molécula geradora deste íon é comum e majoritária nas árvores dessas espécies. A lista de íons e m/z encontram-se no **APÊNDICE I**.

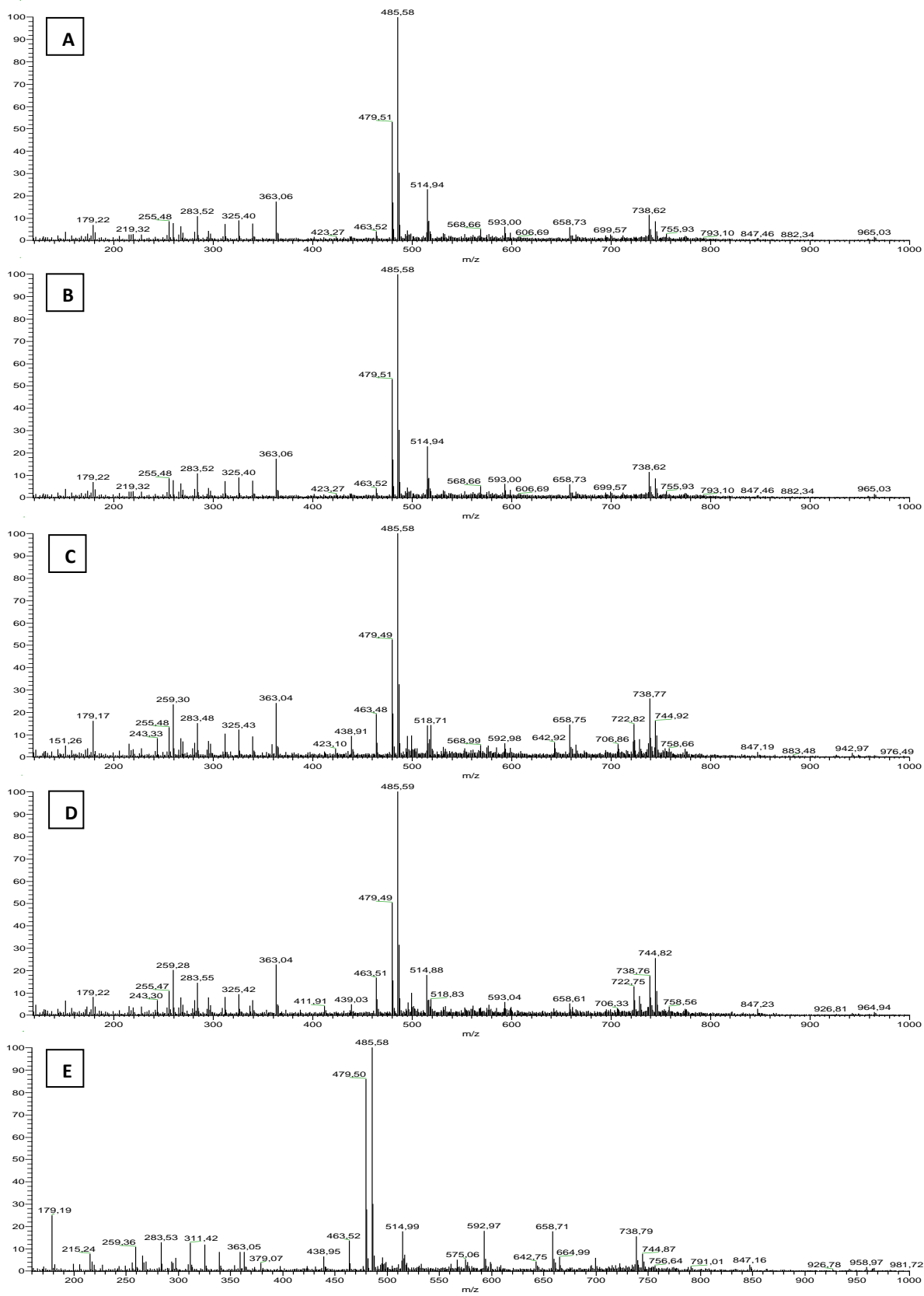


Figura 24 – Perfis espectrométricos das cascas extraídas com etanol:água (7:3) das cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa

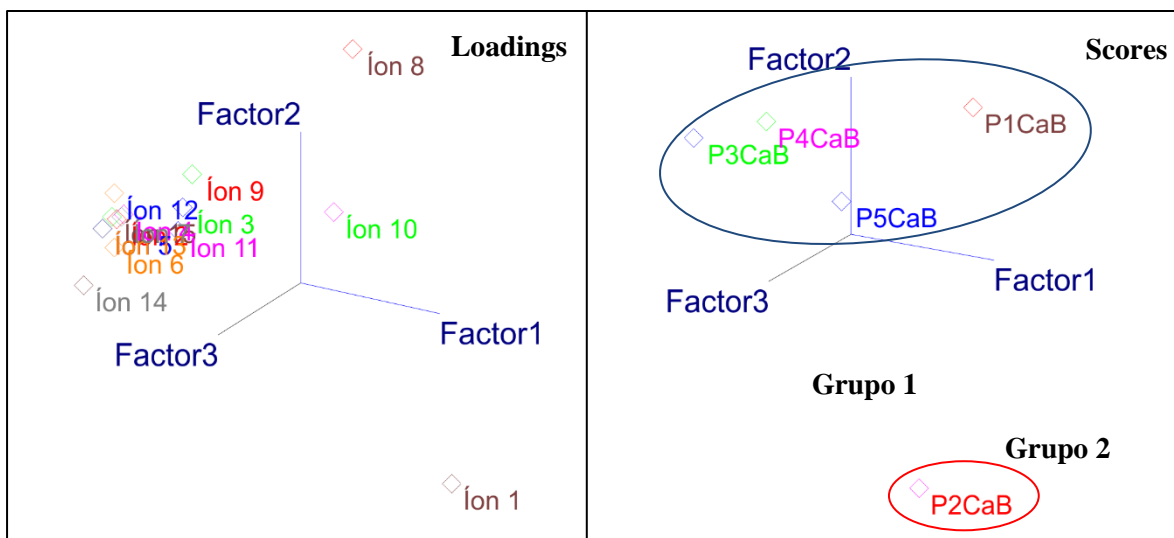


Figura 25 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de casca extraídas com a mistura de água e etanol, da primeira coleta

5.2.2.8 Principais informações obtidas nas extrações etanólicas e hidroalcoólicas

Todas as extrações etanólicas e hidroalcoólicas se mostraram capazes de realizar agrupamentos entre as amostras das cinco variedades de pau-rosa. As análises estatísticas do extrato etanólico de folhas secas geraram três grupos, enquanto que as demais análises geraram apenas dois grupos. O único método que possibilitou a formação de três grupos foi o de extratos etanólicos de folhas secas, sendo, portanto, escolhido para a validação dos agrupamentos a serem realizados na segunda coleta.

5.2.3 Análise comparativa dos perfis espectrométricos das frações alcalóidicas de folhas e galhos

Foi aplicada uma metodologia de extração seletiva de alcaloides segundo Soares *et al.* (2015), por ser eficiente e de rápida execução. A técnica de espectrometria de massas no modo

positivo $[M+H]^+$, foi aplicada para todas as frações alcaloídicas de folhas e galhos e a partir dos dados de perfil espectrométrico de cada espécime, foi possível realizar diferenciações.

Dentre os íons observados nos espectros de cada amostra de folhas (ver **Figura 26**) e galhos (ver **Figura 27**), foram encontrados vários íons de m/z par em comum em diferentes intensidades. Dentre os íons observados, destacam-se os de m/z 328 e 330, por apresentarem maiores intensidades em relação aos demais. Estes dois íons encontram-se presentes em todas as amostras e desta forma, não podem ser usados como parâmetros na diferenciação das mesmas. O íon de m/z 328 possui similaridade com o íon *quasi* molecular de um alcaloide aporfínico de nome boldina e o íon de m/z 330 é compatível com o alcaloide reticulina (**Figura 26**). Outro íon de interesse é o de m/z 314, compatível com a norboldina, presente nas amostras P3 (C) e P4 (D) de folhas (ver **Figura 26**) e P2 (B), P3 (C), P4 (D) e P5 (E) de galhos (ver **Figura 27**). Estes três alcaloides já foram descritos em *Aniba rosaeodora* Ducke por Custódio em sua tese de Doutorado, intitulada “Aproveitamento dos subprodutos da extração do óleo do pau-rosa para obtenção de bioprodutos”, sendo finalizada no ano de 2013, no mesmo grupo de pesquisa onde este trabalho de Dissertação foi desenvolvido.

O perfil dos compostos majoritários na amostra P2 (B) de folhas se difere consideravelmente quando comparado com as demais amostras. Esta variedade, além de possuir os íons de m/z 328 e 330, também apresenta o íon intenso de m/z 426, diferindo dos demais perfis. Entretanto as extrações alcaloídicas das amostras P4 e P5 de folhas, bem como as amostras P1 e P5 de galhos devem ser aperfeiçoadas para obtenção de uma robustez adequada para análise comparativa.

A lista de íons e m/z encontrados nas folhas encontram-se no **APÊNDICE J** e galhos **APÊNDICE K**.

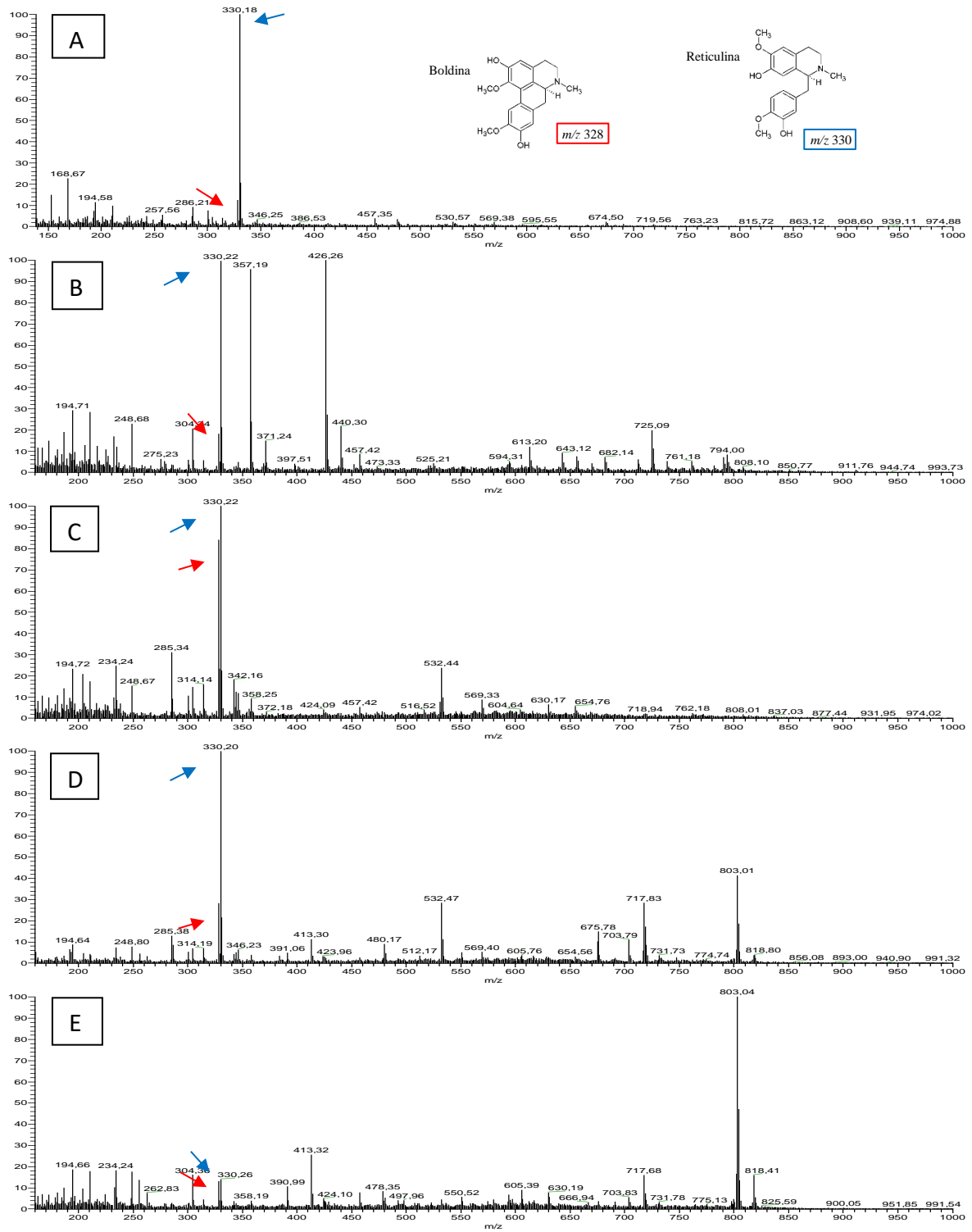


Figura 26 – Perfis espectrométricos de frações alcalóidicas das folhas pertencentes às cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: A) imbaúba, B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa

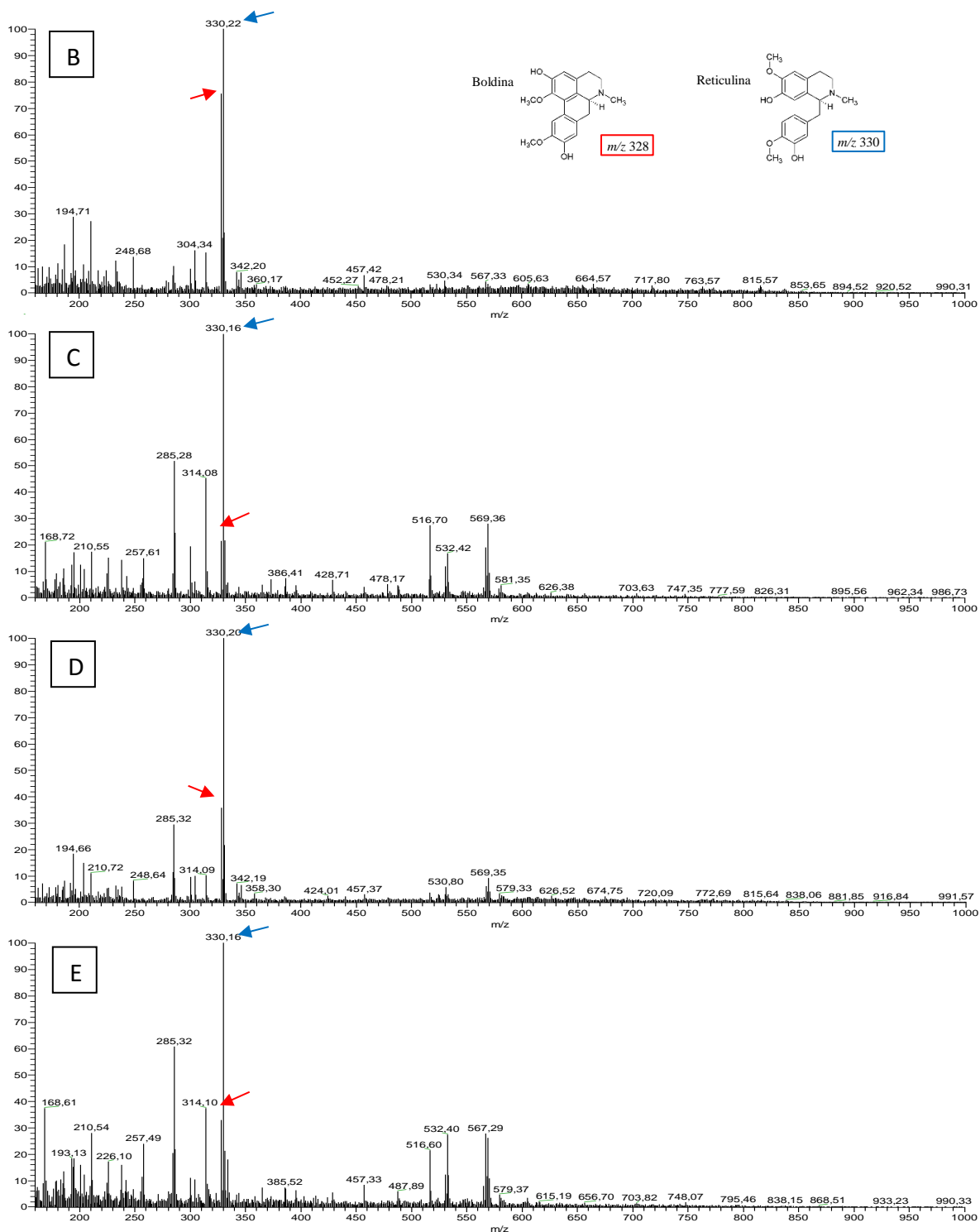


Figura 27 – Perfis espectrométricos de frações alcalóidicas dos galhos pertencentes às cinco variedades de pau-rosa da 1ª coleta: B) louro, C) tucuribá, D) abacate e E) preciosa

5.3 A segunda coleta. Validação

Nesta etapa, as amostras escolhidas por meio do estudo preliminar realizado na primeira coleta foram recoletadas e o número de espécimes de cada variedade foi aumentado. Sendo assim, foram coletadas folhas de cinco espécimes de cada variedade de pau-rosa. Os óleos essenciais de folhas secas foram obtidos em duplicata e os extratos etanólicos foram obtidos em triplicata.

5.3.1 Análise de rendimentos dos óleos essenciais

Os rendimentos e os desvios padrões referentes aos óleos essenciais das folhas de cada espécime na segunda coleta constam na **Tabela 4**. Os valores médios dos rendimentos de cada grupo de amostras, seus desvios padrões (DV) e coeficiente de variação de Pearson (CV) também são apresentados. O maior rendimento foi observado para o terceiro espécime de pau-rosa imbaúba (P1-III) com valor de 2,4%. Dentre o menor rendimento podemos observar o de 0,8% do primeiro espécime de pau-rosa louro (P2-I).

Foi possível observar de maneira mais abrangente que o grupo de espécimes da variedade de pau-rosa imbaúba apresentou o maior valor de rendimento (2,1%), enquanto que o grupo de espécimes de pau-rosa louro apresentou o menor valor de rendimento (1,1%). Esses resultados nos mostram uma concordância com os valores de rendimentos máximos e mínimos citados anteriormente para as amostras P1-III e P2-I.

<i>folhas secas</i>				
<i>nomes</i>	<i>amostra</i>	<i>VM, %</i>	<i>DP, %</i>	<i>VM ± DP (CV)</i>
Imbaúba	P1-I	2,2	± 0,0	2,1 ± 0,3 (16,6 %)
	P1-II	2,3	± 0,0	
	P1-III	2,4	± 0,1	
	P1-IV	1,5	± 0,0	
	P1-V	1,9	± 0,1	
Louro	P2-I	0,8	± 0,0	1,1 ± 0,3 (31,0 %)
	P2-II	0,9	± 0,1	
	P2-III	1,6	± 0,0	
	P2-IV	1,2	± 0,1	
	P2-V	0,9	± 0,1	
Tucuribá	P3-I	1,3	± 0,1	1,5 ± 0,3 (19,5 %)
	P3-II	1,9	± 0,0	
	P3-III	1,7	± 0,2	
	P3-IV	1,2	± 0,0	
	P3-V	1,4	± 0,1	
Abacate	P4-I	1,5	± 0,1	1,7 ± 0,2 (11,1 %)
	P4-II	2,0	± 0,0	
	P4-III	1,7	± 0,14	
	P4-IV	1,6	± 0,2	
	P4-V	1,8	± 0,0	
Preciosa	P5-I	1,1	± 0,2	1,5 ± 0,3 (18,0 %)
	P5-II	1,7	± 0,1	
	P5-III	1,6	± 0,1	
	P5-IV	1,8	± 0,0	
	P5-V	1,4	± 0,0	

VM – valor médio; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação

Tabela 4 – Rendimento (valor médio da duplicata, em %) das amostras dos óleos essenciais de folhas secas, da segunda coleta

5.3.2 Análise estatística dos perfis cromatográficos dos óleos essenciais das folhas

Ao todo, 89 substâncias foram encontradas (**APÊNDICE L**). A substância majoritária em todas as amostras foi o monoterpeno linalol, também encontrado em altos percentuais nas amostras, assim como, na primeira coleta.

Os percentuais médios de linalol variaram de 82,6% até 45,0%, onde a variedade imbaúba (P1) apresentou 82,6%, seguida por tucuribá (P3) 80,7%, abacate (P4) 80,1%, preciosa (P5) 79,6% e louro (P2) 45,0%.

As análises por PCA de *loadings* e *scores* (**Figura 28**) possibilitaram a formação de três grupos. O primeiro grupo, marcado com um círculo azul, foi constituído por todas as amostras pertencentes às variedades de pau-rosa imbaúba (P1), pau-rosa tucuribá (P3), pau-rosa abacate (P4) e pau-rosa preciosa (P5). Este agrupamento foi extremamente preciso, pois as amostras e suas respectivas duplicatas ficaram extremamente sobrepostas. Uma das substâncias mais representativas deste grupo foi o linalol (S20). Sendo assim, a diferenciação destas quatro variedades de pau-rosa, não pôde ser realizada através da análise estatística dos perfis cromatográficos de óleos essenciais. Os 20 espécimes coletados, sendo cinco de cada variedade, possuem composição química dos óleos essenciais semelhante o que impossibilita afirmar que são variedades diferentes.

Industrialmente, as variedades imbaúba (P1), tucuribá (P3), abacate (P4) e preciosa (P5) são consideradas promissoras para a extração de óleos essenciais e aplicação na indústria de perfumes quando se deseja obter o composto linalol em altos teores.

O segundo grupo, marcado com um círculo vermelho, é constituído apenas pelo primeiro espécime do grupo de pau-rosa louro (P2-I) e sua duplicata. Esta amostra se separou

das demais de seu grupo, sendo mais um indicativo de que o grupo de amostras desta variedade não é homogêneo e, portanto, devem possuir outras espécies de *Aniba* ou de outro gênero. O composto mais representativo para este grupo é o benzoato de benzila (íon 88).

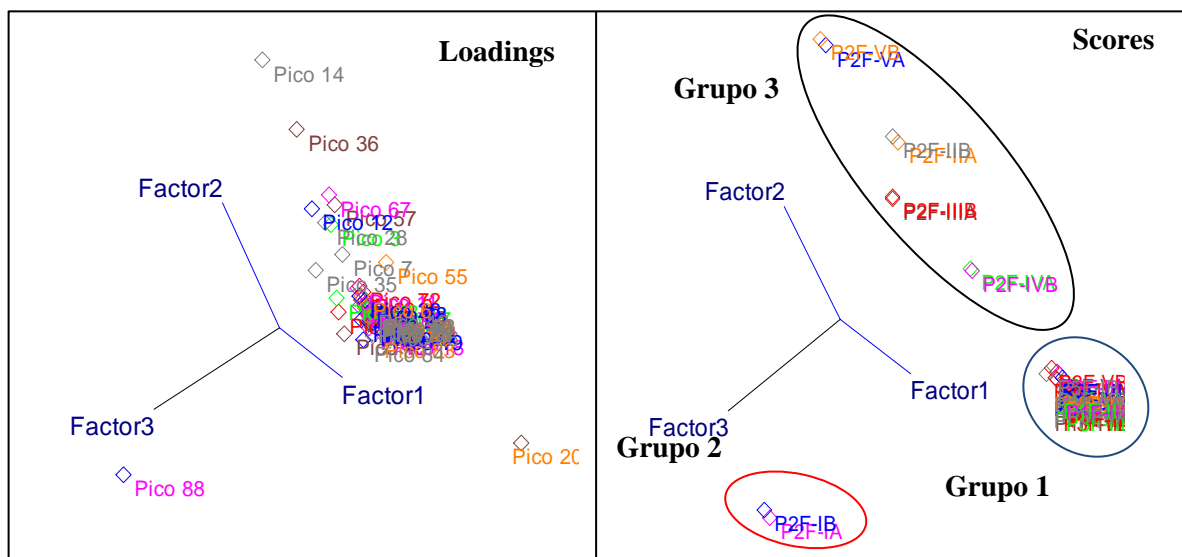


Figura 28 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de óleos essenciais de folhas secas, da segunda coleta

O terceiro grupo, marcado com o círculo preto, é bem heterogêneo. Como podemos observar pelas dispersões das amostras no PCA de *scores* e também pelos resultados de PCA (**Figura 29**), onde as amostras do terceiro grupo se encontram isoladas das demais. Todos os componentes dos óleos desse grupo influenciam diretamente essas amostras. De forma geral as amostras da variedade louro (P2) estudadas nessa pesquisa não são aconselhadas para a extração do óleo.

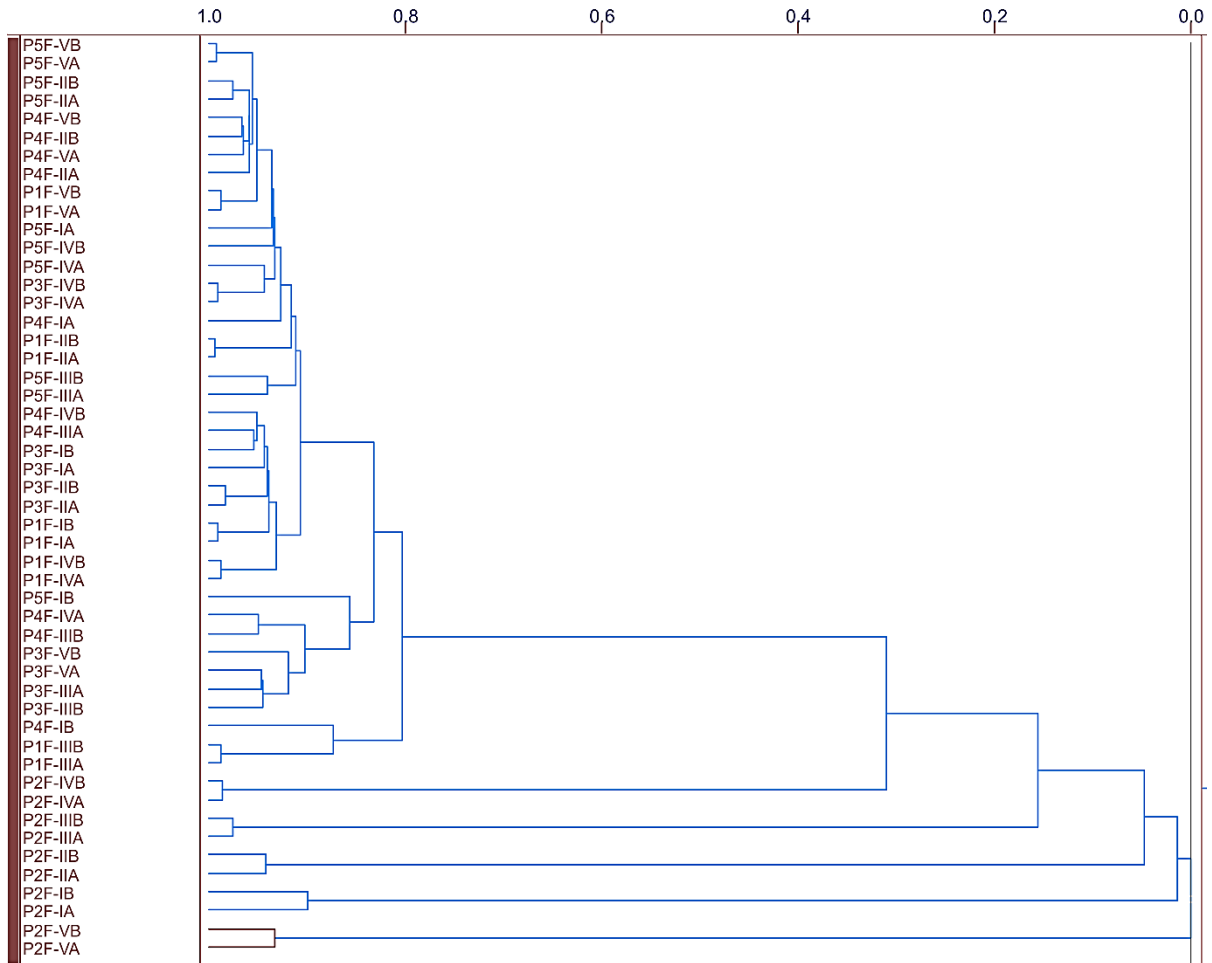


Figura 29 – HCA das amostras, em duplicata, de óleos essenciais de folhas secas de pau-rosa imbaúba (P1), pau-rosa louro (P2), pau-rosaa tucuribá (P3), pau-rosa abacate (P4) e pau-rosa preciosa (P5), da segunda coleta

5.3.3 Avaliação de coesão dos resultados obtidos na comparação dos perfis cromatográficos dos óleos essenciais com exclusão da substância majoritária linalol

Esta avaliação foi realizada com o intuito de permitir a visualização dos agrupamentos das análises estatísticas por PCA, sem a influência da substância linalol. A exclusão permite

observar se os componentes minoritários influenciam nos resultados de PCA, da mesma maneira que o linalol (quando este está incluído na análise).

A exclusão do linalol foi realizada em todas as tabelas de percentual de cada espécime coletado e em seguida, os percentuais foram calculados novamente, permitindo a obtenção da quantia de 100% na soma dos percentuais das substâncias de cada amostra.

O resultado de PCA de *loadings* e *scores*, podem ser observados na **Figura 30**.

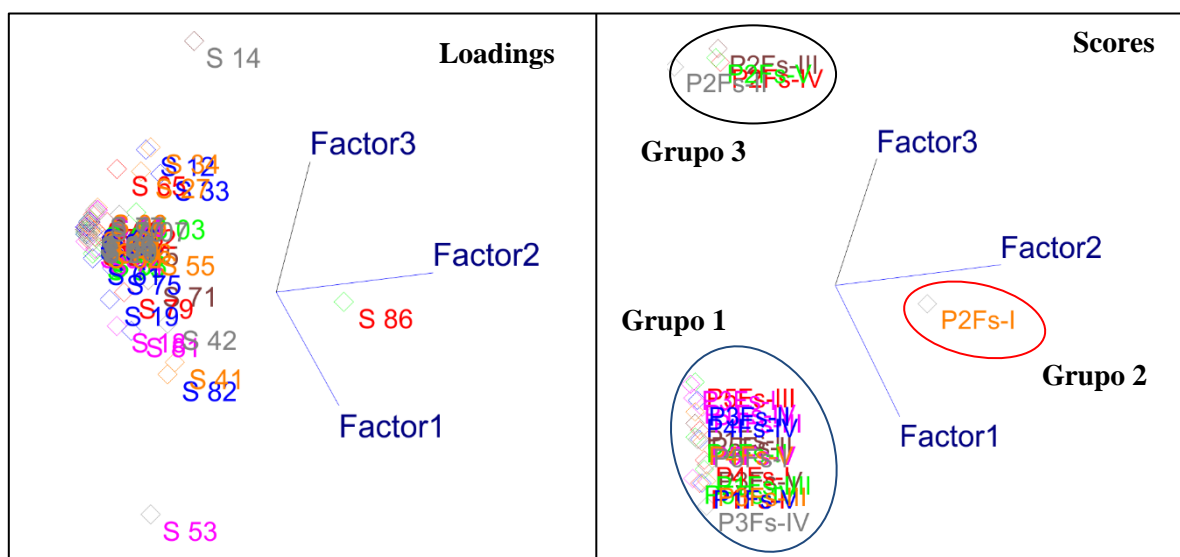


Figura 30 – PCA, em três dimensões, de *loadings* e *scores* das amostras de óleos essenciais de folhas secas, com exclusão da substância linalol, da segunda coleta

Foi possível constatar que as amostras foram agrupadas de maneira similar ao observada nas análises de PCA que possuíam linalol. Os agrupamentos se dividiram em três e as amostras também permaneceram nos mesmos grupos.

Assim, todos os espécimes da variedade imbaúba (P1), tucuribá (P3), abacate (P4) e preciosa (P5) constituíram o primeiro grupo. O espécime P2-I, constituiu o segundo grupo e os espécimes P2-II, P2-III, P2-IV e P2-V, todos pertencentes à variedade louro (P2), constituíram

o terceiro grupo. Estes resultados confirmam o obtido nas correlações entre os perfis cromatográficos.

5.3.4 Análise de rendimento dos extratos etanólicos das folhas secas

Os rendimentos e desvios padrões referentes aos extratos etanólicos de cada espécime constam na **Tabela 5**, bem como os valores médios dos rendimentos de cada grupo de variedade, desvios padrões (DV) e coeficiente de variação de Pearson (CV). Os resultados encontrados para as extrações possuem como maior rendimento o valor 15,4% da segunda amostra da variedade de pau-rosa preciosa (P5-II) e o menor rendimento o valor de 5,8% para quarta amostra de pau-rosa preciosa (P5-IV).

Analisando os valores de rendimento de cada grupo de variedades, foi possível observar um maior rendimento do quarto grupo de amostras referentes à variedade de pau-rosa abacate (P4) no valor de 12,3%. O grupo de amostras que produziram o menor rendimento foi o de pau-rosa louro (P2) com o valor de 7,1%.

<i>folhas secas</i>				
<i>nomes</i>	<i>amostra</i>	<i>VM, %</i>	<i>DP, %</i>	<i>VM ± DP (CV)</i>
Imbaúba	P1-I	6,2	± 0,7	11,3 ± 3,0 (26,6 %)
	P1-II	11,7	± 1,1	
	P1-III	13,0	± 0,6	
	P1-IV	13,9	± 1,0	
	P1-V	12,0	± 0,9	
Louro	P2-I	6,6	± 0,2	7,1 ± 1,1 (15,9 %)
	P2-II	6,9	± 0,4	
	P2-III	6,8	± 0,3	
	P2-IV	9,0	± 0,4	
	P2-V	6,2	± 0,7	
Tucuribá	P3-I	10,6	± 0,6	11,4 ± 3,3 (28,9 %)
	P3-II	8,3	± 0,4	
	P3-III	11,4	± 0,2	
	P3-IV	9,8	± 0,7	
	P3-V	16,9	± 0,3	
Abacate	P4-I	12,4	± 0,7	12,3 ± 1,4 (11,3 %)
	P4-II	11,4	± 0,4	
	P4-III	13,5	± 0,6	
	P4-IV	10,4	± 1,2	
	P4-V	13,7	± 1,0	
Preciosa	P5-I	13,6	± 1,4	12,2 ± 3,8 (31,3 %)
	P5-II	15,4	± 1,2	
	P5-III	14,2	± 0,6	
	P5-IV	5,8	± 0,1	
	P5-V	12,0	± 1,8	

VM – valor médio; DP – desvio padrão; CV – coeficiente de variação

Tabela 5 – Rendimento (valor médio da triplicata, em %) das amostras dos extratos etanólicos de folhas secas, da segunda coleta

A PCA de *loadings* permitiu observar os íons que mais colaboraram nos agrupamentos destas trinta amostras. Como íons diferenciais foi possível encontrar os de m/z de 479 (íon 3), 485 (íon 5) e 486 (íon 6). Estes três íons foram encontrados anteriormente nas análises preliminares deste mesmo material e método, descritos nos resultados da primeira coleta, contudo a relação das influências que cada íon diferencial teve nos agrupamentos foi diferente. Algumas diferenças foram observadas quanto aos tipos de íons encontrados nos perfis da segunda coleta quando comparados com a primeira. Foi observada a ausência dos picos de m/z 573 e 738, ambos marcadores do primeiro e terceiro grupo, respectivamente. Essa variação poderia ser decorrente da sazonalidade das coletas dos materiais vegetais ou também uma variação no comportamento da amostra durante a partição hexânica dos extratos etanólicos de folhas.

As análises por HCA confirmaram os agrupamentos observados nas análises de PCA, como podemos observar na **Figura 32**.

Os resultados encontrados também sugerem que podem haver mais variedades quando analisados os grupos individualmente devido o posicionamento espacial existente entre os grupos.

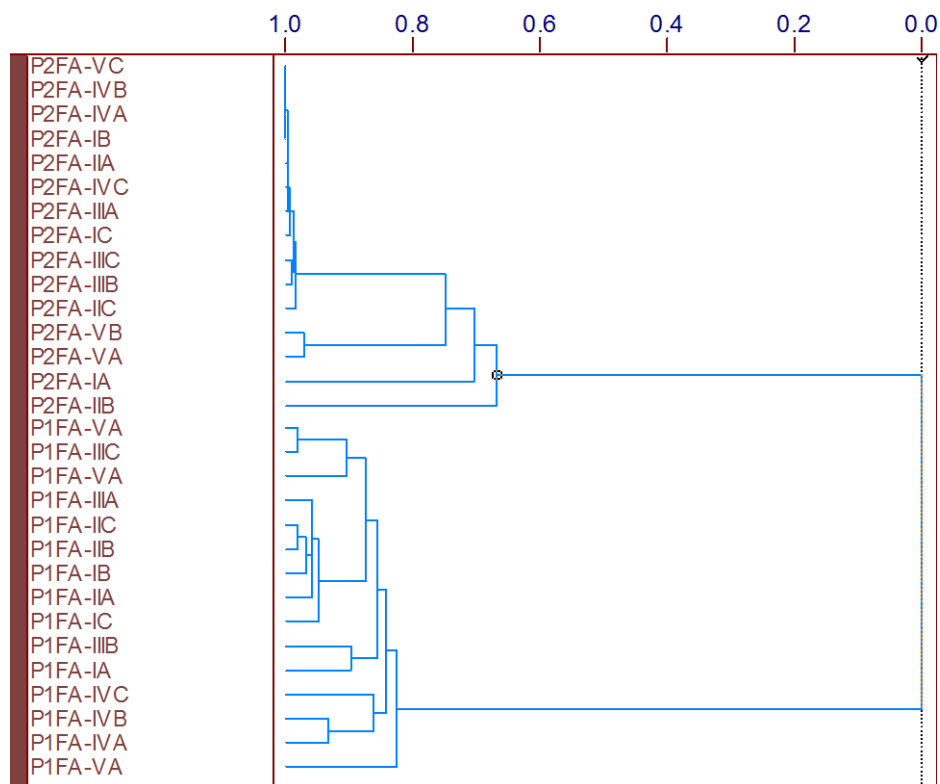


Figura 32 – HCA das amostras, em triplicata, de folhas secas de pau-rosa imbaúba (P1) e pau-rosa louro (P2) extraídas com etanol absoluto, da segunda coleta

A técnica de espectrometria de massas do método de extração por sonicação das folhas foi eficiente na diferenciação por agrupamentos entre os espécimes das variedades de pau-rosa imbaúba (P1) e os da variedade pau-rosa louro (P2). Contudo não foi sensível o suficiente para realizar diferenciação entre as variedades de pau-rosa tucuribá (P3), abacate (P4) e preciosa (P5).

6 CONCLUSÃO

Os perfis cromatográficos obtidos nas análises dos óleos essenciais das folhas das cinco variedades de pau-rosa estudadas, possibilitaram, após tratamento estatísticos, a classificação dos espécimes coletados em três grupos definidos. O primeiro grupo abrangeu as variedades de pau-rosa imbaúba (P1), tucuribá (P3), abacate (P4) e preciosa (P5). O segundo grupo incluiu o primeiro espécime coletado da variedade louro (P2-I) e por fim, o terceiro grupo abrangeu os demais espécimes da variedade louro (P2-II, P2-III, P2-IV e P2-V).

Apesar dos resultados das extrações alcoólicas e hidroalcoólicas das cascas e galhos terem harmonizado com os resultados de extração obtidos para as folhas, eles foram insuficientes para a classificação de grupos quanto ao perfil químico, sugerindo que uma etapa de extração deve ser estudada e inserida no procedimento para obtenção significativa do teor de metabólitos, sobremaneira os minoritários.

O método de obtenção de alcaloides (Soares, 2015) permitiu a visualização de substâncias já identificadas em outros estudos como a anibina (Mors, Gotlieb e Djerassi, 1957), que é um alcaloide característico da espécie *Aniba rosaeodora* Ducke. Contudo, a aplicação de outras metodologias de obtenção destas frações alcaloídicas devem ser realizadas e analisadas para uma melhor compreensão deste grupo de metabólitos.

Todos os resultados mostraram similaridade nos perfis químicos por meio de técnicas instrumentais e métodos de extração diferentes, corroborando com a ideia de que os espécimes pertençam à mesma espécie, entretanto houve questionamento para as amostras da variedade louro (P2), que apresentaram perfis diferenciados das demais amostras, sugerindo que pertençam a uma outra espécie.

Os óleos essenciais das folhas das variedades imbaúba (P1), tucuribá (P3), abacate (P4) e preciosa (P5) apresentaram composição química semelhantes, com altos teores de linalol e desta maneira, podem ser utilizadas para extração de óleos essenciais em nível industrial sem comprometer a qualidade do produto final.

Este estudo abre caminho para o desenvolvimento de metodologias de identificação e certificação de pau-rosa (*A. rosaeodora* Ducke), espécie da flora Amazônica comercializada e ameaçada de extinção, para a qual ainda residem dúvidas quanto à identificação botânica.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P., *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*, 4th ed. **Allured Business Media, 2001.**

ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. de L.; VEIGA JUNIOR, V. F. *Composição Química e Atividade Biológica dos Óleos Essenciais das Folhas e Caules de Rhodostemonodaphne parvifolia Madriñán (Lauraceae)*. **Acta Amazônica**, 3:40 (2010) 567 – 572.

ALELUIA, I. B.; BRAZ, R. F.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, E. G.; MARQUES, R., *The Chemistry of Brazilian Lauraceae*. **Phytochemistry** part 49 17 (1978) 517-521.

AQUINO NETO, F. R., NUNES, D. S. S., *Cromatografia - Princípios Básicos e Técnicas Afins*. 1^a ed. Rio de Janeiro: **Interciência, 2003.**

ANDRADE, C. H. S.; BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R., *Neolignans from Aniba ferrea*. **Phytochemistry** 6:19 (1980) 1191-1194.

BARBOSA-FILHO, J. M ; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R., *Neolignans from the Fruits of Licaria armeniaca*. **Phytochemistry** 1:26 (1987) 319-321.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B., *Chemometrics: A Practical Guide*. 1^a ed. New York: **John Wiley & Sons Ltda, 1998.**

BRAVO, J. A.; SAUVAIN, M.; BALDERRAMA, L.; MORETTI, C.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J., *Alkaloids from Aniba muca*. **Revista Boliviana de Química** 1:13 (1996) 19-22.

BRERETON, R. G., *Chemometrics for Pattern Recognition*. UK: **John Willey and Sons, 2009.**

CHANDERBALI, A. S.; van der WERFF, H.; RENNER, S. S., *Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes*. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 88 (2001) 104–134.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S., *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas, SP: **Editora da Unicamp, 2006.**

COMBES, G.; VASSORT, PH.; WINTERNITZ, F., *Structure de la Rubranine, Chalcone Isolee de l'Aniba rosaeodora Ducke*. **Tetrahedron** 26 (1970) 5981-5992.

COUTINHO, D. F.; AGRA, M. de F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BASÍLIO, I. J. L. D., *Morfo-anatomia foliar de Ocotea gardneri (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroideae)*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16 (2006) 178-184.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C., *Reconhecimento de Padrões por Métodos Não Supervisionados: Explorando Procedimentos Quimiométricos para o Tratamento de Dados Analíticos*. **Química Nova** 2:30 (2007) 481-487.

CUSTÓDIO, D. L., *Aproveitamento dos Subprodutos da Extração do Óleo do pau-rosa (Aniba rosaeodora Ducke) para a Obtenção de Bioprodutos*. (157 folhas). Manaus: **Departamento de Biotecnologia**, 2013.

DEWICK, P. M., *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2ª ed England: **John Wiley & Sons Ltd**, 2002.

DIAZ, A. M. P. et al. *The chemistry of Brazilian Lauraceae XLVI. Note on Aniba species*. **Acta Amazonica** 1:7 (1977) 41-43.

DIAZ, A. M. P.; GOTTLIEB, H. E.; GOTTLIEB, O. R., *Dehydrodieugenols from Ocotea cymbarum*. **Phytochemistry Reviews** 19 (1980) 681.

FIDELIS, C. H. V; SAMPAIO, P. T. B; KRAINOVIC, P. M.; AUGUSTO, F.; BARATA, L. E. S., *Correlation Between Maturity of Tree and GC x GC-qMS Chemical Profiles of Essential Oil from Leaves of Aniba rosaeodora Ducke*. **Microchemical Journal** 109 (2012) 73-77.

GOTTLIEB, O. R. *Plant Chemosystematics and Phylogeny III*. **Phytochemistry** 11 (1972) 1537-1570.

GOTTLIEB, O. R. ; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; MAIA, J. G. S. et al., *Óleos Essenciais da Amazônia VII*. **Acta Amazônica** 1:11 (1981) 143-148.

GOTTLIEB, O. R.; KUBITZKI K., *Plant Chemosystematics and Phylogeny XIV*. **Biochemical Systematics and Ecology** 1:9 (1981a) 5-12.

GOTTLIEB, O. R.; KUBITZKI K. *Plant Chemosystematics and Phylogeny XII*. **Biochemical Systematics and Ecology** 137 (1981b) 281-289.

GOTTLIEB, O. R.; BITTENCOURT, A. M.; MORS, W. B.; TAVEIRA MAGALHÃES, M., **Anais da Academia brasileira de Ciência** 36 (1964) 29.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. **Journal of Organic Chemistry**, 24 (1959) 17-18.

GOTTLIEB, O. R., MAGALHÃES, M. T.; MORS, W. B., *The Chemistry of rosewood V: 4-Methoxifenilcomalina*. **Anais da Associação Brasileira de Química** 18 (1959) 37-41.

HAYASHI, N. & KOMAE, H. *Chemistry and Distribution of Sesquiterpene Furans in Lauraceae*. **Biochemical Systematics and Ecology** 8 (1980) 381- 383.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D.J. *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. **The Journal of Nutritional Biochemistry** 13:10 (2002) 572-584.

- JOBST, J & HESSE, O. **Justus Liebigs Annalen der Chemie.** 199 (1879) 17-96.
- KLAUSMEYER, P.; CHMURNY, G. N.; MCCLOUD, T. G.; TUCKER, K. D.; SHOEMAKER, R. H. *A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from Aniba panurensis.* **Journal of natural products** 67 (2004) 1732-1735.
- KOSTERMANS, A. J. G. H., *A monograph of the genera: Anaueria, Beilschmiedia (American species) and Aniba.* **Recueil des travaux botaniques néerlandais** 35 (1938) 834-931.
- KUBITZKI, K.; RENNER, S., *Lauraceae I (Aniba and Aiouea).* New York, New York Botanical Garden: **Flora Tropical** 31 (1982).
- MARQUES, C. A., *Importância Econômica da Família Lauraceae.* **Floresta e Ambiente, Universidade Federal de Viçosa** 1:8 (2001) 195-206.
- MONTERO, J. L.; WINTERNITZ, F., *Struture de la rubranine chalcona isolee du bois de rose Aniba rosaeodora Ducke.* **Tetrahedron** 29 (1972) 1243-1252.
- MORAIS, A. A de; REZENDE, C. M. A. M.; BÜLOW, M. V. von; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; ROCHA, A. I.; MAGALHÃES, M. T. *Óleos essenciais do gênero Aniba.* **Acta Amazônica** 1:2 (1972) 41-44.
- MORS, W. B.; GOTTLIEB, O. R.; DJERASSI, C., **Journal of American Chemical Society** 79 (1957) 4507.
- MORS, W. B.; MAGALHÃES, M. T.; GOTTLIEB, O. R., *Aniba fragrans Ducke, a valid species.* **Anais da Associação Brasileira de Química** 19 (1960) 193-197. 1960. (*The chemistry of the genus Aniba, 10*).
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introdução à espectroscopia.* 4^a.ed. **Cengage Learning™**, 2010.
- REZENDE, C. M. A. da M.; VON BULOW, M. V.; GOTTLIEB, O. R.; PINHO, S. L. V., *Constituição e fitoquímica de estiril-pironas da Aniba parviflora.* **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 43 (1971) 121-122. (*A química de lauráceas brasileiras, 16*).
- ROHWER, J. G.; KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V., *The families and genera of vascular plants.* Berlim: **Springer-Verlag** 2 (1993) 366-391.
- LIN, R. J.; LO, W. L.; WANG, Y. D.; CHEN, C. Y. *A novel cytotoxic monoterpenoid from the leaves of Cinnamomum subavenium.* **Natural Product Research** 12:22 (2008) 1055–1059.
- ROSSI, M. H.; YOSHIDA, M.; MAIA, J. G. S. *Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from Aniba species.* **Phytochemistry** 6:45 (1997) 1263-1269.

SILVERSTEIN, R. S.; WEBSTER, F. X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos* 6ªed. LTC, 2000.

SIMIÉ, A.; SOKOVIÉ, M. D.; RISTIÉ, M.; GRUJIÉ-JOVANOVIÉ, S.; VUKOJEVIÉ, J. & MARIN, P. D., *The Chemical Composition of some Lauraceae Essential Oils and Their Antifungal Activities*. **Phytotherapy Research** 18 (2004) 713-717.

SOARES, E. A.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R., et al., *Chemical Composition and antimicrobial evaluation of the essential oils of Bocageopsis pleiosperma Maas*. **Natural Products Research** 29 (2015) 1285-1288.

SOUZA, V. C. *Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa, São Paulo: **Instituto Plantarum**, 2005.

SOUZA, V. C. *Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2ª ed. Nova Odessa, São Paulo: **Instituto Plantarum**, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E., **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2004.

TREVISAN L. M. V., YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R., *Hexahydrobenzofuranoid neolignans from an Aniba species*. **Phytochemistry** 3:23 (1984) 661-665.

SHARAF, M. A.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R., *Chemometrics*, New York: **John Wiley & Sons**, 1986.

VAN DER WERFF, H., *A Key to the Genera of Lauraceae in the New World*. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 2:78 (1991) 377-387.

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H. G. *Toward and improved classification of Lauraceae*. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 8 (1996) 419-432.

YAMAGUCHI, K. L; ALCÂNTARA, J. M.; VEIGA JUNIOR, V. F., *Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae*. **Acta Amazônica** 42 (2012) 541-546.

APÊNDICE A. Tabela com o número de substâncias e tempos de retenção encontrados nos perfis cromatográficos dos óleos essenciais de folhas frescas da primeira coleta.

<i>Óleos essenciais de folhas frescas</i>							
substâncias	tempos de retenção	I.D	I.A	substâncias	tempos de retenção	I.D	I.A
S 01	3,16	n.i	-	S 31	31,87	n.i	-
S 02	4,34	n.i	-	S 32	31,98	óxido de cariofileno	1582
S 03	6,28	α -pineno	932	S 33	32,55	n.i	-
S 04	6,90	benzaldeído	952	S 34	32,99	n.i	-
S 05	7,52	β -pineno	974	S 35	33,14	n.i	-
S 06	9,20	β -felandreno	1025	S 36	34,06	n.i	-
S 07	10,80	n.i	-	S 37	34,36	n.i	-
S 08	11,41	n.i	-	S 38	34,68	n.i	-
S 09	12,04	linalol	1095	S 39	34,83	n.i	-
S 10	12,21	n.i	-	S 40	34,96	n.i	-
S 11	14,68	n.i	-	S 41	35,13	n.i	-
S 12	14,88	n.i	-	S 42	35,14	n.i	-
S 13	15,37	n.i	-	S 43	35,25	n.i	-
S 14	15,51	n.i	-	S 44	35,30	n.i	-
S 15	15,63	α -terpineol	1186	S 45	35,42	n.i	-
S 16	15,86	n.i	-	S 46	35,78	n.i	-
S 17	16,90	n.i	-	S 47	36,55	n.i	-
S 18	19,10	n.i	-	S 48	36,65	n.i	-
S 19	22,04	n.i	-	S 49	36,84	n.i	-
S 20	22,84	n.i	-	S 50	36,98	n.i	-
S 21	23,40	n.i	-	S 51	37,13	n.i	-
S 22	23,66	n.i	-	S 52	37,28	n.i	-
S 23	24,32	(-)- β -elemeno	1389	S 53	37,94	n.i	-
S 24	25,46	β -cariofileno	1417	S 54	38,12	n.i	-
S 25	27,76	n.i	-	S 55	38,68	benzoato de benzila	1759
S 26	28,19	β -selineno	1489	S 56	41,15	n.i	-
S 27	28,56	α -selineno	1498	S 57	41,47	n.i	-
S 28	30,81	n.i	-	S 58	41,86	n.i	-
S 29	31,19	n.i	-	S 59	42,11	n.i	-
S 30	31,78	n.i	-	S 60	42,83	n.i	-

APÊNDICE B. Tabela com o número de substâncias e tempos de retenção encontrados nos perfis cromatográficos dos óleos essenciais de folhas secas da primeira coleta.

<i>Óleos essenciais de folhas secas</i>							
substâncias	tempos de retenção	I.D	I.A	substâncias	tempos de retenção	I.D	I.A
S 01	3,16	n.i	-	S 29	31,86	n.i	-
S 02	4,35	n.i	-	S 30	31,98	óxido de cariofileno	1582
S 03	6,27	α -pineno	932	S 31	32,54	n.i	-
S 04	6,90	benzaldeído	952	S 32	32,98	n.i	-
S 05	7,51	β -pineno	974	S 33	33,13	n.i	-
S 06	9,20	β -felandreno	1025	S 34	34,05	n.i	-
S 07	10,79	n.i	-	S 35	34,52	n.i	-
S 08	11,40	n.i	-	S 36	34,67	n.i	-
S 09	12,02	linalol	1095	S 37	34,78	n.i	-
S 10	12,20	n.i	-	S 38	34,81	n.i	-
S 11	14,88	n.i	-	S 39	34,95	n.i	-
S 12	15,37	n.i	-	S 40	35,13	n.i	-
S 13	15,49	n.i	-	S 41	35,24	n.i	-
S 14	15,61	α -terpineol	1186	S 42	35,30	n.i	-
S 15	15,86	n.i	-	S 43	35,42	n.i	-
S 16	19,09	n.i	-	S 44	36,53	n.i	-
S 17	22,81	n.i	-	S 45	36,64	n.i	-
S 18	23,39	n.i	-	S 46	36,82	n.i	-
S 19	23,65	n.i	-	S 47	36,98	n.i	-
S 20	24,02	n.i	-	S 48	37,12	n.i	-
S 21	24,32	(-)- β -elemeno	1389	S 49	37,93	n.i	-
S 22	25,46	β -cariofileno	1417	S 50	37,93	n.i	-
S 23	27,47	n.i	-	S 51	38,68	benzoato de benzila	1759
S 24	28,19	β -selineno	1489	S 52	41,47	n.i	-
S 25	28,55	α -selineno	1498	S 53	41,86	n.i	-
S 26	30,80	n.i	-	S 54	42,11	n.i	-
S 27	31,18	n.i	-	S 55	42,83	n.i	-
S 28	31,77	n.i	-				

APÊNDICE C. Tabela com o número de substâncias e tempos de retenção encontrados nos perfis cromatográficos dos óleos essenciais de galhos secos da primeira coleta.

<i>Óleos essenciais de galhos secos</i>							
substâncias	tempos de retenção	I.D	I.A	substâncias	tempos de retenção	I.D	I.A
S 01	3,16	n.i		S 35	32,55	n.i	-
S 02	4,45	n.i		S 36	32,79	n.i	-
S 03	6,27	α -pineno	932	S 37	32,98	n.i	-
S 04	6,90	benzaldeído	952	S 38	33,13	n.i	-
S 05	7,51	β -pineno	974	S 39	33,33	n.i	-
S 06	7,68	n.i		S 40	33,70	n.i	-
S 07	7,88	n.i		S 41	33,84	n.i	-
S 08	9,20	β -felandreno	1025	S 42	33,99	n.i	-
S 09	10,79	n.i		S 43	34,06	n.i	-
S 10	11,40	n.i		S 44	34,18	n.i	-
S 11	12,02	linalol	1095	S 45	34,36	n.i	-
S 12	12,06	n.i		S 46	34,53	n.i	-
S 13	14,20	n.i		S 47	34,68	n.i	-
S 14	14,88	n.i		S 48	34,81	n.i	-
S 15	15,06	terpinen-4-ol	1174	S 49	34,97	n.i	-
S 16	15,37	n.i		S 50	35,14	n.i	-
S 17	15,62	α -terpineol	1186	S 51	35,25	n.i	-
S 18	15,86	n.i		S 52	35,32	n.i	-
S 19	18,33	n.i		S 53	35,54	n.i	-
S 20	19,20	n.i		S 54	35,63	n.i	-
S 21	22,78	n.i		S 55	35,73	n.i	-
S 22	24,31	(-)- β -elemeno	1389	S 56	35,83	n.i	-
S 23	25,46	β -cariofileno	1417	S 57	36,12	n.i	-
S 24	27,74	n.i		S 58	36,37	n.i	-
S 25	28,18	β -selineno	1489	S 59	36,54	n.i	-
S 26	28,55	α -selineno	1498	S 60	36,66	n.i	-
S 27	29,65	n.i		S 61	36,86	n.i	-
S 28	30,39	n.i		S 62	37,00	n.i	-
S 29	30,64	n.i		S 63	37,15	n.i	-
S 30	30,80	n.i		S 64	37,94	n.i	-
S 31	31,19	n.i		S 65	38,27	n.i	-
S 32	31,76	n.i		S 66	38,52	n.i	-
S 33	31,88	n.i		S 67	42,79	n.i	-
S 34	31,98	óxido de cariofileno	1582				

APÊNDICE D. Tabela com a o número de íons e suas respectivas m/z encontrados nos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos de folhas secas da primeira coleta.

<i>Extratos etanólicos de folhas secas</i>			
	<i>m/z</i>		<i>m/z</i>
Íon 1	121,2	Íon 29	518,8
Íon 2	179,2	Íon 30	519,8
Íon 3	215,3	Íon 31	529,9
Íon 4	255,5	Íon 32	530,9
Íon 5	259,2	Íon 33	531,0
Íon 6	273,3	Íon 34	532,9
Íon 7	283,5	Íon 35	554,6
Íon 8	286,3	Íon 36	546,0
Íon 9	287,4	Íon 37	547,0
Íon 10	294,9	Íon 38	559,8
Íon 11	297,1	Íon 39	560,9
Íon 12	311,4	Íon 40	572,5
Íon 13	322,0	Íon 41	573,0
Íon 14	324,1	Íon 42	574,0
Íon 15	325,4	Íon 43	575,0
Íon 16	339,4	Íon 44	593,0
Íon 17	438,9	Íon 45	658,7
Íon 18	466,0	Íon 46	737,9
Íon 19	479,5	Íon 47	738,7
Íon 20	480,5	Íon 48	739,8
Íon 21	485,5	Íon 49	740,9
Íon 22	486,6	Íon 50	744,9
Íon 23	495,3	Íon 51	745,9
Íon 24	496,4	Íon 52	754,6
Íon 25	515,0	Íon 53	755,5
Íon 26	516,1	Íon 54	774,4
Íon 27	517,0	Íon 55	775,6
Íon 28	518,2	Íon 56	793,0

APÊNDICE E. Tabela com a o número de íons e suas respectivas m/z encontrados nos perfis espectrométricos dos extratos hidroalcoólicos de folhas secas da primeira coleta.

<i>Extratos hidroalcoólicos de folhas secas</i>	
	<i>m/z</i>
Íon 1	179,2
Íon 2	191,3
Íon 3	215,3
Íon 4	255,5
Íon 5	259,2
Íon 6	269,1
Íon 7	294,9
Íon 8	311,4
Íon 9	325,4
Íon 10	339,4
Íon 11	363,0
Íon 12	371,0
Íon 13	438,9
Íon 14	479,5
Íon 15	480,5
Íon 16	485,5
Íon 17	495,3
Íon 18	514,9
Íon 19	516,1
Íon 20	517,0
Íon 21	518,8
Íon 22	530,9
Íon 23	593,0
Íon 24	609,1
Íon 25	738,7
Íon 26	739,8

APÊNDICE F. Tabela com a o número de íons e suas respectivas m/z encontrados nos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos de galhos secos da primeira coleta.

<i>Extratos etanólicos de galhos secos</i>			
	<i>m/z</i>		<i>m/z</i>
Íon 1	121,2	Íon 23	530,9
Íon 2	255,5	Íon 24	532,1
Íon 3	259,2	Íon 25	532,9
Íon 4	273,3	Íon 26	554,6
Íon 5	294,9	Íon 27	593,0
Íon 6	311,4	Íon 28	658,7
Íon 7	325,4	Íon 29	722,7
Íon 8	463,4	Íon 30	723,8
Íon 9	479,5	Íon 31	737,9
Íon 10	480,5	Íon 32	738,7
Íon 11	481,5	Íon 33	739,8
Íon 12	485,5	Íon 34	740,9
Íon 13	495,3	Íon 35	752,6
Íon 14	496,4	Íon 36	753,0
Íon 15	498,9	Íon 37	753,7
Íon 16	514,3	Íon 38	754,6
Íon 17	515,0	Íon 39	755,5
Íon 18	516,1	Íon 40	774,4
Íon 19	517,0	Íon 41	774,7
Íon 20	518,2	Íon 42	775,6
Íon 21	518,8	Íon 43	776,7
Íon 22	519,8	Íon 44	958,8

APÊNDICE G. Tabela com a o número de íons e suas respectivas m/z encontrados nos perfis espectrométricos dos extratos hidroalcoólicos de galhos secos da primeira coleta.

<i>Extratos hidroalcoólicos de galhos secos</i>			
	<i>m/z</i>		<i>m/z</i>
Íon 1	113,1	Íon 20	515,0
Íon 2	121,2	Íon 21	516,1
Íon 3	179,1	Íon 22	517,0
Íon 4	255,5	Íon 23	518,2
Íon 5	259,2	Íon 24	518,8
Íon 6	273,3	Íon 25	530,9
Íon 7	294,9	Íon 26	532,1
Íon 8	311,4	Íon 27	593,0
Íon 9	325,4	Íon 28	658,7
Íon 10	339,4	Íon 29	722,7
Íon 11	363,0	Íon 30	737,9
Íon 12	438,8	Íon 31	738,7
Íon 13	463,4	Íon 32	739,8
Íon 14	479,5	Íon 33	740,9
Íon 15	480,5	Íon 34	752,6
Íon 16	481,5	Íon 35	754,0
Íon 17	485,5	Íon 36	754,6
Íon 18	495,3	Íon 37	755,5
Íon 19	498,9	Íon 38	774,4

APÊNDICE H. Tabela com a o número de íons e suas respectivas m/z encontrados nos perfis espectrométricos dos extratos etanólicos de cascas secas da primeira coleta.

<i>Extratos etanólicos de cascas secas</i>			
	<i>m/z</i>		<i>m/z</i>
Íon 1	179,2	Íon 25	517,0
Íon 2	215,3	Íon 26	518,2
Íon 3	243,3	Íon 27	518,8
Íon 4	255,5	Íon 28	519,8
Íon 5	259,2	Íon 29	552,7
Íon 6	283,5	Íon 30	554,6
Íon 7	294,9	Íon 31	568,6
Íon 8	297,1	Íon 32	593,0
Íon 9	325,4	Íon 33	658,3
Íon 10	339,4	Íon 34	658,7
Íon 11	363,0	Íon 35	706,9
Íon 12	438,9	Íon 36	722,1
Íon 13	463,5	Íon 37	722,7
Íon 14	464,5	Íon 38	723,8
Íon 15	479,5	Íon 39	728,7
Íon 16	480,5	Íon 40	736,7
Íon 17	485,5	Íon 41	737,9
Íon 18	486,6	Íon 42	738,2
Íon 19	495,3	Íon 43	738,7
Íon 20	499,0	Íon 44	739,8
Íon 21	502,8	Íon 45	744,9
Íon 22	514,8	Íon 46	745,9
Íon 23	515,0	Íon 47	774,4
Íon 24	516,1		

APÊNDICE I. Tabela com a o número de íons e suas respectivas m/z encontrados nos perfis espectrométricos dos extratos hidroalcoólicos de cascas secas da primeira coleta.

<i>Extratos hidroalcoólicos de cascas secas</i>	
	<i>m/z</i>
Íon 1	113,1
Íon 2	283,5
Íon 3	179,1
Íon 4	259,2
Íon 5	283,5
Íon 6	363,0
Íon 7	463,4
Íon 8	479,5
Íon 9	480,5
Íon 10	485,5
Íon 11	486,5
Íon 12	515,0
Íon 13	722,7
Íon 14	738,7
Íon 15	744,9

APÊNDICE J. Tabela com a o número de íons e suas respectivas m/z encontrados nos perfis espectrométricos das frações alcaloídicas de folhas secas da primeira coleta.

<i>Frações alcaloídicas de folhas secas</i>			
	<i>m/z</i>		<i>m/z</i>
Íon 1	152,7	Íon 25	285,3
Íon 2	154,7	Íon 26	286,2
Íon 3	160,8	Íon 27	300,3
Íon 4	161,0	Íon 28	304,3
Íon 5	166,6	Íon 29	314,1
Íon 6	168,6	Íon 30	328,1
Íon 7	172,6	Íon 31	329,2
Íon 8	180,6	Íon 32	330,2
Íon 9	186,6	Íon 33	331,2
Íon 10	192,2	Íon 34	342,1
Íon 11	193,1	Íon 35	344,2
Íon 12	194,7	Íon 36	346,2
Íon 13	201,0	Íon 37	357,1
Íon 14	204,1	Íon 38	358,2
Íon 15	206,1	Íon 39	391,0
Íon 16	210,5	Íon 40	413,2
Íon 17	216,8	Íon 41	414,3
Íon 18	226,1	Íon 42	457,4
Íon 19	232,5	Íon 43	478,3
Íon 20	234,6	Íon 44	480,1
Íon 21	248,6	Íon 45	481,0
Íon 22	255,8	Íon 46	532,4
Íon 23	257,5	Íon 47	533,4
Íon 24	262,8		

APÊNDICE K. Tabela com a o número de íons e suas respectivas m/z encontrados nos perfis espectrométricos das frações alcaloídicas de galhos secos da primeira coleta.

<i>Frações alcaloídicas de galhos secos</i>			
	<i>m/z</i>		<i>m/z</i>
Íon 1	152,7	Íon 31	286,2
Íon 2	154,7	Íon 32	300,3
Íon 3	162,8	Íon 33	301,2
Íon 4	166,6	Íon 34	304,3
Íon 5	168,7	Íon 35	314,1
Íon 6	169,7	Íon 36	315,1
Íon 7	172,6	Íon 37	328,1
Íon 8	178,4	Íon 38	329,2
Íon 9	180,6	Íon 39	330,2
Íon 10	185,3	Íon 40	331,2
Íon 11	186,6	Íon 41	332,3
Íon 12	192,2	Íon 42	334,2
Íon 13	193,1	Íon 43	342,1
Íon 14	194,7	Íon 44	346,2
Íon 15	201,0	Íon 45	386,4
Íon 16	204,1	Íon 46	391,0
Íon 17	210,5	Íon 47	413,2
Íon 18	211,5	Íon 48	414,3
Íon 19	224,7	Íon 49	428,6
Íon 20	226,0	Íon 50	457,4
Íon 21	232,5	Íon 51	479,0
Íon 22	238,1	Íon 52	480,1
Íon 23	242,2	Íon 53	481,0
Íon 24	248,6	Íon 54	515,9
Íon 25	255,8	Íon 55	516,7
Íon 26	256,9	Íon 56	517,7
Íon 27	257,6	Íon 57	530,7
Íon 28	262,8	Íon 58	532,4
Íon 29	284,3	Íon 59	533,4
Íon 30	285,3		

APÊNDICE L. Tabela com o número de substâncias e tempos de retenção encontrados nos perfis cromatográficos dos óleos essenciais de folhas secas da segunda coleta.

<i>Óleos essenciais de folhas secas</i>															
Subst.	T.R	ID	IA	Subst.	T.R	ID	IA	Subst.	T.R	ID	IA	Subst.	T.R	ID	IA
S 01	3,16	n.i	-	S 23	13,47	n.i	-	S 45	28,96	n.i	-	S 67	34,02	n.i	-
S 02	6,08	α -tujeno	924	S 24	14,61	n.i	-	S 46	29,31	n.i	-	S 68	34,07	n.i	-
S 03	6,28	α -pineno	932	S 25	14,90	n.i	-	S 47	29,57	n.i	-	S 69	34,13	n.i	-
S 04	6,71	camfeno	946	S 26	15,08	terpinen-4-ol	1174	S 48	29,67	n.i	-	S 70	34,37	n.i	-
S 05	6,92	benzaldeído	952	S 27	15,39	n.i	-	S 49	30,66	n.i	-	S 71	34,53	n.i	-
S 06	7,40	n.i	-	S 28	15,63	α -terpineol	1186	S 50	30,82	n.i	-	S 72	34,68	n.i	-
S 07	7,53	β -pineno	974	S 29	15,87	n.i	-	S 51	31,00	n.i	-	S 73	34,80	n.i	-
S 08	7,89	n.i	-	S 30	22,54	n.i	-	S 52	31,20	n.i	-	S 74	34,97	n.i	-
S 09	8,38	α -felandreno	1025	S 31	23,41	n.i	-	S 53	31,42	n.i	-	S 75	35,15	n.i	-
S 10	8,79	p-cimeno	1020	S 32	23,66	n.i	-	S 54	31,79	n.i	-	S 76	35,25	n.i	-
S 11	9,05	n.i	-	S 33	24,03	n.i	-	S 55	31,88	espatulenol	1577	S 77	35,32	n.i	-
S 12	9,21	n.i	-	S 34	24,34	(-)- β -elemeno	1389	S 56	32,00	óxido de cariofileno	1582	S 78	35,84	n.i	-
S 13	9,30	n.i	-	S 35	25,48	β -cariofileno	1417	S 57	32,34	n.i	-	S 79	36,55	n.i	-
S 14	9,32	1,8-cineol	1026	S 36	26,28	n.i	-	S 58	32,47	n.i	-	S 80	36,65	n.i	-
S 15	9,49	n.i	-	S 37	26,88	n.i	-	S 59	32,56	n.i	-	S 81	36,85	n.i	-
S 16	9,87	n.i	-	S 38	27,09	n.i	-	S 60	32,68	n.i	-	S 82	37,00	n.i	-
S 17	10,30	γ -terpineno	1054	S 39	27,77	n.i	-	S 61	32,74	n.i	-	S 83	37,13	n.i	-
S 18	10,81	n.i	-	S 40	27,80	n.i	-	S 62	32,99	n.i	-	S 84	37,95	n.i	-
S 19	11,41	n.i	-	S 41	27,89	n.i	-	S 63	33,14	n.i	-	S 85	38,30	n.i	-
S 20	12,07	linalol	1095	S 42	28,20	β -selineno	1489	S 64	33,51	n.i	-	S 86	38,53	n.i	-
S 21	12,07	n.i	-	S 43	28,57	α -selineno	1498	S 65	33,79	n.i	-	S 87	38,67	benzoato de benzila	1759
S 22	12,22	n.i	-	S 44	28,75	n.i	-	S 66	33,88	n.i	-	S 88	41,48	n.i	-

APÊNDICE M. Tabela com número de íons e suas respectivas m/z dos extratos etanólicos de folhas secas da segunda coleta.

<i>Extratos etanólicos de folhas secas</i>	
	<i>m/z</i>
Íon 1	259,4
Íon 2	283,6
Íon 3	479,5
Íon 4	480, 5
Íon 5	485,6
Íon 6	486,6
Íon 7	495,3
Íon 8	609,4