

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabalho de Licenciatura

Estudo da composição dos monoterpenos das plantas

Juniperus virginiana, *Juniperus bermudiana* e *Thuja Orientalis*



Autor: Ernestina Xavier dos Santos

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

Tema: Estudo da composição dos monoterpenos das plantas
Juniperus virginiana, Juniperus bermudiana e Thuja orientalis

Autor: Ernestina Xavier dos Santos
Supervisor: Dr. Felisberto Pedro Pagula

U. E. M. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BIBLIOTECA
R. E. 23-1.1.A.
DATA 14.12.7.1996
AQUISIÇÃO 2.F.F.R.J.A.
COTA.....

Maputo, 1998

Errata

Página	Linha	Onde se lê	Deve lêr-se
1	5	<i>Ocimum</i>	<i>Ocimum</i>
6	14	3,3-dimetilnorcanfano	3,3-dimetil-2-metileno-biciclo [2.2.1]-heptano
7	2	6,6-dimetil-2-metilenobiciclo[3.1.1]-hepteno-2	6,6-dimetil-2-metileno-biciclo [3.1.1]-heptano
9	2	p-menta-1,8-dieno	1-metil-4 (1-metil-etileno) 3-ciclohexadieno
10	8	<i>Ocimum</i>	<i>Ocimum</i>

DEDICATÓRIA

“À Tenchu, com todo o amor que um coração de mãe pode albergar”

DECLARAÇÃO SOB PALAVRA DE HONRA

O presente trabalho de licenciatura foi elaborado pela autora com base nos recursos a que se faz referência ao longo do texto

AGRADECIMENTOS

A autora deseja aqui expressar os seus mais sinceros agradecimentos ao seu supervisor, Dr. Felisberto Pedro Pagula, pela sábia, dinâmica e eficaz transmissão de conhecimentos e orientação ao longo de todo o trabalho.

À seu esposo Carlos Gonzalez vai um especial agradecimento pela compreensão, incentivo e contínuo apoio ao longo dos estudos

Ao INIA, em especial ao DTA e ao Herbário vão os seus agradecimentos pelo auxílio na composição do trabalho e no levantamento e localização das espécies.

Ao National Botanical Institute – Pretoria, na pessoa do Prof. Dr. H. F. Glen um muito obrigado pela pronta e desinteressada ajuda prestada na classificação taxonómica das espécies.

À sua família, deixa expresso um muito, muito obrigado.

À Faculdade de Ciências, Departamento de Química da Universidade Católica de Chile agradece pela facilidade de acesso à bibliografia.

Seus sinceros agradecimentos à Sr^a. Amélia Furvela pelo seu acompanhamento na realização das tarefas laboratoriais.

Quero agradecer ainda a todas as pessoas amigas e instituições que, de uma ou de outra forma, com seu contributo tornaram possível este trabalho.

A sua profunda gratidão.

A autora

RESUMO

O presente trabalho foi realizado no óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas das plantas *Juniperus virginiana* (Cedro), *Juniperus bermudiana* (Cedro das bermudas) e *Thuja orientalis* (Tuia).

Dada a complexidade das amostras investigadas, reporta-se neste estudo a composição química e enantiomérica dos monoterpenos, como primeira etapa de um programa de investigação sobre esta família.

Este estudo enquadra-se no projecto de investigação em curso no Departamento de Química da Faculdade de Ciências, o qual visa a pesquisa de produtos naturais, sua valorização e possibilidade de aplicação como fonte de fragâncias, feromonas, etc e o consequente enriquecimento do conhecimento sobre a flora Moçambicana.

Os óleos essenciais obtidos das folhas secas, cujos rendimentos foram de 0.28%, 0.31% e 0,49%, respectivamente do *Juniperus virginiana*, *Juniperus bermudiana* e *Thuja orientalis*, foram analisados por Cromatografia Gasosa, usando uma coluna capilar polar (DB-Wax).

A identificação dos compostos foi feita com base na comparação dos tempos de retenção dos padrões. Os resultados obtidos revelam a presença dos compostos: α -pineno, β -pineno, canfeno, 3-careno, α -felandreno, mirceno, limoneno, γ -terpineno e p-cimeno como principais constituintes.

A composição dos hidrocarbonetos das duas espécies de *Juniperus* foi comparada, entre si e com a composição da *Thuja orientalis*, e verificou-se que existem semelhanças entre elas. No entanto elas podem ser diferenciadas pelo seu conteúdo de α -pineno (maioritário na *Thuja orientalis*) e limoneno (maioritário nas espécies *Juniperus*).

O rácio enantiomérico foi determinado através da Cromatografia Gasosa bidimensional usando uma coluna quiral (β -ciclodextrina), tendo-se verificado que o (-) limoneno está presente com elevado grau de pureza óptica (99%) no *Juniperus virginiana*, e na *Thuja orientalis* o componente de maior pureza óptica é o α -(+)-pineno (90%).

ÍNDICE

<u>DEDICATÓRIA</u>	i
<u>DECLARAÇÃO SOB PALAVRA DE HONRA</u>	ii
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ÍNDICE	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
I. INTRODUÇÃO	1
Caracterização das plantas em estudo	2
II OBJECTIVOS DO TRABALHO	3
III. METODOLOGIA DE TRABALHO	3
3.1. Pesquisa bibliográfica	3
3.1.1. Extracção dos óleos essenciais	4
3.1.2. Métodos de determinação da densidade e do índice de refracção	4
3.1.3. Monoterpenos	5
3.1.4. Principais compostos existentes	5
3.1.4.1 α -pineno	6
3.1.4.2 Canfeno	6
3.1.4.3 β -pineno	i
3.1.4.4 Δ^3 -Careno	7
3.1.4.5 α - felandreno	8
3.1.4.6 Mirceno	8
3.1.4.7 Limoneno	9
3.1.4.8 γ -terpineno	9
3.1.4.9 p-cimeno	10
3.2. Cromatografia	10
3.2.1 Cromatografia gasosa	10

3.2.2	Análise por cromatografia gasosa quiral.....	12
3.2.2.1	Classificação das fases estacionárias quirais.....	14
3.2.2.2	Enantioselectividade usando ciclodextrinas derivadas.....	14
3.2.2.3	Enantiomerização.....	16
3.2.2.4	Definições e nomenclatura.....	17
3.2.2.5	Determinação da pureza óptica ou enantiomérica.....	19
3.2.2.6	Princípio do método para interacção enantioselectiva.....	20
3.2.2.7	Fontes de erro.....	22
3.2.2.8	Precisão.....	23
3.2.2.9	Importância dos compostos enantioméricamente puros.....	23
3.3	Instrumentação.....	25
3.3.1	O cromatógrafo.....	26
3.3.2	Integrador.....	27
3.3.3	O computador.....	27
IV.	PARTE EXPERIMENTAL.....	27
4.1	Classificação e colheita das amostras.....	27
4.2	Isolamento dos óleos essenciais.....	28
4.3	Determinação do índice de refração.....	28
4.4	Determinação da densidade.....	28
4.5	Preparação das soluções.....	28
4.6	Análise por Cromatografia Gasosa Monodimensional.....	28
4.7.	Análise por Cromatografia Gasosa Bidimensional.....	30
V.	RESULTADOS.....	32
5.1	Resultados da Cromatografia Gasosa Monodimensional.....	32
5.2	Resultados da Cromatografia Gasosa Bidimensional.....	36
5.3	Resultados de rendimento da extracção dos óleos essenciais do <i>Juniperus virginianas</i> (J.v), <i>Juniperus bemurdiana</i> (J.b) e <i>Thuja orientalis</i> (To).....	37
5.4	Resultados do índice de refração.....	37
5.5	Resultados da densidade.....	38
VI.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	39
	GLOSSÁRIO.....	43
	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	45
	ANEXOS.....	48

Anexo A: Fórmulas usadas nos cálculos estatísticos	
Anexo B: Cromatograma dos padrões	
Anexo C: Relatório do cromatograma dos padrões	
Anexo D: Cromatograma do <i>Juniperus virginiana</i>	
Anexo E: Relatório do cromatograma do <i>Juniperus virginiana</i>	
Anexo F: Cromatograma do <i>Juniperus bermudiana</i>	
Anexo G: Relatório do cromatograma do <i>Juniperus bermudiana</i>	
Anexo H: Cromatograma da <i>Thuja orientalis</i>	
Anexo I: Relatório do cromatograma da <i>Thuja orientalis</i>	
Anexo J: Cromatogramas comparativos entre os padrões e os óleos do <i>Juniperus virginiana</i> , <i>Juniperus bermudiana</i> e <i>Thuja orientalis</i>	
Anexo L: Cromatograma do <i>Juniperus virginiana</i> por 2DGC	
Anexo M: Cromatograma da <i>Thuja orientalis</i> por 2DGC	
Anexo N: Estruturas dos enantiômeros citados ao longo do texto	

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. A_S e A_M – Quantidade de compostos em cada uma das fases
2. CD – Ciclodextrina
3. CDS – Ciclodextrina alquilada
4. CSP – Fase estacionária quiral
5. DTA – Departamento de Terra e Água
6. F – Capacidade de fluxo
7. G.C – Cromatografia gasosa
8. FFAP – Fase de ácidos gordos livres
9. FID – Detector de ionização de chama
10. INIA – Instituto Nacional de Investigação Agronómica
11. K – Constante de equilíbrio
12. K' – Factor capacidade
13. K_{CR} e K_{CS} – Constantes de partição enantioselectivas gás-líquido
14. PPG – Polipropileno glicol
15. $K_{S \rightarrow R}^S$ e $K_{R \rightarrow S}^S$ – Constantes de interconversão
16. R – Rectus
17. RMN – Ressonância magnética nuclear
18. S – Sinister
19. T_R – Tempo de retenção
20. V_0 – Volume morto
21. V_R – Volume de retenção

I. INTRODUÇÃO

Este trabalho enquadra-se num amplo programa de estudo em curso no Departamento de Química da Faculdade de Ciências relativo à pesquisa de produtos naturais, sua valorização e possibilidade de aplicação para a indústria farmacêutica, de insecticidas, de fragâncias e feromonas.

Fez-se um levantamento preliminar em torno de 6 plantas, (*Ocimum americanum*, *Chenopodium ambrosioides*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus bermudiana* e *Thuja orientalis*) nos herbários do Instituto Nacional de Investigação Agronómica (INIA) e no herbário da Faculdade de Ciências, Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane, com o fim de determinar a sua existência e localização para posterior colheita.

Do levantamento feito, seleccionaram-se 3 plantas. *Juniperus virginiana*, *Juniperus bermudiana* e *Thuja orientalis*, que não sendo originárias de Moçambique podem ser utilizadas para o reflorestamento pois, tempos atrás existiram plantações na zona da Namaacha e Marracuene. A *Thuja orientalis* é abundante em quase todas as zonas do País como planta ornamental.

O estudo recaiu sobre essas plantas devido às propriedades biológicas que lhes são atribuídas nomeadamente anti-virais, anti-tumorais, antifúngicas e anti-infecciosas. Além disso, são largamente usadas na indústria de perfumes. Sendo da mesma família (Cupressaceae), permitem uma análise comparativa sob o ponto de vista das características fisiológicas, actividade biológica, bem como da sua composição em termos de monoterpenos. O género *Juniperus* é parte das 20 espécies de plantas mais cotadas no mercado internacional de óleos essenciais, pelo que sobre ele há bastante interesse em desenvolver um estudo teórico - experimental.

O trabalho debruça-se sobre a análise dos monoterpenos e da composição enantiomérica do α -pineno, β -pineno e limoneno dos óleos essenciais extraídos das folhas das plantas acima mencionadas. A extracção foi feita usando um hidrodestilador de Clevenger.

A identificação química dos componentes monoterpénicos bem como o estudo da sua composição enantiomérica e a avaliação da sua pureza óptica é importante, pois, possuindo os óleos destas plantas as actividades biológicas acima reportadas importa saber quais os enantiómeros responsáveis por tal actividade e em que proporção existem

Caracterização das plantas em estudo

Tabela I: Principais características das plantas

Nome científico	<i>Juniperus virginiana</i>	<i>Juniperus bermudiana, h.</i>	<i>Thuja orientalis</i>
Família	Cupressaceae	Cupressaceae	Cupressaceae
Nome vernáculo	Cedro	Cedro das bermudas e dos barbados	Thuja
Tipo e características	Árvore conífera +/- 12m, com frutos azulados quando imaturos	Árvore conífera +/- 5-6m, com frutos cor de vinho quando maduros	Arbusto conífero de mais ou menos 2m, com frutos cónicos e lenhosos
Origem	América do Norte	Bermudas	Ásia central
Cultura	Planta cultivada	Planta cultivada	Planta cultivada
Localização	Maputo e Namaacha	Mata da Namaacha	Em quase todas as cidades do território nacional
Local de colheita	Namaacha/Jardim Tunduru	Mata de Namaacha	Faculdade de Engenharia
Condições climáticas e de solo	Solos arenosos	Solos arenosos	Solos medianamente pobres
Propagação	Semente	Semente	Semente
População	Escassa	Escassa	Vasta
Parte da planta usada	Folhas	Folhas	Folhas
Principais componentes	Limoneno, cedreno, cedrol	Limoneno, cedreno, cedrol, α - pineno	α -pineno, β - pineno, Δ^3 -careno
Uso	Anti-viral e anti-tumoral, infecções cutâneas, tosse, nefrite, gonorreia, incenso, repelente de insectos.	Anti-reumático, usa-se para fumigação e é repelente de insectos	Anti-fúngico, anti-viral e anti-tumoral

II OBJECTIVOS DO TRABALHO

O trabalho tem como objectivos principais:

- Estudo da composição química e enantiomérica dos hidrocarbonetos monoterpénicos das plantas *Juniperus virginiana*, *Juniperus bermudiana* e *Thuja orientalis*.
- Determinação da pureza óptica dos monoterpenos α - pineno, β -pineno e limoneno.
- Aprofundar conhecimentos na área da cromatografia gasosa e suas aplicações de forma qualitativa e quantitativa.
- Comparação das espécies na família e no género

III. METODOLOGIA DE TRABALHO

A execução do trabalho compreendeu as seguintes fases:

- Pesquisa bibliográfica
- Trabalho experimental
- Avaliação dos resultados

3.1. Pesquisa bibliográfica

Na pesquisa bibliográfica a informação recolhida refere-se aos métodos de extracção dos óleos essenciais e a alguns métodos de determinação de certas propriedades físicas nomeadamente densidade e índice de refacção. Inclui ainda a pesquisa dos componentes maioritários existentes nos óleos essenciais do *Juniperus virginiana*, *Juniperus bermudiana* e *Thuja orientalis* e suas propriedades, para além da separação de misturas de compostos voláteis por cromatografia gasosa e análise da composição enantiomérica por cromatografia gasosa quiral, mediante o uso de colunas capilares polares contendo ciclodextrinas derivadas.

3.1.1. Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais, assim chamados devido a sua natureza líquida à temperatura ambiente, são na sua maioria derivados de plantas aromáticas; alguns provêm de fontes animais ou são produzidos por microorganismos.

Nas plantas, os óleos essenciais encontram-se no cloroplasto ou nas cavidades de secreção. Podem obter-se mediante destilação, hidrodestilação, destilação por arraste com vapor, hidrodifusão ou expressão (usada sobretudo para a obtenção de óleos cítricos) e extração. Quando se usam solventes não polares para a extração de material de plantas frescas, o produto final chama-se *concreto* e pode ser reextraído com etanol de modo a obter-se um *absoluto*. Ao usar-se material de plantas secas, o produto final toma o nome de *oleoresina*. O *enfleurage* é uma técnica especial usada para extrair os componentes aromáticos das flores frescas, com gorduras de alta pureza. À gordura contendo o óleo dá-se o nome de *pomada* e o óleo é dela extraído com etanol dando um *absoluto*. Escolheu-se como método de extração a hidrodestilação, por ser o método mais recomendado à escala laboratorial pois, permite observar qualquer tipo de alteração durante o processo de destilação e a medição rigorosa do teor de óleo extraído a partir de uma quantidade conhecida de amostra [8].

O equipamento recomendado é o hidrodestilador de Clevenger.

A hidrodestilação tem como vantagem, o baixo custo do equipamento envolvido no processo. O desenho dos destiladores, condensadores e frascos de colheita é simples. É viável em termos de energia podendo ser usado em zonas rurais.

O rendimento foi determinado tomando como base 100 gr de amostra de folhas secas.

3.1.2. Métodos de determinação da densidade e do índice de refração

A densidade de um óleo, é igual à massa de 1ml de óleo, a uma dada temperatura, comparada com a massa de igual volume de água à mesma temperatura. Usa-se um picnómetro para esta determinação.

O índice de refração de um óleo em relação ao ar, é a razão entre o seno do ângulo de incidência e o seno do ângulo de refração, quando um raio luminoso de comprimento de onda definido, passa do ar para o óleo a uma dada temperatura constante. O índice de

refracção varia com o comprimento de onda da luz usada para a medida. Usa-se em geral o refractómetro de Abbe para a determinação do índice de refração.

3.1.3. Monoterpenos

Numerosos produtos naturais são biogeneticamente constituídos a partir de precursores isoprenóicos e não isoprenóicos. Tais compostos, em que as unidades isoprenicas estão ligadas cabeça-cauda são classificados de monoterpenos. Os monoterpenos eram considerados como sendo sub-produtos do metabolismo das plantas sem nenhum fim específico. Estudos feitos com o ácido mevalónico mostraram que os monoterpenos desempenham um papel importante na síntese de compostos como pigmentos, açúcares, aminoácidos e co-enzimas da respiração, tendo ainda um papel importante na fisiologia e ecologia das plantas [6].

Datam do século passado os conhecimentos escritos sobre estruturas de monoterpenos. Entre as primeiras estruturas reportadas figuram as da cânfora, mentol e α -pineno.

O α -pineno é o maior constituinte da terebentina, solvente já usado na Pérsia no século XII e isolado da *Pistacia Terbinthus L*, a chamada árvore da terebentina. A definição da estrutura do α -pineno e a sua correlação com as estruturas do limoneno e do canfeno abriram as portas ao entendimento da estrutura química de uma grande variedade de monoterpenos.

Quanto à sua estrutura os monoterpenos podem dividir-se em três grupos:

- Monoterpenos acíclicos.
- Monoterpenos monocíclicos.
- Monoterpenos bicíclicos.

Este tipo de classificação permite um conveniente estudo dos monoterpenos.

3.1.4. Principais compostos existentes

Os principais compostos existentes nestas espécies são os monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos [10].

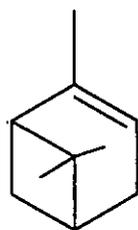
O trabalho destina-se ao estudo do monoterpeno acíclico - mirceno.

Monoterpenos monocíclicos - α -felandreno, limoneno e γ -terpineno.

Monoterpenos bicíclicos - α -pineno, canfeno, β -pineno, Δ^3 -careno, e ainda ao estudo do hidrocarboneto aromático p-cimeno.

3.1.4.1 α -pineno

2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1]hepteno-2

 $C_{10}H_{16}$

-PF. - 57 °C

-PE. 155-160 °C (760mm Hg)

 d_4^{20} 0.858 - 0.860 η_D^{20} 1.4650

O α -pineno é o membro mais importante da classe dos pinenos. Ocorre nas formas (+) e (-) em todos os óleos de terebentina, da qual tem o cheiro característico.

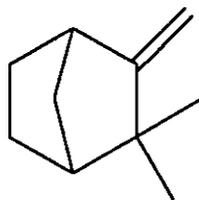
Sob influência de ácidos, o α -pineno sofre rearranjos moleculares.

É insolúvel em água, solúvel em álcool, clorofórmio, e éter.

Usa-se na manufactura da cânfora e de insecticidas.

3.1.4.2 Canfeno

3,3-dimetil-2-metilnorcanfano

 $C_{10}H_{16}$

-PF. - 51 °C

-PE. 158.5 -159.5 °C (760mm Hg)

 d_4^{20} 0.8422 η_D^{54} 1.4551

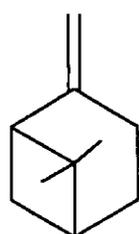
Ocorre na natureza nas formas (+), (-) e (\pm) nos óleos de terebentina, ginja e valeriana.

Tem cheiro insípido, volatiliza quando exposto ao ar. Sua estrutura foi determinada por Wagner em 1899, que sugeriu ser este um rearranjo das moléculas dos borneóis ou dos cloretos de bornil quando são convertidos em canfeno.

É insolúvel em água, moderadamente solúvel em álcool, solúvel em clorofórmio, dioxano e ciclo-hexano.

3.1.4.3 β -pineno

6,6-dimetil-2-metilenobicyclo[3.1.1]-hepteno-2

 $C_{10}H_{16}$

-PE. 164-169 °C (760mm Hg)

d 0.8740-0.8770 (15°C)

 η_D^{20} 1.4775-1.4790

É ópticamente activo encontrando-se na forma (+) no óleo de limão e laranja, na sua forma (-) no óleo de menta e na forma (\pm) no óleo de terebentina.

Outro isómero do β - pineno é o α - pineno. Os dois isómeros distinguem-se pelo facto de o espectro do α -pineno mostrar a presença de três grupos metílicos e o do β -pineno só de dois [1,7].

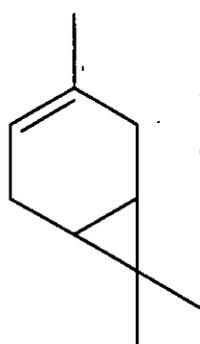
Tem cheiro insípido, volatiliza quando exposto ao ar.

É insolúvel em água, moderadamente solúvel em álcool, solúvel em clorofórmio, dioxano e ciclo-hexano.

Usa-se na manufactura de resinas e como intermediário na indústria de perfumes.

3.1.4.4 Δ^3 -Careno

3,7,7-trimetilbicyclo[4.1.0]-hepteno-3

 $C_{10}H_{16}$

-PE. 168-169 °C (705mm Hg)

d 0.8668(15°C)

 η_D^{20} 1.4740

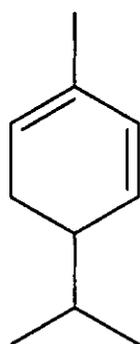
Só se conhecem dois derivados do careno que ocorrem na natureza. O Δ^3 -careno que ocorre no óleo das agulhas do pinho e o Δ^2 -careno que ocorre em diversos óleos essenciais. Por reacção com o ácido clorídrico dá o dicloreto de silvestreno [1].

O Δ^3 -careno é um hidrocarboneto bicíclico que se oxida com facilidade quando exposto ao ar. Tem um cheiro adocicado e mais agradável que o da terebentina, onde é geralmente encontrado.

É praticamente insolúvel na água e solúvel em óleos e solventes orgânicos.

3.1.4.5 α - felandreno

5-isopropil-2-metil-1,3-ciclohexadieno



$C_{10}H_{16}$

-PE. 175-176 °C (760mm Hg)

d_4^{25} 0.8463

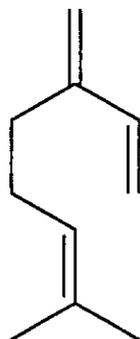
η_D^{20} 1.4777

Este composto tem um isómero, o β -felandreno, sendo ambos ópticamente activos.

Todos os seus enantiómeros ocorrem na natureza. O α -felandreno ocorre na forma (+) no óleo de ginja, anis e em certos cactos, na forma (-) no óleo de eucalipto. É insolúvel em água e é solúvel no éter.

3.1.4.6 Mirceno

7-metil-3-metileno-1,6-octadieno



$C_{10}H_{16}$

-PE. 167°C (760mm Hg)

d_4^{15} 0.8013

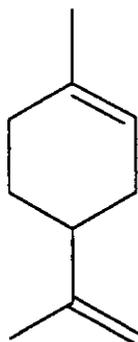
η_D^{19} 1.4700

É um hidrocarboneto monoterpénico acíclico que ocorre em geral no óleo da verbena e do loureiro. É insolúvel em água, é solúvel em álcool, clorofórmio e ácido acético glacial



3.1.4.7 Limoneno

p-menta-1,8-dieno



$C_{10}H_{16}$

-PE. 175-176 °C (762mm Hg)

d_4^{20} 0.8402

η_D^{20} 1.4744

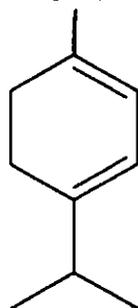
É opticamente activo. Ocorre em vários óleos particularmente no óleo de limão laranja hortelã, alcaravia e no óleo da casca da tangerina. Encontra-se na sua forma (+) no óleo de limão e laranja, na forma (-) no óleo de menta e na forma (\pm) no óleo de terebentina.

É um monoterpene monocíclico. A modificação racémica é conhecida por dipenteno.

Usa-se como solvente, na manufactura de resinas, como agente de secagem e de dispersão.

3.1.4.8 γ -terpineno

1-isopropil-4-metil-1,4-ciclohexadieno



$C_{10}H_{16}$

-PE. 182 °C (760mm Hg)

d_4^{20} 0.849

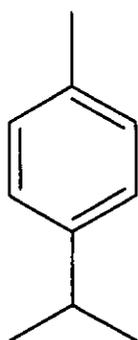
η_D^{20} 1.4740

É um monoterpene cíclico, que ocorre na natureza. Tem dois isómeros, o α e o β -terpineno, sendo este último sintético e preparando-se a partir do sabineno.

O γ -terpineno encontra-se em geral no óleo do *Cardamomum* e em algumas *Cupressaceas*.

3.1.4.9. p-cimeno

p-isopropiltolueno



$C_{10}H_{16}$

PF. $-72^{\circ}C$

-PE. $176-178^{\circ}C$ (760mm Hg)

d 0.860 ($15^{\circ}C$)

η_D^{20} 1.4900

É um hidrocarboneto aromático. Ocorre maioritariamente nas folhas do *Ocimum basilicum*. É um líquido incolor, insolúvel em água e solúvel em álcool e éter.

Usa-se como solvente e na manufactura de resinas sintéticas

3.2. Cromatografia

A cromatografia é um método que data dos primórdios do século e desde lá tem-se desenvolvido, sendo nos nossos dias, um dos métodos mais poderosos e diversificados das técnicas de separação química.

A cromatografia assenta basicamente na distribuição de um composto entre duas fases, uma das quais (a fase móvel) desloca-se em relação á outra (fase estacionária). As várias formas de cromatografia dependem da natureza respectiva das duas fases [2, 3, 22].

3.2.1 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa é a técnica mais importante na separação dos constituintes dos óleos essenciais.

Devido aos avanços tecnológicos, dispõe-se de numerosos tipos de colunas e detectores e com as modernas colunas capilares de sílica fundida é possível a separação, identificação e quantificação de numerosos constituintes dos óleos essenciais sem distorção dos picos, mesmo nos casos de tempos de eluição muito longos. A cromatografia gasosa baseia-se na separação de componentes voláteis de um sistema líquido ou gasoso absorvido em forma de película delgada num suporte (fase estacionária).

A fase móvel é o gás azoto ou hélio que arrasta os compostos voláteis ao longo da coluna. A coluna encontra-se num forno que pode funcionar isotermicamente ou com um programa de temperatura.

Os componentes da mistura separam-se devido à diferença dos coeficientes de partição dos mesmos entre a fase móvel e a fase estacionária. Os compostos com menor afinidade para com a fase estacionária são eluídos primeiro. Nas análises de rotina injecta-se por meio de microseringas 1 µl de óleo a 10% em n-Hexano ou éter dietílico. O rácio do "split" selecciona-se mediante experiência mas em geral é de 1:60 - 1:40. Devido ao seu alto poder de separação em análises rápidas usam-se actualmente colunas capilares de vidro ou de sílica fundida. São colunas longas (20 - 60 m) e de diâmetro interno muito pequeno. As fases apolares geralmente usadas para os óleos essenciais são as de sílica SE-30, 52, 54, OV-1, 73, 101, DB-1 e DB-5 (apolares) e as polares são as de polipropileno glicol (PPG), as fases de Carbowax e de seus ésteres nitrotereftálicos (fases FFAP)

Na cromatografia gasosa usam-se diferentes tipos de colunas [2] sendo contudo as capilares as que têm capacidade de albergar um elevado número de bandas cromatográficas. A elevada permeabilidade das colunas capilares permite o uso de colunas longas sem perdas excessivas de carga e a obtenção de considerável eficácia. As colunas capilares relativamente curtas permitem análises mais rápidas. Obtêm-se melhores resultados se a coluna capilar for longa e estreita, sem que tal comprimento seja excessivo de modo a não aumentar desnecessariamente os tempos de retenção.

A retenção de um composto na coluna pode ser expressa pelo seu tempo de retenção t_R , volume de retenção V_R , é dado por:

$$V_R = t_R \times F$$

em que F é capacidade de fluxo ou factor capacidade (K') que está directamente relacionada com a sua constante de equilíbrio (K) na fase móvel e estacionária do sistema.

O factor capacidade define-se como:

$$K' = A_s/A_m$$

em que A_s e A_m são as quantidades do composto em cada uma das fases. Se V_s e V_m

são os volumes das respectivas fases e V_m em geral é V_o = volume morto, consequentemente:

$$K' = (V_R - V_o) / V_o$$

o que nos permite calcular o factor capacidade directamente do cromatograma.

Os componentes eluídos vão para o detector. Os detectores mais usados são: Detector de condutividade térmica (TCD), Detector de Ionização de chama (FID), Detector de Captura electrónica (ECD) e mais recentemente o Detector de emissão atómica (AED), o espectrómetro de infravermelho (IR), a espectrometria de massa (MS) e outros.

Os compostos detectados são processados por meio de um integrador e são registados em forma de picos na escala de tempo. Esse é o cromatograma. O integrador indica os tempos de retenção (RT) e faz a integração das percentagens relativas de cada pico.

Sendo os óleos essenciais misturas complexas de compostos voláteis cuja separação depende da habilidade do analista para a optimização das condições de análise tais como o tipo de coluna, fase estacionária, parâmetros do programa de temperatura e outros, uma vez estabelecidos esses parâmetros pode-se obter um cromatograma bem resolvido. Cada pico no cromatograma representa pelo menos um constituinte e cada um deles pode ser identificado medindo a sua posição relativa a um pico padrão de uma substância conhecida (RT relativo) ou o seu tempo de retenção pode ser comparado ao de compostos conhecidos cuja eluição tenha sido feita em condições idênticas. A certeza do pico pode ser obtida por co-injecção do suposto componente com óleo essencial. Esta técnica é designada "enriquecimento do pico". Um aumento do tamanho do pico é uma prova de existência do componente.

Pode-se fazer a análise quantitativa por cromatografia gasosa. Nos sistemas modernos a quantificação das análises é feita por integração em sistemas computarizados mediante a padronização. Resultados quantitativos fiáveis podem ser obtidos apenas pelo método do padrão interno ou por calibração com padrões de referência.

3.2.2 Análise por cromatografia gasosa quiral

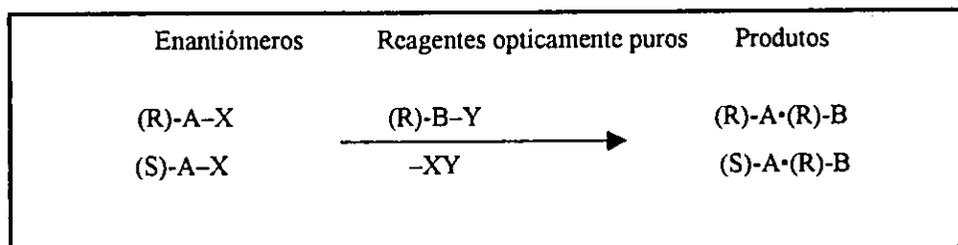
A separação dos enantiómeros pode ser feita de duas formas:

- (i) *Método indirecto* - por conversão dos enantiómeros em derivados diastereómeros através de uma reacção com um agente de resolução enantiomericamente puro e,

subsequente separação dos diastereómeros por cromatografia gasosa numa fase estacionária não quiral convencional.

- (ii) *Método directo* - Separação dos enantiómeros por cromatografia gasosa em fases estacionárias quirais que contenham um agente de resolução de alta pureza (mas não necessariamente completa) [9,11].

Enquanto o método (i) envolve a formação de diastereómeros antes da separação, no método (ii) há uma associação diastereomérica rápida e reversível entre a fase estacionária quiral (CSP) (também designada de selector quiral) e o analito racémico ou não racémico. Os diastereómeros têm diferentes propriedades físicas podendo por isso ocorrer perdas ou decomposições durante as etapas do trabalho, no manuseamento e isolamento das amostras no método (i). Além disso, a composição enantiomérica original pode resultar falseada devido a diferenças na resposta do detector aos diastereómeros, sendo por isso preferido o método (ii). É um método útil quando não se requer derivatização da amostra [4, 11, 19, 21].



Esquema 1 - Princípio de derivatização quiral dos enantiómeros de modo a dar diastereómeros separáveis por cromatografia em fases estacionárias não quirais [4].

O sucesso duma separação quiral pode ser verificado por controle experimental. Um critério inequívoco da separação enantiomérica é a ocorrência do pico coalescente (primeiro tipo) quando a fase estacionária correspondente é usada e, da inversão do pico (primeiro tipo) quando se usa uma fase estacionária quiral de configuração oposta, para o analito enriquecido enantiomericamente [16,17].

A enantioselectividade $-\Delta R,S$ (ΔG), observada na cromatografia gasosa, advém da associação diastereomérica entre os enantiómeros do selectante e o seleccionador quiral.

3.2.2.1 Classificação das fases estacionárias quirais

Na separação enantiomérica por cromatografia gasosa usam-se principalmente três tipos de fases estacionárias quirais [19]: (1) em derivados aminoácidos quirais via ligação hidrogénio [4,11,19], (2) em complexos de coordenação metálica via complexação [20,22] e (3) em ciclodextrinas derivadas via inclusão [7,8,23].

Inicialmente, todos os seleccionadores quirais eram usados como líquidos não voláteis ou como soluções em polisiloxano ou esqualeno. Subsequentemente alguns selectores foram ligados quimicamente ao polisiloxano (fases estacionárias quirais tipo Chirasil) e a primeira foi a fase estacionária tipo Chirasil-Val [24] e fases relacionadas [25,26]. Esta aproximação foi recentemente estendida à complexação cromatográfica pela síntese do Chirasil -Me [27] e para a inclusão por cromatografia gasosa, pela síntese do Chirasil-Dex (tabela II) [28,31].

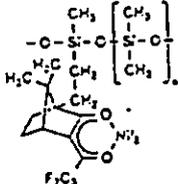
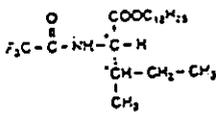
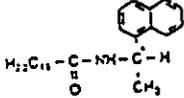
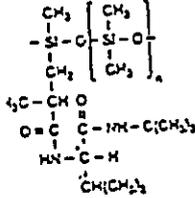
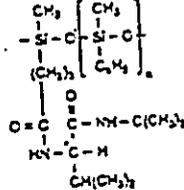
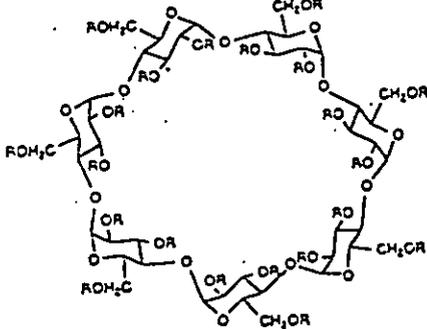
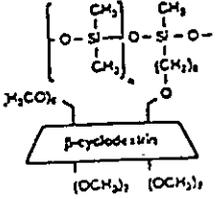
Os polímeros quirais ligados quimicamente, combinam a selectividade das fases estacionárias quirais com a eficiência dos polisiloxanos, dando assim uma coluna capilar de alta resolução com uma maior gama de temperatura de operação. Além disso, as fases estacionárias tipo Chirasil podem ser immobilizadas no interior da coluna capilar de sílica fundida por moderação [11,24] ou por cruzamento de ligação extensiva [31].

3.2.2.2 Enantioselectividade usando ciclodextrinas derivadas

A primeira separação enantiomérica usando uma fase estacionária quiral tipo inclusão foi reportada em 1983 para o α e β - pineno e ainda para o *cis* - e *trans* - pinano em colunas tubulares contendo a α -ciclodextrina em formamida [23]. Mais tarde reconheceu-se que as ciclodextrinas alquiladas (CDS) podiam ser usadas em colunas capilares de alta resolução nas análises enantioméricas.

A fim de combinar a enantioselectividade das CSPs com as excelentes propriedades de revestimento e eficiência dos polisiloxanos, as CDS foram dissolvidas em siliconas moderadamente polares. Assim, as CDS podem ser empregues para a separação enantiomérica por cromatografia gasosa independentemente dos pontos de fusão e fases de transição [28,29].

Tabela II: Algumas fases estacionárias quirais usadas para a cromatografia gasosa quiral

Tipo	Estrutura/Nome	Abreviatura
Metal Coordination		Chiralasil-Metal
Hydrogen Bonding. Modified Amino Acids		amino acid phase
		amide phase
		Chiralasil-Val
		diamide phase linked to modified XE-60 polysiloxane phase
Apolar Cyclodextrin	 <p data-bbox="565 1685 959 1770"> R = CH₃, heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)-β-cyclodextrin R = C₄H₉, heptakis(2,3,6-tri-O-pentyl)-β-cyclodextrin </p>	Chiralasil-Dex
		

As colunas capilares de sílica fundida cobertas com Chirasil-Dex (disponíveis a partir do Chrompack international) têm as seguintes vantagens [30]:

- Uso de uma matriz não polar de polisiloxano (na qual os derivados podem ser diluídos fisicamente) resultando uma baixa temperatura de eluição para os analitos polares.
- São altamente inertes permitindo a análise de compostos polares sem prévia derivatização.
- São de alta concentração de CD o que resulta num aumento do factor de separação α .
- Têm uma alta estabilidade a longo prazo e são compatíveis com todas as técnicas de injeção.

Os factores de separação α para os enantiómeros em fases estacionárias quirais de CDS são geralmente baixos. Esse facto, é porém compensado pela alta eficiência das colunas capilares de alta resolução. Estes baixos factores de separação são mesmo úteis em termos de tempo de análise e em relação a sobreposição das matrizes complexas. [30,31]

3.2.2.3 Enantiomerização

A integridade configuracional dos enantiómeros durante o processo de separação por cromatografia gasosa é essencial para uma análise enantiomérica correcta. Quando os enantiómeros são susceptíveis à inversão de configuração obtêm-se picos de perfil característicos, tal facto é reconhecido pelo aparecimento dum planalto, entre os picos terminais dos enantiómeros. Pela análise da forma dos picos, os parâmetros de enantiomerização (ΔG^\ddagger) podem ser determinados por cromatografia gasosa dinâmica baseada no processo ilustrado na Figura 1.

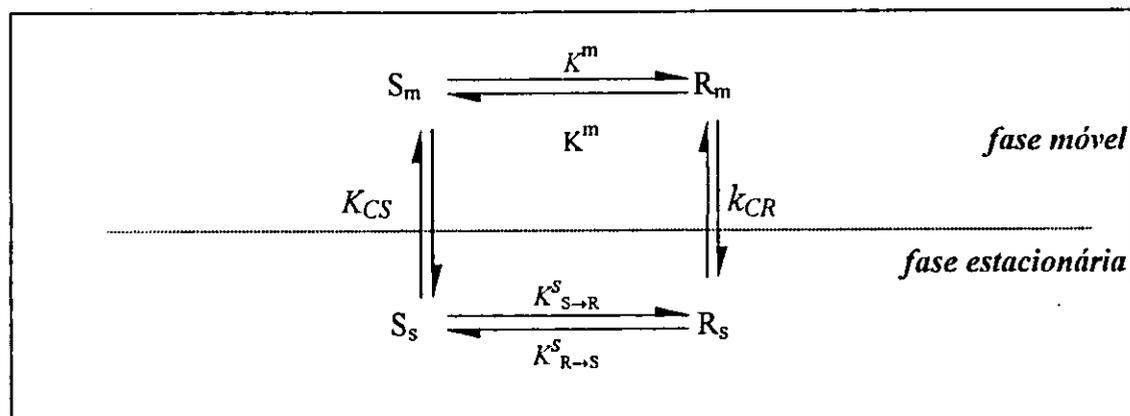


Figura 1- Processo cíclico envolvendo enantiomerização

A interconversão dos enantiômeros tem diferente energia na fase estacionária devido as constantes de partição enantioselectivas (gás-líquido) $K_{CR} > K_{CS}$ (Figura 1) responsáveis pela separação enantiomérica. Daí as razões da interconversão $K^S_{S \rightarrow R} > K^S_{R \rightarrow S}$ serem diferentes de acordo com a equação:

$$\frac{K_{CR}}{K_{CS}} = \frac{K^S_{S \rightarrow R}}{K^S_{R \rightarrow S}}$$

Enquanto o primeiro enantiômero eluído é transformado em alto grau no segundo enantiômero eluído R, ($K^S_{S \rightarrow R} > K^S_{R \rightarrow S}$), o segundo enantiômero eluído R tem um tempo longo de residência na coluna $K_{CR} > K_{CS}$. Assim, o enriquecimento e o esgotamento do R (e vice-versa o mesmo acontecendo com S) cancela-se mutuamente e ocorre uma desracemização total.

3.2.2.4 Definições e nomenclatura

As moléculas quirais podem ser de diferente natureza e forma. Sob o ponto de vista dos elementos de simetria, podem ser classificadas em três categorias: Central, axial e planar, significando isso que o espaço tridimensional pode estar assimetricamente ocupado por um centro quiral (1) axial (2) ou planar (3) como se pode ver na Figura 2 [4].

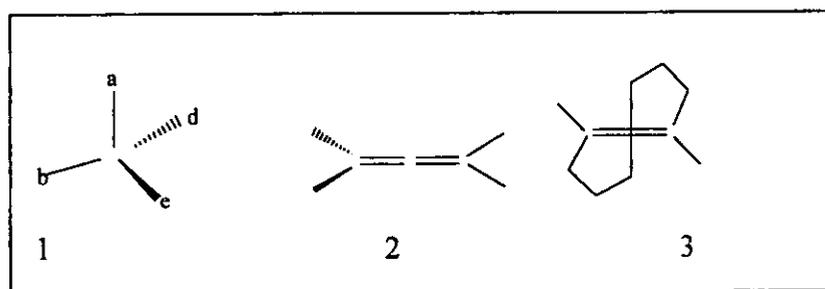


Figura 2- Centros quirais

De modo a determinar a correcta configuração espacial de átomos ou grupos numa molécula opticamente activa, em 1956 Cahn, Ingold e Prelog apresentaram um novo sistema, a nomenclatura (**R, S**) que é aplicável a qualquer molécula quiral e permite determinar a configuração a partir da designação R (rectus=direito) ou S (sinister=esquerdo) [4,9].

O princípio deste sistema assenta em 3 etapas: (1) Ordenar os ligandos associados a um dado elemento de quiralidade numa sequência. (2) Usar essa sequência para estabelecer uma regra de quiralidade. (3) Usar o sentido quiral dessa regra para classificar o elemento de quiralidade.

(1) Os ligandos em redor do centro quiral estão ordenados de acordo com as seguintes regras básicas:

- a) Tem prioridade o maior n° atómico.
- b) Tem prioridade a maior massa atómica
- c) A posição *cis* tem prioridade em relação à *trans*
- d) Os pares (R, R) ou (S, S) têm prioridade em relação aos (R, S) ou (S, R).
- e) Os pares de electrões livres são considerados átomos com n° atómico zero.

2) Usando essas regras, os ligandos ordenados na sequência $A > B > C > D$ são vistos de tal modo que D, o substituinte de menor prioridade está do lado oposto ao do observador. (Figura 3)

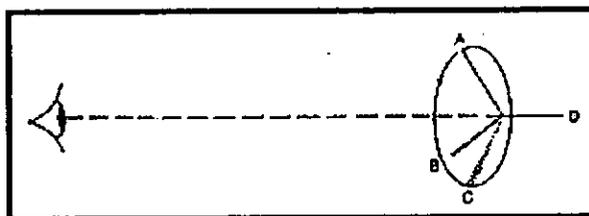


Figura 3- Ordenamento dos ligandos (S) em torno de um centro quiral.

- 3) Os restantes ligandos são contados começando pelo de maior prioridade (A, B, C). Se essa operação for feita no sentido dos ponteiros do relógio, a designação é R (de *rectus*) e de outro modo é S (ou seja *sinister*).

A escolha da regra na simetria axial, implica que os átomos mais próximos do eixo sejam considerados em sequência prioritária, como por exemplo o carbono *orto* num composto biarílico.

Nas moléculas com simetria planar (Figura 4), deve determinar-se antes de mais o plano de quiralidade. O passo seguinte é a determinação do átomo piloto P que deve estar directamente ligado a um átomo do plano estando de preferência do lado mais próximo. P é escolhido de acordo com a regra de sequência e deve ser passado para o plano do átomo a que está directamente ligado. Esse átomo é o de maior prioridade na sequência planar. O 2º átomo dessa sequência é o átomo (b) directamente ligado a (a) [4].

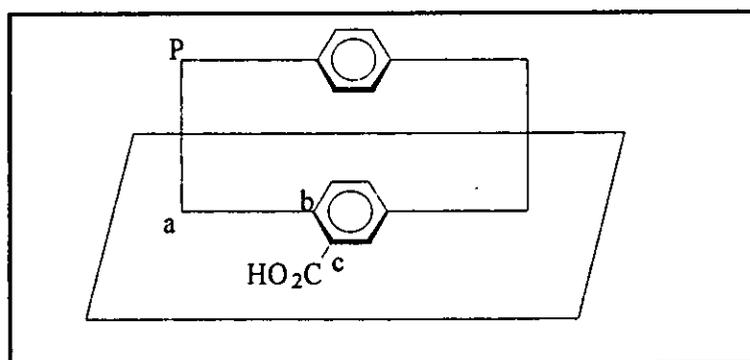


Figura 4- Ordenamento dos ligandos num plano quiral

3.2.2.5 Determinação da pureza óptica ou enantiomérica

Um dos aspectos mais importantes ligados à actividade óptica dos compostos é a

determinação da sua pureza.

A pureza enantiomérica é determinada com respeito à presença de um só enantiómero. Os métodos aplicados para a determinação podem ser divididos em duas categorias conforme requeiram ou não a separação dos enantiómeros.

Os métodos que não requerem a separação dos enantiómeros são a polarimetria, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a diluição isotópica, a calorimetria e as técnicas enzimáticas.

O mais aplicado é a polarimetria. Com excepção da RMN, todos os outros métodos medem um efeito directo de modo que se necessitam de dados de um enantiómero puro para a comparação.

3.2.2.6 Princípio do método para interacção enantioselectiva

Na cromatografia gasosa quiral é importante o tipo de interacção molecular com a fase estacionária que provoca a retenção dos compostos. Há casos em que a retenção não é causada por interacção das ligações com a fase estacionária mas por diferenças na distância que os componentes a serem separados devem percorrer ao longo da coluna [8].

A teoria da cromatografia gasosa quiral (separação na qual uma fase estacionária selectiva retém mais um enantiómero em relação ao outro) é ainda de certo modo rudimentar. Os modelos de reconhecimento óptico usados para a resolução, baseiam-se na "teoria dos três pontos de interacção" proposta por Dalgliesh em 1952. De acordo com esse postulado, três interacções operando simultaneamente entre o enantiómero e a fase estacionária quiral são necessárias para a discriminação quiral [4]. A situação enantioselectiva é visualizada na Fig (5).

É óbvio que esta é a condição suficiente para a enantioselectão.

A "regra dos 3 pontos de interacção" é sem dúvida frequentemente usada para a racionalização dos resultados. Para a determinação da configuração do objecto quiral comparando-o com um padrão, devem existir no mínimo três interacções simultâneas específicas significativas.

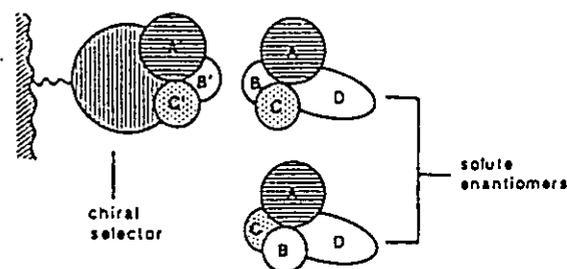


Figura 5 - Modelo da teoria dos "3 pontos de interação"

Todavia, este número mínimo de pontos de contacto não significa necessariamente pontos de ligação, no caso de interacções moleculares.

Em princípio, é possível a existência de uma situação em que somente as estereointerações causem a discriminação estereo molecular. Entretanto na absorção cromatográfica deverão existir sempre algumas interacções de ligação com o solvente através de qualquer ligação não covalente.

Consequentemente, as ligações de hidrogénio bem como as atracções iónicas dipolo-dipolo aumentam em solventes não polares enquanto que as interacções hidrofóbicas diminuem em meio aquoso.

A resolução óptica por cromatografia é possível através de uma associação diastereomérica reversível entre o meio quiral introduzido na coluna e o soluto enantiomérico.

Esta associação que pode ser quantitativamente expressa como K_{eq} , será função da amplitude da ligação, bem como das interacções repulsivas envolvidas. Estas últimas não são usualmente estéreas, não obstante a possibilidade da ocorrência de repulsões dipolo-dipolo enquanto diferentes tipos de interacções de ligações tomam lugar. Isso inclui ligações de hidrogénio, electrostáticas, atracções dipolo-dipolo, bem como interacções de transferência de carga e interacções hidrofóbicas (em sistemas aquosos).

O facto de soluções enantioméricas possuindo somente uma ligação de hidrogénio substituinte, poderem ser separadas em tais condições, induz a conclusão de que é apenas necessário uma força atractiva para a discriminação quiral neste tipo de cromatografia .

3.2.2.7 Fontes de erro

Apesar do grande sucesso da cromatografia gasosa para a determinação da pureza enantiomérica, devem ser consideradas as potenciais fontes de erro:

- 1) Decomposição da amostra na coluna, ex: o segundo enantiómero eluído que é retido mais tempo na coluna será preferencialmente diminuído causando um erro na determinação da pureza enantiomérica.
- 2) Decomposição do enantiómero na fase estacionária quiral, o que causará a perda preferencial de um enantiómero .
- 3) Co-eluição de impurezas, o que causará indesejáveis aumentos das áreas dos picos.
- 4) O fraccionamento dos enantiómeros devido ao "efeito-EE" durante a manipulação da amostra (as propriedades físicas escalares dos isómeros ópticos variam com a composição enantiomérica).
- 5) "Enantiomerização" das moléculas, causando distorção do pico devido à inversão de configuração durante a separação enantiomérica.
- 6) Distorções dos picos, causados por instrumentação inadequada.
- 7) Resposta não linear dos detectores.

Os erros devidos a 1 e 2 podem ser reconhecidos devido ao desvio na proporção esperada de 1:1 no caso de uma mistura racémica ex: verifica-se diminuição do segundo pico.

Erros devidos a 1 e 2 podem ser reconhecidos procedendo à determinação com uma fase estacionária de quiralidade oposta. Erros devidos a 3 podem ser também reconhecidos e eliminados alterando os parâmetros cromatográficos tais como temperatura ou o fluxo dos gases.

Antes da determinação da pureza enantiomérica dever-se-á sempre estabelecer a razão de 1:1 para a mistura racémica.

A resposta do detector para a mistura racémica dos enantiómeros é estritamente 1:1, uma vez que os enantiómeros não podem ser distinguidos em ambiente aquiral.

Assim sendo, a composição racémica obtida por síntese em meio aquiral representa uma mistura equimolar ideal (excepto estatísticas mínimas) que são úteis para o teste de precisão das facilidades de integração.

Contudo, para a análise enantiomérica é indispensável uma resposta linear do detector, para uma correcta determinação ou seja 0,1% de impureza enantiomérica e é necessário que haja linearidade de amplitude de pelo menos três ordens de grandeza [4,10,15]. É geralmente aceite que o detector de ionização de chama (FID) não satisfaça esse requisito, mas é recomendado que a resposta linear do detector seja verificada através de diluição.

3.2.2.8 Precisão

A precisão na determinação da pureza enantiomérica por cromatografia gasosa é alta.

Esta afirmação é verdadeira não só para casos de baixa pureza enantiomérica (~ 0% ee) por exemplo na diferenciação de um racemato verdadeiro, de misturas ligeiramente ricas em enantiómeros, mas também em casos de alta pureza enantiomérica (~100% ee), com detecções de 1 a 0,1% (e menos) de impurezas enantioméricas.

É sempre vantajoso que o enantiómero presente como impureza seja eluído no primeiro pico da coluna da cromatografia gasosa. Isso consegue-se com uma relação apropriada da quiralidade da fase estacionária não racémica, o que infelizmente não se consegue com as fases de ciclodextrina.

3.2.2.9 Importância dos compostos enantioméricamente puros

A determinação da pureza enantiomérica é de importância crucial não só para o sucesso das sínteses enantioselectivas mas também largamente desejada para a caracterização dos produtos naturais quirais tais como compostos saborizantes, fragrâncias e feromonas de insectos.

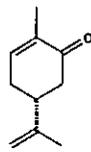
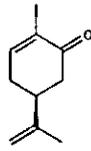
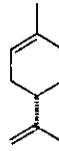
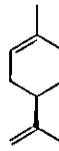
É absolutamente necessária no monitoramento da especificidade enantiomérica das enzimas, na detecção da racemização durante as transformações de compostos iniciadores enantiomericamente puros (ex. aminoácidos nas sínteses de peptídeos) e, no estudo de mecanismos de reacções.

A pureza enantiomérica dos auxiliares quirais, processos catalíticos quirais, investigações de compostos químicos não racémicos, medicamentos, pesticidas e herbicidas é também de elevada importância.

A diferenciação dos enantiómeros é importante para a determinação da qualidade de cheiro do óleo, de um extracto ou de um aromatizante químico. Revela-se de particular importância na detecção da adulteração.

Na tabela III [4] são dados exemplos de diferentes cheiros de enantiómeros de dois terpenos comuns.

Tabela III: Cheiro e configuração absoluta de dois terpenos simples

Terpeno	Configuração absoluta	Cheiro
(R)-(-)-carvone		Hortelã
(S)-(+)-carvone		Alcaravia
(R)-(+)-limoneno		Laranja
(S)-(-)-limoneno		Limão

É de extrema importância no monitoramento de reacções de catálise enzimática com o qual consegue-se um alto nível de estereoespecificidade. Deste modo espera-se uma alta pureza enantiomérica nos produtos naturais quirais. Por outro lado as sínteses químicas aquirais dão compostos racémicos [18].

Os enantiómeros dos compostos quirais devem ser considerados como dois compostos diferentes sob o ponto de vista da sua actividade biológica.

Pode acontecer que um dos isómeros do par sirva como nutriente, antibiótico, estimulante cardíaco, ou precursor de feromonas e o outro isómero seja complemente

inútil.

A pureza enantiomérica de uma amostra quiral (em termos de percentagem de um enantiómero na mistura) é definida de acordo com a expressão:

$$ee = \frac{\frac{R}{S} - 1}{\frac{R}{S} + 1} e \frac{R}{S} = \frac{1 + ee}{1 - ee} \text{ ou } \frac{R}{S} = \frac{1 + \%ee}{1 - \%ee}$$

em que:

R- Massa ou fracção molar do enantiómero predominante

S- Massa ou fracção molar do enantiómero em menor quantidade

% ee- Excesso do enantiómero predominante na mistura racémica em percentagem

A pureza óptica é definida como a rotação específica (α) de uma mistura enantiomérica, dividida pela rotação específica máxima (α)_{max} do enantiómero puro, ignorando-se por conveniência o sinal da rotação

$$\%P = \frac{[\alpha]}{[\alpha]_{\max}} \times 100$$

O valor da pureza óptica só é igual ao da pureza enantiomérica na ausência de associação diastereiomérica (no caso de diluição infinita dos enantiómeros).

3.3 Instrumentação

Nos diagramas da Figura 6 está representado o sistema usado no trabalho para a realização das experiências.

Os diagramas representam os seguintes elementos:

- Cromatógrafo, com uma coluna polar.
- Cromatógrafo, com uma coluna quiral.

- Integrador.
- Computador em que está instalado o programa "Star chromatography workstation version 4.5".

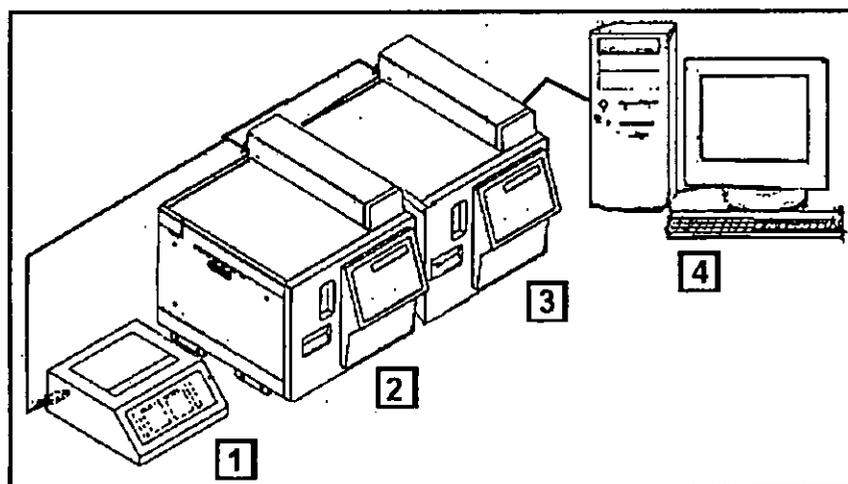


Figura 6- Sistema cromatográfico: 1-Integrador 2- Cromatógrafo com coluna polar 3- Cromatógrafo com coluna quiral 4- Computador com o programa "Star chromatography workstation 4.5"

3.3.1 O cromatógrafo

O cromatógrafo é a parte mais importante de todo o sistema e é constituído por um circuito de alta precisão. Nele está instalado um sistema de injeção "wet needle", tendo contudo capacidade para albergar dois injectores. Tem um detector de ionização de chama (FID) podendo-se instalar dois deste tipo ou um detector de condutividade térmica (TCD). No forno podem instalar-se tanto colunas capilares de sílica fundida ou colunas tubulares empacotadas. Este tipo de aparelho está equipado com um sistema de auto diagnóstico que permite testar as condições do aparelho e detectar falhas nos circuitos. Quando estas são detectadas ocorre automaticamente uma acção de protecção e é indicado o tipo de erro no visor.

É no cromatógrafo onde ocorre a resolução dos componentes.

3.3.2 Integrador

O integrador permite a execução dos relatórios dos cromatogramas num tempo mínimo. Fornece-nos os tempos de retenção, a integração dos picos, a percentagem da área de integração e outros dados que têm de estar inicialmente predefinidos.

3.3.3 O computador

O uso do computador com o programa "Star chromatography workstation 4.5" permite realizar uma análise automatizada, executar a medição de parâmetros experimentais com muita precisão (tempo de retenção, a forma de integração dos picos, etc.) realizar cálculos e armazenar dados.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho experimental teve as seguintes etapas:

- (i) Classificação e colheita das amostras.
- (ii) Extracção dos óleos, usando o hidrodestilador de Clevenger [8]
- (iii) Análise dos monoterpenos, por cromatografia gasosa.
- (iv) Determinação enantiomérica, feita nos monoterpenos maioritários e que apresentam quiralidade, por cromatografia gasosa bidimensional
- (v) Avaliação dos resultados por tratamento estatístico.

4.1 Classificação e colheita das amostras

Para a realização da parte experimental e tendo em conta a escassa população do *Juniperus virginiana*, *Juniperus bermudiana* e, a existência irregular da *Thuja orientalis*, a colheita das amostras foi feita consoante a disponibilidade das mesmas sem ter em conta a idade das plantas.

A classificação das plantas fez-se com base nos dados existentes no herbário do INIA, como se pode ver na Tab. I, excepção feita à *Thuja orientalis* que não constava na colecção de herbário. A classificação desta foi feita com a cooperação do National Botanical Institute – Pretória e serviu para enriquecer as colecções de herbário tanto do INIA, como do National Herbarium – Pretória.

Colheram-se folhas frescas do *Juniperus virginiana* no Jardim Tunduro e na mata da Namaacha, do *Juniperus bermudiana* na mata de Namaacha e da *Thuja orientalis* no jardim da Faculdade de Engenharia e Ciências.

As folhas foram secas à sombra, num laboratório bem arejado do Departamento de química.

4.2 Isolamento dos óleos essenciais

Das folhas secas e pesadas, fez-se a extracção dos óleos essenciais por hidrodestilação usando o sistema de Clevenger modificado [8], durante uma hora com temperatura de água de refrigeração a 10° C.[3]

Dos óleos obtidos determinou-se o teor, cujo resultado pode ser visto na Tab. XIII, o índice de refração e a densidade. Foram analisados por cromatografia gasosa monodimensional para a identificação dos monoterpenos e por cromatografia gasosa bidimensional para a análise enantiomérica.

4.3 Determinação do índice de refração

O índice de refração determinou-se a uma temperatura de 22° C no refractómetro de Abbe. Na Tab. XIV encontram-se os resultados.

4.4 Determinação da densidade

A determinação da densidade do óleo foi feita usando um picnómetro com uma capacidade de 1 ml a uma temperatura de 15°C. Os resultados desta determinação encontram-se na Tab. XV.

4.5 Preparação das soluções

Os óleos para a injeção, bem como os padrões foram preparados tomando 1µl de óleo ou padrão com um capilar da mesma capacidade e colocando-o num frasco de vidro contendo 1ml de n-hexano medido com uma pipeta volumétrica. Estas soluções injectaram-se na coluna com uma microseringa.

4.6 Análise por Cromatografia Gasosa Monodimensional

Para a análise dos componentes dos óleos, usou-se a cromatografia gasosa

monodimensional num aparelho "Varian 3400" acoplado a um integrador "Varian 4270" com um sistema de detecção FID e usou-se uma coluna capilar polar DB - Wax 30 m x 0.25 mm d.i. e 0.25 μ m de espessura de filme.

Condições de funcionamento do cromatógrafo

- Gás transportador - Hélio - fluxo 30 ml/min.
- Gás de "make-up" - Azoto - fluxo 30 ml/min.
- Combustível - Hidrogénio - fluxo 30 ml/min.
- Comburente - Oxigénio - fluxo 300 ml/min.
- Programa de temperatura 40°C (4 min) 4°C / min; 100°C (0,1 min) 4°C / min; 200°C (10 min).

Em cooperação com o Royal Institute of Technology - Suécia foram analisadas as mesmas amostras, que serviram como termo de comparação. Compararam-se desse modo os níveis da separação dos componentes e as concentrações destes nas amostras usando um aparelho "Varian 3400" acoplado a um integrador "Spectra-Physics SP 4400" com um sistema de detecção FID e usou-se uma coluna capilar polar DB - Wax 30 m x 0.25 mm d.i. e 0.25 μ m de espessura de filme.

Condições de funcionamento do cromatógrafo

- Gás transportador - Hélio - fluxo 30 ml/min.
- Gás de "make-up" - Azoto - fluxo 30 ml/min.
- Combustível - Hidrogénio - fluxo 30 ml/min.
- Comburente - Oxigénio - fluxo 300 ml/min.
- Programa de temperatura 40°C (4 min) 4°C / min; 100°C (0,1 min) 4°C / min; 200°C (10 min).

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos padrões, como indicado nos anexos B e C, eluídos em condições idênticas às das amostras e ainda por co-injecção das amostras com padrões.

Esta técnica é designada de “enriquecimento do pico”, em que um aumento do tamanho deste (altura e/ou área integrada) é prova de existência do componente.

4.7. Análise por Cromatografia Gasosa Bidimensional

A determinação exacta da composição enantiomérica e da configuração absoluta, é uma tarefa analítica importante na síntese, caracterização e uso de compostos quirais (isómeros ópticos, enantiómeros) bem como na investigação de novos produtos químicos intermediários, auxiliares, metabolitos, precursores, medicamentos, pesticidas, fungicidas, herbicidas, feromonas, saborizantes e fragrâncias.

Devido à sua alta eficiência, sensibilidade e velocidade, a separação de isómeros ópticos por cromatografia gasosa quiral de alta resolução, representa um método versátil para a análise enantiomérica. Contudo, o pré-requisito do método é a volatilidade, estabilidade térmica e resolvibilidade do analito quiral, sem necessidade de recorrer a cromatografia preparativa.

Os componentes da mistura foram analisados sob o ponto de vista da sua composição enantiomérica, sem necessidade de uma separação prévia, mediante o uso da cromatografia gasosa bidimensional. Esta, é um técnica útil para a separação de misturas nos seus componentes, usando duas colunas de diferente polaridade. Pode ser visto como um sistema GC-GC (2D-GC).

Há dois cromatógrafos gasosos ligados através de uma interfase à alta temperatura.

Usaram-se duas microválvulas pneumáticas programadas tipo “Valco w series”, sendo a função de uma, o corte dos picos seleccionados no primeiro cromatógrafo e, a da outra instalada no segundo cromatógrafo a derivação dos picos cortados para uma ou outra coluna.

Condições de funcionamento do 1º cromatógrafo

- Gás transportador – Hélio – fluxo 30 ml/min.
- Gás de “make-up” – Azoto – fluxo 30 ml/min.
- Combustível – Hidrogénio – fluxo 30 ml/min.
- Comburente – Oxigénio – fluxo 300 ml/min.
- O primeiro cromatógrafo usa uma coluna capilar polar DB – Wax .

- Programa de temperatura 40°C (4 min) 4°C / min; 100°C (0,1 min) 4°C / min; 200°C (10 min).
- Detector (FID, $t=230^{\circ}\text{C}$).

Para a análise da composição enantiomérica de todos os monoterpenos usaram-se colunas de β -Ciclodextrina.

Condições de funcionamento do 2º cromatógrafo

- Colunas de β -Ciclodextrina 30 m x 0.25 mm d.i. e 0.25 μm de espessura de filme.
- Gás transportador – Hélio – fluxo 30 ml/min.
- Gás de “make-up” – Azoto – fluxo 30 ml/min.
- Combustível – Hidrogénio – fluxo 30 ml/min.
- Comburente – Oxigénio – fluxo 30 ml/min.
- Isoterma de 70°C
- Detector (FID, $t=230^{\circ}\text{C}$).

A composição enantiomérica de todos os monoterpenos foi obtida de uma só vez. A ordem de eluição dos picos respeita a volatilidade dos componentes. O enantiómero (-) foi eluído antes do enantiómero (+) para o α -pineno e para o limoneno. Para o β -pineno o enantiómero (+) eluiu em primeiro lugar. Os respectivos cromatogramas encontram-se nos anexos J e L. Os tempos de retenção dos enantiómeros foi obtido fazendo a injeção de padrões de (+) α -pineno, (+) β -pineno e (+) limoneno.

V. RESULTADOS

5.1 Resultados da Cromatografia Gasosa Monodimensional

IA tabela IV indica a percentagem média de cinco determinações dos componentes identificados

Tabela IV: Percentagem média dos componentes identificados nos óleos essenciais do J.v., J.b. e T.o. por cromatografia gasosa monodimensional.

Componentes	<i>Juniperus virginiana.</i>	<i>Juniperus bermudiana.</i>	<i>Thuja orientalis.</i>
α - pineno	1.48	17.10	42.50
Canfeno	0.31	0.52	0.98
β - pineno	0.58	0.76	1.40
Δ^3 -careno	-	0.19	15.00
α -felandreno + Mirceno	0.54	2.46	2.80
Limoneno	55.52	58.04	10.57
γ - terpineno	-	0.42	0.10
p- cimeno	-	0.14	0.80

Os teores médios dos componentes identificados servem-nos de indicação sob o ponto de vista dos monoterpenos existentes em cada uma das plantas. Usam-se os teores dos componentes maioritários como forma de identificação das espécies.

Tabela V: Teores de α -pineno e cálculos dos limites de confiança

Amostra	Óleos Essenciais (% v/p)					m	n	t*	s	m \pm t*.s/n ^{1/2}
	1	2	3	4	5					
J.v.	1.88	1.83	1.50	1.14	1.07	1.48	5	2,776	0.3763	1.48 \pm 0.47
J.b.	17.61	17.39	17.32	16.25	16.43	17.10	5	2,776	0.5104	17.1 \pm 0.63
T.o.	44.41	45.13	45.14	45.23	42.50	44.50	5	2,776	1.1561	44.5 \pm 1.44

Tabela VI: Teste de significância para os teores de α pineno no *Juniperus virginiana* e no *Juniperus bermudiana*

Amostra	<i>Juniperus virginiana</i>	<i>Juniperus bermudiana</i>
n	5	5
n-1	4	4
m ₁₂	1.48	17.1
s ₁₂	0.3763	0.5104
s ₁₂ ²	0.1416	0.2605
s=0.4484	Graus de liberdade = 8	
t _{ob} =55.8	P = 0.05	
t _{crit} =2.31		

Conclusão: $|t|_{obs} > |t|_{crit}$. Pode-se concluir que as médias dos teores de α -pineno para o *Juniperus bermudiana* e para o *Juniperus virginiana* são significativamente diferentes, podendo-se usar essa diferença significativa como via de distinção entre os dois géneros.

Tabela VII: Teste de significância para os teores de α pineno no *Juniperus bermudiana* e na *Thuja orientalis*

Amostra	<i>Juniperus bermudiana</i>	<i>Thuja orientalis</i>
n	5	5
n-1	4	4
m_{12}	17.1	44.5
s_{12}	0.5104	1.1561
s_{12}^2	0.2605	1.3366
S=0.9128		Graus de liberdade = 8
$ t _{ob}=47.5$		P = 0.05
$ t _{crit}=2.31$		

Conclusão: $|t|_{obs} > |t|_{crit}$. Pode-se concluir que as médias dos teores de α -pineno para o *Juniperus bermudiana* e para a *Thuja orientalis* são significativamente diferentes, pelo que também são significativamente diferentes os teores de α -pineno entre o *Juniperus virginiana* e *Thuja orientalis*, sendo essa diferença de esperar, visto tratar-se de dois géneros distintos.

Tabela VIII: Teores de Δ^3 -careno e cálculos dos limites de confiança

Amostra						m	n	t*	s	$m \pm t^*.s \div n^{\frac{1}{2}}$
	1	2	3	4	5					
J.v.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J.b.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.o.	15.09	15.27	15.14	14.29	15.26	15.00	5	2.776	0.4098	15.00 \pm 0.51

Tabela IX: Teores de limoneno e cálculos dos limites de confiança

Amostra						m	n	t*	s	m ± t*.s÷n
	1	2	3	4	5					
J.v.	57.30	56.28	55.77	55.33	52.90	55.52	5	2.776	1.6362	55.5 ± 2.03
J.b.	58.41	58.72	57.34	58.14	57.57	58.04	5	2.776	0.5745	58.0 ± 0.71
T.o.	9.94	10.81	11.20	10.75	10.17	10.57	5	2.776	0.5103	10.6 ± 0.63

Tabela X: Teste de significância para os teores de limoneno no *Juniperus virginiana* e no *Juniperus bermudiana*.

Amostra	<i>Juniperus virginiana</i>	<i>Juniperus bermudiana</i>
n	5	5
n-1	4	4
m ₁₂	55.52	58.04
s ₁₂	1.6362	0.5745
s ₁₂ ²	2.6772	0.3300
s=1.2262	Graus de liberdade = 8	
t _{ob} =3.22	P = 0.05	
t _{crit} =2.31		

Conclusão: $|t|_{obs} > |t|_{crit}$. Pode-se concluir que as médias dos teores de limoneno para o *Juniperus bermudiana* e para o *Juniperus virginiana* são significativamente diferentes. Embora tratando-se de plantas da mesma família e género e de terem ambas o limoneno como componente maioritário, verifica-se que o teor deste, é significativamente mais alto no *Juniperus bermudiana* que no *Juniperus virginiana*.

Tabela XI: Teste de significância para os teores de limoneno no *Juniperus bermudiana* e na *Thuja orientalis*

Amostra	<i>Juniperus bermudiana</i>	<i>Thuja orientalis</i>
n	5	5
n-1	4	4
m_{12}	58.04	10.57
s_{12}	0.5745	0.5108
ss_{12}^2	0.3300	0.2609
$s=0.7366$		Graus de liberdade = 8
$ t _{ob}=102.908$		$P = 0.05$
$ t _{crit}=2.31$		

Conclusão: $|t|_{obs} > |t|_{crit}$. Pode-se concluir que as médias dos teores de limoneno para o *Juniperus bermudiana* e para a *Thuja orientalis* são significativamente diferentes, pelo que são também significativamente diferentes os teores de limoneno entre o *Juniperus virginiana* e a *Thuja orientalis*.

5.2 Resultados da Cromatografia Gasosa Bidimensional

A tabela XII indica a média de cinco determinações da composição enantiomérica do J.v. e da T.o. realizadas pelo método descrito na referência bibliográfica [3].

Tabela XII: Composição enantiomérica dos monoterpenos α -pineno, β -pineno e limoneno

Componentes	<i>Juniperus virginiana.</i>		<i>Thuja orientalis</i>	
	+	-	+	-
α - pineno	97.89	2.11	90.60	9.40
β - pineno	59.09	40.91	69.41	30.59
Limoneno	0.25	99.75	12.62	87.38

5.3 Resultados de rendimento da extracção dos óleos essenciais do *Juniperus virginiana* (J.v), *Juniperus bemurdiana* (J.b) e *Thuja orientalis* (T.o)

Os resultados do rendimento da extracção indicados na tabela XIII foram obtidos das amostras de óleo essencial extraído das folhas secas do J.v., J.b., T.o, por hidrodestilação. O rendimento foi determinado tomando como base 100 gr de amostra de folhas secas. Nesta tabela indicam-se também os limites de confiança para as médias, calculados pela equação (3) do anexo A.

Tabela XIII: Resultados de rendimento dos óleos J.v., J.b., T.o.

Amostra	Óleos Essenciais (% v/p)					m	n	t*	s	m ± t*.s÷n ¹ / ₂
	1	2	3	4	5					
J.v.	0.27	0.29	0.28	0.28	0.27	0.28	5	2,776	0.0087	0.28 ± 0.01
J.b.	0.32	0.28	0.30	0.34	0.32	0.31	5	2,776	0.0229	0.31 ± 0.03
T.o.	0.49	0.52	0.48	0.49	0.47	0.49	5	2,776	0.0187	0.49 ± 0.02

5.4 Resultados do índice de refração

Os resultados do índice de refração indicados na tabela foram obtidos por medida do respectivo índice de refração dos óleos J.v., J.b., T.o, a uma temperatura de 20° no refractómetro de Abbe. Encontram-se também indicados os limites de confiança para as médias dos índices.

Tabela XIV: Resultados do índice de refração dos óleos J.v., J.b., T.o.

Amostra	Índice de refração $[n]_D^{20}$					m	n	t*	s	$m \pm t^*.s/n^{1/2}$
	1	2	3	4	5					
J.v.	1.4935	1.4936	1.4950	1.4937	1.4944	1.4940	5	2,776	0	1.4940 ± 0
J.b.	1.4684	1.4683	1.4686	1.4685	1.4683	1.4684	5	2,776	0	1.4684 ± 0
T.o.	1.4766	1.4737	1.4736	1.4743	1.4749	1.4746	5	2,776	0	1.4746 ± 0

Onde n é o número de ensaios feitos, m a média das n determinações, s o desvio padrão e t* é um factor estatístico, que se achou com 95% de probabilidade dos resultados se situarem dentro dos limites de confiança. As fórmulas para o cálculo destes e de outros parâmetros estatísticos encontram-se no anexo A

5.5 Resultados da densidade

Os resultados da densidade dos óleos J.v., J.b., T.o indicados na tabela, foram determinados experimentalmente por medida da massa de 1 ml de óleo essencial contido num picnómetro, comparando-a com a massa de igual volume de água a uma temperatura constante de 15°.

Tabela XV Resultados da densidade dos óleos J.v., J.b., T.o.

Amostra	Densidade $[d]_{15}^{15}$					m	n	t*	s	$m \pm t^*.s/n^{1/2}$
	1	2	3	4	5					
J.v.	0.9491	0.9490	0.9489	0.9489	0.9491	0.9490	5	2,776	0	0.9490 ± 0
J.b.	0.8804	0.8805	0.8805	0.8805	0.8804	0.8805	5	2,776	0	0.8805 ± 0
T.o.	0.8748	0.8746	0.8747	0.8746	0.8748	0.8747	5	2,776	0	0.8747 ± 0

VI. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O presente trabalho de licenciatura enquadra-se no projecto de investigação em curso no Departamento de Química da Faculdade de Ciências, o qual visa a pesquisa de produtos naturais, sua valorização e possibilidade de aplicação como fonte de fragâncias, feromonas etc e, o conseqüente enriquecimento do conhecimento sobre a flora Moçambicana. A determinação enantiomérica dos monoterpenos nos óleos essenciais de *Juniperus virginiana*, *Juniperus bermudiana* e *Thuja orientalis* foi em certa medida possível.

O método é sensível e só requer pequenas quantidades de amostra, o que para a análise dos óleos essenciais é importante pois são misturas complexas e de baixo rendimento de extracção.

Não foi feita a determinação enantiomérica no óleo do *Juniperus bermudiana* nem a do Δ^3 -careno no óleo da *Thuja orientalis*, embora seja este um componente maioritário pois, a determinação dos rácios enantioméricos dos monoterpenos não foi feita no departamento e, tornou-se possível graças à cooperação com Royal Institute of Technology (Suécia) no âmbito do projecto SAREC. Porém, não se dispunha de padrões de careno de modo a determinar o tR deste composto nas condições de análise. Uma avaria no sistema 2D-GC, inviabilizou a análise enantiomérica do *Juniperus bermudiana*.

Verificou-se que o (+) limoneno está presente com elevado grau de pureza óptica (99.8%) no *Juniperus virginiana* e na *Thuja orientalis* o componente de maior pureza óptica é o α (+)-pineno (90%), como indicado na Tab. XII.

Recomenda-se a implantação do método de cromatografia gasosa bidimensional no Departamento de Química e para tal, seriam necessários dois cromatógrafos e sistemas de válvulas de corte e derivação dos picos montados por especialistas. Já se dispõe de uma coluna quirál β -Ciclodextrina.

As quantidades relativas dos enantiômeros em percentagem foram calculadas a partir das áreas integradas dos picos bem como, a proporção de cada monoterpeneo.

Os resultados obtidos revelam a presença dos compostos: α -pineno, canfeno, β -pineno, Δ^3 -careno, α -felandreno, mirceno, limoneno, γ -terpineno e p-cimeno como principais componentes monoterpênicos e nesta mesma ordem de eluição. Esse resultado está patente na Tab. IV.

Na *Thuja orientalis*, o componente maioritário é o α -pineno (44.5%) seguindo-se o Δ^3 -careno (15.0%), e o limoneno (10.6%),

Por cromatografia gasosa bidimensional, verificou-se que em termos de composição enantiomérica, o α -pineno existente na *Thuja* é essencialmente (+), o mesmo verificando-se com o limoneno e com o β -pineno.

Já para o *Juniperus virginiana* o composto maioritário é o limoneno (55.5%) seguindo-se o α -pineno (1.5%).

Em termos de composição enantiomérica o α -pineno existente no *Juniperus virginiana* é essencialmente (+) e o limoneno é praticamente (-). O β -pineno apresenta uma composição que é quase equitativamente (+) e (-), pois tem (41%) do enantiômero (-) e (59%) do (+), como indicado na Tab. XII.

O *Juniperus bermudiana* apresenta como componente maioritário o limoneno (58.0%), seguindo-se o α -pineno, (17.1%). Não houve a possibilidade de analisar enantiomericamente os monoterpeneos do *Juniperus bermudiana*, pelas razões anteriormente citadas.

Estes resultados permitem uma perfeita distinção entre as três amostras não só sob o ponto de vista dos componentes mas também dos teores destes.

As duas espécies *Juniperus* estudadas têm semelhanças em termos de componentes. Apresentam ambas as espécies o limoneno, como componente maioritário sendo contudo mais alto o teor (58.8%) no *Juniperus bermudiana* que no *Juniperus virginiana* (55.5%), como se pode ver na Tab. IX e nos anexos D-G. Em caso de necessidade de isolamento e purificação do limoneno é recomendável o *Juniperus bermudiana*.

A distinção entre os dois *Juniperus* pode ser feita ainda mediante comparação dos teores de α -pineno que são em média 11 vezes mais elevados (17,1%) no *Juniperus bermudiana* que no *Juniperus virginiana* (1,5%), como mostra a Tab. VI.

A *Thuja orientalis* tem como componente maioritário o α -pineno (44.5%). Por outro lado possui um elevado teor de Δ^3 -careno (15.0%), componente ausente no *Juniperus virginiana* e de baixíssimo teor no *Juniperus bermudiana* (0.19%). O teor de limoneno é também considerável (10.6%), conforme indicado nos cromatogramas dos anexos H e I.

O tratamento estatístico só foi feito com base no número de injeções para testar a fiabilidade dos resultados e não em termos de população das espécies pois é escassa e não há dados disponíveis em termos de idade das mesmas de modo a fazer uma comparação adequada.

Com o uso da cromatografia gasosa monodimensional foi possível a análise dos óleos essenciais da *Thuja orientalis*, do *Juniperus virginiana* e do *Juniperus bermudiana*.

Por cromatografia gasosa bidimensional foi possível a determinação dos rácios enantioméricos do α -pineno, β -pineno e limoneno na *Thuja* e no *Juniperus virginiana*. Este é um método exacto e através dele pode-se detectar a adulteração de um óleo ou mesmo a sua proveniência.

O primeiro método pode ser encarado como auxiliar do segundo pois no primeiro

cromatógrafo encontra-se a coluna DB-Wax que separa os componentes que são seleccionados, cortados e derivados ao segundo cromatógrafo onde há uma coluna quiral onde se dá a resolução.

Além dos monoterpenos, os óleos essenciais que foram objecto deste estudo contêm também diterpenos, sesquiterpenos e álcoois cuja presença seria interessante confirmar e, prosseguir o estudo de forma multidisciplinar de modo a testar as propriedades que estes óleos possuem e sobretudo quais são exactamente os enantiómeros por elas responsáveis, pelo que, além da implantação do método anteriormente recomendado, seria de considerar a hipótese de adequar o sistema de modo a poder-se fazer cromatografia preparativa.

O estudo foi feito no óleo extraído das folhas, mas seria recomendável o prosseguimento do mesmo no óleo extraído dos frutos pois a composição do óleo varia consoante a parte da planta da qual for extraído.

GLOSSÁRIO

Composição enantiomérica. - É a expressão da proporção R:S dos enantiómeros R, S presentes na amostra de um composto quiral.

Configuração absoluta - É o arranjo dos átomos numa molécula quiral que permite distingui-la da sua imagem no espelho e, a sua descrição estereoquímica (R ou S).

Diastereómeros - Estereoisómeros que não são imagem no espelho plano. Diferem em geral em suas propriedades físicas e químicas.

Enantiómeros - São compostos opticamente activos, de estrutura similar e configuração oposta ou seja, de imagem não sobreponível no espelho. Têm em geral todas as propriedades semelhantes, excepto a rotação do plano da luz polarizada e diferem nas suas propriedades fisiológicas.

Enantiomerização. - Processo de conversão de um enantiómero noutra.

Isómeros - Espécies químicas que têm o mesmo número e tipo de átomos mas diferem em suas propriedades físicas e/ou químicas devido à diferença na sua estrutura (constituição e/ou configuração e/ou conformação).

Make-up - É um gás auxiliar empregue em cromatografia gasosa quando se usam colunas capilares e tem por fim manter constante a pressão no detector.

Monoterpenos - São os hidrocarbonetos mais baixos da classe dos terpenos, encontram-se em quase todos os óleos essenciais e em grande número de compostos isolados de produtos animais ou vegetais. Têm esqueletos carbonados formados por unidades isoprénicas ligadas regularmente cabeça-cauda, existindo contudo algumas excepções.

Nomenclatura (R,S) - É um sistema de nomenclatura aplicada a qualquer tipo de molécula quiral, que permite a sua descrição estereoquímica em R ou S.

Óleos essenciais – São misturas complexas de substâncias voláteis, constituídas na sua maioria por hidrocarbonetos e seus derivados oxigenados. São ainda constituídos por mono-, sesqui- e ainda por diterpenos. Em alguns óleos essenciais podem encontrar-se ainda gorduras e ésteres.

Derivam na sua maioria de plantas, mas podem ser encontrados em outros organismos vivos tais como algas e fungos.

Pureza óptica – É determinada com respeito à presença de um só enantiómero.

Diz-se que um composto está opticamente puro quando é inteiramente constituído por um dos isómeros ópticos, não contendo absolutamente nada do outro enantiómero.

Quiral – Não sobreponível com a sua imagem no espelho.

Este conceito é aplicado a moléculas, conformações, bem como a objectos macroscópicos como por exemplo cristais. O termo torna-se extensivo a amostras de substâncias cujas moléculas são quirais, mesmo se o conjunto macroscópico de ditas moléculas é racémico.

Quiralidade – Na terminologia moderna, as moléculas são quirais quando não têm reflexo simétrico. Átomos que geram estruturas moleculares não planares devido a ligações covalentes com outros átomos, são também centros quirais. Desse modo, as estruturas tetraédricas formadas por quatro grupos diferentes de átomos, em torno de átomos como o C, Si, P, N ou S, criam compostos de actividade óptica conhecida.

Regra de quiralidade – É a regra que define a descrição como R ou S para um átomo tetraédrico Xabcd, uma vez estabelecida a prioridade para a, b, c, d.

Split – Sistema de injeção com divisão que permite uma rápida injeção da amostra na coluna e por outro lado, diminuir a quantidade injectada por meio de um escape regulado

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- [1] I.L. Finar. *Stereochemistry and the Chemistry of Natural Products*. Longman Scientific & Technical, Fifth edition, 1991.
- [2] J. Tranchant. *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse*. Paris, Milan, Barcelone: Masson, 1991. 4e Edition.
- [3] A. P. M. Ntimane. *Análise de óleos essenciais de origem vegetal por cromatografia gasosa: Determinação do 1,8-cineol e dos principais constituintes no óleo essencial do Eucalipto camaldulensis*. 1996. 59 pp. Tema de licenciatura, Universidade Eduardo Mondlane.
- [4] G. Stig, Allenmark. *Enantioseparation Methods and Applications*. 1988, Ellis Harwood Limited, Publishers Chichester.
- [5] J. M. Tedder, A. Nechvatal, A. W. Murray, J. Carnduff. *Basic organic chemistry Part 4 Natural products*, John Willey & Sons, London, New York, Sidney, Toronto, 1972, pp. 226-234.
- [6] K. Sjödin. *Volatile wood constituents in insect plant interactions: chemical studies on Scots pine and Norway spruce*. pp 1-54 Dissertation, Royal Institute of Technology, Department of organic chemistry, 1992.
- [7] I. Chibata. *Asymmetric Reactions and Processes in Chemistry*. Washington, DC. American Chemical Society, 1989, pp. 195. ACS Symposium Series, Vol. 185.
- [8] B.M. Lawrence. *Third Unido Workshop on Essential Oils and Aroma Chemical Industries*. November, 1995. The Isolation Of Aromatic Materials From Natural Plants Products. Eskisehir, Turkey. Unido, 1995.
- [9] K. Nakaomishi, T.Goto, S.Ito, S.Natori, S.Ngoe. *Natural Products Chemistry*.nd Edition. Academic Press, Inc, N. Y. and London. 1994, pp. 28-72.
- [10] E. Boyer. *Gas Chromatography*. Institute of Organic Chemistry, Technological University Karlsruhe, Germany. Elsevier Publishing Company, Amesterdan, London, N. Y. 1991, pp. 41-52/178-180.

- [11] E. E. Storrs. *Biochemical Applications of Gas Chromatography*. 1st Edition. Academic Press, N. Y. 1962, pp. 76-92.
- [12] G. B. Marini, G. Battista. *Produits Naturels et la Protection des Plantes. Communications de la Semaine d'Étude sur le Thème*. Ciudad del Vaticano, 1974, pp. 19
- [13] K. Nakanishi et all. *Natural Products Chemistry*. 3rd Edition. Academic Press, New York, Tokyo, 1974
- [14] H. P. Burchfield. *Biochemical Applications of Gas Chromatography*. 2nd Edition. Academic Press, New York and London, 1993
- [15] I. Laakso, A. Kosna, A. Polijola. 22nd International Symposium of Essential Oils, Sep 11-14 1991. *Enantiomeric Separation of some Monoterpene Hydrocarbons*, St Vicent, Aosta, Italy. Abs. pp 37.
- [16] R. Ikan. *Natural Products: A Laboratory Guide*. 1st Edition, Jerusalem, Israel: University Press. 1989, pp. 301 XVI.
- [17] F.A. Carey, R. J. Sundberg. *Advanced Organical Chemistry*. 2nd edition. New York, Interscience Publishers, 1968, pp. 43-71 XXI
- [18] Y. Wilfried, A. Konig, H. Huthig. *Gas Chromatografic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrin*. Edição única. Heidelberg, 1992, pp 168. VIII.
- [19] A. Y. Leung, S. Foster, A. Wiley. *Enciclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*. 2nd edition. New York, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, Inc - Interscience Publication. 1996.
- [20] S. Debe. 11th IUPAC International Symposium on Chemistry of Natural Products, 1988, Sofia, Bulgarian Academy of Sciences. 1988. Vol. 4, Part 1, pp 433.
- [21] I. Hardt, W. A. Koning. 15th International Symposium on Capillary Chromatography. River del Guarda. P. Sandra. 1993 Vol. 1 pp 229.

- [22] E. Gil, Av. F. Bruner. *The Science of Chromatography*. J. of Chromatography Library. 1985, Vol. 32, pp. 111.
- [23] A. N. Collins, G. N. Sheldrak, J. Crosby. *Chirality in Industry. The comercial Manufacture and Aplications of Optically Active Compounds*. 2nd edition. Manchester, U.K. ICI Specialities. 1995. pp.1 – 20
- [24] K. L. Williams, A. M. Stalcup. *Molecular Interations in Bioseparations*. New York. TT. Ngo Plenum Press. 1993 pp 189.
- [25] A.M. Stalcup. *A Pratical Approach to Chiral Separations by Gas Chromatography*. New York. VCH. 1994, pp. 95 – 107
- [26] R. A. Sheldon, F. J. J. Leusen, Van der Haest, A. D. Wijnberg. 90th Chiral Symposium. Manchester. *Enantiomers, Racemates and resolutions*. Spring Innovations. 1990. pp. 101 – 130.
- [27] W. J. Lough, T. A. G. Noctor. *Pharmaceutical and Biomedical Application of Gas Chromatography*. 2nd edition. New York. Elsevier 1994. pp. 241-247.
- [28] W. Koning. *The Praticce of Enantiomer Separation by Capillary Chromatography*. 1st edition. Heidelberg. Huthig. 1987. pp. 23 – 27.
- [29] H. G. Shmarr, A. Kaunzinger, A. Mosandl. 13th Symposium on Capillary Gas Chromatography. 1991, Heidelberg. *Separations of Racemic Mixtures of Volatile Compounds*. Huthig. 1991. pp. 188 – 190.
- [30] C. Bicchi, A. D'Amato, V. Manzin, A. Galli, M. Galli. *Cyclodextrin Derivatives in the Gas Chromatography*. Jornal of Chromatography. 1996. Vol. A 742. pp. 161 – 173.
- [31] A. M. Stalcup. *A pratical Approach to Chiral Separation by Liquid Chromatography*. 1st edition. New York. G. Subramanian VCH. 1994, pp. 95

ANEXOS

Anexo A: Fórmulas usadas nos cálculos estatísticos

1. Valor médio (m)

$$m = \sum x_i \div n$$

Onde x_i é o valor de um ensaio e o n corresponde ao número total de ensaios.

2. Desvio padrão (s)

O desvio padrão s de n medições foi calculado pela equação:

$$s = \sqrt{\sum (x_i - m)^2 \div (n - 1)}$$

Onde $n-1$ são os graus de liberdade

3. Limites de confiança

Os limites de confiança para a média m foram calculados pela equação:

$$m \pm t^* \cdot s \div n^{1/2}$$

Onde t^* ($t_{\text{crítico}}$) é um parâmetro estatístico tabelado, achado com a probabilidade 0.05 dos resultados se situarem dentro dos limites de confiança.

4. Testes de significância

Os testes de significância para duas médias de duas séries de valores foram calculados a partir da equação:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

t_{ob} é dado por

$$t = \frac{(m_1 - m_2)}{s \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}}$$

Anexo B: Cromatograma dos padrões

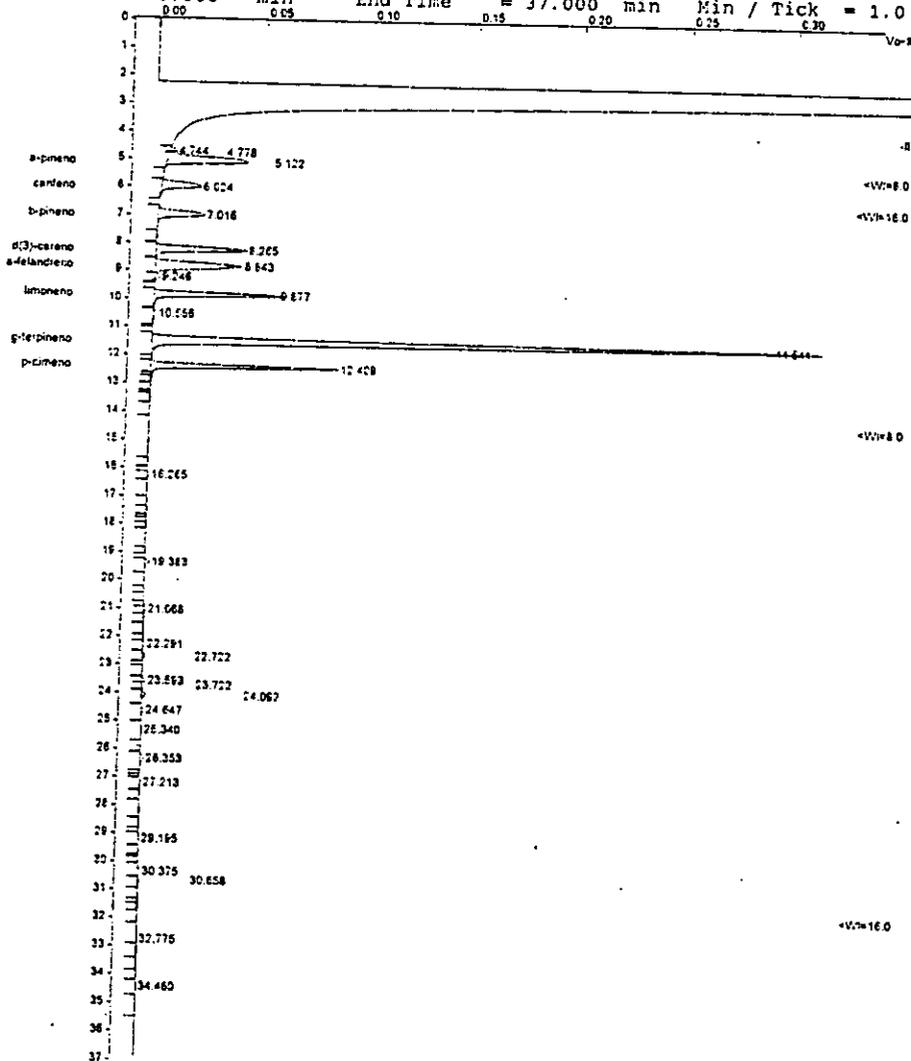
Title :
 Run File : C:\STAR\MODULE16\MODULE16\STAR011.RUN
 Method File : C:\STAR\JUNIPBER.MTH
 Sample ID : Padrões (monoterp.)

Injection Date: 8-JAN-98 3:38 PM Calculation Date: 8-JAN-98 4:15 PM

Operator : E. X. Santos Detector Type: ADCB (10 Volts)
 Workstation: MS-DOS 6 Bus Address : 16
 Instrument : GC INV Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : A = FID Run Time : 37.002 min

***** Star Chromatography Workstation ***** Version 4.51 *****

Chart Speed = 0.58 cm/min Attenuation = 150 Zero Offset = 3%
 Start Time = 0.000 min End Time = 37.000 min Min / Tick = 1.0





Anexo C: Relatório do cromatograma dos padrões

Peak No	Peak Name	Result Q	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		0,3373	4,744	0,000	2121	0,68	BV	9,4		0
2		0,1620	4,778	0,000	1019	0,68	VV	9,4		0
3	a-pineno	8,8528	5,122	0,025	55679	0,73	VB	14,4		0
4	canfeno	4,0566	6,024	0,027	25514	0,86	BB	13,5		0
5	b-pineno	4,4510	7,016	0,029	27994	1,00	BP	12,5		0
6	d(3)-careno	7,2023	8,265	0,026	45298	1,18	PV	10,2		0
7	a-felandreno+mirceno	9,2357	8,843	0,023	58088	1,26	VB	14,5		0
8		0,2594	9,246	0,000	1631	1,32	TS	0,0		0
9	limoneno	8,5925	9,877	0,026	54042	1,41	BB	8,3		0
10		0,2860	10,556	0,000	1799	1,50	TS	0,0		0
11	g-terpineno	43,9161	11,541	0,020	276207	1,64	BB	8,1		0
12	p-cimeno	9,7468	12,409	0,024	61302	1,77	VB	6,2		0
13		0,0954	16,265	0,000	600	2,32	BB	6,1		0
14		0,2601	19,383	0,000	1636	2,76	BB	6,2		0
15		0,1585	21,068	0,000	997	3,00	VV	7,9		0
16		0,1287	22,291	0,000	809	3,18	VV	7,2		0
17		0,1496	22,722	0,000	941	3,24	VB	6,8		0
18		0,1998	23,593	0,000	1257	3,36	BV	6,0		0
19		0,1642	23,722	0,000	1033	3,38	VV	12,9		0
20		0,3145	24,092	0,000	1978	3,43	VV	8,2		0
21		0,2061	24,647	0,000	1297	3,51	VP	9,0		0
22		0,1266	25,340	0,000	796	3,61	PB	9,1		0
23		0,3286	26,353	0,000	2067	3,76	BP	9,1		0
24		0,1439	27,213	0,000	905	3,88	VV	9,4		0
25		0,0869	29,195	0,000	547	4,16	BP	9,8		0
26		0,2062	30,375	0,000	1297	4,33	BV	12,7		0
27		0,1135	30,658	0,000	714	4,37	VV	15,2		0
28		0,1222	32,775	0,000	769	4,67	PV	17,9		0
29		0,0967	34,460	0,000	608	4,91	VV	23,6		0
Totals		100,0000		0,200	628945					

Status Codes:

Anexo D: Cromatograma do *Juniperus virginiana*

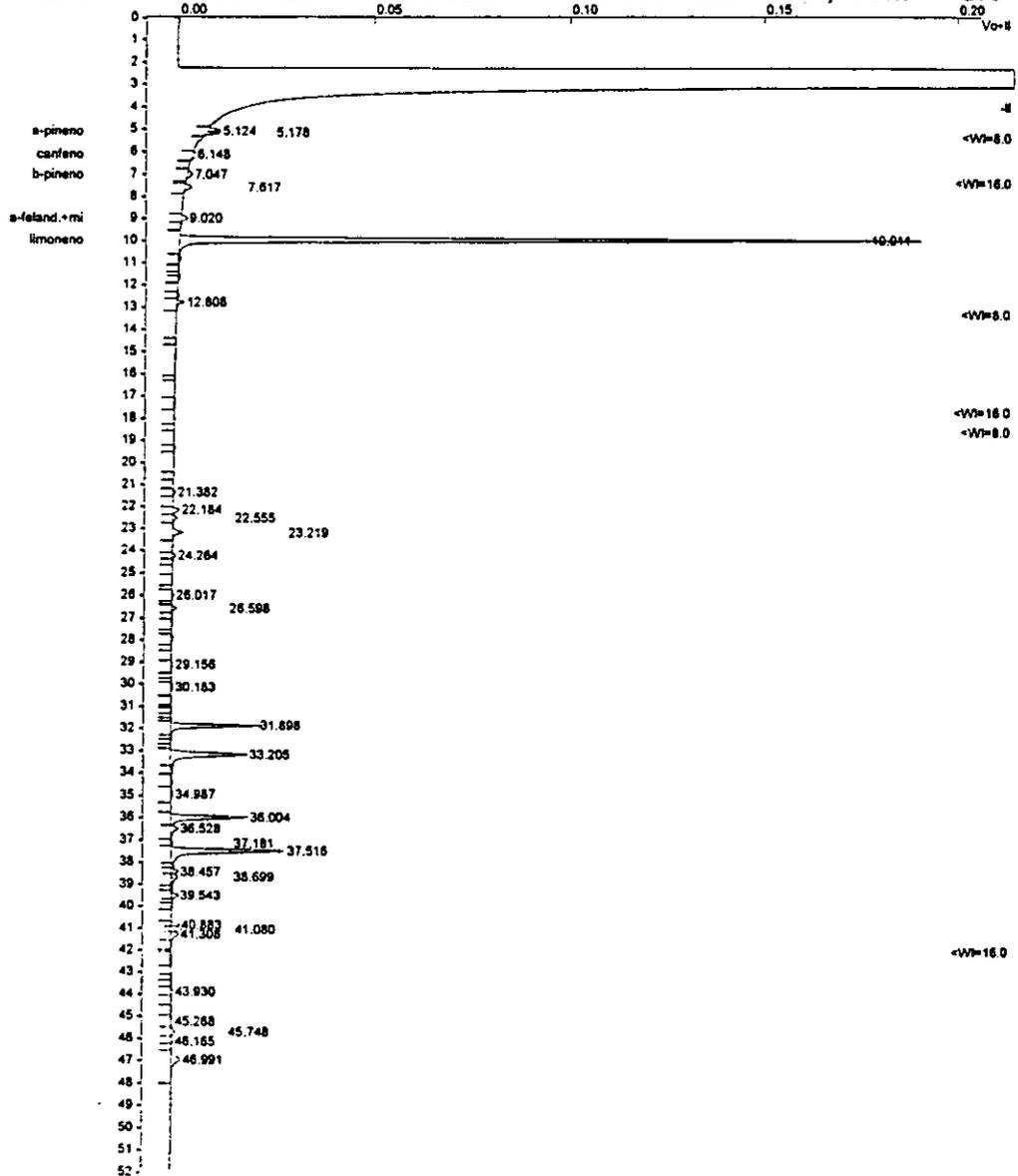
Title :
 Run File : C:\STAR\MODULE16\MODULE16\STAR016.RUN
 Method File : C:\STAR\JUNIPBE1.MTH
 Sample ID : junip. virginiana

Injection Date: 9-JAN-98 2:43 PM Calculation Date: 9-JAN-98 3:35 PM

Operator : E. X. Santos Detector Type: ADCB (10 Volts)
 Workstation: MS-DOS_6 Bus Address : 16
 Instrument : GC Investigaçao Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : A = FID Run Time : 52.002 min

***** Star Chromatography Workstation ***** Version 4.51 *****

Chart Speed = 0.41 cm/min Attenuation = 91 Zero Offset = 3%
 Start Time = 0.000 min End Time = 52.000 min Min / Tick = 1.0



Anexo E: Relatório do cromatograma do *Juniperus virginiana*

Print Date: Mon Feb 02 11:08:11 1998

Page 1 of 2

Title :
 Run File : C:\STAR\MODULE16\MODULE16\STAR016.RUN
 Method File : C:\STAR\JUNIPBE1.MTH
 Sample ID : junip. virginiana

Injection Date: 9-JAN-98 2:43 PM Calculation Date: 9-JAN-98 3:35 PM

Operator : E. X. Santos Detector Type: ADCB (10 Volts)
 Workstation: MS-DOS 6 Bus Address : 16
 Instrument : GC Investigaçao Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : A = FID Run Time : 52.002 min

***** Star Chromatography Workstation ***** Version 4.51 *****

Run Mode : Analysis - Subtract Blank Baseline
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel. Ret. Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	a-pineno	1.0751	5.124	0.027	3501	0.727	BV	13.1	
2		0.6533	5.178	0.000	2127	0.735	VB	14.2	
3	canfeno	0.3320	6.148	0.151	1081	0.872	BB	9.0	
4	b-pineno	0.6315	7.047	0.060	2056	1.000	BB	12.5	
5		0.6722	7.617	0.000	2189	1.081	BB	11.4	
6	d(3)-careno		8.239						M
7	a-feland.+mi	0.5771	9.020	0.200	1879	1.280	BP	9.7	
8	limoneno	52.9044	10.011	0.160	172264	1.421	PB	8.4	
9	g-terpineno		11.521						M
10	p-cimeno		12.385						M
11		0.5071	12.808	0.000	1651	1.817	VB	6.8	
12		0.1827	21.382	0.000	595	3.034	BB	7.4	
13		0.5289	22.184	0.000	1722	3.148	BV	9.1	
14		0.3570	22.555	0.000	1163	3.201	VV	8.0	
15		0.8932	23.219	0.000	2908	3.295	VB	8.2	
16		0.2327	24.264	0.000	758	3.443	BV	7.6	
17		0.2162	26.017	0.000	704	3.692	BB	8.9	
18		0.3126	26.598	0.000	1018	3.774	BV	7.5	
19		0.2107	29.156	0.000	686	4.137	BB	10.3	
20		0.2705	30.183	0.000	881	4.283	VB	12.1	
21		6.3720	31.898	0.000	20748	4.526	VB	7.8	
22		8.2246	33.205	0.000	26780	4.712	BP	10.8	
23		0.2517	34.987	0.000	820	4.965	TS	0.0	
24		6.0701	36.004	0.000	19765	5.109	PV	8.8	
25		0.8882	36.528	0.000	2892	5.184	VV	12.1	
26		0.1790	37.181	0.000	583	5.276	VV	0.0	
27		10.8439	37.516	0.000	35309	5.324	VB	9.3	
28		0.4128	38.457	0.000	1344	5.457	TF	0.0	
29		0.5856	38.699	0.000	1907	5.492	TF	0.0	
30		0.5564	39.543	0.000	1812	5.611	TF	0.0	
31		0.6013	40.883	0.000	1958	5.801	BV	9.0	
32		0.9676	41.080	0.000	3151	5.829	VV	13.7	
33		0.7926	41.308	0.000	2581	5.862	VV	14.4	
34		0.1951	43.930	0.000	635	6.234	BV	12.1	
35		0.2884	45.268	0.000	939	6.424	VV	14.7	
36		0.4403	45.748	0.000	1434	6.492	VV	13.7	
37		0.2317	46.165	0.000	755	6.551	VV	0.0	
38		1.5414	46.991	0.000	5019	6.668	VB	16.1	
Totals:		99.9999		0.598	325615				

Status Codes:
 M - Missing peak

Total Unidentified Counts : 144833 counts

Detected Peaks: 71 Rejected Peaks: 36 Identified Peaks: 8

Multiplier: 1 Divisor: 1

Baseline Offset: -28 microVolts

Noise (used): 40 microVolts - monitored before this run

Anexo F: Cromatograma do *Juniperus bermudiana*

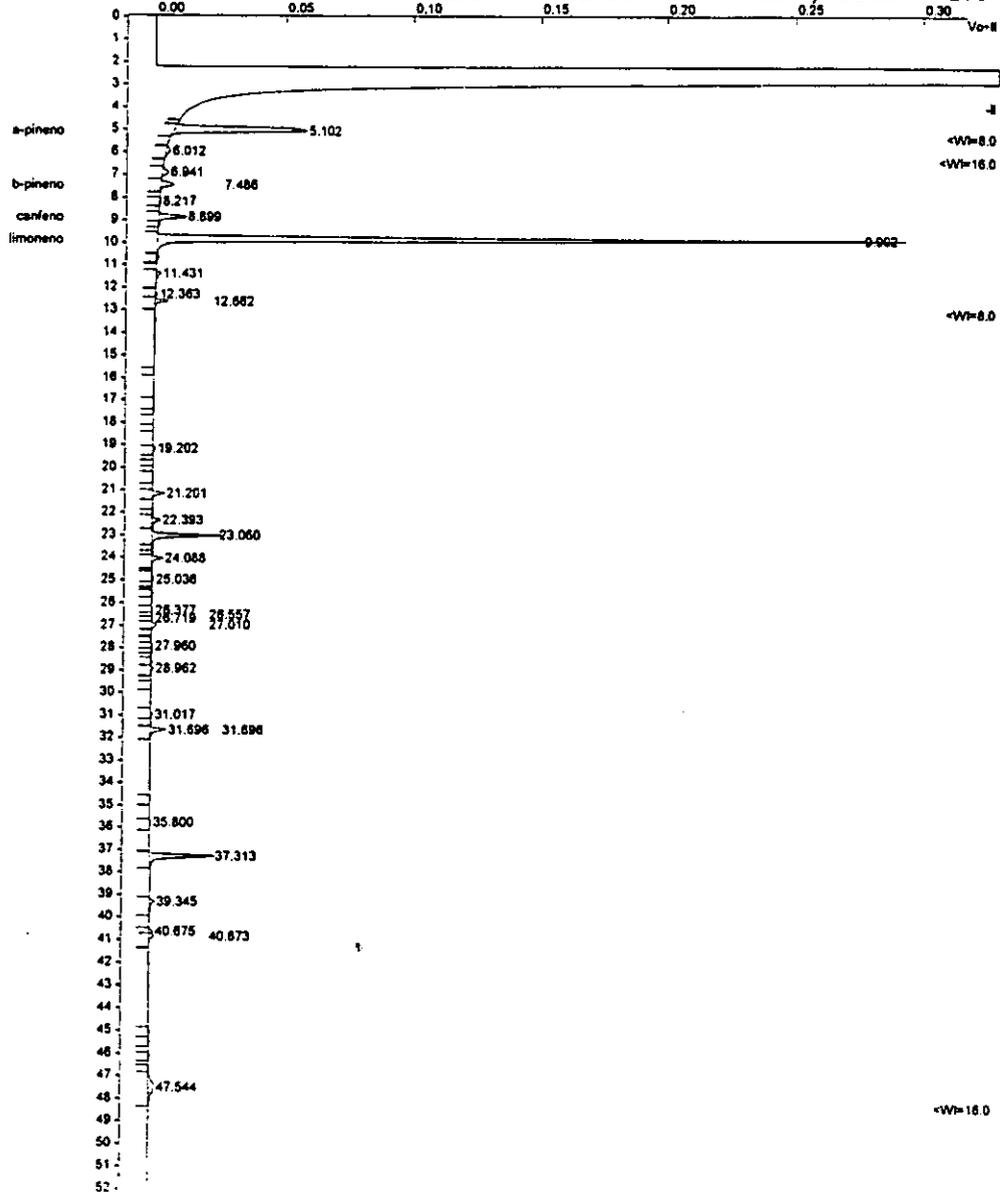
Title :
 Run File : C:\STAR\MODULE16\MODULE16\STAR009.RUN
 Method File : C:\STAR\JUNIPBER.MTH
 Sample ID : junip. bermudiana

Injection Date: 8-JAN-98 12:11 PM Calculation Date: 8-JAN-98 1:04 PM

Operator : E. X. Santos Detector Type: ADCB (10 Volts)
 Workstation: MS-DOS_6 Bus Address : 16
 Instrument : GC INV_ Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : A = FID Run Time : 52.002 min

***** Star Chromatography Workstation ***** Version 4.51 *****

Chart Speed = 0.41 cm/min Attenuation = 139 Zero Offset = 3%
 Start Time = 0.000 min End Time = 52.000 min Min / Tick = 1.0



Anexo G: Relatório do cromatograma do *Juniperus bermudiana*

Print Date: Mon Feb 02 10:48:21 1998

Page 1 of 1

Title :
 Run File : C:\STAR\MODULE16\MODULE16\STAR009.RUN
 Method File : C:\STAR\JUNIPBER.MTH
 Sample ID : junip. bermudiana

Injection Date: 8-JAN-98 12:11 PM Calculation Date: 8-JAN-98 1:04 PM

Operator : E. X. Santos Detector Type: ADCB (10 Volts)
 Workstation: MS-DOS 6 Bus Address : 16
 Instrument : GC INV. Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : A = FID Run Time : 52.002 min

***** Star Chromatography Workstation ***** Version 4.51 *****

Run Mode : Analysis - Subtract Blank Baseline
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel. Ret. Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	a-pineno	16.4303	5.102	-0.081	75020	0.573	BB	14.6	
2		0.6050	6.012	0.000	2763	0.676	BB	13.0	
3		0.7283	6.941	0.000	3325	0.780	BP	12.5	
4	b-pineno	1.3048	7.486	-0.236	5958	0.841	PB	10.9	
5		0.1158	8.217	0.000	529	0.923	BB	9.8	
6	canfeno	2.4533	8.899	-0.231	11202	1.000	BP	9.5	
7	limoneno	58.4146	9.902	-0.221	266719	1.113	PB	8.5	
8		0.4583	11.431	0.000	2093	1.285	BP	7.7	
9		0.1183	12.363	0.000	540	1.389	PV	5.0	
10		0.7947	12.662	0.000	3628	1.423	VB	6.2	
11		0.1753	19.202	0.000	800	2.158	BB	6.5	
12		0.8205	21.201	0.000	3747	2.383	BB	6.9	
13		0.6920	22.393	0.000	3160	2.516	VV	6.9	
14		4.8920	23.060	0.000	22337	2.591	VV	6.7	
15		0.7856	24.088	0.000	3587	2.707	VB	6.8	
16		0.1808	25.036	0.000	825	2.814	BV	7.2	
17		0.1211	26.377	0.000	553	2.964	PV	9.2	
18		0.1386	26.557	0.000	633	2.984	VV	8.4	
19		0.1104	26.719	0.000	504	3.003	VV	9.9	
20		0.4602	27.010	0.000	2101	3.035	VV	10.7	
21		0.1353	27.960	0.000	618	3.142	VV	7.5	
22		0.1986	28.962	0.000	907	3.255	VB	8.1	
23		0.1953	31.017	0.000	892	3.486	BV	8.6	
24		1.1808	31.696	0.000	5391	3.562	VB	8.0	
25		0.1527	35.800	0.000	697	4.023	BB	11.5	
26		5.2347	37.313	0.000	23901	4.193	BB	8.3	
27		0.4867	39.345	0.000	2222	4.421	BB	9.1	
28		0.2799	40.675	0.000	1278	4.571	BV	8.1	
29		0.5053	40.873	0.000	2307	4.593	VB	10.4	
30		1.8308	47.544	0.000	8360	5.343	VB	36.1	
Totals:		100.0000		-0.769	456597				

Total Unidentified Counts : 97699 counts

Detected Peaks: 57 Rejected Peaks: 27 Identified Peaks: 4

Multiplier: 1 Divisor: 1

Baseline Offset: -18 microVolts

Noise (used): 60 microVolts - monitored before this run

Manual injection

Revision Log:

8-JAN-98 1:04 PM: Calculated results from channel A using method:
 'C:\STAR\JUNIPBER.MTH'

.....

Anexo I: Relatório do cromatograma da *Thuja orientalis*

Print Date: Mon Feb 02 10:52:33 1998

Page 1 of 1

Title : Thuja orientalis (Óleo essencial)
 Run File : C:\STAR\MODULE16\MODULE16\STAR004.RUN
 Method File : C:\STAR\THUJA1.MTH
 Sample ID : Thuja orientalis

Injection Date: 6-JAN-98 3:26 PM Calculation Date: 6-JAN-98 4:20 PM

Operator : Paçula Detector Type: ADCB (10 Volts)
 Workstation: MS-DOS 6 Bus Address : 16
 Instrument : Varian Star #1 Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : A = A Run Time : 54.102 min

***** Star Chromatography Workstation ***** Version 4.51 *****

Run Mode : Analysis - Subtract Blank Baseline
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		44.2761	5.307	0.000	140528	BB	14.5	
2		0.6690	5.968	0.000	2123	BB	13.4	
3		1.5141	7.215	0.000	4806	BP	12.1	
4		1.5222	7.742	0.000	4831	PB	10.4	
5		15.0809	8.503	0.000	47865	BP	10.0	
6		1.7156	9.162	0.000	5445	PB	8.9	
7		11.1696	10.127	0.000	35451	BB	8.2	
8		0.4762	10.416	0.000	1511	TS	0.0	
9		0.8085	12.667	0.000	2566	BV	7.8	
10		1.1262	12.967	0.000	3575	VB	6.7	
11		0.3612	22.379	0.000	1147	BV	7.6	
12		2.1435	23.304	0.000	6803	VB	10.8	
13		0.6643	24.425	0.000	2108	BB	7.3	
14		1.0064	25.581	0.000	3194	VB	7.1	
15		1.8680	26.934	0.000	5929	PB	7.0	
16		0.4914	31.795	0.000	1560	VV	8.4	
17		0.6137	32.047	0.000	1948	VB	9.0	
18		0.4253	35.114	0.000	1350	BB	9.1	
19		0.5198	36.142	0.000	1650	BP	8.8	
20		2.1171	37.656	0.000	6720	BV	9.8	
21		0.8444	37.983	0.000	2680	VV	10.5	
22		7.6359	38.464	0.000	24235	VB	9.2	
23		0.5039	41.245	0.000	1599	VB	11.2	
24		2.4465	48.302	0.000	7765	VB	37.4	
Totals:		99.9998		0.000	317389			

Total Unidentified Counts : 317389 counts

Detected Peaks: 59 Rejected Peaks: 35 Identified Peaks: 0

Multiplier: 1 Divisor: 1

Baseline Offset: -35 microVolts

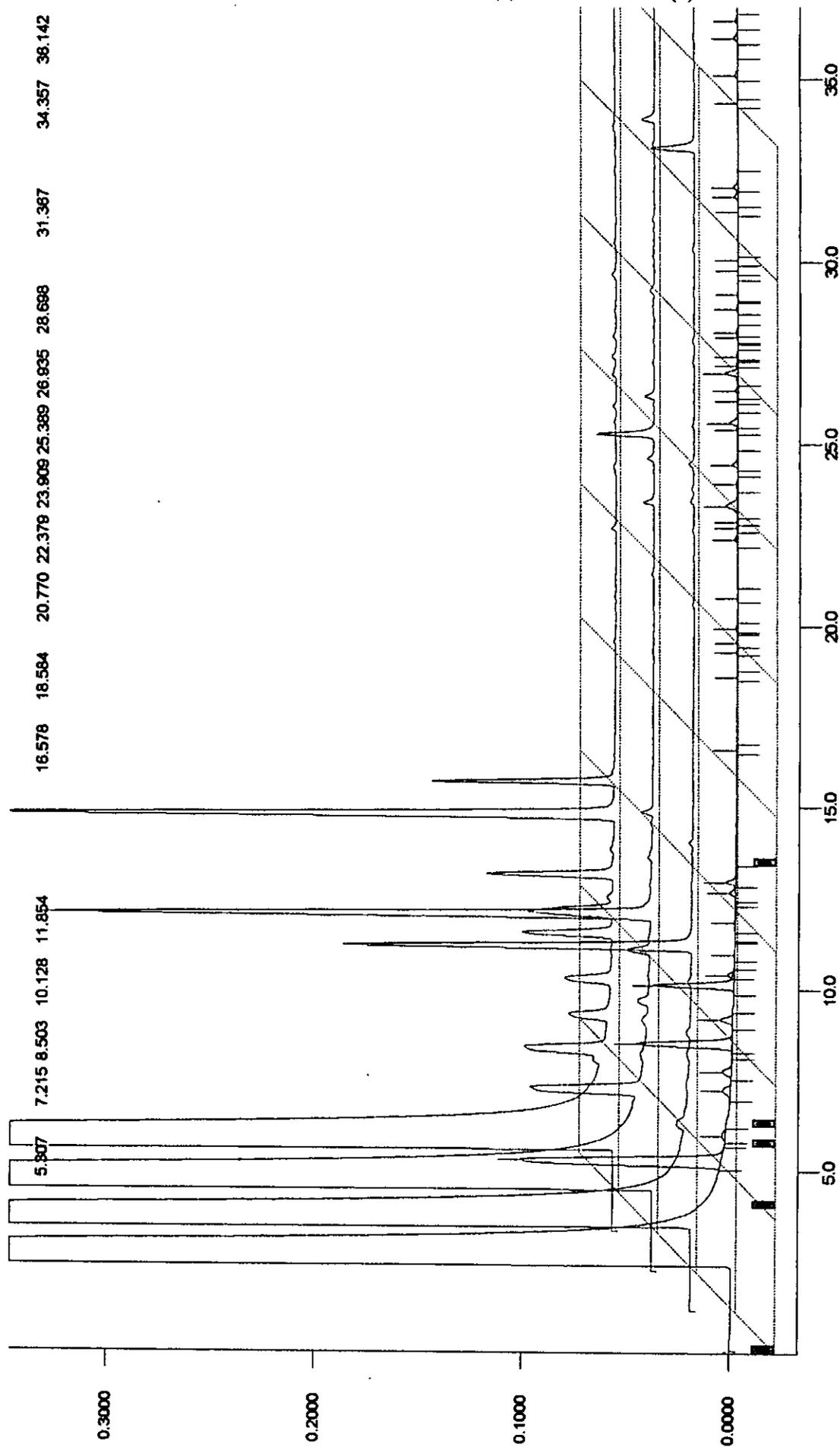
Noise (used): 60 microVolts - monitored before this run

Manual injection

Revision Log:

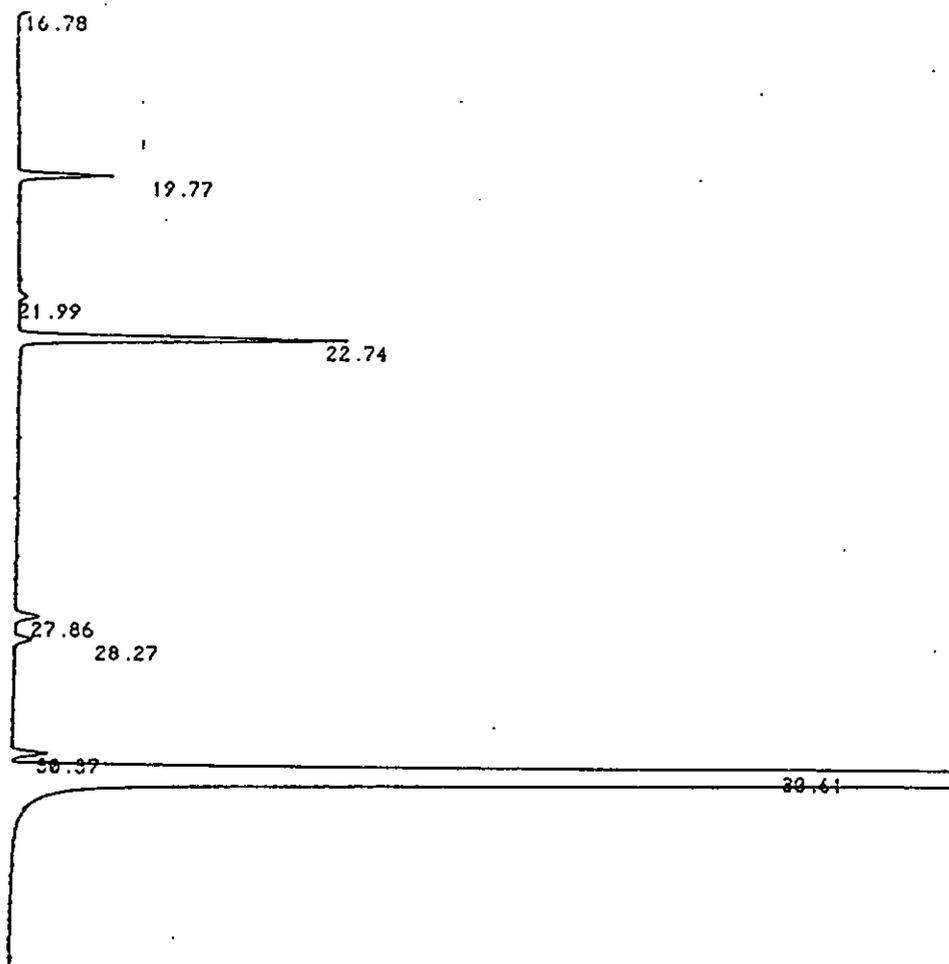
6-JAN-98 4:20 PM: Calculated results from channel A using method:
 'C:\STAR\THUJA1.MTH'

Anexo J: Cromatogramas comparativos entre os padrões (1) e os óleos essenciais do *J. virginiana* (2), *J. bermudiana* (3) e *T. orientalis* (4)



Filename: C:\STARMODULE16\MODULE16\STAR004.RUN Channel: A = A
Filename: C:\STARMODULE16\MODULE16\STAR005.RUN Channel: A = FID
Filename: C:\STARMODULE16\MODULE16\STAR009.RUN Channel: A = FID
Filename: C:\STARMODULE16\MODULE16\STAR011.RUN Channel: A = FID

Anexo L: Cromatograma dos compostos: α -pineno, β -pineno e limoneno do *Juniperus virginiana* por 2DGC



DATA SAVED TO BIN : 65

CCBB 28-01-97 16:30:56 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 68 INDEX 68 BIN 65

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	0.032	7.09	205 01
2	0.036	8.57	233 01
3	0.022	10.72	141 01
4	0.067	16.78	430 01
5	0.565	19.77	3642 01
6	0.052	21.99	333 01
7	2.418	22.74	15583 01
8	0.169	27.86	1071 01
9	0.117	28.27	753 01
10	0.244	30.37	1574 02
11	96.278	30.61	620457 03

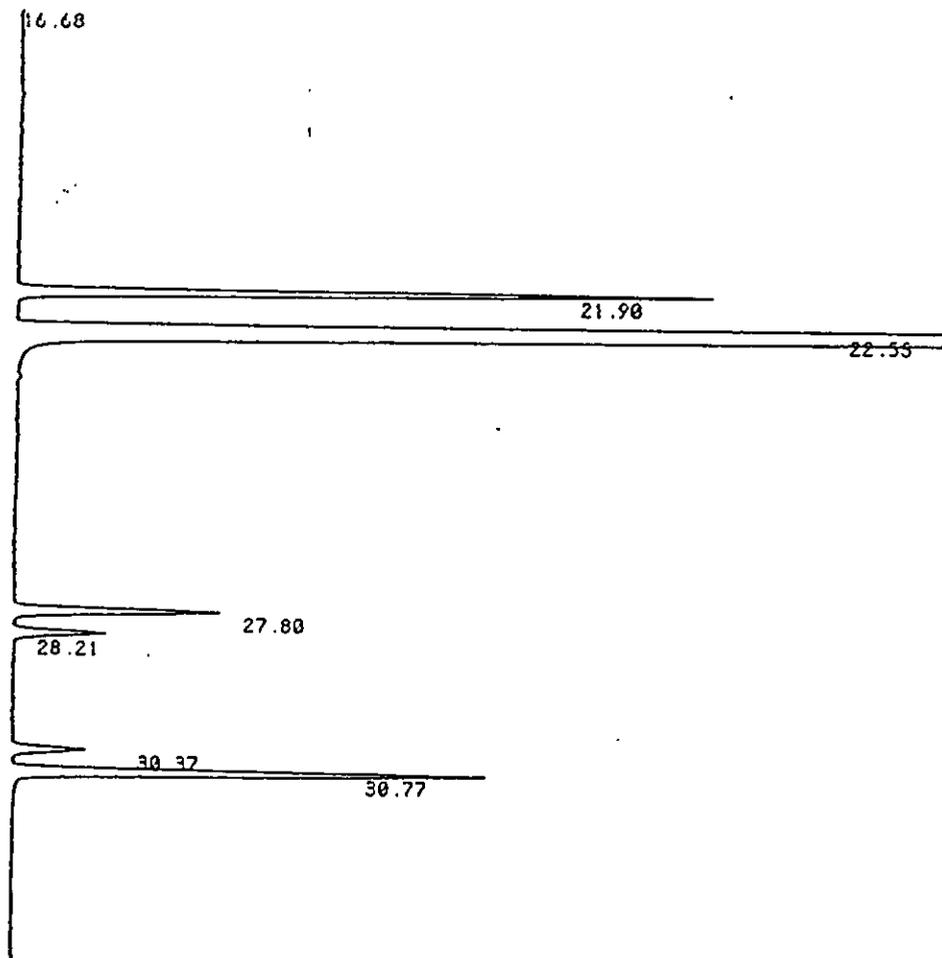
Legenda:

pico	RT	composto
1	21.99	(-)- α -pineno
2	22.74	(+)- α -pineno
3	27.86	(+)- β -pineno
4	28.27	(-)- β -pineno
5	30.37	(+)-limoneno
6	30.61	(-)-limoneno

TOTAL 100. 644442

WARNING - MEMORY AT 7. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

Anexo M: Cromatograma dos compostos: α -pineno, β -pineno e limoneno da *Thuja orientalis* por 2DGC



DATA SAVED TO BIN # 66

GCBB 30-01-97 17:09:26 CH= "A" PS= 1.
 FILE 1. METHOD 0. RUN 69 INDEX 69 BIN 66

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.062	7.13	244	01
2	0.048	8.58	190	01
3	0.036	10.65	141	01
4	0.094	16.68	370	01
5	8.345	21.9	32768	01
6	80.438	22.53	315844	01
7	2.705	27.8	10623	01
8	1.211	28.21	4755	01
9	0.891	30.37	3498	01
10	6.168	30.77	24220	01
TOTAL	100.		392653	

Legenda:

pico	RT	composto
1	21.90	(-)- α -pineno
2	22.53	(+)- α -pineno
3	27.80	(+)- β -pineno
4	28.21	(-)- β -pineno
5	30.37	(+)-limoneno
6	30.77	(-)-limoneno

Anexo N: Estruturas dos enantiómeros citados ao longo do texto

