



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL
DA *Pimenta dioica* LINDL E SUA APLICAÇÃO
COMO ATRATIVO DE ABELHAS EUGLOSSINA**

ODAIR DOS SANTOS MONTEIRO

**João Pessoa – PB - Brasil
Fev/2008**



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL
DA *Pimenta dioica* LINDL E SUA APLICAÇÃO
COMO ATRATIVO DE ABELHAS EUGLOSSINA**

ODAIR DOS SANTOS MONTEIRO

Tese de Doutorado
apresentada ao Centro de Ciências
Exatas e da Natureza da
Universidade Federal da Paraíba
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

2º Orientador: Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

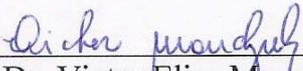
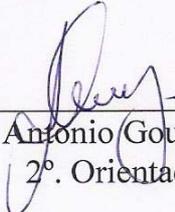
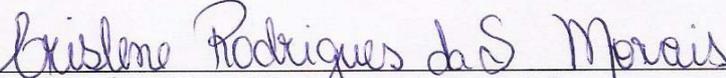
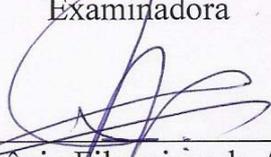
João Pessoa – PB - Brasil

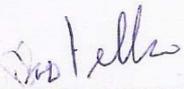
Fev/2008

CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Pimenta dioica* LINDL E SUA APLICAÇÃO COMO ATRATIVO DE ABELHAS EUGLOSSINA.

ODAIR DOS SANTOS MONTEIRO

Aprovada pela banca examinadora:


Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho Orientador/Presidente

Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza 2º. Orientador

Prof ^{ta} Dr. ^a Crislene Rodrigues da Silva Moraes Examinadora

Prof. Dr. Petrónio Filgueiras de Athayde Filho Examinador

Prof ^{ta} Dr. ^a Marta Maria da Conceição Examinadora

Prof. Dr. José Régis Botelho Examinador

M 775c Monteiro, Odair dos Santos.

Caracterização do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas Euglossina / Odair dos Santos Monteiro. – João Pessoa, 2008.

126 p. : il –

Orientadores: Victor Elias Mouchrek Filho e Antonio Gouveia de Souza.

Tese (doutorado) – UFPB / CCEN.

1. Pimenta dioica 2. Óleos essenciais 3. Eugenol 4. Euglossina.

UFPB / BC

CDU: 664.522 (043)

Dedico este trabalho

*À memória de meu Pai, Orlando,
e meu tio Matias, que vivem em
meus pensamentos.*

*À minha mãe, Lúcia, um
exemplo de vida a ser seguida por
todos os seus filhos.*

*À minha querida esposa, Mel,
pelo infinito amor que nutrimos um pelo outro
e pela cumplicidade em todos os momentos de
nossas vidas.*

*Aos meus dois queridos filhos,
Matheus e Indira, que me dão inspiração e
força para enfrentar as dificuldades da vida.*

*A todos os meus Irmãos, que,
unidos, tornam a vida mais leve.*

*Aos meus cunhados(as) e
sobrinhos, que tanto contribuem para a alegria
de nossa família.*

“Não quero falar por um largo tempo,

Silêncio, quero aprender ainda,

Quero saber se existo”

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek, Filho, pela orientação deste trabalho, pela amizade, paciência, compreensão e ensinamentos transmitidos durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza, pela inestimável ajuda na elaboração deste trabalho, pela orientação sempre segura e pela amizade demonstrada.

Aos amigos Roberto, Reivilândio, Wilson, Fábio, Rodrigo, Cristovam e George Alexander, pelo apoio, pelo incentivo e pela amizade fraterna.

Aos colegas de Doutorado, em especial aos amigos Rogério Teles, Vasconcelos, Sílvio e Joelson, pelo apoio, pela amizade e pelo compartilhamento de informações.

Aos novos amigos da UFPB, Manoel, Raul, Lúcia, Marta, Geuza e Marcos Pequeno, pela amizade, discussão e colaboração prestada na realização deste trabalho.

Ao amigo Orleans Silva, pela orientação, pelo incentivo e pela amizade sem compromisso.

À Prof. Dra. Márcia Régio, pela ajuda valiosa na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Edmundo Bastos Soledade, pela colaboração prestada na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jamal da Silva Chaar, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pela colaboração sempre valiosa.

Aos Colégios Batista “Daniel de La Touche”, CEM Cidade Operária II e CINTRÁ, pelo apoio e reconhecimento deste trabalho.

À Dierberger Indústria de Óleos Essenciais S.A., pelo fornecimento nos padrões utilizados neste trabalho.

À Andréia, estudante e estagiária do Pavilhão Tecnológico, pela colaboração prestada e pela amizade.

Aos colegas do Colégio Batista “Daniel de La Touche” pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Marcelo, Sidney, Hamilton, Içamira, Joelma, Josélia, Selma e Elizângela, pela força e confiança sempre necessárias.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii

Capítulo 1

INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais sobre óleos essenciais	1
1.1.1 Definição e características.....	2
1.1.2 Processos de extração	3
1.1.3 Enfloração	3
1.1.4 Prensagem.....	4
1.1.5 Extração com solventes orgânicos.....	4
1.1.6 Extração por fluido supercrítico.....	4
1.1.7 Arraste por vapor d'água	5
1.1.8 Aplicações industriais	5
1.1.9 Controle de qualidade dos óleos essenciais	6
1.1.10 Análises dos componentes dos óleos essenciais	8
1.2 Aspectos gerais sobre a <i>Pimenta dioica</i> Lindl.	8
1.2.1 Clima e solo.	11
1.2.2 Uso popular da <i>Pimenta dioica</i> L.	11
1.3 Óleo essencial da espécie <i>Pimenta dioica</i> Lindl	12
1.3.1 Técnicas Analíticas	14
1.3.1.1 Cromatografia Gasosa (CG)	14
1.3.1.2 Espectrometria na Região do Ultravioleta (UV-VIS)	15
1.3.1.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV) ..	15
1.3.1.4 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM)....	16
1.3.1.5 Métodos de quantificação	18
1.3.2 Técnicas Termoanalíticas	18

1.3.2.1 Termogravimetria (TG)	19
1.3.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	21
1.3.3 Fatores que podem influenciar as curvas termogravimétricas e calorimétricas	23
1.4 Área de restinga	24
1.5 Abelhas Euglossina	26
1.6 Biologia da conservação das abelhas Euglossina	29
1.7 Justificativa	35
1.8 Objetivos	38
 Capítulo 2	
PARTE EXPERIMENTAL	39
2.1 Equipamentos e acessórios	39
2.1.1 Moinho elétrico	39
2.1.2 Refratômetro	39
2.1.3 Extrator de Clevenger	40
2.1.4 Espectrofotômetro de Ultravioleta	40
2.1.5 Espectrofotômetro de Infravermelho	41
2.1.6 Cromatógrafo a gás acoplado a Espectrômetro de Massas	41
2.1.7 Análise térmica	41
2.1.7.1 Calorimetria exploratória diferencial	41
2.2 Metodologia experimental	41
2.2.1 Coleta dos frutos da <i>Pimenta dioica</i> L.	42
2.2.2 Extração do óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i> L.	42
2.2.2.1 Determinação do tempo de extração	42
2.2.3 Padrão	43
2.2.4 Características físicas do óleo essencial	43
2.2.4.1 Densidade	43
2.2.4.2 Solubilidade em etanol (70%)	43
2.2.4.3 Índice de refração	44
2.2.4.4 Cor	44
2.2.4.5 Aparência	44
2.2.5 Análises Espectroscópicas	45

2.2.5.1 Análise Espectroeletrônica na Região do Ultravioleta-Visível	45
2.2.5.2 Análise Espectroscópica Vibracional na Região do Infravermelho	45
2.2.5.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas	45
2.2.6 Análise Térmica	46
2.3 Área de estudo	46
2.4 Amostragens em armadilhas odoríferas	48
2.5 Análise dos dados	49
 Capítulo 3	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Cinética de extração do óleo essencial	52
3.2 Características físicas do óleo essencial	53
3.3 Análises espectrofotométricas e cromatográficas do óleo essencial dos frutos da espécie <i>Pimenta dioica</i> L.	55
3.3.1 Análise espectroeletrônica na região do Ultravioleta	55
3.3.2 Análise espectroscópica vibracional na região do Infravermelho	56
3.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas ...	59
3.4 Análise térmica do óleo essencial	81
3.4.1 Análise Termogravimétrica	81
3.4.2 Calorimetria exploratória diferencial	82
3.5 Coletas de abelhas Euglossina	87
 Capítulo 4	
CONCLUSÃO	97
PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	100
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICE	128

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag	Aglae
Al	Alumínio
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
Ef	Eufriesea
EG	Eugenol Puro (2006-2007)
EG1	Eugenol Puro (2005-2006)
Eg	Euglossa
EI	Eulaema
EM	Espectrometria de Massas
Ex	Exaerete
IBD	Instituto Biodinâmico
F.M.	Fórmula Molecular
IE	Impacto de elétrons
IV	Infravermelho
M ⁺	Íon Molecular
OL	Óleo Essencial
PNLM	Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
TG	Termogravimetria
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Árvore da espécie <i>Pimenta dioica</i> L.	9
Figura 1.2. Folhas e flores da <i>Pimenta dioica</i> L.	10
Figura 1.3. Fruto da <i>Pimenta dioica</i> L.	10
Figura 1.4. Fórmula estrutural plana do eugenol.	13
Figura 1.5. Abelha Euglossina (<i>Eulaema cingulata</i>).....	27
Figura 2.1. Sistema extrator de Clevenger.	40
Figura 2.2. Localização da área de estudos no município de Barreirinhas, MA.....	48
Figura 2.3. Ísca odorífera embebida com o óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i>	49
Figura 3.1. Cinética referente ao rendimento de extração do óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i> L. em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C.....	53
Figura 3.2. Espectro de absorção molecular na região do UV: (A) mistura etanol/água a 60%; (B) Óleo essencial; (C) Padrão eugenol.....	55
Figura 3.3. Espectro na região do infravermelho: (A) Padrão eugenol; (B) Óleo essencial.....	59
Figura 3.4. Cromatograma da amostra do óleo dos frutos da pimenta dióica, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca NIST02.....	60
Figura 3.5. Espectros de massas de (A) composto do pico 1 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.	63

- Figura 3.6.** Espectros de massas de (A) composto do pico 2 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02 64
- Figura 3.7.** Espectros de massas de (A) composto do pico 3 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02 65
- Figura 3.8.** Espectros de massas de (A) composto do pico 4 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02. 66
- Figura 3.9.** Espectros de massas de (A) composto do pico 5 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02 67
- Figura 3.10.** Fragmentação tipo reação *retro*-Diels-Alder do Limoneno.....68
- Figura 3.11.** Espectros de massas de (A) composto do pico 6 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02 68
- Figura 3.12.** Espectros de massas de (A) composto do pico 7 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02. 70
- Figura 3.13.** Espectros de massas de (A) composto do pico 8 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02. 71
- Figura 3.14.** Espectros de massas de (A) composto do pico 9 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02. 72
- Figura 3.15.** Espectros de massas de (A) composto do pico 10 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02. 73

Figura 3.16. Espectros de massas de (A) composto do pico 11 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.	74
Figura 3.17. Espectros de massas de (A) composto do pico 12 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.	75
Figura 3.18. Espectros de massas de (A) composto do pico 13 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02	76
Figura 3.19. Espectros de massas de (A) composto do pico 14 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02	77
Figura 3.20. Espectros de massas de (A) composto do pico 15 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02	78
Figura 3.21. Espectros de massas de (A) composto do pico 16 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02	79
Figura 3.22. Espectros de massas de (A) composto do pico 17 do cromatograma da figura 13 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02	80
Figura 3.23. Curva TG Isotérmica para o óleo essencial da <i>Pimenta dioica</i> L.....81	
Figura 3.24. Curva DSC para padrão de eugenol em porta amostra de Al sem furo.....	83
Figura 3.25. Curva DSC para o óleo essencial da pimenta dioica em porta amostra de Al sem furo.....	84
Figura 3.26. Curva DSC para padrão de eugenol em porta amostra de Al com furo..	85

- Figura 3.27.** Curva DSC para o óleo essencial da pimenta dioica em porta amostra de Al com furo..... 86
- Figura 3.28.** Média mensal do número de espécies (A) e de indivíduos (B) capturados no eugenol puro e no óleo essencial de eugenol, de agosto de 2006 a junho de 2007, no entorno do PNLM. Os valores em B estão transformados em logaritmo porque a variância no eugenol é quase nove vezes maior que a encontrada no óleo essencial, além do desvio padrão e a média serem proporcionais..... 89
- Figura 3.29.** Curvas de rarefação do EG1 (eugenol estudado em 2005-2006) e do EG (eugenol estudado em 2006-2007). Para um tamanho amostral de 43 indivíduos, o número estimado de espécies no EG1 é 4,5 (desvio padrão: 0,54) e no EG é de 3,8 (desvio padrão: 0,79). 90
- Figura 3.30.** Similaridade faunística de abelhas Euglossina coletadas no eugenol puro e no óleo essencial de eugenol, no PNLM, Maranhão, Brasil, calculada através do índice de Jaccard (A) e de Morisita (B). EG1 = eugenol puro estudado de 2005 a 2006; EG = eugenol puro estudado de 2006 a 2007; OL = óleo essencial de eugenol. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Propriedades físicas do óleo essencial extraído de frutos da espécie <i>Pimenta dioica</i> L.	54
Tabela 3.2. Bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial na região do infravermelho.	58
Tabela 3.3. Teor dos componentes identificados através do espectro de massas da amostra dos frutos da pimenta dióica.....	62
Tabela 3.4. Abelhas <i>Euglossina</i> coletadas no eugenol (EG) e no óleo essencial (OL) de agosto de 2006 a junho de 2007, e no eugenol (EG1) de agosto de 2005 a junho de 2006 em área de restinga do nordeste do Maranhão, Brasil.....	88
Tabela 3.5. Estimativa da riqueza de espécies de abelhas <i>Euglossina</i> através do Estimador de Cobertura baseado na Abundância (ACE), de espécies compartilhadas através do estimador Chao1 e similaridade de Jaccard baseado na abundância (Chao-Jaccard) entre as essências EG1 (eugenol estudado em 2005-2006), EG (eugenol estudado em 2006-2007) e o óleo essencial; S_{obs} – riqueza de espécies observada; S_{comp} – riqueza de espécies compartilhada observada; IC (95%) – Intervalo de Confiança de 95%.	92

Título: CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Pimenta dioica* LINDL E SUA APLICAÇÃO COMO ATRATIVO DE ABELHAS EUGLOSSINA.

Autor: Odair dos Santos Monteiro

Orientadores: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho

Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

PALAVRAS-CHAVE: Óleos essenciais, *Pimenta dioica*, Eugenol, Euglossina

RESUMO

A espécie vegetal *Pimenta dioica* Lindl, conhecida popularmente como pimenta da jamaica, é uma árvore de 6 a 15 m de altura, que pertence à família das Mirtaceae e tem como origem a América Central e oeste da Índia. Seu fruto contém um óleo essencial de grande valor econômico no mercado internacional, devido ao elevado teor de eugenol (seu composto majoritário) o qual é largamente usado nas indústrias químicas e farmacêuticas. Neste trabalho, promoveu-se a extração do óleo essencial do fruto da *Pimenta dioica* Lindl através do método da hidrodestilação, utilizando um sistema de Clevenger modificado. Através da cinética de extração, observou-se que o volume de óleo extraído é máximo em um tempo ótimo de extração de 4 horas com um rendimento de 2,8% m/v. Além das constantes físicas densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência, foi possível – através de técnicas espectrofotométricas UV, espectrofotométricas IV, cromatografia gasosa e espectrometria de massas – identificar com segurança o eugenol como constituinte majoritário do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl (76,98%). O óleo essencial da *Pimenta dioica* e o padrão de eugenol foram testados como atrativos de abelhas Euglossina no Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses. Neste trabalho são registradas as diferenças e semelhanças sazonais e de especificidade na atração de abelhas Euglossina entre o óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl e o eugenol puro. As implicações para a biologia da conservação são discutidas.

Title: CHARACTERIZATION OF THE *Pimenta dioica* LINDL ESSENTIAL OIL AND ITS APPLICATION AS AN ATTRACTIVE OF EUGLOSSINE BEES.

Author: Odair dos Santos monteiro

Advisors: Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

KEY-WORDS: Essential oil; *Pimenta dioica*; Eugenol; Euglossine.

ABSTRACT

The vegetal species *Pimenta dióica* Lindl, popularly known as Jamaican pepper, is a 6-15-meter tall tree, which belongs to the Mirtaceae family and has Central America and West India as its origin. Its fruit has an essential oil of great economic value in the international market, due to its high level of eugenol (its major compound), which is largely used in chemical and pharmaceutical industries. In this work, it was promoted the extraction of the essential oil from the fruit of *Pimenta dioica* Lindl through the method of hydrodestilation, using a Clevenger modified system. Through the extraction kinetic, it was observed that the volume of the extracted oil is maximum in a surpassing time of four-hour extraction with a yield of 2.8% m/v. Besides the density physical constancy, refraction rate, solubility, color and appearance, it was possible – through the spectrophotometric techniques of UV, spectrophotometric IR, gaseous chromatography spectrometry of masses – to identify, with security, the eugenol as the major compound of the essential oil of *Pimenta dioica* Lindl (76,98%). The essential oil of *Pimenta dióica* and the eugenol standard were tested as attractive to the Euglossine bees in the “Lençóis Maranhenses” National Park. In this work, it was registered the sazonal differences and similarities in the attraction of the Euglossine bees between the essential oil of the *Pimenta dioica* and the pure eugenol. The implications to the conservation biology are discussed.

INTRODUÇÃO

O estudo de substâncias extraídas de plantas tem se mostrado imprescindível ao longo do tempo, seja pela grande diversidade biológica existente no Brasil ou mesmo pelas potencialidades que as mesmas apresentam.

Neste contexto, os óleos essenciais representam uma alternativa viável em diversos trabalhos envolvendo substâncias de origem vegetal. Porém, é necessário que as técnicas de análises químicas desses óleos sejam aperfeiçoadas ou, até mesmo, que novas técnicas sejam aplicadas para uma melhor caracterização de seus componentes.

Nesse trabalho, algumas técnicas espectroscópicas (UV-VIS e IV), cromatografia gasosa e espectrometria de massas, além da análise térmica, foram aplicadas para a caracterização do óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl.

Atualmente, além da caracterização, procura-se expandir a utilização dos óleos essenciais. Esses óleos já são usados na indústria de cosméticos, na indústria farmacêutica, entre outras. Com esse objetivo, o óleo essencial da *Pimenta dioica* também foi aplicado como atrativo de abelhas *Euglossina* no Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses.

1.1 Aspectos gerais sobre óleos essenciais

O termo “óleo essencial” é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos,

sendo o mais freqüente a destilação por arraste de vapor d'água (MOUCHREK FILHO, 2000).

1.1.1 Definição e características

A *International Standard Organisation* (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos polícarpos de frutos cítricos (Rutacaceae). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Eles são assim chamados por serem: geralmente de aparência oleosa e serem líquidos; voláteis; geralmente possuem aroma agradável; solúveis em solventes apolares, como o éter. Em água, eles apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que nesse caso são denominadas hidrolatos (DI STASI, 1996; LEMOS, 1990).

É interessante notar que os óleos essenciais diferem-se quimicamente dos óleos vegetais e dos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos, compostos oxigenados e outros tipos de funções orgânicas. Já os óleos vegetais são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias. Enquanto que os últimos óleos citados são parafinas líquidas misturados a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado (WILLIAMS, 1996).

A constituição química dos óleos essenciais é muito complexa, chegando alguns a dezenas de compostos com funções orgânicas diferentes: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres e fenóis.

Os óleos essenciais apresentam as mais diversas ações farmacológicas, tais como:.

- ação eupépticas (digestiva): condimentos como orégano, manjeriço, sálvia, tomilho etc.

- hiperemizante local: óleo de menta, que é rico em mentol; a cânfora como princípio ativo isolado.

- antisséptica: óleo essencial de cravo, devido ao eugenol; óleo essencial de eucalipto, devido a grande quantidade de eucalipto (cineol) (OMS, 2002).

1.1.2 Processos de extração

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam de acordo com a parte da planta em que ele se encontra bem como com a proposta de utilização do mesmo. Os mais comuns são: enfloração (*enfleurage*), arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO₂ supercrítico (DI STASI, 1996; LEMOS, 1990; WILLIANS, 1996; CRAVEIRO, 1981).

No presente trabalho utilizou-se a destilação por arraste de vapor d'água.

1.1.3 Enfloração

Esse método já foi muito utilizado, mas atualmente é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregado para extrair óleo essencial de pétalas de flores. As pétalas são depositadas, à temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um certo tempo. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo

essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura e o produto assim obtido possui alto valor comercial (SIMÕES, 1999).

1.1.4 Prensagem

Esse método é empregado para a extração dos óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo essencial é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (SIMÕES, 1999).

1.1.5 Extração com solventes orgânicos

Os óleos essenciais são extraídos, preferencialmente, com solventes (éter, éter de petróleo ou diclorometano) que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além do óleo essencial. Por isso, os produtos obtidos assim raramente possuem valor comercial (SIMÕES, 1999).

1.1.6 Extração por fluido supercrítico

Esse método permite recuperar os aromas naturais de vários tipos, não somente óleo essencial, de modo bastante eficiente e, atualmente, é um dos métodos de escolha para extração industrial de óleos essenciais. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31°C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de

um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (SIMÕES, 1999; FAJARDO, 1997).

1.1.7 Arraste por vapor d'água

Na indústria de óleos essenciais existem três tipos de extrações, distinguidas pela forma como se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor; a primeira é chamada de hidrodestilação, onde a amostra fica imersa na água contida numa caldeira; a segunda de destilação pela água e vapor, onde uma rede colocada na parte inferior de uma caldeira mais alta separa a água da amostra e a terceira de destilação pelo vapor de água, onde a amostra é colocada em uma caldeira e o vapor de água ali injetado provém de um gerador próprio, independente (ALVES, 1988; CRAVEIRO, 1981; BRUNETON, 1991).

A indústria utiliza, de preferência, o terceiro método, pois, em relação aos demais métodos, é reduzido o contato da amostra com a água, e a hidrólise dos ésteres e a polimerização de outros constituintes, em particular dos aldeídos, é menos acentuada. (ALVES, 1988; CRAVEIRO, 1981; BRUNETON, 1991).

1.1.8 Aplicações industriais

Os óleos essenciais são largamente usados em muitas indústrias para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos etc. (CRAVEIRO, 1981; COSTA, 1994; KIRK, 1981; ROBLES, 1998). São empregados também para mascarar odores desagradáveis em

ambientes de trabalho e instalações sanitárias, além de serem usados como insumos em diversos produtos das indústrias de plásticos, tintas, borrachas, inseticidas e outras (CRAVEIRO, 1981; CAVICCHIOLI, 1986).

Muitos óleos essenciais oferecem compostos de partida para sínteses de outras substâncias úteis nas indústrias químicas e farmacêuticas (ALVES, 1988; CRAVEIRO, 1981; FUH et al, 1996; FAJARDO, 1997; MATOS, 1989). Outros componentes têm propriedades farmacológicas e são usados como analgésicos (KOLLMANNSBERGER, 1993; KOROLKOVAS, 1998; SILVA, 1926), bactericidas (CRAVEIRO, 1981; ROBLES, 1998), sedativos (CRAVEIRO, 1981), expectorantes (CRAVEIRO, 1981), reumáticos, estomáquicos (WEYERSTAHL, 1998) etc.

1.1.9 Controle de qualidade dos óleos essenciais

A qualidade dos óleos essenciais é preocupação freqüente entre pesquisadores devido, entre outras coisas à variabilidade da sua composição química.

Os óleos essenciais apresentam freqüentemente problemas de qualidade, que podem ter origem na variabilidade da sua composição química, na adulteração ou falsificação ou, ainda, na identificação incorreta do produto e sua origem. Os produtores de grande parte dos óleos essenciais comercializados não apresentam a identificação correta da planta da qual o produto foi obtido (nome científico), a partir do vegetal que foi empregado e a procedência do mesmo (SIMÕES, 1999).

As essências alteram-se com maior ou menor facilidade, dependendo da natureza química dos seus constituintes e consoante às circunstâncias do meio. Entre os fatores principais que as modificam estão o ar, a luz, o calor, a água e impurezas

diversas de origem natural ou oriunda de falsificações. As alterações podem ser reconhecidas tanto por mudanças de suas características organolépticas (aroma, cor, sabor, transparência, fluidez), como também dos valores dos seus parâmetros químicos e físicos. Desta maneira, diminuindo as suas qualidades, reduz-se de igual modo o seu aproveitamento nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentos, química etc. (MATOS, 1988; CRAVEIRO, 1981; COSTA, 1994).

A adulteração de óleos essenciais já é conhecida desde os tempos mais antigos. Além da fraude evidenciada ao consumidor, dependendo do tipo de falsificação, esta pode acarretar conseqüências negativas para a saúde do usuário e, portanto, especial atenção deve ser reservada a esse tipo de problema. Tipicamente, os óleos essenciais são adulterados por adição de compostos sintéticos, de baixo custo, tais como: álcool benzílico, ésteres do ácido ftálico e até hidrocarbonetos clorados. Esta adulteração se faz por mistura do óleo essencial de qualidade com outros de menor valor para aumentar o rendimento; por adição de substâncias sintéticas que são os compostos principais do óleo em questão ou por falsificação completa do óleo através de misturas de substâncias sintéticas dissolvidas num veículo inerte (SIMÕES, 1999).

Estima-se que aproximadamente 80% dos óleos essenciais disponíveis no mercado não mais apresentam sua composição original. Sabe-se que existe uma grande variedade de estratégias sofisticadas de falsificações e, dessa forma, torna-se cada vez mais difícil detectá-las. Devido a esta problemática fica cada vez mais intenso o uso de métodos de avaliação para o controle dos óleos essenciais. Dentre os métodos, podemos citar a solubilidade em etanol a 70%, índice de refração, densidade, ponto de ebulição, além de análises cromatográficas (SIMÕES, 1999).

1.1.10 Análises dos componentes dos óleos essenciais

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos é feita por meio de técnicas de Cromatografia Gasosa, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CG e CLAE) (KIRK, 1981; ROBLES, 1998; WEYERSTAHL, 1998) e Espectroscópicas (SILVERSTEIN, 2000), dentre as quais as mais freqüentes são a Espectroscopia de Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono 13 (RMN ^1H e ^{13}C) e a Espectrometria de Massas (EM), além do uso de bibliotecas contendo informações existentes na literatura de um grande número de substâncias já conhecidas (DI STASI, 1996; KOLLMANNBERGER, 1993; FAJARDO, 1997; CAVICCHIOLI, 1986; WEYERSTAHL, 1998; SILVERSTEIN, 2000).

1.2 Aspectos gerais sobre a *Pimenta dioica* L.

A *Pimenta dioica* Lindl (Figura 1.1), também conhecida como Pimenta da Jamaica, é uma árvore de 6 a 15 m de altura, que pertence a família Mirtaceae e tem como origem a América Central e Oeste da Índia (CAVICCHIOLI, 1986; WEYERSTAHL, 1998). Estas foram encontradas primeiramente na Jamaica por exploradores espanhóis que ficaram bastante impressionados com o gosto e aroma dos seus frutos e folhas. Outras árvores de pimenta foram depois descobertas em Cuba e foram atribuídas a pássaros migratórios, que comeram dos seus frutos. Elas também foram encontradas no México, mas foi na Jamaica que estas foram identificadas por volta do ano 1509 (GUENTHER, 1950).



Figura 1.1 Árvore da espécie *Pimenta dioica* L. Fonte: (MONTEIRO, 2004)

O nome “pimenta” foi atribuído ao fruto seco da árvore da “allspice” e foi originário da palavra "pimienta" (termo espanhol para pimenta) por exploradores espanhóis, logo depois que Colombo descobriu o Novo Mundo. Este termo foi completamente impróprio, pois foi baseado somente na aparência visual com o grão de pimenta preta, no que diz respeito ao tamanho, forma e aroma (GUENTHER, 1950; PARRY, 1969; KATZER, 2004; ASTA, 2004).

A espécie é uma árvore fortemente aromática em todas as suas partes, apresenta folhas pecioladas, elíptico alongadas; flores numerosas, pequenas, dispostas em cimeiras axilares (Figura 1.2). Contém fruto baga, globoso, piriforme, contendo duas sementes, raras vezes uma (Figura 1.3) (CORREA, 1978).



Figura 1.2. Folhas e flores da *Pimenta dioica* L. Fonte: (PLANT IMAGES, 2003)



Figura 1.3. Fruto da *Pimenta dioica* L. Fonte: (PLANT IMAGES, 2003)

1.2.1 Clima e solo

O clima mais propício para o seu cultivo é o quente e úmido, com precipitação pluviométrica acima de 1300 mm, chuvas bem distribuídas durante a maioria dos meses do ano, temperatura média de 25°C e umidade relativa em torno de 80%. O solo deve ser de textura média e bem drenado com relevo plano ou levemente inclinado com pH entre 5,0 e 6,0.

1.2.2 Uso popular da *Pimenta dioica* L.

Na História Antiga, a *Pimenta dioica* L. foi usada principalmente para embalsamentos. Com a descoberta do novo mundo, ela foi um condimento exótico que atingiu altos preços e promessa de fama e fortuna aos exploradores espanhóis (THE EPICENTRE, 2004).

No século XVII foi usada como conservante de carnes em longas viagens marinhas. Hoje é usada em pickles, especialmente na Noruega, Finlândia e Suécia (THE EPICENTRE, 2004). Na Jamaica é usada na cozinha como temperos de sopas, guisados, pickles, chás, bolos, biscoitos, pastéis e produtos alimentares usados em ketchups, salsichas e sanduíches. Também é utilizada na produção de bebidas “pimento dram” obtida dos frutos. Nas Bahamas produz-se um chá muito agradável obtido das folhas. A árvore nova é utilizada na fabricação de bengalas e cabos de guarda-chuva (DUKE, 1985).

A mesma espécie vegetal tem larga aplicação medicinal em vários países, dentro os quais podemos citar a Jamaica onde os frutos na forma de decocto são utilizados no tratamento de resfriados, hemorragias e estomatites; na Costa Rica obtém-se das

folhas por infusão um carminativo e estomáquico, excelente para diabetes. Na Guatemala aplica-se externamente em escoriações e dores reumáticas; em Cuba é uma bebida refrescante, chá depurativo e estimulante tônico, o óleo essencial do fruto é usado medicinalmente em diarreia (dispepsia) e flatulência (DUKE, 1985).

No Brasil, a *Pimenta dioica* L., apresenta alguns sinônimos como: pimenta da jamaica, pimenta de coroa e murta pimenta. A espécie apresenta a seguinte posição taxonômica: Reino: Vegetal; Divisão: Angiosperma; Classe: Dicotiledôneas; Ordem: Mirtales; Família: Mirtaceae; Gênero: Eugenia; Espécie: *Pimenta dioica* Lindl (PARRY, 1969; PURSEGOLVE, 1960; CORREA, 1978; BARROSO, 1978).

1.3 Óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* Lindl

Estudos fitoquímicos de seus frutos não detectaram a presença de alcalóides e sim de compostos tanínicos e grande quantidade de óleo essencial (SIMÕES, 1999).

A extração, para fins de comercialização, é feita com frutos secos, por meio de arraste a vapor. O rendimento da extração varia em torno de 2% (m/m), o seu principal componente químico é o eugenol (Figura 1.4) com cerca de 65-85% (m/m), o que confere ao óleo uma alta cotação no mercado internacional, alcançando valores de até 150 dólares por litro (FONT QUER, 1967), devido a sua utilização como fonte de extração de eugenol para a síntese da vanilina (CRAVEIRO, 1981).

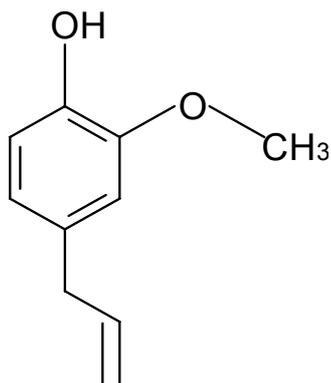


Figura 1.4. Fórmula estrutural plana do eugenol

Este constituinte, o eugenol, é um líquido fracamente amarelado, que escurece ao ar, com aroma de cravo, e com sabor ardente e picante. Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{12}O_2$ e massa molar 164g/mol (MOUCHREK FILHO, 2000). Este é muito usado como flavorizante (CRAVEIRO, 1981), antioxidante (FAJARDO, 1997), antiespasmódico (MOUCHREK FILHO, 2000), anti-séptico, agente antimicrobiano, agente bactericida, fungicida, inibidor inflamatório (OMS, 2002), antialérgico, na composição de cosméticos assim como no tratamento de Aids (ATRASSO, 2002).

Atualmente alguns produtos obtidos por sínteses químicas, a partir do eugenol, tais como: o metileugenol e o acetato de eugenila adquiriram um elevado valor comercial, devido as utilizações desses produtos como princípios ativos nas indústrias agroquímicas, substituindo os atuais defensivos agrícolas, por atrativo de insetos (feromônios), nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (MOUCHREK FILHO, 2000), respectivamente.

1.3.1 Técnicas Analíticas

As técnicas analíticas permitem a avaliação das qualidades do óleo essencial, garantindo, assim, a constância de seus constituintes químicos e a segurança de sua utilização.

A avaliação quantitativa e qualitativa de óleos essenciais envolve a utilização de diversas técnicas analíticas, que sofreram algumas alterações nos últimos anos, devidas essencialmente a evolução da informática (programas de computadores, níveis de automação, forma de integração dos dados obtidos) e da sofisticação dos experimentos que podem ser realizados, resultando na dedução de uma estrutura química pertinente. Dentre estas podemos citar: a Cromatografia Gasosa, Espectroscopia Eletrônica de Ultravioleta (UV), Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (IV) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (MOUCHREK FILHO, 2000; CHAAR, 2000).

1.3.1.1 Cromatografia Gasosa (CG)

A análise de misturas complexas como os óleos essenciais requer a aplicação de métodos analíticos modernos e instrumentação adequada. Diferentes técnicas cromatográficas são predominantes na análise de voláteis; em particular, métodos de cromatografia gasosa que resultam na separação da mistura em componentes individuais (SCHREIER, 1984; LANÇAS, 1993). Assim, a cromatografia permite determinar, qualitativamente e quantitativamente, as frações individuais observadas nos cromatogramas.

1.3.1.2 Espectrometria na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

O uso de técnicas complementares fica mais evidente relacionando-se o infravermelho, a RMN e o ultravioleta. Com a finalidade de caracterizar um composto orgânico, o químico usa, nos casos normais o IV para detectar e identificar os grupos funcionais e a RMN para determinar a disposição estrutural de prótons e carbonos. Depois de ter estabelecido pelo menos uma idéia preliminar sobre a estrutura do composto, o químico está habilitado a decidir se o UV será útil para caracterizar o composto (RALPH, 1983).

A absorção molecular na região do UV e do Vis depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em estado excitado. Para muitas estruturas eletrônicas esta absorção ocorre em uma porção acessível do UV. Na prática, a espectrofotometria no UV é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados (SILVERSTEIN, 2000).

1.3.1.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Como alternativa para avaliações cromatográficas de compostos voláteis, podem ser usadas técnicas que proporcionam informação direta acerca da composição de uma amostra particular sem prévia separação dos componentes, isto é, os métodos espectroscópicos complementares.

A espectroscopia no infravermelho pode ser usada para obter informações acerca dos grupos funcionais da composição dos óleos essenciais, principalmente grupos contendo oxigênio,

uma vez que as vibrações moleculares são perceptíveis nessa região do espectro. Apesar de ser uma técnica altamente sensível, é pouco seletiva no caso de misturas de multicomponentes e difícil para fazer medidas quantitativas de concentrações de componentes individuais (RALPH, 1983).

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma das ferramentas mais comuns para a identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros, pois, com exceção de poucas moléculas homonucleares, tais como O_2 , N_2 e Cl_2 , todas as espécies moleculares absorvem radiação no IV. A intensidade de absorção é uma função da variação do momento de dipolo envolvido na vibração (CRACKER, 1987). Duas categorias básicas de vibrações moleculares são conhecidas: as vibrações de deformações axiais e as de deformações angulares. Uma vibração de deformação axial (estiramento) envolve uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Vibrações de deformação angular são caracterizadas pela mudança no ângulo entre duas ligações. O espectro IV é obtido depois que uma transformação de Fourier converte o interferograma do domínio do tempo à forma mais familiar do domínio de frequências. O interferograma é uma série oscilatória de combinações destrutivas ou construtivas, resultando de uma variação completa de comprimentos de onda (SILVERSTEIN, 2000).

1.3.1.4 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM)

Existem no mercado várias empresas que oferecem o conjunto cromatográfico a gás-espectrometria de massas (CG-EM), acoplado por meio de uma interface que aumenta a concentração da amostra no gás de arraste, aproveitando a maior difusibilidade

do gás. A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo (BUDZIKIEWICZ, 1964). A conexão direta de colunas capilares de cromatografia gasosa ao espectrômetro de massas, sem a interface de enriquecimento, permite várias varreduras de massas rápidas em pontos diferentes de um pico cromatográfico, de modo a testar sua homogeneidade. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (ADAMS, 1995). Na técnica de impacto de elétrons (IE), mais comumente usada em espectrometria de massas, um espectrômetro de massas bombardeia moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de alta energia e registra o resultado do impacto dos elétrons como um espectro de íons separados na base da razão massa/carga (m/z). A maior parte dos íons formados tem carga unitária. Os espectros de massas são obtidos rotineiramente com o uso de um feixe eletrônico de energia de 70 eV. O evento mais simples que pode ocorrer em fase gasosa é a remoção de um único elétron pelo feixe, com formação do íon molecular, um cátion-radical (M^+). O ponto simples representa o elétron desemparelhado. A maior parte dos íons desintegra-se em 10^{-10} - 10^{-3} s, dando, no caso mais simples, um fragmento carregado positivamente e um radical. Assim, forma-se um certo número de fragmentos iônicos que podem ser posteriormente decompostos em fragmentos menores (SILVERSTEIN, 2000).

Pode-se apresentar o espectro na forma de um gráfico ou uma tabela. O gráfico tem a vantagem de mostrar seqüências de fragmentação que com a prática podem ser facilmente reconhecidas. No espectro de massas por impacto de elétrons, gerado por um computador na forma de um gráfico de barras, a abundância relativa dos picos, apresentada como percentagem do pico base (100 %), é lançada contra a razão massa/carga (m/z).

1.3.1.5 Métodos de quantificação

Na análise quantitativa são necessárias precauções em todas as etapas para minimizar ou evitar erros. A alíquota a ser analisada deve ser representativa da amostra. Em cromatografia, a etapa de separação dos componentes da amostra no cromatógrafo pode acarretar erros como: adsorção irreversível de parte da amostra na fase estacionária ou suporte, resposta do detector afetada por alterações de temperatura e vazão de gás, quantidade de amostra injetada fora da faixa linear do detector etc. (RODRIGUES, 1996).

A concentração de uma substância na amostra pode ser determinada por um dos seguintes métodos: método do padrão externo, método da adição padrão, método do padrão interno e método da normalização. No presente trabalho, utilizou-se o método da normalização. Neste método, faz-se a integração eletrônica das áreas dos picos cromatográficos utilizando um software do equipamento CG-EM (Varian 2100). A normalização é muito usada em técnicas analíticas, principalmente em amostras complexas, como é o caso dos óleos essenciais e, também, quando a concentração do analito é muito baixa e existem efeitos de diluição em matrizes (PINO, ROSADO & GONZALEZ, 1989).

1.3.2 Técnicas Termoanalíticas

As técnicas termoanalíticas têm se tornado um instrumento quase que essencial nos estudos da cinética e mecanismos de substâncias, principalmente pelo fato de fornecer informações muitas vezes ausentes em métodos convencionais, porém, são de pouco uso na análise de óleos essenciais. No entanto, são possíveis estudos da perda de massas da amostra

pela ação térmica. Além disso, os pontos de congelamento, fusão e ebulição são propriedades físicas que têm todas as condições para serem determinadas por análise térmica, especialmente pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Para que uma técnica térmica seja considerada termoanalítica ela deve atender a três critérios (WENDLANDT, 1986):

- Medir uma propriedade física;
- Expressar a medida, direta ou indiretamente, em função da temperatura;
- Realizar a medida sob um controle da temperatura.

A habilidade das técnicas de caracterizar os materiais torne-se eficiente quando combinadas com outra técnica analítica, principalmente para caracterização de produtos gasosos, sendo freqüentemente possível realizar medidas simultaneamente de mais de uma propriedade (BROWN, 1988).

Dentre os vários sistemas simultâneos existentes podemos citar: termogravimetria-cromatografia gasosa (TG-CG); termogravimetria-espectrometria de massas (TG-MS) e termogravimetria-cromatografia gasosa- espectrometria de massas (TG-CG-MS) (DOLLIMORE, 1984).

1.3.2.1 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria é uma técnica na qual a variação de massa que ocorre na amostra, perda ou ganho, é acompanhada em função do tempo (a uma temperatura constante) ou em função da temperatura.

A termogravimetria é essencialmente aplicável quando se deseja acompanhar variações de massa envolvidas em um experimento e este tipo de medida é realizada utilizando-se um equipamento denominado termobalança.

A termobalança consiste na combinação de uma microbalança eletrônica adequada com um forno e programador linear de temperatura, permitindo a pesagem contínua da amostra em função da temperatura, à medida que a amostra é aquecida ou resfriada (WENDLANDT, 1986).

O porta-amostra deve ser escolhido de acordo com a amostra a ser analisada e com a temperatura máxima de aquecimento aplicada à amostra. Os porta-amostras são geralmente constituídos de alumínio (temperatura máxima de 600°C), alumina (temperatura máxima de 1200°C), platina, níquel, quartzo, tungstênio, grafite e cobre.

A atmosfera que circunda a amostra pode ser controlada, possibilitando trabalhar com atmosfera estática ou dinâmica à pressão ambiente, sob pressão ou à vácuo. Os gases utilizados podem ser inertes (nitrogênio), oxidantes (oxigênio) ou corrosivos (WENDLANDT, 1986).

Os métodos termogravimétricos são classificados em dinâmico, isotérmico e quase-isotérmico:

- DINÂMICO

No método dinâmico a perda de massa é registrada continuamente à medida que a temperatura aumenta. Este método é o mais geral, quando se utiliza o termo termogravimetria normalmente refere-se à termogravimetria dinâmica.

- ISOTÉRMICO

No método isotérmico a variação de massa da amostra é registrada em função do tempo, mantendo-se a temperatura constante.

- QUASE-ISOTÉRMICO

No método quase-isotérmico, a partir do momento em que começa a perda de massa da amostra ($\Delta m \neq 0$), a temperatura é mantida constante até que a massa se estabilize novamente ($\Delta m = 0$), neste momento recomeça-se o aquecimento e este procedimento pode ser repetido em cada etapa da decomposição (YOSHIDA, 1993).

1.3.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A determinação de pontos de ebulição de óleos essenciais sempre apresenta dificuldades, devido ao fato de serem considerados misturas complexas, proporcionando uma larga faixa de ebulição pelos métodos usuais. Além disso, a falta de uma instrumentação mais específica para essa medida oferece resultados pouco precisos.

Os métodos mais comuns para esta determinação são executados por meio de um alambique de vidro, o qual é constituído por um balão conectado a um tubo vertical com uma abertura superior (suficientemente comprido para o encaixe do termômetro) sendo aquecido a fogo direto, com uma chama regular de modo a manter-se constante a ebulição (COSTA, 1994).

O outro processo é o Siwoloboff, que utiliza um aparelho de W. Büchi para a determinação do ponto de fusão e ebulição, o qual é feito por tubos e capilares de vidro (COSTA, 1994).

Recentemente vem sendo usado a técnica DSC para a determinação de pontos de ebulição de líquidos (IONASHIRO e GIOLITO, 1980), apresentando resultados bastante interessantes e que serviram como ponto de partida para a utilização desta técnica na determinação de pontos de ebulição para os diversos tipos de óleos essenciais. Este tipo de medida é definida como aquela na qual o fluxo de calor entre a amostra e um material termicamente inerte é medido em função da temperatura a que ambos estão submetidos (WENDLANT, 1986).

Quando um material sofre algum tipo de mudança de estado físico (fusão, transição cristalina, ebulição, etc.), ou quando sofre reação química, ocorre liberação ou absorção de calor. Os equipamentos de DSC medem o fluxo de calor para manter iguais as temperaturas de amostra e da referência durante um fenômeno térmico (WENDLANT, 1986).

No DSC cada cadinho (amostra e referência), tem sua temperatura controlada por um aquecedor individual, e o aquecimento é efetuado segundo uma programação de temperatura pré-estabelecida (JONES, 1980).

1.3.3 Fatores que podem influenciar as curvas termogravimétricas e calorimétricas

Algumas técnicas instrumentais possuem um grande número de fatores que podem afetar a natureza, precisão e exatidão dos resultados experimentais, dentre elas a análise térmica. Os fatores que podem influenciar o aspecto das curvas termogravimétricas são denominados fatores experimentais e são classificados em duas categorias (WENDLANDT, 1986) e (BROWN, 1988):

1. Fatores Instrumentais, dentre os quais podemos citar:

- Atmosfera do forno;
- Composição do porta-amostra;
- Razão do fluxo do gás de arraste;
- Razão de aquecimento do forno;
- Geometria do porta-amostra e do forno;
- Sensibilidade do mecanismo de detecção.

2. Fatores característicos da amostra, dentre os quais podemos citar:

- Natureza da amostra;
- Granulometria da amostra;
- Quantidade da amostra;
- Calor de reação;
- Solubilidade dos gases liberados;
- Condutividade térmica da amostra.

O conhecimento detalhado da ação destes fatores é muito importante, pois permite que o operador tire o máximo de informações das curvas termogravimétricas e calorimétricas, evitando que os erros mascarem os resultados. Para se ter uma boa reprodutibilidade nas medidas é preciso que se tenha amostra e condições experimentais com as mesmas características. Muitos dos fatores citados ainda continuam sendo estudados, porque apesar de boa parte deles serem constantes para uma dada termobalança (geometria do porta-amostra, sensibilidade do mecanismo de detecção), muitos outros fatores são variáveis e difíceis de serem controlados (solubilidade dos gases liberados, compactação da amostra).

1.4. Áreas de restinga

As planícies litorâneas arenosas de idade quaternárias existentes ao longo da costa brasileira são geralmente ocupadas por comunidades vegetais características e diversificadas, resultado de fatores locais, tais como topografia, proximidade do mar, condições do solo, profundidade do lençol freático, bem como pelas diferentes inter-relações, aumentando em complexidade na medida em que se distanciam do oceano (LACERDA; ARAÚJO; MACIEL, 1993).

Esse complexo fitogeográfico é conhecido como restinga, representando grandes mosaicos de ecossistemas definidos e interligados funcionalmente (ARAÚJO & LACERDA, 1987).

Por sua localização ao longo do litoral, os ecossistemas que compõem as restingas têm sido, desde a colonização européia, submetidos a um intenso processo de degradação de suas características naturais (BUENO, 1999).

A ocupação preferencial do litoral brasileiro pelos europeus, durante os primeiros 400 anos de colonização, resultou no crescimento de pólos demográficos irradiadores, centrados particularmente, nos estados do Maranhão, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina. Após a exaustão de grande parte de seus recursos florestais, as restingas, sob influência desses pólos, foram e continuam sendo locais preferenciais para o desenvolvimento urbano e turístico, só recentemente acompanhados das necessárias avaliações de impactos ambientais.

Como resultado desta exploração de seus recursos biológicos naturais, pode-se atualmente considerar que as restingas, em todo litoral brasileiro, encontram-se de alguma maneira alteradas, a maioria infelizmente, total ou parcialmente degradada, e são considerados ecossistemas de grande fragilidade no contexto da macrozoneamento do litoral brasileiro (MMA, 1996).

Em conseqüência, são raras as áreas de restinga ainda com características naturais, muito poucas protegidas em unidade de conservação, como por exemplo, as do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses e áreas de influência.

Lamentavelmente, apesar da ameaça real a este ecossistema, somente nas duas últimas décadas a restinga tem sido alvo de estudos mais sistematizados. Embora atualmente, no caso da vegetação, se conheça relativamente bem os taxa (cada agrupamento dentro das categorias taxonômicas) presentes na maioria das restingas brasileiras, estudos sobre a ecologia das populações e biocenoses que a compõe ainda são praticamente inexistentes (ESTEVES & LACERDA, 2000).

1.5 Abelhas Euglossina

As abelhas, designação genérica dos himenópteros da superfamília Apoidea, são, sem dúvida, um dos mais importantes grupos de insetos, do ponto de vista ecológico, por serem os principais polinizadores das flores, comportamento cuja importância não é preciso enaltecer. As abelhas comumente são agrupadas em sete grandes famílias: Fideliidae, Melittidae, Andrenidae, Colletidae, Halictidae, Anthophoridae e Apidae.

A família Apidae é frequentemente dividida em quatro subfamílias: Euglossinae, Bombinae, Meliponinae e Apinae, sendo que nas três últimas encontramos as verdadeiras abelhas sociais e eusociais. A *Apis mellifera* (Apidae) é abelha mais conhecida do homem por causa do mel e da cera que produz, embora essas características sejam comuns também ao miliponíneos, as abelhas sem ferrão, nativas dos trópicos. A notável organização social e o comportamento abnegado e complexo dos seus indivíduos são motivos que têm atraído a atenção dos biólogos e outros profissionais.

Menos conhecidas, mas não menos importantes, são as abelhas da subfamília Euglossinae, doravante chamadas de euglossíneas, um grupo de abelhas exclusivas da Região Neotropical. Suas espécies são constituídas de indivíduos de tamanho moderado a muito grande e possuem o tegumento brilhantemente metálico e glabro bem escuro e densamente pubescente. Extraordinário é o prolongamento da língua (glossa), chegando, em algumas espécies, a ultrapassar o comprimento do próprio corpo (Figura 1.5) (REBÊLO, 2001).



Figura 1.5. Abelha Euglossina (*Eulaema cingulata*)

Muitas espécies de euglossíneas são solitárias, mas um certo número delas adquiriram o hábito de viver juntas em aglomerados pequenos, resultando daí o comportamento do tipo comunal, quase social e primitivamente eusocial. Dois grupos desenvolveram o hábito cleptoparasita, possivelmente a partir de um tronco subsocial (RÊBELO. 2001).

As euglossíneas são um dos poucos taxa de abelhas tropicais que mantêm relações restritas com grupos particulares de angiospermas, sem especificidade por pólen, como ocorre freqüentemente com as abelhas oligoléticas das regiões temperadas. O hábito de sugar néctar tem desempenhado um papel muito importante na evolução de alguns grupos florais. Os machos mantêm uma relação estreita com certas orquídeas numa síndrome baseada na oferta e coleta de compostos aromáticos, resultando daí a designação “as abelhas das orquídeas”. Associado a esta síndrome, os machos apresentam modificações

estruturais e um complexo e intrigante comportamento, incomum em qualquer outro grupo conhecido de abelhas – coletam e armazenam substâncias aromáticas em suas tíbias posteriores altamente modificadas, possivelmente como parte de seu comportamento sexual.

Se as euglossíneas forem julgadas por seu comportamento e modificação estrutural, deveriam ser consideradas como um dos grupos de abelhas mais especializados. O belo colorido e modificações morfológicas de seus espécimens, a bizarra relação dos machos com as orquídeas, a controvertida posição sistemática que ocupam em relação às outras subfamílias de apídeos são apenas alguns motivos que fazem destes insetos um dos mais interessantes grupos da nossa fauna tropical.

As euglossíneas normalmente são abelhas ariscas, de vôo rápido e relativamente difíceis de serem observadas nas flores ruderais ou em áreas mais abertas. Por essas razões, durante muito tempo foram pouco estudadas, especialmente com respeito a estrutura de sua comunidades. Tanto que até três décadas atrás o que se conhecia sobre elas era proveniente unicamente de informações sobre as suas relações com certas orquídeas tropicais.

A descoberta da atração de machos por compostos aromáticos sintéticos puros e sua utilização permitiram a realização de estudos pormenorizados do grupo sob todos os aspectos. Hoje se conhece razoavelmente bem estas abelhas, sua biologia e sua história.

O presente trabalho pretende ampliar o número de compostos que exerçam atração sobre as euglossíneas, sobretudo quando combinados com outros constituintes químicos nos óleos

essenciais de plantas, bem como a ampliação na aplicação desses óleos.

1.6. Biologia da Conservação das abelhas Euglossina.

A maioria das fanerógamas do mundo necessita de animais para realizar a polinização (ASHMAN, 2004), sendo as abelhas os principais polinizadores na maioria dos ecossistemas (NABHAN & BUCHMANN, 1997). Estas populações de plantas podem manter uma diversidade genética apenas se grupos de polinizadores estiverem presentes e puderem se mover entre os trechos de habitat (KELLER & WALLER, 2002).

Entretanto, a evidência de que muitas populações de polinizadores estão em declínio em muitas partes do mundo (KREMEN, C. N. M.; RICKETTS, T, 2000) tem uma relevância importante para a implantação de políticas de conservação da biodiversidade em geral, e de polinizadores em particular.

Muitas abelhas coletoras de resina são os principais polinizadores de muitas plantas tropicais auto-incompatíveis (BAWA, 1974). Dessa forma, plantas produtoras de resina floral, mesmo indiretamente, representam um componente essencial para a manutenção da estrutura da comunidade.

A manutenção destes ecossistemas é essencial para a sobrevivência das abelhas Euglossina. Hábitats grandes e ricos em espécies de plantas apresentam disponibilidade de locais de nidificação, recursos nutritivos e proteção da diversidade de abelhas e de sua função ecológica como polinizadoras (GATHMANN & TSCHARNTKE, 2002).

Por outro lado, como as Euglossina podem voar grandes distâncias durante sua vida (JANZEN, 1971), são importantes agentes na reprodução de plantas esparsamente distribuídas na vegetação (RAW, 1989). Esta relação é particularmente importante

no contexto da crescente transformação de grandes extensões de vegetação contínua em blocos isolados de hábitat.

Deste modo, a destruição, deterioração e fragmentação de hábitats afetam as interações entre as abelhas e seus recursos (PYLE; BENTZIEN; OPLER, 1981), principalmente devido ao isolamento de suas populações a remanescentes de vegetação (POWELL & POWELL, 1987; MILLET-PINHEIRO & SCHLINDWEIN, 2005), embora alguns grupos de abelhas sejam mais tolerantes aos efeitos antropogênicos (WINFREE, R.; GRISWOLD, T.; KREMEN, C., 2007).

Muitas espécies vegetais mostram diminuição drástica na produção de frutos e sementes após a ocorrência de distúrbios no habitat (PARRA-TABLA *et al.*, 2000), principalmente devido à diminuição da disponibilidade de polinizadores (PAVILIK; FERGUSON; NELSON, 1993) e efetividade na polinização (AIZEN & FEINSINGER, 1994). Em consequência, pode ocorrer diminuição da comunidade de plantas, aumento da taxa de herbívoros (MALO; LEIRANA-ALCOCER; TABLA-PARRA, 2001) e depressão endogâmica (SIGRIST & SAZIMA, 2004), o que pode conduzir a uma extinção local de várias espécies.

Como resultado da exploração de seus recursos biológicos naturais, pode-se atualmente considerar que as restingas, em todo litoral brasileiro, encontram-se de alguma maneira alteradas, a maioria infelizmente, total ou parcialmente degradada, e são considerados ecossistemas de grande fragilidade no contexto da macrozoneamento do litoral brasileiro (MMA, 1996).

Embora atualmente, no caso da vegetação, se conheça relativamente bem os taxa presentes na maioria das restingas brasileiras, estudos sobre a ecologia das populações e biocenoses que a compõe ainda são praticamente inexistentes (ESTEVES & LACERDA, 2000).

Além disso, apesar das dificuldades em documentar declínios de populações de polinizadores, e estimativas de déficits na polinização serem apenas parte de um problema mais complexo, medidas deste tipo fazem parte de qualquer esforço para a conservação da diversidade biológica (THOMSON, 2001) e práticas adequadas de manejo (HENLE *et al.*, 2004).

Assim, devido ao acelerado processo de transformação a que os ecossistemas de restinga estão submetidos, faz-se necessário conhecer as condições ambientais e determinar as causas do declínio das espécies.

Entre os insetos, as abelhas constituem o mais importante grupo de polinizadores em número e diversidade de plantas polinizadas, sendo responsáveis pelo fluxo de pólen na maioria das espécies das famílias mais comuns em florestas tropicais, (BACKER & HURD, 1968; KEVAN & BACKER, 1983; BAWA, 1990; RAMÍREZ, 2004).

Comumente amostradas no cerrado, restinga e vegetação de dunas (GOTTSBERGER *et al.*, 1989), as abelhas vêm garantindo, nesses ecossistemas, a manutenção de muitas espécies florais com as quais mantêm relações específicas ou generalistas.

As Euglossina, principalmente os machos, polinizam muitas famílias de plantas, como Malpighiaceae, Geraniaceae, Polygalaceae, Balsaminaceae, Malvaceae, Passifloraceae, Apocynaceae, Convolvulaceae, Solanaceae, Verbenaceae, Bignoniaceae, Boraginaceae, Leguminosae, Lecytidaceae, Rubiaceae, Melastomataceae, Bromeliaceae, Musaceae, Maranthaceae, Zingiberaceae e Orquidaceae, apresentando muitas espécies de importância econômica, como *Bixa orellana* (Bixaceae), principalmente visitada por fêmeas para coleta de pólen (ZUCCHI, *et al.*, 1969; DODSON, *et al.*, 1969; FRANKIE *et al.*, 1976; BUCHMANN & BUCHMANN, 1981; SCHEMSKE, 1981;

GRACIE, 1993; MAUÉS, 2002; AGUIRAR, 2003; OLIVEIRA-REBOUÇAS & GIMENES, 2004; CORREIA *et al.*, 2005), muitas das quais polinizadas quase exclusivamente por estas abelhas (ZUCCHI *et al.*, 1969; DRESSLER, 1968; ARMBRUSTER & WEBSTER, 1979; ZIMMERMAN *et al.*, 1989; BAWA, 1990).

Considerando a alta frequência de espécies auto-incompatíveis nas comunidades vegetais da região tropical (BAWA, 1974; FRANKIE *et al.*, 1976; BULLOCK, 1975; BAWA, 1985; OLIVEIRA & GIBBS, 2000; PARRA-TABLA *et al.*, 2000; NARA & WEBBER, 2002) e o potencial destas abelhas para a realização de fertilização entre plantas separadas mesmo por vários quilômetros (JANZEN, 1971), a manutenção da comunidade de Euglossina é essencial para a conservação da diversidade biológica em todos os ecossistemas da região Neotropical via relação planta-polinizador ou através dos efeitos indiretos desta interação.

Em áreas de restinga, abelhas Euglossina são importantes agentes promovedores do fluxo de pólen, responsáveis pelo sucesso reprodutivo de inúmeras espécies vegetais e da fauna.

Informações sobre o fluxo de pólen e da dinâmica das interações mutualísticas chave são aspectos críticos para a conservação adequada e manejo dos recursos genéticos da diversidade biológica (BAWA, 1990).

Muitas populações destas abelhas são vulneráveis à modificação das condições ambientais (POWELL & POWELL, 1987), as quais podem influenciar o desenvolvimento dos machos (PERUQUETTI, 2003) e promover uma diminuição da comunidade de plantas e depressão endogâmica devido ao isolamento de suas populações (SIGRIST & SAZIMA, 2004).

As abelhas Euglossina apresentam distribuição praticamente restrita à região Neotropical (BURQUEZ, 1997). Os

limites ao norte são regiões do Arizona (MINCKLEY & REYERS, 1996) e Flórida (SKOV & WILEY, 2005), nos Estados Unidos da América. Ao sul, são encontradas em Córdoba, Argentina (MOURE, 1967).

A subtribo Euglossina contém três gêneros de vida livre, *Euglossa* (=Eg.), *Eulaema* (=El.) e *Eufriesea* (Ef.), e dois cleptoparasitas, *Aglae* (=Ag.) e *Exaerete* (=Ex.), o primeiro de *Eulaema* e o segundo de *Eufriesea* (MOURE, 1946; ZUCCHI *et al.*, 1969; KINSEY, 1967). Os machos coletam substâncias químicas de inúmeras espécies de orquídeas neotropicais, de outras espécies florais e de fontes não florais (DRESSLER, 1982; REBÊLO & GARÓFALO, 1991; GRACIE, 1993).

Os odores secretados por estas plantas funcionam tanto para atração de polinizadores em populações dispersas, aumentando a área de reconhecimento das flores, como um mecanismo de isolamento entre espécies interférteis, através da atração seletiva de um ou poucos polinizadores (WILLIAMS & DODSON, 1972).

Muitas espécies de orquídeas, como do gênero *Gongorra* e *Coryanthes*, apresentam uma multiplicidade de características florais (tal como momento apropriado de secreção glandular de fragrância) utilizadas como atrativos para uma mesma espécie de abelha (BAKER, 1963).

Além disso, a atração, pelo menos para muitas espécies de orquídeas não é promovida por apenas um composto ou classe de compostos, mas a um conjunto de diferentes classes de substâncias químicas (REIS *et al.*, 2004).

Pouco se sabe sobre o papel destas substâncias para os machos de Euglossina. É provável que sejam precursores de feromônios sexuais (WILLIAM & WHITTEN, 1983). As fragrâncias estocadas nas tíbias posteriores poderiam ser modificadas e

utilizadas no reconhecimento espécie-específico ou como evidência de vigor do macho (ELTZ, 1999).

Comportamento de acasalamento utilizando sinais visuais é conhecido em *Eulaema meriana*, que pousam em troncos de árvores e exibem seu brilhante dorso abdominal com suas asas enquanto produzem um zumbido (EICKWORT & GINSBERG, 1980; KINSEY, 1980). Entretanto, é mais provável que a utilização de sinais químicos ou em combinação com outras sinalizações secundárias, seja bastante difundida entre as espécies de Euglossina.

Vários outros taxa de abelhas são conhecidos por produzirem compostos químicos para o reconhecimento durante a cópula. Composições espécie-específica de compostos alifáticos e isoprenóides são produzidas por ambos os sexos de *Andrena*, que as liberam durante a cópula (TENGO & BERGSTRÖN, 1977). Secreções produzidas pelas glândulas mandibulares podem ser depositadas na fêmea, como em algumas espécies de *Centris* (EICKWORT & GINSBERG, 1980), ou borrifadas sobre a fêmea, como em algumas espécies do gênero cleptoparasita *Nomada* (TENGO & BERGSTRÖN, 1977) por ocasião do acasalamento.

A investigação das relações entre machos de Euglossina e as flores de várias espécies de orquídeas levou à descoberta de uma série de compostos altamente atrativos a essas abelhas (DODSON & HILL, 1966; HILL *et al.*, 1968; DODSON *et al.*, 1969; WILLIAMS & DODSON, 1972), o que tem permitido o estudo da comunidade de Euglossina em vários ecossistemas.

Essa técnica de iscas-odores tem sido utilizada para o estudo da fauna de Euglossina em Floresta Tropical da Costa Rica (JANZEN *et al.*, 1982), Panamá (ACKERMAN, 1983) e Peru (PEARSON & DRESSLER, 1985).

No Brasil, trabalhos foram realizados principalmente em área de Floresta Amazônica (BRAGA, 1976; POWELL & POWELL, 1987; BECKER *et al.*, 1991; MORATO *et al.*, 1992; OLIVEIRA & CAMPOS, 1995), remanescente de Floresta (PERUQUETTI *et al.*, 1999; SOFIA *et al.*, 2004; REBELO & GARÓFALO, 1991; GOMES & LACERDA, 1992; REBELO & CABRAL, 1997; SILVA & REBELO, 1999; WITTMAN *et al.*, 1988; BRITO & REGO, 2001). Entretanto, poucos estudos foram realizados em área de restinga e de dunas litorâneas (VIANA *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2002).

A utilização desta metodologia apresenta-se viável particularmente pela possibilidade de estudo de vários aspectos ecológicos destas abelhas e acesso rápido das condições do ecossistema. Contudo, a coleta apenas de machos representa uma limitação por desconsiderar possível diferença sexual na amplitude de forrageio e na razão sexual, podendo conduzir a uma subestimativa da comunidade de Euglossina. Por isso, estudos com iscas odores que incluam observações e inventários também nas flores e de ninhos são necessários para uma melhor compreensão da biologia das “abelhas das orquídeas”.

Um método complementar ao estudo da comunidade de machos é o estudo das relações destas abelhas com plantas que produzem resinas florais, uma vez que as fêmeas são visitantes e principais polinizadores em muitas espécies vegetais.

1.7 Justificativa

Os machos de abelhas da subtribo Euglossina apresentam um comportamento intrigante. Coletam compostos odoríferos de diversas fontes, mas principalmente das mais de 600 espécies de orquídeas que são polinizadas por estas abelhas (DRESSLER, 1968; DODSON, 1969; WITTMAN *et al.*, 1989). Estes compostos provavelmente são utilizados como precursores de feromônios

sexuais, os quais poderiam atrair fêmeas para sítios específicos (WITTMAN *et al.*, 1989).

Embora muitas espécies de Euglossina possam ocorrer em um mesmo habitat, uma espécie de orquídea será polinizada apenas por uma ou poucas espécies destas abelhas, sendo esta especificidade baseada numa combinação de compostos nas fragrâncias florais (HILLS *et al.* 1972; WITTMAN *et al.*, 1986).

Investigações sobre estas fragrâncias mostraram que o sistema olfatório dos machos parece responder seletivamente, de modo espécie-específico, aos compostos aromáticos, incluindo acetato de benzila, 1,8-cineol, eugenol, cinamato de metila e salicilato de metila (WILLIAMS & DODSON, 1972; WILLIAMS & WHITTEN, 1983; ACKERMAN, 1989; SHIESTL & ROUBIK, 2003), embora mais seletivamente às combinações de odores (DODSON *et al.*, 1969; WILLIAMS & DODSON, 1972; ACKERMAN, 1989).

Os estudos relacionados ao poder de atração para machos de Euglossina de combinações com eugenol e de eugenol puro foram realizados em grande parte em laboratório, com Cromatografia de Gás e Detecção Antenográfica (SHIESTL & ROUBIK, 2003). Estes autores mostraram que nem sempre a atratividade de uma substância está relacionada à ausência de detecção, indicando que fragrâncias eletrofisiologicamente ativas podem não apenas atrair, mas também repelir estas abelhas.

Por outro lado, poucos estudos foram conduzidos para testar o poder de atração de um único composto e misturas em ambiente natural. DODSON *et al.* (1969) e WILLIAMS & DODSON (1972) mostraram que certas porções das fragrâncias florais de orquídeas modificam o potencial de atratividade de outros componentes da fragrância, podendo desempenhar um papel importante na especificidade da atração.

Esta seletividade das misturas é muito importante, e algumas combinações de compostos atrairão apenas uma ou poucas espécies, mesmo que alguns ingredientes pudessem, sozinhos, atrair muitas espécies (DODSON *et al.*, 1969; DRESSLER, 1982).

Desde que algumas espécies de Euglossina são sensíveis à modificação do habitat, com potencial para serem utilizadas como indicadoras das condições ambientais (POWELL & POWELL, 1987; PERUQUETTI *et al.*, 1999), a utilização de iscas odores específicas e mais atrativas para estas espécies poderiam conduzir a uma rápida compreensão da qualidade do ecossistema.

Além disso, a identificação e disponibilidade de compostos químicos atrativos para as Euglossina podem conduzir a uma amostragem de um grande número de machos destas abelhas, que podem pertencer a espécies pobremente conhecidas ou aparentemente raras (WILLIAMS & DODSON, 1972).

WILLIAMS & DODSON (1972) também declara que a utilização destes odores pode possibilitar uma compreensão mais clara da distribuição geográfica de muitas espécies.

O uso de novas essências atrativas para abelhas Euglossina, portanto, faz-se necessário. Nessa perspectiva, os óleos essenciais se apresentam como uma alternativa viável como iscas odores para capturas de machos de Euglossina e, até mesmo, das fêmeas destas espécies, tendo em vista que substâncias puras não têm poder atrativo para estas abelhas.

1.8 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar e estudar o uso do óleo essencial extraído do fruto da espécie *Pimenta dioica* L. como atrativo de abelhas Euglossina no entorno do parque nacional dos lençóis maranhenses.

Para tanto, será necessário cumprir os objetivos específicos abaixo:

1. Extrair quantitativamente o óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* L., coletados na Cooperativa Agrícola Mista do Projeto Onça LTDA, no município de Taperoá-BA, Brasil.
2. Caracterizar fisicamente o óleo essencial.
3. Identificar analiticamente os componentes do óleo, usando cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas, espectroscopia no ultravioleta e infravermelho.
4. Relacionar as curvas de DSC do padrão de eugenol com o óleo essencial da pimenta dioica, bem como determinar a perda de massa do óleo essencial através de análise termogravimétrica isotérmica.
5. Investigar a atratividade do óleo essencial e do eugenol puro em relação à fauna de Euglossina, determinando a riqueza de espécies, abundância e variação bimestral da abundância.

PARTE EXPERIMENTAL

Essa pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em parceria com o Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Laboratório do Mestrado em Biodiversidade e Conservação do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão e com a Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

2.1 Equipamentos e Materiais

A metodologia adotada envolveu atividades usuais em um tratamento analítico de plantas aromáticas, bem como os testes de atratividade de abelhas usando essências odores e, de forma inédita, óleos essenciais.

2.1.1 Moinho elétrico

Utilizou-se o moinho elétrico Tecnal, modelo TE-340 para a trituração das amostras.

2.1.2 Refratômetro

Utilizou-se um refratômetro de AABE, modelo 2 WAJ, para as medidas de índice de refração.

2.1.3 Extrator de Clevenger

Foi utilizado um extrator de Clevenger de vidro, acoplado a um balão de fundo redondo de 100 mL, para extração do óleo essencial (Figura 2.1) e uma manta de aquecimento foi usada como fonte de calor.

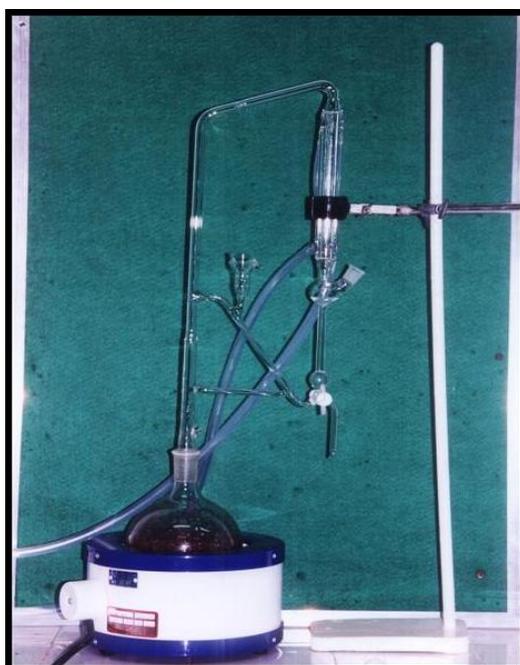


Figura 2.1. Sistema Extrator de Clevenger

2.1.4 Espectrofotômetro de Ultravioleta

Utilizou-se um espectrofotômetro da marca HP 8451A para a análise do óleo essencial por UV-Vis.

2.1.5 Espectrofotômetro de Infravermelho

Utilizou-se um espectrofotômetro da marca Nicolet-5SXC FTIR, equipado com detector TGS.

2.1.6 Cromatógrafo a gás acoplado a Espectrômetro de Massas

Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas em equipamento da marca Varian 2100.

2.1.7 Análise Termogravimétrica

As curvas TG foram obtidas em uma Termobalança SHIMADZU TGA-50.

2.1.8 Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas calorimétricas foram obtidas em Analisador Térmico, TA INSTRUMENTS, SDT 2920

2.2 Metodologia experimental

A seguir descrevem-se os procedimentos efetuados experimentalmente para a realização desse trabalho.

2.2.1 Coleta dos frutos da *Pimenta dioica* L.

Os frutos foram coletados na Cooperativa Agrícola Mista do Projeto Onça LTDA, no município de Taperoá-BA, Brasil, em agosto de 2005, recebendo o certificado orgânico pelo Instituto Biodinâmico (IBD) (Apêndice 1).

Estes foram secos sob ventilação natural e em seguida, triturados e armazenados em recipientes de polietileno.

2.2.2 Extração do óleo essencial da *Pimenta dioica* L.

O óleo essencial foi extraído de 30 gramas de frutos da espécie *Pimenta dioica* L., previamente triturados e secos, com 300mL de água destilada por hidrodestilação em sistema de Clevenger modificado (Figura 6), mantendo-se a temperatura a 100°C. Posteriormente, o óleo foi seco por meio da percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas operações foram realizadas em triplicata e as amostras foram armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração, para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Em seguida esses óleos foram submetidos às análises.

O rendimento foi calculado na relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume obtido no próprio sistema de extração.

2.2.2.1 Determinação do tempo de extração

O melhor tempo de extração foi determinado em função do rendimento do óleo essencial. Seis extrações foram realizadas nos tempos 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 horas.

2.2.3 Padrão

Foi selecionado para o presente estudo, o padrão de eugenol, constituinte majoritário da *Pimenta dioica* L. Esse padrão, que foi utilizado para o desenvolvimento da metodologia analítica, foi gentilmente fornecido pela Indústria Dierberger de Óleos Essenciais S.A.

As soluções padrão foram preparadas por diluição a diferentes concentrações em etanol e clorofórmio.

2.2.4 Características físicas do óleo essencial

Na caracterização das propriedades físicas do óleo essencial foram determinadas a densidade, o índice de refração, a solubilidade em etanol a 70% v/v, cor e aparência.

2.2.4.1 Densidade

Para o cálculo da densidade, utilizou-se um balão volumétrico de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionaram as amostras do óleo essencial.

2.2.4.2 Solubilidade em etanol (70%)

Para a determinação da solubilidade, utilizou-se uma mistura de álcool/água a 70% (v/v) mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se proporcionalmente volumes crescentes da mistura alcoólicas até a sua completa solubilização.

2.2.4.3 Índice de refração

Para a determinação do índice de refração, foram utilizados tubos capilares de vidro para adicionar as amostras dos óleos diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, a uma temperatura de 25°C.

2.2.4.4 Cor

A técnica proposta é a visual, feita por comparação das cores das essências com as cores conhecidas.

2.2.4.5 Aparência

A técnica proposta também é a visual, onde se faz uma comparação das essências no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

2.2.5 Análises Espectroscópicas

2.2.5.1 Análise Espectroeletrônica na Região do Ultravioleta-Visível

Analisou-se o óleo essencial por UV-Vis no espectrofotômetro da HP 8451A. As amostras foram diluídas em mistura de 60 % de etanol/água.

2.2.5.2 Análise Espectroscópica Vibracional na Região do Infravermelho

Utilizou-se um espectrofotômetro FTIR marca Nicolet modelo 5SXC, equipado com detector TGS na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando janelas de KBr.

2.2.5.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas

Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas.

As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por impacto de elétrons e analisador íon trap (CG-EM-IE-Ion trap), equipamento Varian 2100, foram realizadas utilizando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1 mL min^{-1} ; temperatura do Injetor: 270 °C, split 1:50; coluna capilar (15 m x 0,25 mm) com fase estacionária VF-1ms (100 % metilsiloxano 0,25 μm) e programação de temperatura do forno de 60 °C a 200 °C com taxa de aquecimento de 8 °C min^{-1} , e

de 200 °C a 290 °C com taxa de aquecimento de 15 °C min⁻¹. No Espectrômetro de Massas as temperaturas do manifold, ion trap e da linha de transferência foram de 50 °C, 190 °C e 200 °C, respectivamente. Foram injetadas alíquotas de 1,0 µL (injetor automático CP-8410) das amostras diluídas na proporção de 20 µL em 1,5 mL de hexano.

2.2.6 Análise Térmica

As curvas TG foram obtidas em uma Termobalança SHIMADZU TGA-50, através do método isotérmico de análise, com massa da amostra de 10,17 mg em cadinho de platina, na atmosfera de ar sintético a uma temperatura de aproximadamente 40 °C.

As curvas calorimétricas foram obtidas em Analisador Térmico, TA INSTRUMENTS, MDSC 2920 através do método não isotérmico de análise, na razão de aquecimento de 10°C/min em porta amostra de alumínio com e sem furo em atmosfera de nitrogênio. E intervalo de temperatura de 25-350°C, visando verificar o perfil da decomposição térmica.

2.3 Área de estudo

O trabalho foi realizado em uma localidade no interior do Maranhão - Barreirinhas (2°43'25.52"S; 42°49'48.33"W) - que distam cerca de 164 Km, em linha reta, da capital do Estado do Maranhão (Figura 2.2).

O município de Barreirinhas localiza-se próximo ao Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses (PNLM). Predominam na região, o cerrado, (considerado o mais próximo do litoral, Einten, in. pessoal) a restinga e

a mata ciliar, formada por buritizais que margeiam o Rio Preguiças e seus afluentes.

A área de coleta está localizada no Sítio Buriti, a 600 m da comunidade do povoado Cantinho e a 220 m de uma área de derrubada. As margens do Rio Preguiças aproximam-se do local de coleta a 800 m na comunidade e a 1500 m numa vegetação primária.

Comparado a outros ambientes de restinga ao longo do litoral brasileiro, a riqueza de espécies da flora do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses é baixa (133 espécies, MMA/IBAMA 2002). A vegetação é composta por comunidades herbáceas, esclerofilas arbustivas e/ou arbóreas, e higrófilas.

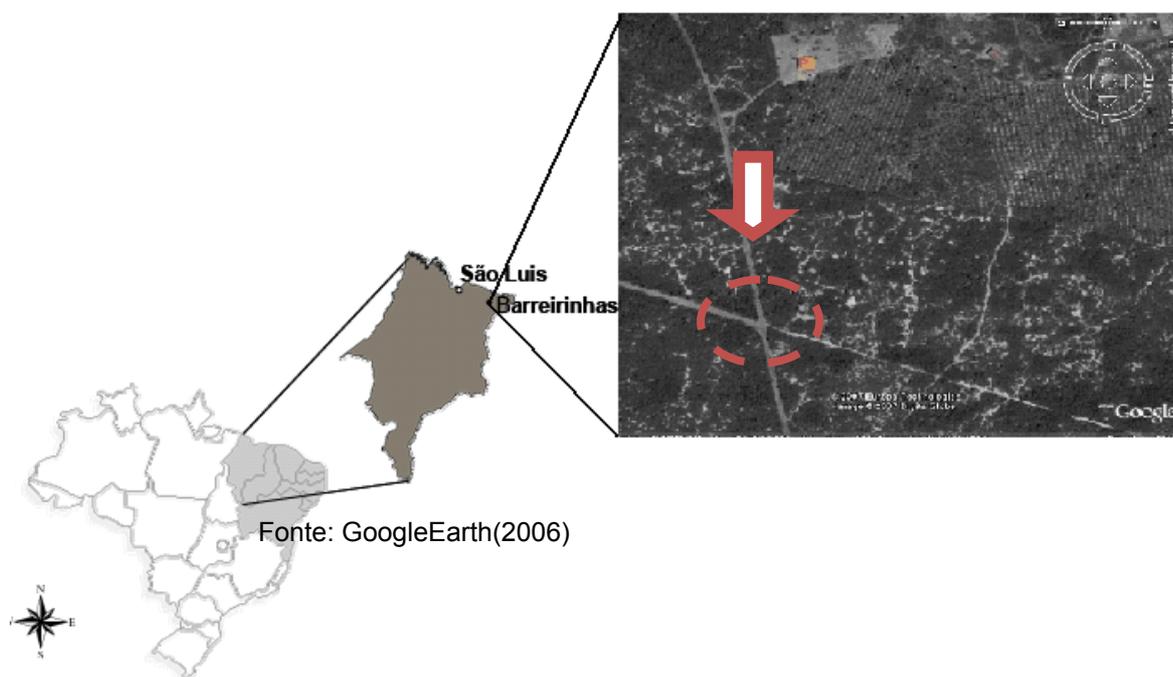


Figura 2.2. Localização da área de estudos no município de Barreirinhas, Maranhão. Fonte: GoogleEarth (2006)

2.4 Amostragens em armadilhas odoríferas

Para testar a atratividade do óleo essencial em relação ao eugenol puro (atrativo para abelhas *Euglossina*), foi empregada a técnica de iscas odores para atração de machos de *Euglossina*. As coletas das abelhas foram realizadas a cada bimestre, de agosto de 2005 a junho de 2006 no eugenol puro (EG1); e de agosto de 2006 a junho de 2007 no eugenol puro (EG) e no óleo essencial (OL).

As iscas odoríferas consistiram de dois chumaços de algodão, embebidos com 1 mL de óleo essencial ou eugenol puro (Figura 2.3), abastecidas a cada hora. As iscas foram presas a barbantes, penduradas em ramos de árvores a 1,5m de altura do solo e mantidas distantes aproximadamente 5 m uma da outra.



Figura 2.3. Isca odorífera embebida com óleo essencial da *Pimenta dioica*.

No momento em que alguma abelha era avistada na isca, era capturada com rede entomológica e colocada em câmara mortífera. Esta consistia em recipientes de vidro contendo algodão encharcado com acetato de etila.

As abelhas coletadas nas iscas odores foram acondicionadas em sacos plásticos e devidamente etiquetadas com data e substância odorífera, para posterior triagem e identificação. As abelhas foram depositadas na Coleção Científica do Laboratório de Estudos sobre Abelhas (LEA) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão.

2.5 Análise dos Dados

A comparação da riqueza mensal de espécies e número mensal de indivíduos entre as duas iscas foi realizada através do teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov para duas amostras independentes, uma vez que este teste é significativo para pequenas amostras. A associação entre o número de indivíduos

coletados nas duas essências a cada mês foi analisada através do coeficiente de correlação de Spearman (ZAR, 1999).

A comparação da atratividade do eugenol puro estudado de 2005 a 2006, de 2006 a 2007 e no óleo essencial foi analisada através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, que é comparável à ONE-WAY ANOVA.

Os testes não paramétricos são apropriados quando as amostras são heterocedásticas e/ou não apresentam normalidade, que são casos de violação dos pré-requisitos para aplicação do teste-t para duas amostras independentes (SHESKIN, 2004).

A riqueza de espécies nas três amostras também foi comparada através do método de rarefação, onde a riqueza é estimada para um tamanho amostral menor.

Para analisar a semelhança faunística entre as três amostras foram analisadas duas análises de agrupamento, uma em relação à abundância e outra em relação à incidência.

Um dendograma foi construído de acordo com o índice de similaridade de Morisita (C) (KREBS, 1999), uma vez que considera a abundância das espécies: $C = 2\sum n_1n_2 / (l_1 + l_2)N_1N_2$, onde n_1 e n_2 representam o número de indivíduos pertencentes à mesma espécie nas duas amostras, N_1 e N_2 é o número total de espécies nas amostras 1 e 2, l_1 e l_2 são os valores de l nas amostras, onde $l_i = \sum ni(ni-1)/N(N-1)$; ni é o número de indivíduos de cada espécie nas amostras e N é o número total de indivíduos.

O outro dendograma foi construído de acordo com o índice de similaridade de Jaccard (J) (KREBS, 1999), uma vez que considera apenas os registros de ocorrência das espécies nas amostras: $J = a / (b + c - a)$, onde “a” é o número de espécies que ocorrem nas duas amostras, “b” é o número de espécies encontrados exclusivamente em uma das amostras e “c” é o número de espécies encontrados exclusivamente na outra amostra.

Os coeficientes de similaridade, e os respectivos dendogramas, foram obtidos com a utilização do programa PAST 1.73 (Paleontological Statistics) (HAMMER *et al.*, 2007).

Para minimizar o “efeito de borda metodológico” (LONGINO *et al.*, 2002), onde algumas espécies que são atraídas pelas essências não são capturadas, embora presente no ambiente, foi realizada estimativa da riqueza de espécies compartilhadas pelas iscas odores através do estimador Chao1 corrigido (CHAO *et al.*, 2006).

Para reduzir consistentemente a influência do efeito de subamostragens nas comparações entre as essências, foi calculado o índice de similaridade de Jaccard baseado na abundância (CHAO *et al.*, 2005).

A riqueza de espécies em cada essência foi estimada utilizando o Estimador de Cobertura baseado na Abundância (ACE) (CHAO *et al.*, 1993). Este estimador é baseado no reconhecimento de que as espécies raras (com até 10 indivíduos) apresentam maior informação para deduzir a riqueza de espécies.

Estas estimativas foram calculadas utilizando o programa EstimateS 8.0 (COLWELL, 2006) e SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation) (CHAO & SHEN, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cinética de extração do óleo essencial

A cinética de extração do óleo essencial é um dos principais parâmetros físico-químicos da indústria de essências, pois além de estar diretamente relacionada com a qualidade do óleo essencial, se reflete no tempo de extração e na natureza econômica do processo, além de ser peculiar a cada tipo de essências a ser extraída (MOUCHREK FILHO, 2000).

Uma destilação rápida pode conduzir a um produto contendo, predominantemente, constituintes mais voláteis, mas, destituídos das melhores características; ao contrário, uma destilação prolongada encarece o produto e também pode sobrecarregá-lo de compostos de aroma menos importantes (COSTA, 1994).

A relação entre o rendimento percentual do óleo e o tempo de extração, para uma mesma massa de 30g do fruto seco em pó, está representada na Figura 3.1. Como se pode observar, o rendimento máximo do óleo extraído nas condições do item 2.2.2.1 foi obtido para um tempo de extração de 4,0 horas, obtendo-se um volume de óleo essencial igual a 0,84mL, atribuindo-se a este valor 100%. Para tempos superiores a 4,0 horas, verificou-se uma constância nos rendimentos. Isto se verifica devido à diminuição crescente do óleo essencial no extrato, em decorrência da destilação.

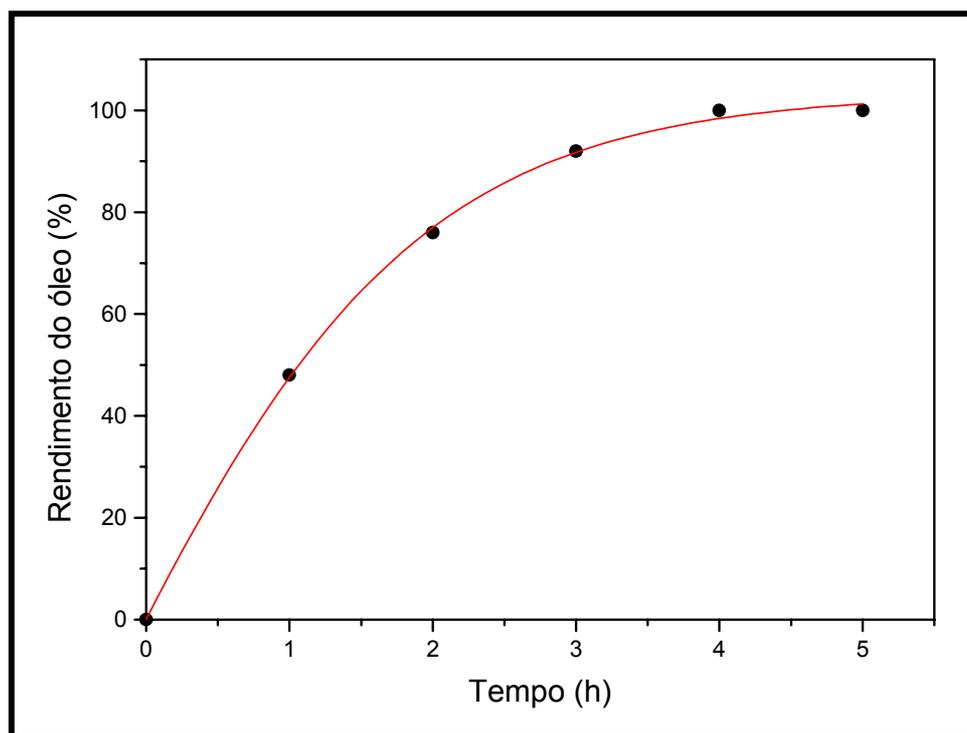


Figura 3.1. Cinética referente ao rendimento de extração do óleo essencial da *Pimenta dioica* L. em função do tempo, com massa de 30g e temperatura de 100°C.

3.2 Características físicas do óleo essencial

Os parâmetros físicos do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* L. são apresentados na Tabela 3.1 (c) e comparados com dados da literatura, Tabela 3.1 (a) e (b).

Tabela 3.1. Propriedades físicas do óleo essencial extraído de frutos da espécie *Pimenta dioica* L.

Propriedades Físico-químicas	Óleo essencial (a)	Óleo essencial (b)	Óleo essencial (c)
Densidade (g mL ⁻¹)	1,021	0,997	0,949
Índice de refração (N _D ^{25°})	1,525	1,521	1,332
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:2	1:2	1:2
Rendimento (%)	3,0	1,6	2,8
Cor	Amarelo	Amarelo	Amarelo
Aparência	Límpido	Límpido	Límpido

(a) Guenter (1950); (b) Mouchreck Filho (2000) ; (c) Monteiro (2006).

Comparando os valores para o óleo essencial dos frutos da espécie *Pimenta dioica* L. com os da literatura, pode-se observar que há uma similaridade entre eles, no que diz respeito aos parâmetros analisados. Pequenas diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento dos frutos.

3.3 Análises espectrofotométricas e cromatográficas do óleo essencial dos frutos da espécie *Pimenta dioica* L.

Os resultados das análises espectrométricas são apresentados abaixo.

3.3.1 Análise espectroeletrônica na região do Ultravioleta-Visível

Os espectros de absorção na região do UV-Vis para a mistura etanol/água a 60% (A), do óleo essencial (B) e do padrão de eugenol (C) são apresentados na Figura 3.2.

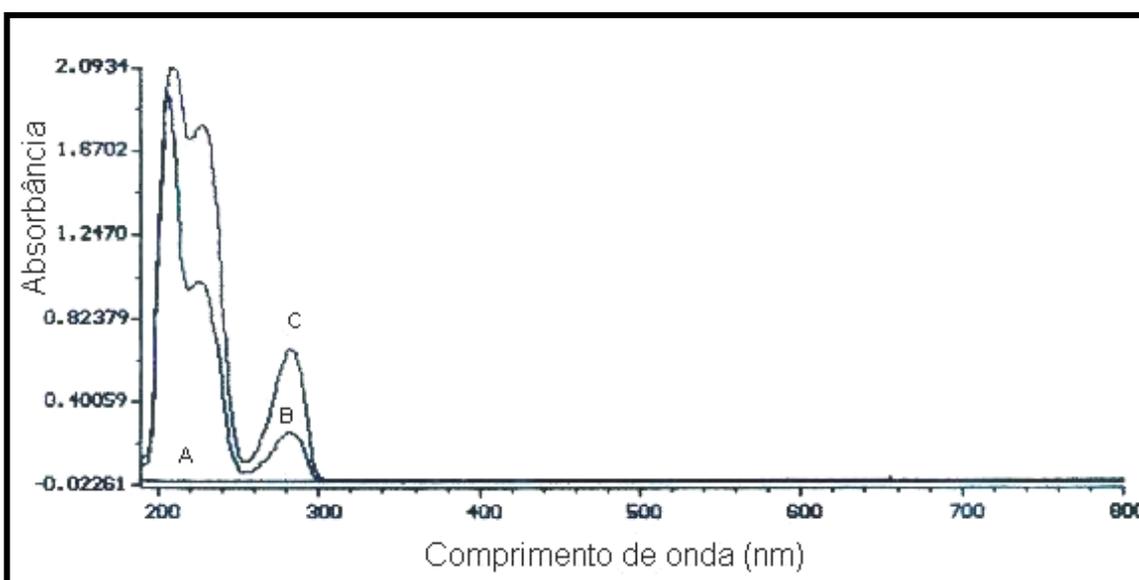


Figura 3.2. Espectro de absorção molecular na região do UV-Vis: (A) mistura etanol/água a 60%; (B) Óleo essencial; (C) Padrão eugenol

Os comprimentos de onda do máximo de absorção $\lambda_{\text{máx}}$, foram de 230 e 280nm, sendo a absortividade molar (ϵ) $2,76 \times 10^3$

L.mol⁻¹.cm⁻¹ para o padrão eugenol, diluído em etanol água a 60%, Figura 3.2C.

Para a amostra do óleo essencial o espectro é mostrado na Figura 3.2B, com absorvância máxima em 230 e 280nm, concordando assim, com os valores apresentados na Figura 3.2C.

As absorções em 230 e 280nm foram atribuídas à presença de insaturações (cromóforos) e à estrutura aromática presentes no óleo essencial. Ambas apresentam transições $\pi \rightarrow \pi^*$, características dos grupos funcionais insaturados. Comparando por superposição o espectro do padrão eugenol (Figura 3.2C) com o espectro do óleo essencial (Figura 3.2B), observa-se que os valores são praticamente idênticos, mostrando assim um indicativo da presença do eugenol no óleo essencial.

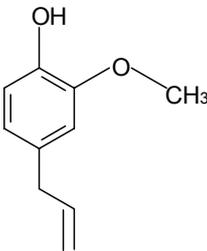
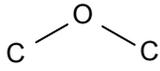
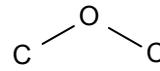
3.3.2 Análise espectroscópica vibracional na região do Infravermelho

A Figura 3.3 mostra os espectros do padrão de eugenol (A) e do óleo essencial extraído dos frutos da espécie *Pimenta dioica* L. (B). Comparando o espectro (A) com o espectro (B) foi possível observar que todas as bandas de absorção coincidem na mesma frequência.

As fortes bandas de absorção na região de 3500 e 1370 cm⁻¹, nos espectros A e B da Figura 3.3, são atribuídas aos estiramentos de OH, principalmente devido à presença majoritária do eugenol, confirmado pelo padrão de eugenol (espectro A). As bandas de 2980 e 2920 cm⁻¹ são atribuídas a estiramentos C–H e a banda de 3100 cm⁻¹ é atribuída a estiramento C–H de aromáticos. As bandas de 1270 e 1615 cm⁻¹ são atribuídas aos estiramentos

C–O da ligação C=C, e ao estiramento C–C de aromático (SILVERSTEIN, 2000). Estas observações são bastante justificáveis, visto que, o eugenol é o componente majoritário do óleo essencial da *Pimenta dioica*. A Tabela 3.2 apresenta os principais estiramentos do padrão de eugenol e do óleo essencial da *Pimenta dioica*.

Tabela 3.2. *Bandas de absorção e modos vibracionais do padrão de eugenol e do óleo essencial na região do infravermelho.*

Composto (eugenol)	Tipo de deformação	Grupo Funcional	Tipo de ligação	Absorção eugenol (cm ⁻¹)	Absorção óleo (cm ⁻¹)
	Axial	Hidroxila	O—H	3508,4	3513,5
	Axial	Aromático	C = C	1613,7	1613,6
	Angular plana	Hidroxila	O—H	1369,8	1372,9
	Axial	Aromático hidroxila	C—OH	1270,6	1270,5
	Axial assimétrica	Éter		1234,1	1234,7
	Axial simétrica	Éter		1034,9	1034,9
	Axial	Aromático	C—H	3067,9	3073,1
	Axial	Metila	C—H	2970,7	2965,6
	Axial	Alifático	C = C	1450	1451

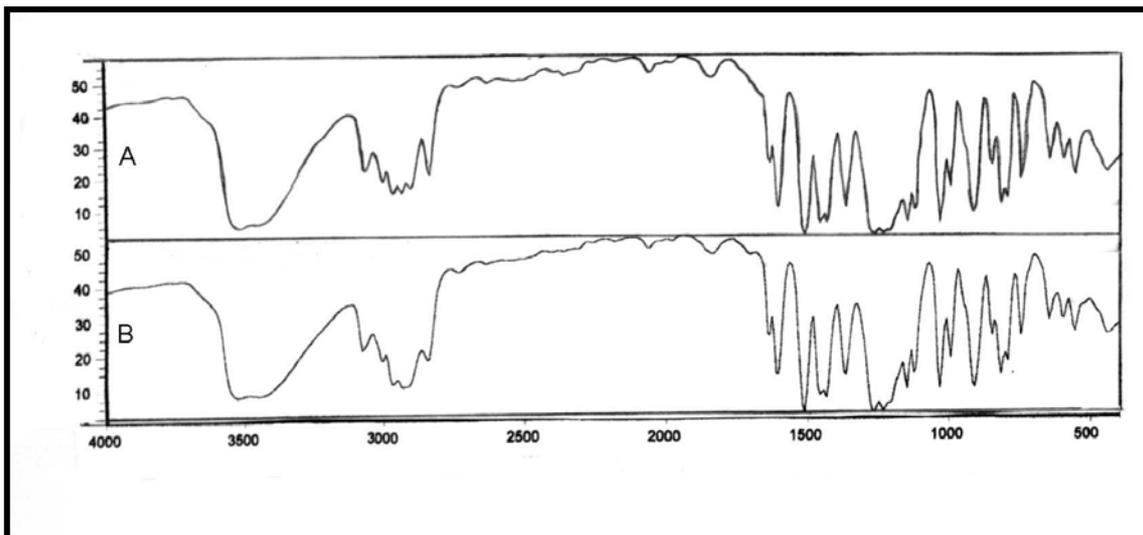


Figura 3.3. Espectro na região do infravermelho: (A) Padrão eugenol; (B) Óleo essencial.

3.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas

O cromatograma do óleo essencial extraído dos frutos da espécie *Pimenta dioica* L., obtidos com o uso de uma coluna capilar (15 m x 0,25 mm) com fase estacionária VF-1ms (100 % metilsiloxano 0,25 μ m) LM100, é mostrado na Figura 3.4.

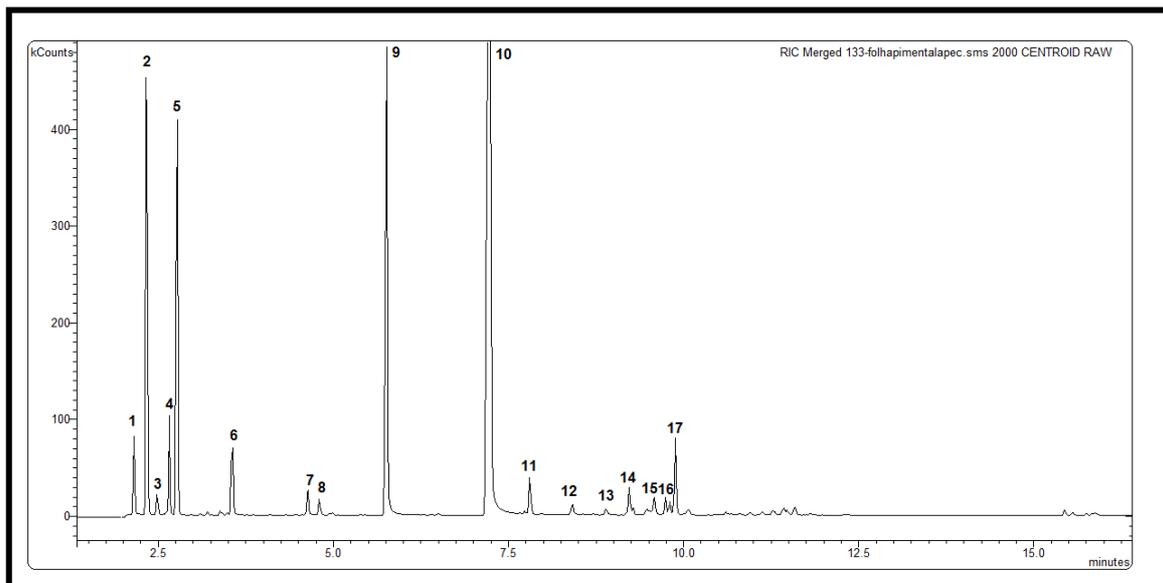


Figura 3.4. Cromatograma da amostra do óleo dos frutos da *Pimenta dióica*, apresentando os picos selecionados e identificados através da comparação dos respectivos espectros de massas com a espectroteca NIST02.

A Figura 3.4 encerra o cromatograma do óleo essencial da *Pimenta dioica*. É notável neste cromatograma a eficiência do método cromatográfico empregado nas condições fixadas no item 2.2.5.3, pois a resolução entre os picos foi satisfatória.

O uso da coluna LM 100 nas condições citadas no item 2.2.5.3, apresentaram a vantagem de mais uma vez poder ser aplicada tanto nas análises qualitativas quanto nas análises quantitativas dos óleos essenciais, proporcionando um menor tempo de análise e uma ótima resolução dos picos cromatográficos.

O pico 10 do cromatograma com tempo de retenção em 7,184 min, corresponde ao eugenol. Todos os picos referidos ao cromatograma do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica* foram identificados por meio dos seus espectros de massas.

A Tabela 3.3 mostra os teores dos componentes contidos no óleo essencial, identificados através do espectro de massas da amostra dos frutos da pimenta dióica. É notável o alto teor relacionado ao pico 10 do cromatograma (76,98%), posteriormente identificado como sendo o eugenol, o que evidencia esse composto como o componente majoritário do óleo essencial.

Tabela 3.3. Teor dos componentes identificados através do espectro de massas da amostra dos frutos da pimenta dióica. Onde, Tr=tempo de retenção; Desvpad=desvio padrão.

Pico	Tr (min)	Teor (%)	Desvpad	CV (%)
1 (1-octen-3-ol)	2.15	1.40	0.04	2.49
2 (β -pineno)	2.33	6.52	0.08	1.27
3 (α -pineno)	2.49	0.28	0.00	1.79
4 (α -cimeno)	2.66	1.94	0.04	1.82
5 (limoneno)	2.77	4.09	0.05	1.32
6 (linalool)	3.56	0.64	0.02	2.38
7 (c.h.sabineno)	4.64	0.22	0.01	4.10
8 (α -terpineol)	4.80	0.13	0.01	4.23
9 (5-indanol)	5.76	5.88	0.20	3.42
10 (eugenol)	7.23	76.98	0.32	0.41
11 (α -cubebeno)	7.80	0.35	0.01	2.94
12 (cariofileno)	8.41	0.09	0.00	3.29
13 (α -cariofileno)	8.90	0.08	0.00	0.44
14 (γ -muroleno)	9.22	0.25	0.01	2.27
15 (α -candideno)	9.58	0.19	0.00	1.53
16 (α -muroleno)	9.74	0.22	0.01	4.16
17 (δ -candideno)	9.88	0.76	0.01	1.36

Abaixo estão relacionados os espectros de massas dos picos apresentados na Figura 3.4 e as respectivas propostas de identificação através da comparação com os dados da espectroteca NIST02 e com ADAMS (1995).

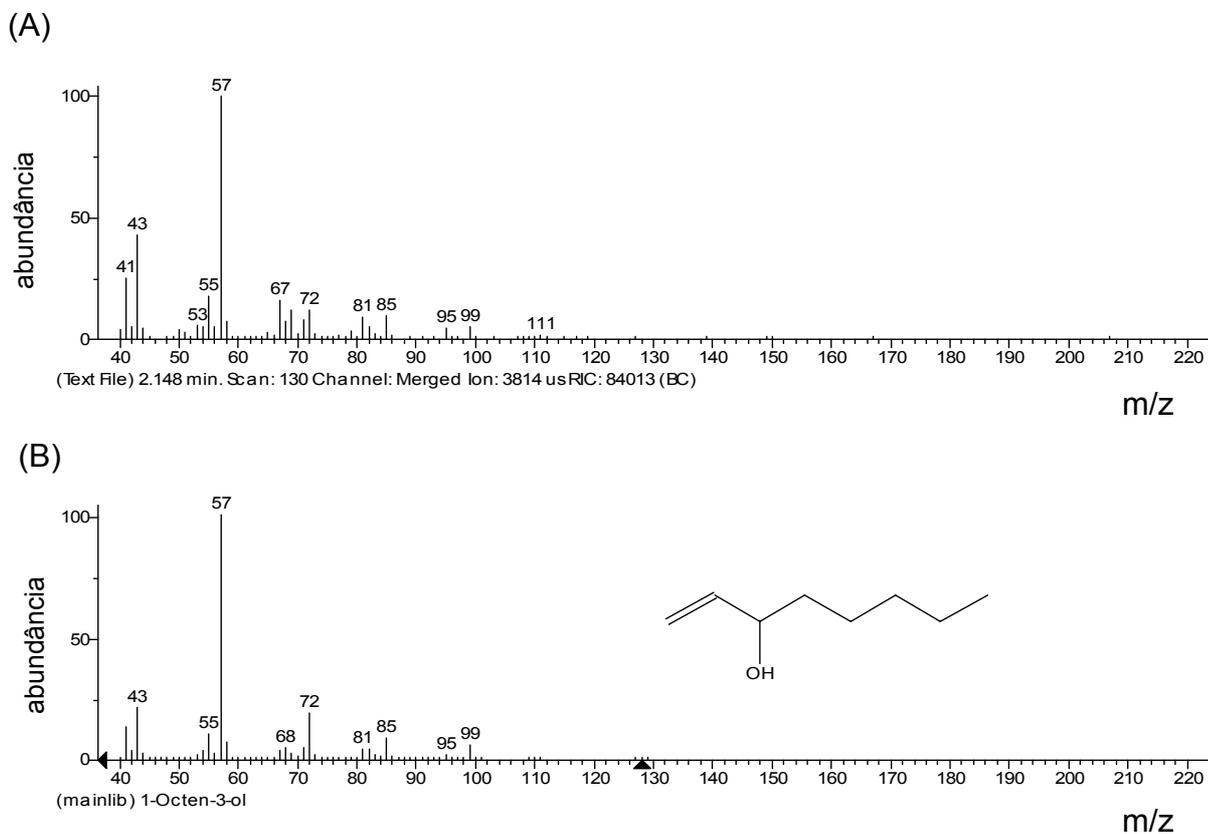


Figura 3.5. Espectros de massas de (A) composto do pico 1 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro de massas da figura 3.5(A) não apresenta o pico do íon molecular $m/z=128$, sendo $C_8H_{16}O$ a fórmula molecular do álcool 1-octen-3-ol. A baixa intensidade do pico do íon molecular é característica de álcoois secundários.

O pico $m/z=111$ [M-17] é característico da perda de hidroxila, o pico $m/z=99$ é, provavelmente, decorrente da perda do grupo CH_2^- e H_2O . O pico $m/z=57$ é relativo ao grupo $[H_2C=CH-CHOH]^+$, o qual é formado por clivagem típica de álcoois secundários (SILVERSTEIN, 2000).

Os principais fragmentos apresentados no espectro de massas são 99(4), 85(10), 81(10), 72(13), 67(16), 57(100), 43(42) e 41(26).

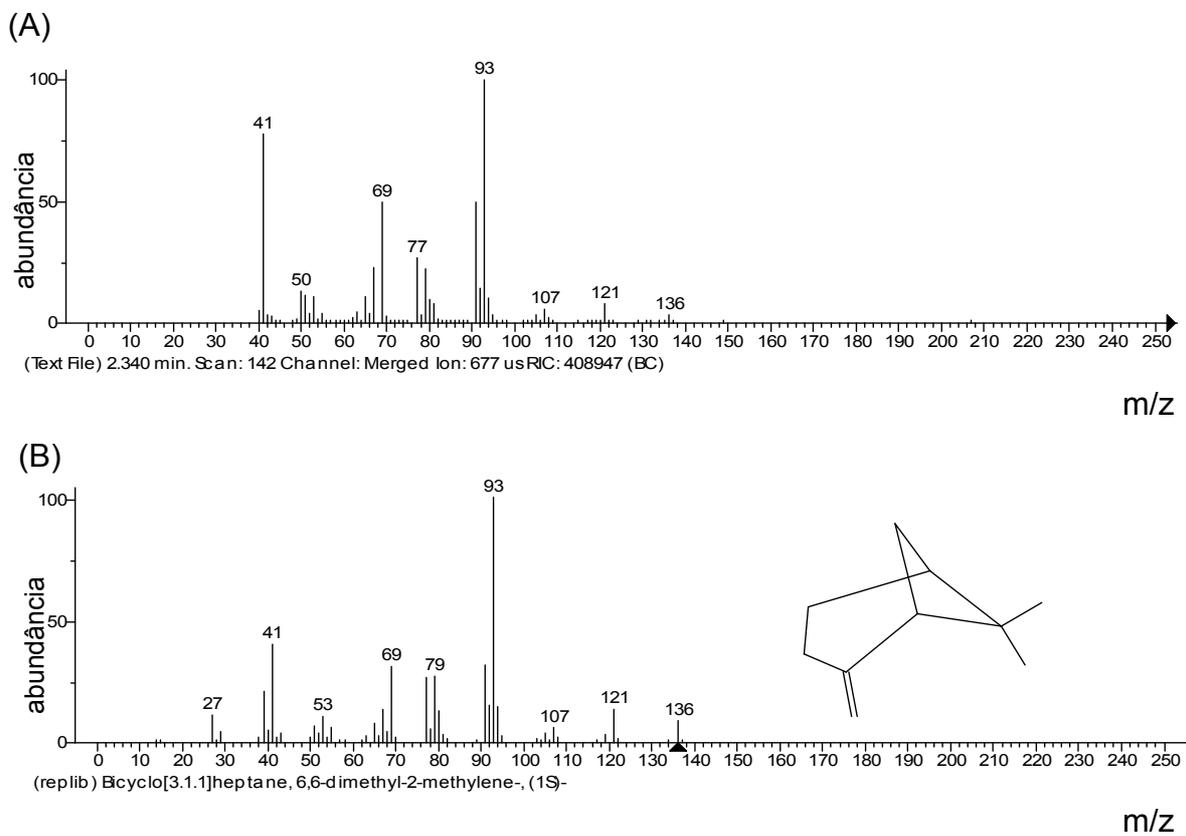


Figura 3.6. Espectros de massas de (A) composto do pico 2 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

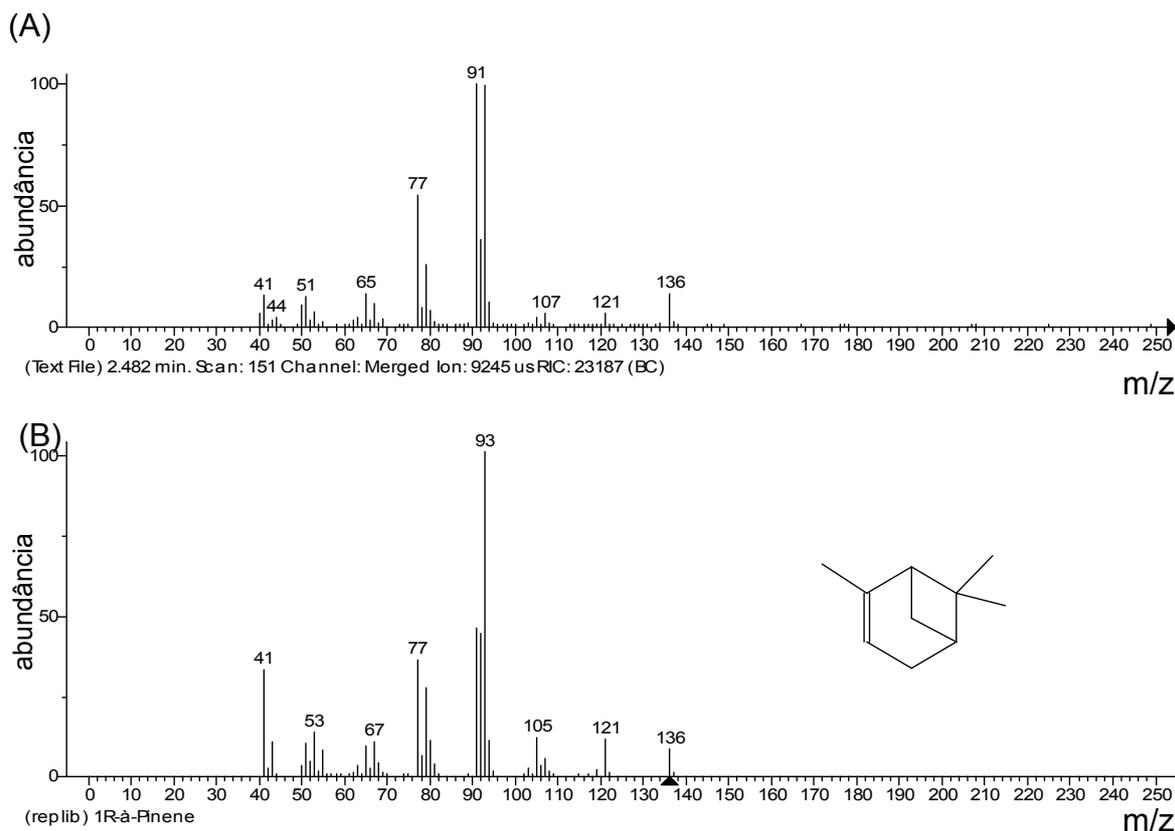


Figura 3.7. Espectros de massas de (A) composto do pico 3 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

Os espectros de massas referentes às figuras 3.6(A) e 3.7(A) indicam, com base na literatura (ADAMS, 1995) e na espectroteca NIST02, a presença no óleo essencial dos compostos β -pineno e α -pineno, respectivamente.

Os picos dos íons moleculares apresentam $m/z=136$, confirmando as fórmulas $C_{10}H_{16}$ para ambos. Os picos de $m/z=93$ para o β -pineno e para o α -pineno são provavelmente produzidos por uma estrutura de fórmula $C_7H_9^+$ formada por isomerização, seguida por clivagem alílica (SILVERSTEIN, 2000).

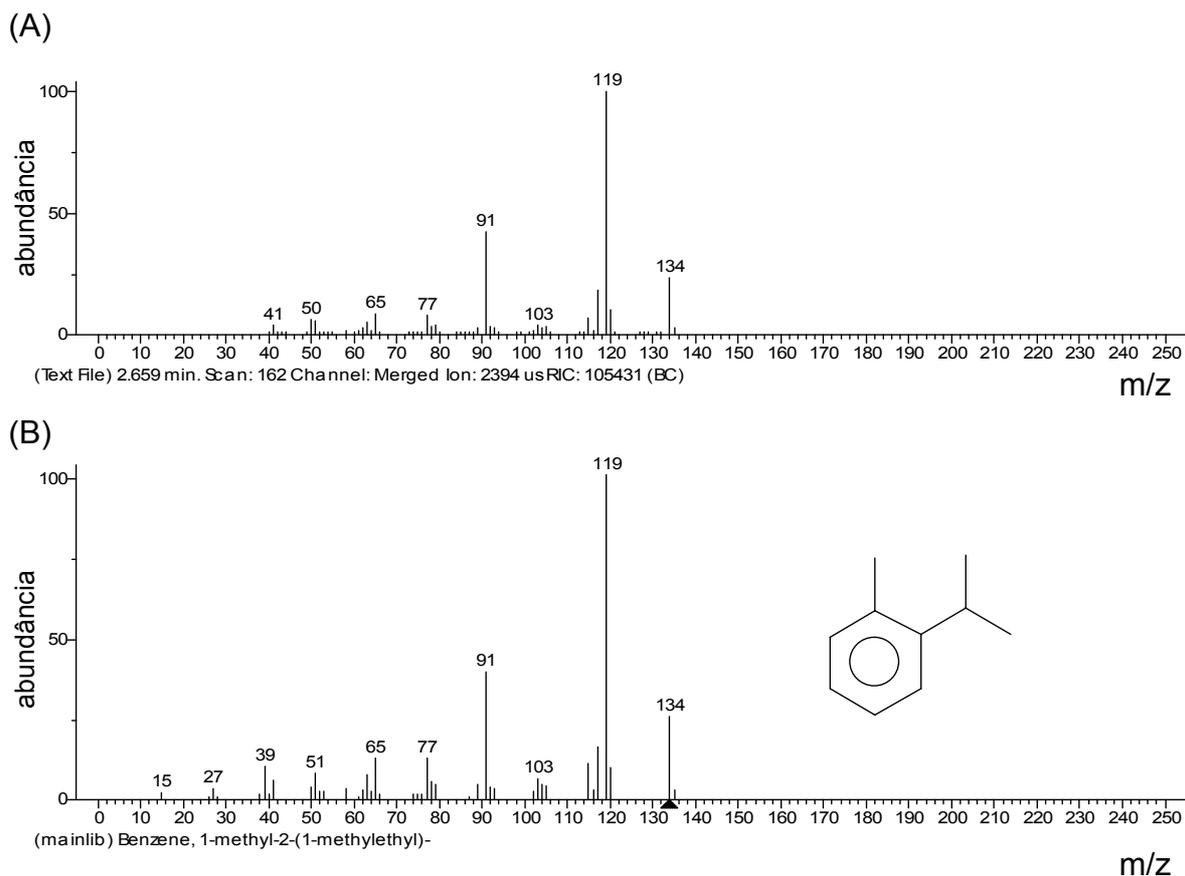


Figura 3.8. Espectros de massas de (A) composto do pico 4 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro de massas da figura 3.8(A), identificado como o-cimeno, apresenta o pico do íon molecular com $m/z=134$, com fórmula $C_{10}H_{14}$, de baixa intensidade, característico de compostos aromáticos.

O pico de maior intensidade com $m/z=119$ [M-15] é proveniente da perda de um grupo metila. O pico com $m/z=91$ (44%) é característico do cátion tropílio ($C_7H_7^+$) e o pico de $m/z=65$ (9%) é resultante da eliminação neutra de acetileno (C_2H_2) do íon tropílio.

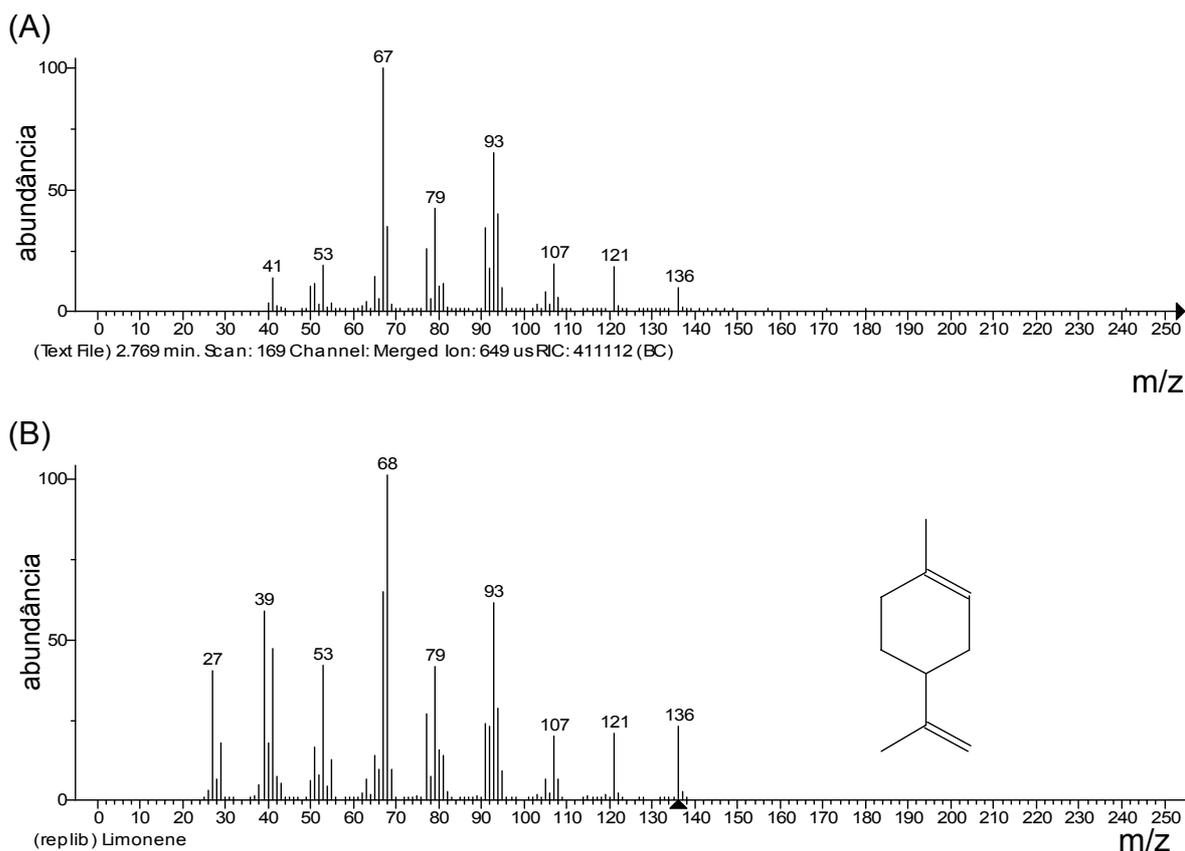


Figura 3.9. Espectros de massas de (A) composto do pico 5 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro da figura 3.9(A) indica a presença do limoneno no óleo essencial da *Pimenta dioica*. O pico do íon molecular apresenta $m/z=136$ (13%), o que evidencia a fórmula $C_{10}H_{16}$.

O pico com $m/z=121$ [M-15] (19%), confirma a presença de um grupo metila como ramificação. O pico $m/z=93$ (66%) é provavelmente produzido por uma estrutura de fórmula $C_7H_9^+$. Alquenos cíclicos, como é o caso do limoneno, apresentam um modo especial de quebra, semelhante a uma reação *retro*-Diels-Alder com $m/z=68$ (38%) (Figura 3.10) (SILVERSTEIN, 2000).

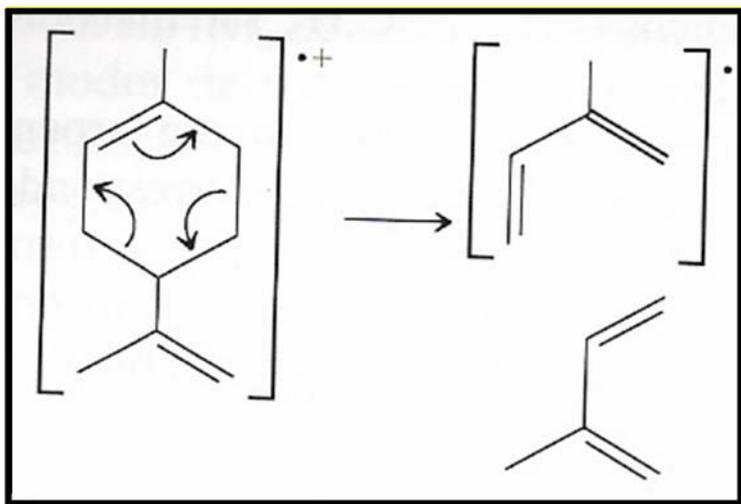


Figura 3.10. Fragmentação tipo reação *retro*-Diels-Alder do Limoneno.

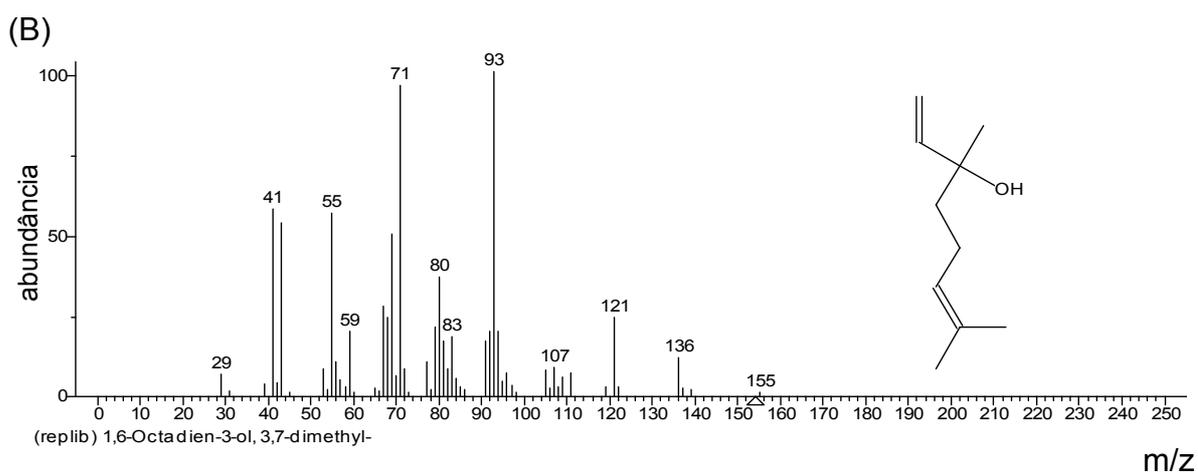
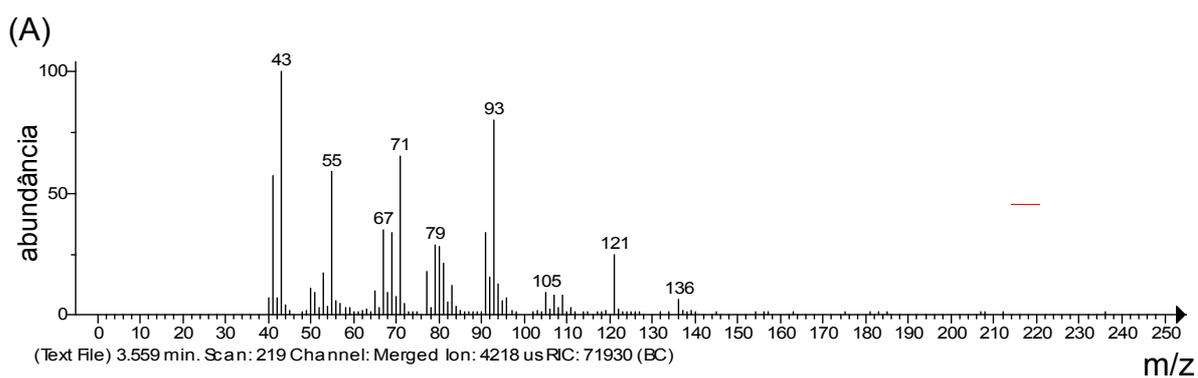


Figura 3.11. Espectros de massas de (A) composto do pico 6 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro da figura 3.11(A) foi relacionado ao linalol, com pico do íon molecular $m/z=154$, confirmado como $C_{10}H_{18}O$ a sua fórmula molecular, de baixa intensidade, característico da álcoois terciários. Os picos $m/z = 136$ [M-18] (9%) e $m/z = 121$ [M-18-15] (25%) são característicos da perda de água e do grupo metila, respectivamente.

Para álcoois terciários, ocorre freqüentemente a quebra de ligação C-C vizinha do átomo de oxigênio, com eliminação do maior grupo, o que fica evidenciado no pico de $m/z=71$ ($H_2C=CH-COH^+-CH_3$) e pelo pico de $m/z=83$. O pico com $m/z=93$ (78%) é devido a eliminação de água [M-18] e do grupo $C_3H_8^+$ [M-44] (SILVERSTEIN, 2000).

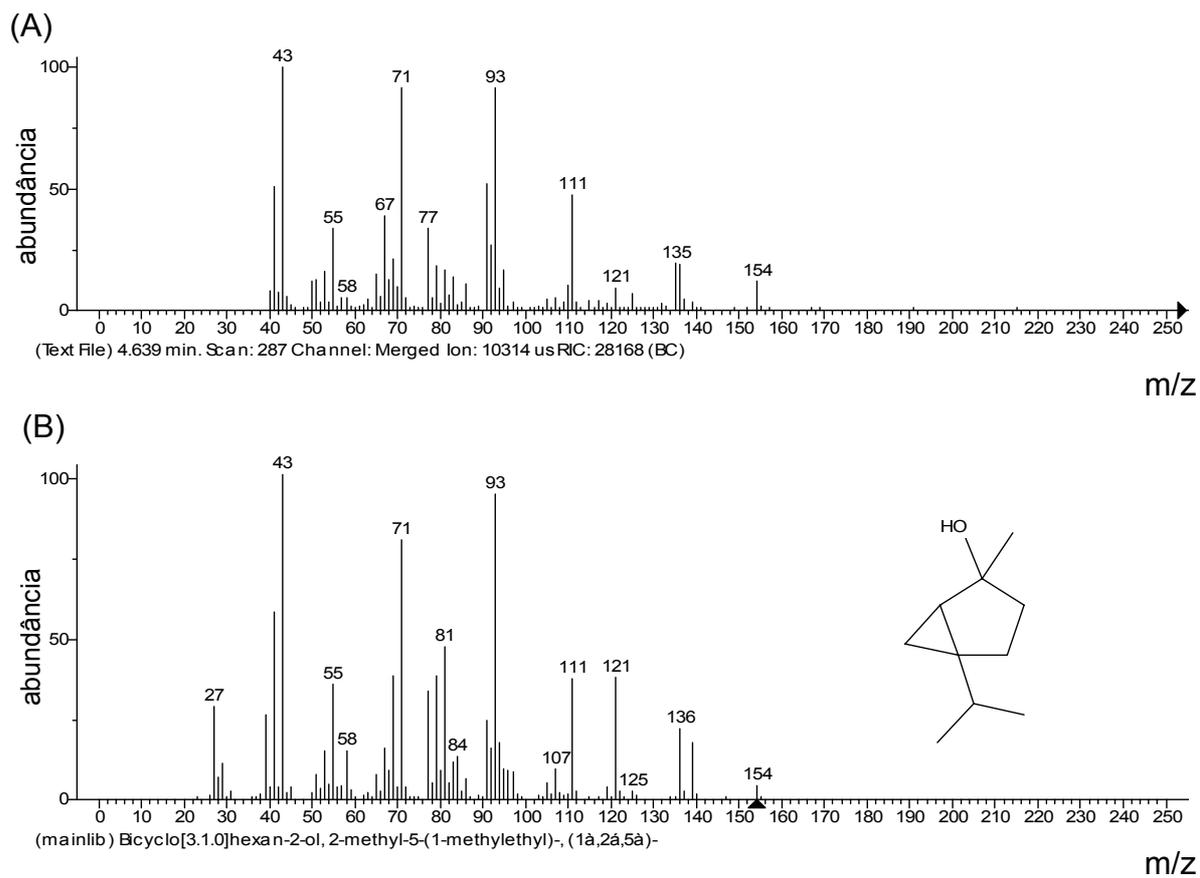


Figura 3.12. Espectros de massas de (A) composto do pico 7 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

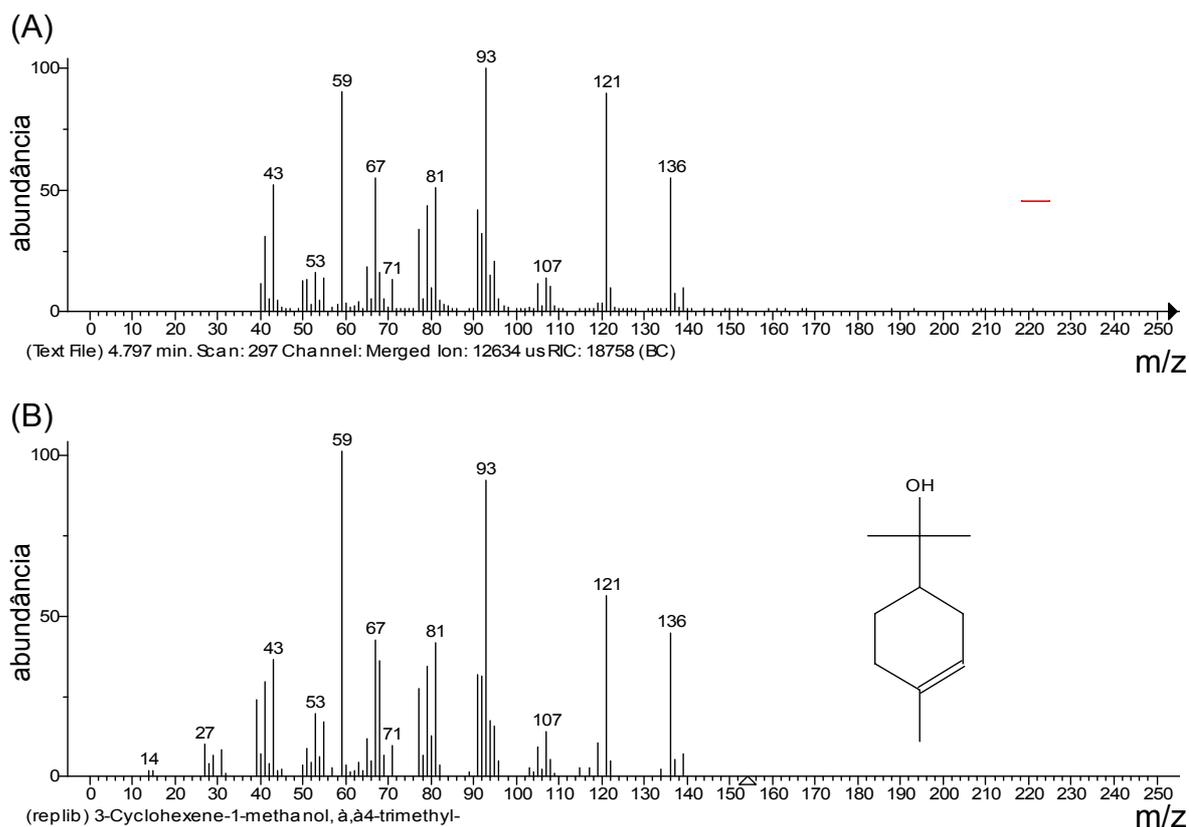


Figura 3.13. Espectros de massas de (A) composto do pico 8 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

As figuras 3.12(A) e 3.13(A) referem-se, segundo a espectroteca NIST02 e a (ADAMS, 1995), a álcoois terciários cíclicos, com picos de m/z iguais a 43, 71 e 93, característicos dessa classe de compostos.

Os compostos dos picos 7 e 8 são, respectivamente, o cis-hidrato de sabineno e α -terpineol.

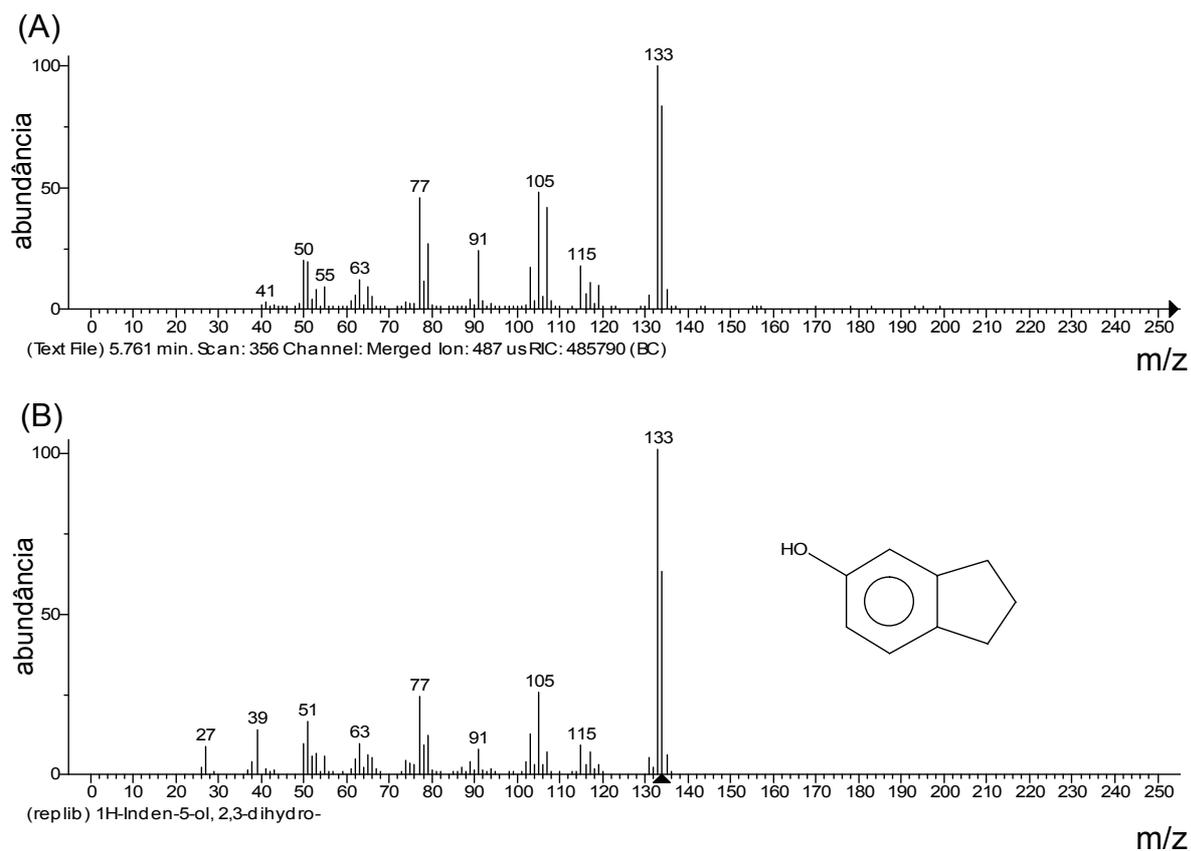


Figura 3.14. Espectros de massas de (A) composto do pico 9 do cromatograma da Figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

A Figura 3.14(A) refere-se ao espectro de massas do 5-indanol. O pico do íon molecular apresenta $m/z=134$ (84%), com pico base de $m/z=133$ [M-1], característico de fenóis substituídos. Um pico de $C_6H_5^+$ em $m/z=77$ (47%) é usualmente encontrado em fenóis (SILVERSTEIN, 2000).

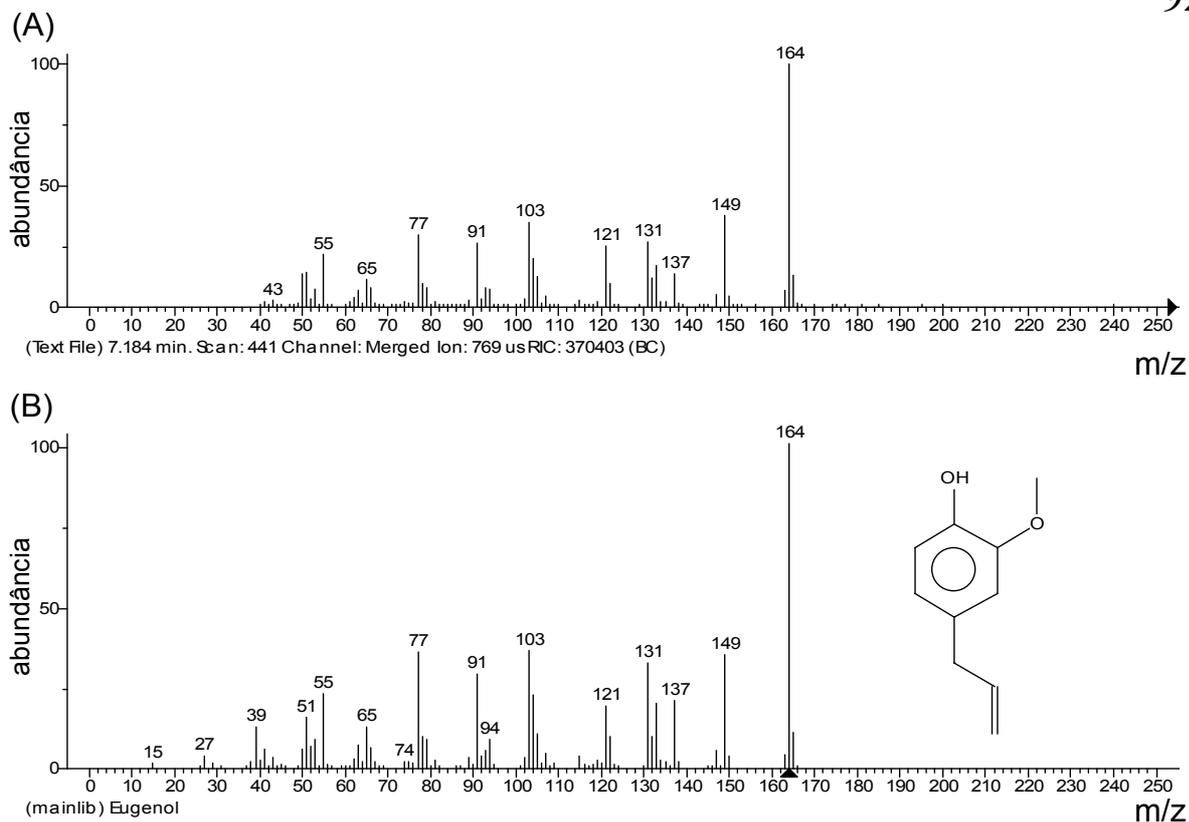


Figura 3.15. Espectros de massas de (A) composto do pico 10 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

A identificação do eugenol por espectrometria de massas, figura 3.15(A), pode ser confirmada pelo arquivo da espectroteca NIST02 e por dados constantes na literatura (ADAMS, 1995).

O espectro de massas apresenta o pico do íon molecular $m/z = 164 [M^+]$, confirmando como $C_{10}H_{12}O_2$ a fórmula do eugenol. Para fenóis, é comum o pico do íon molecular ser também o pico base, como é o caso do eugenol.

O pico $m/z = 149 [M-15]$ (38%) é característico da perda do radical metila ($CH_3\cdot$) e o pico $m/z = 77$ (26%) é característico do íon ($C_6H_5^+$).

Os principais fragmentos apresentados no espectro de massas são 164 (100); 149 (39); 131 (29); 103 (38) e 55 (23), característicos de fenóis e, com base na literatura, picos condizentes com o espectro do eugenol.

Comparando os resultados obtidos pelas quebras e intensidades dos fragmentos do espectro de massas do padrão do eugenol, com o espectro de massas do óleo, foi possível identificar positivamente o eugenol como sendo o principal componente do óleo essencial da pimenta da Jamaica.

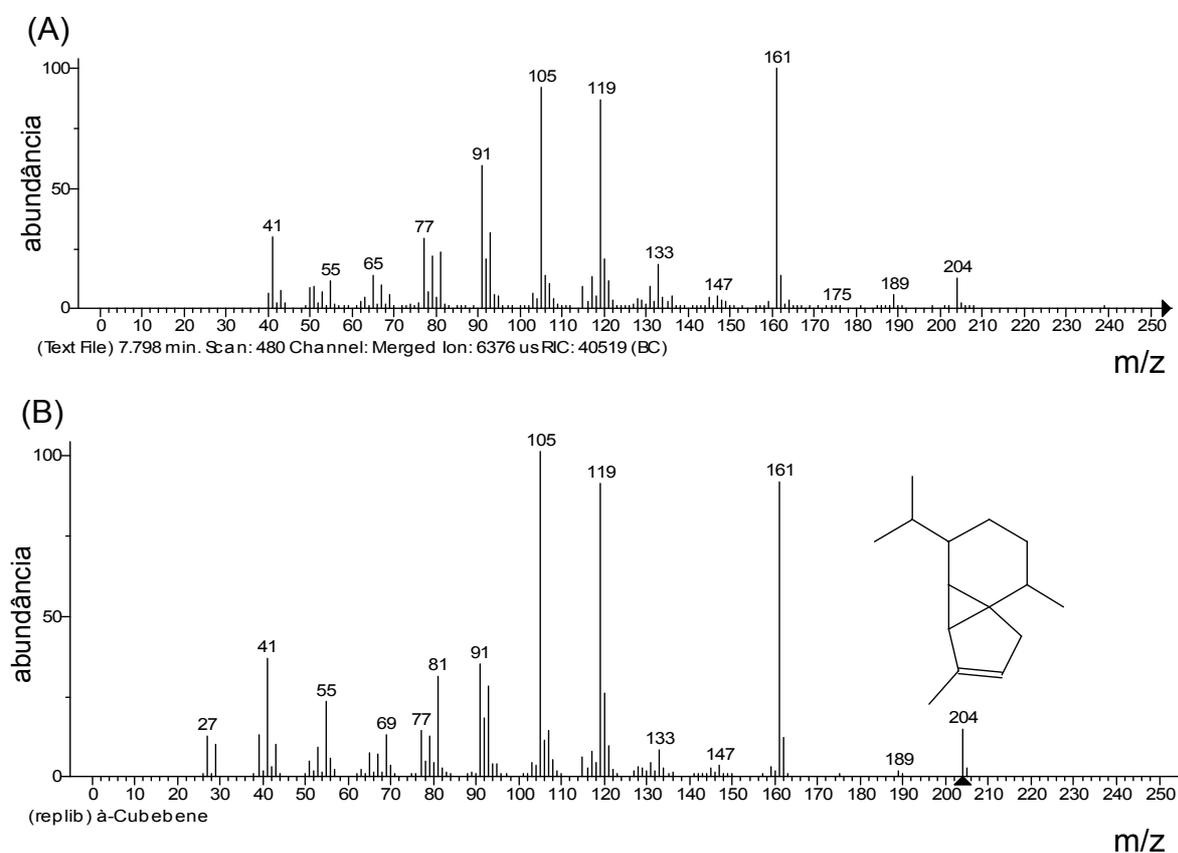


Figura 3.16. Espectros de massas de (A) composto do pico 11 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

O espectro de massas da figura 3.16(A) indica, com base na literatura (ADAMS, 1995) e na espectroteca NIST02, a presença do α -cubebeno no óleo essencial da *Pimenta dioica*.

O pico do íon molecular com $m/z=204$ confirma a fórmula $C_{15}H_{24}$, com seus principais fragmentos em m/z iguais a 161 (100), 119 (87), 105 (91), 91 (59), 77 (28) e 41 (28), condizentes com o espectro de massas do composto α -cubebeno.

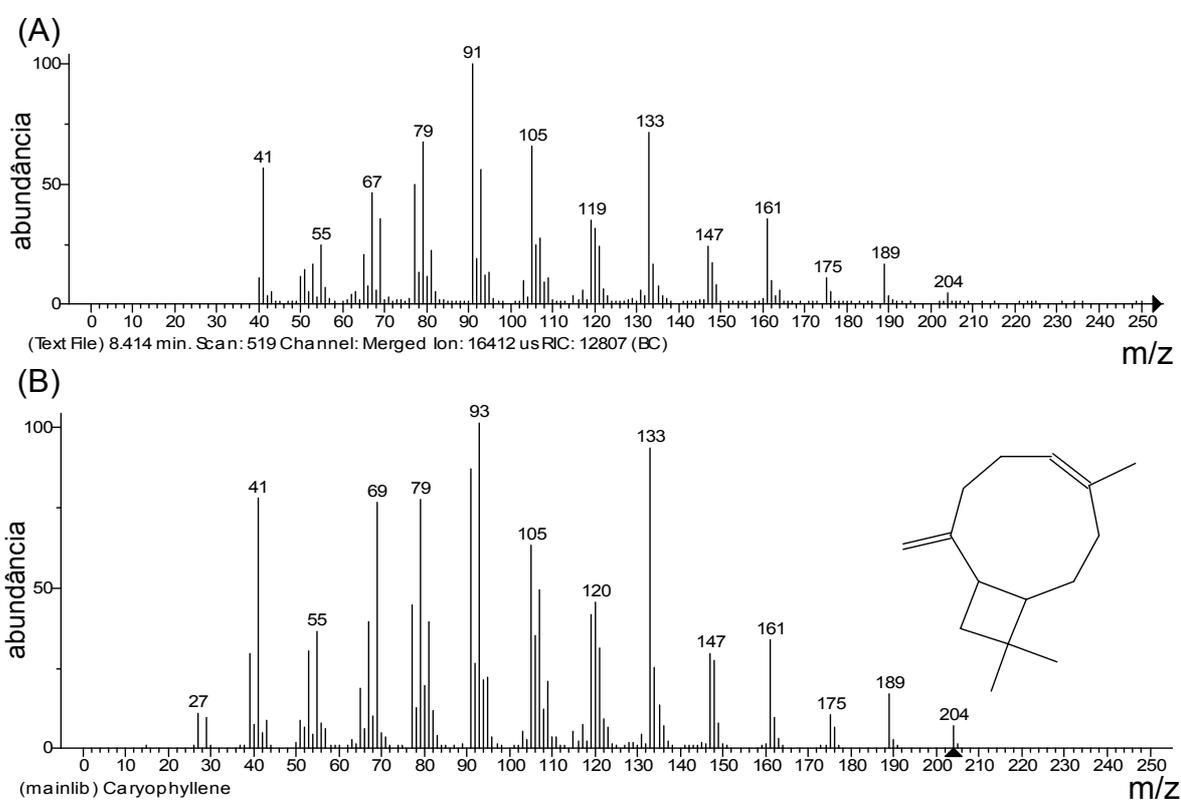


Figura 3.17. Espectros de massas de (A) composto do pico 12 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

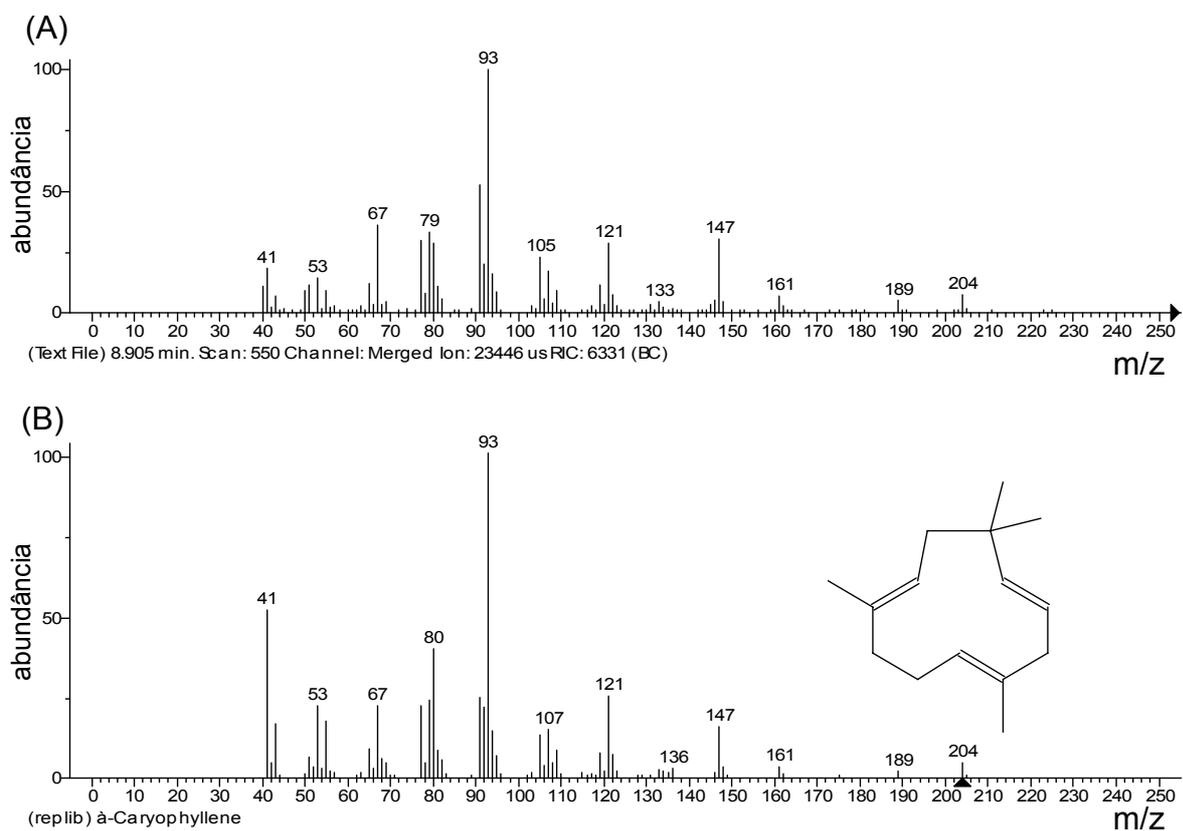


Figura 3.18. Espectros de massas de (A) composto do pico 13 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

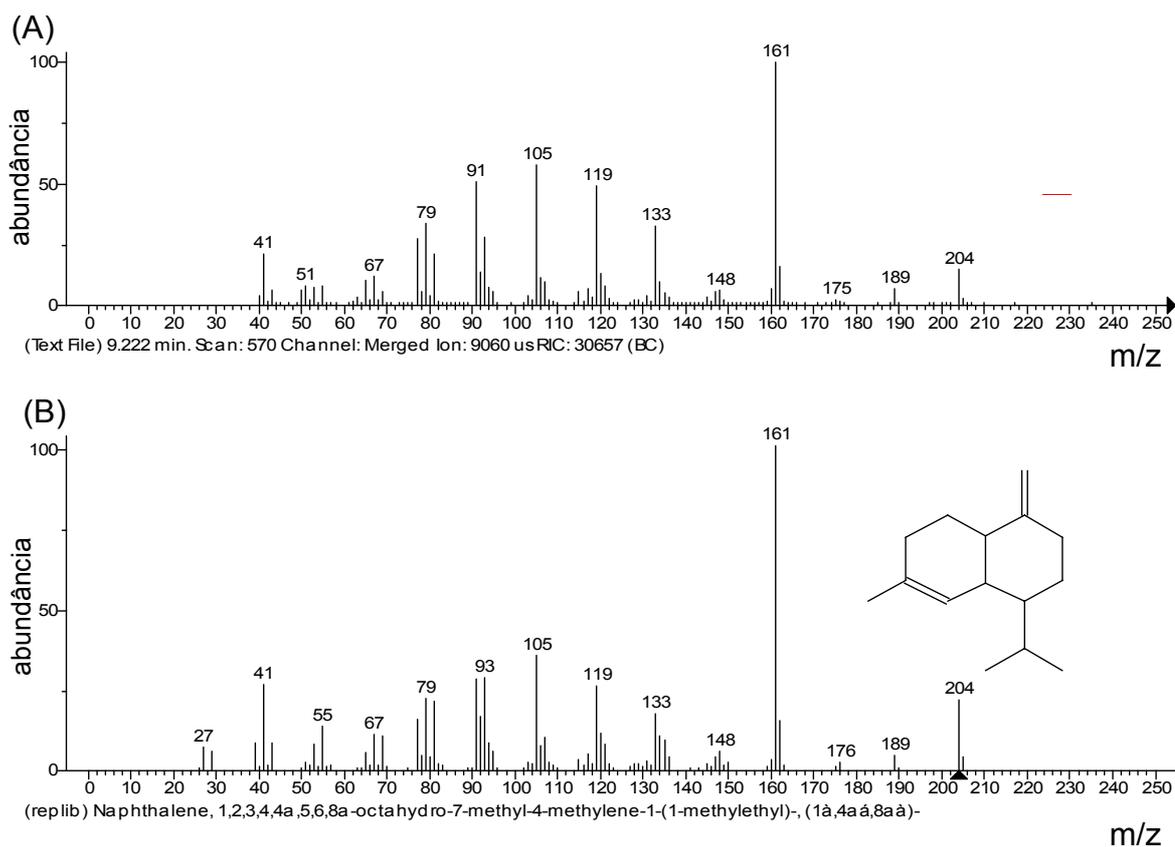


Figura 3.19. Espectros de massas de (A) composto do pico 14 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

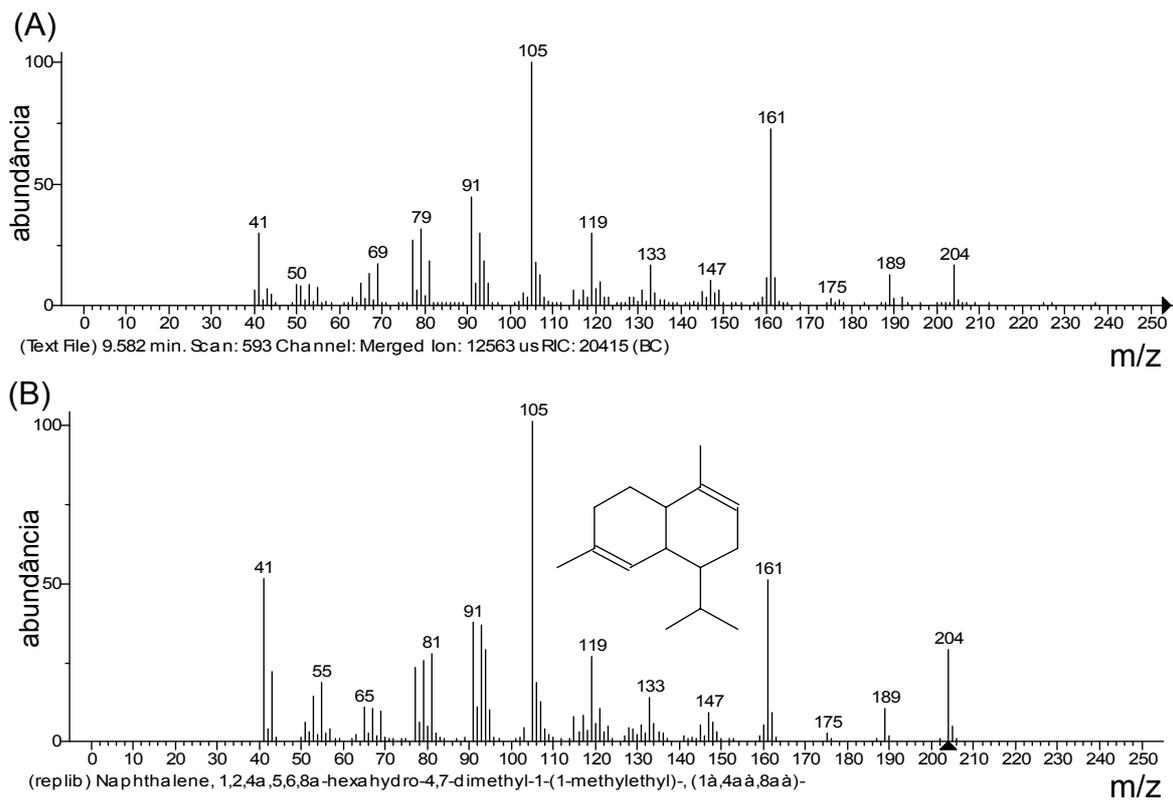


Figura 3.20. Espectros de massas de (A) composto do pico 15 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

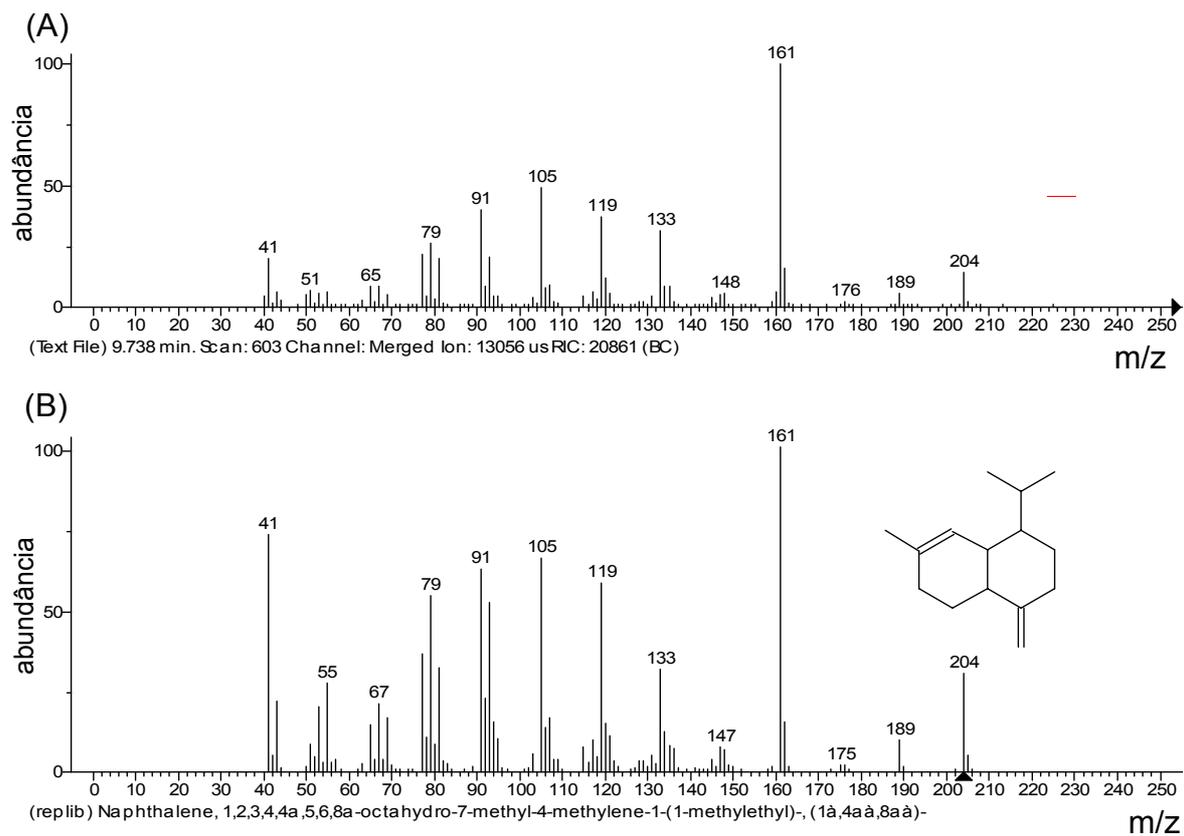


Figura 3.21. Espectros de massas de (A) composto do pico 16 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

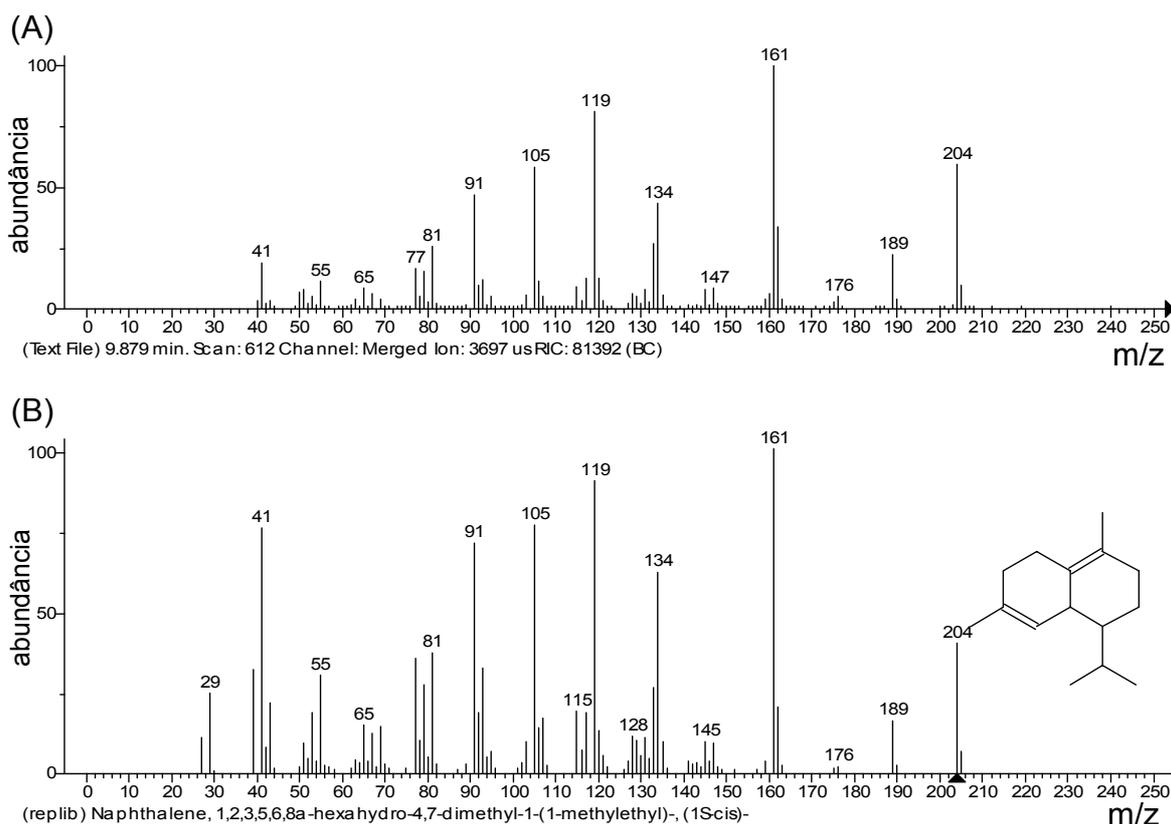


Figura 3.22. Espectros de massas de (A) composto do pico 17 do cromatograma da figura 3.4 e (B) propostas de identificação através da espectroteca NIST02.

Os espectros de massas das figuras 3.17(A) a 3.22(A) referem-se aos componentes minoritários do óleo essencial da *Pimenta dioica* com baixos teores, conforme dados da tabela 3.

A identificação destes compostos foi possível pela espectroteca NIST02, confirmada por dados da literatura (ADAMS, 1995).

Os compostos foram identificados, respectivamente, como o cariofileno, α -cariofileno, γ -muroлено, α -candineno, α -muroлено e δ -candineno.

3.4. Análise Térmica do Óleo Essencial

3.4.1. Análise termogravimétrica

A curva termogravimétrica do óleo essencial da *Pimenta dioica* L. pelo método isotérmico mostrou que a perda de massa da amostra a cada hora foi de aproximadamente 25%, com uma variação de temperatura de 24,5 a 40°C, e que após dez horas de exposição a uma temperatura em torno de 40°C, a perda de massa foi de aproximadamente 47% (figura 3.23). Isto se deve, possivelmente, à volatilização de alguns componentes do óleo essencial.

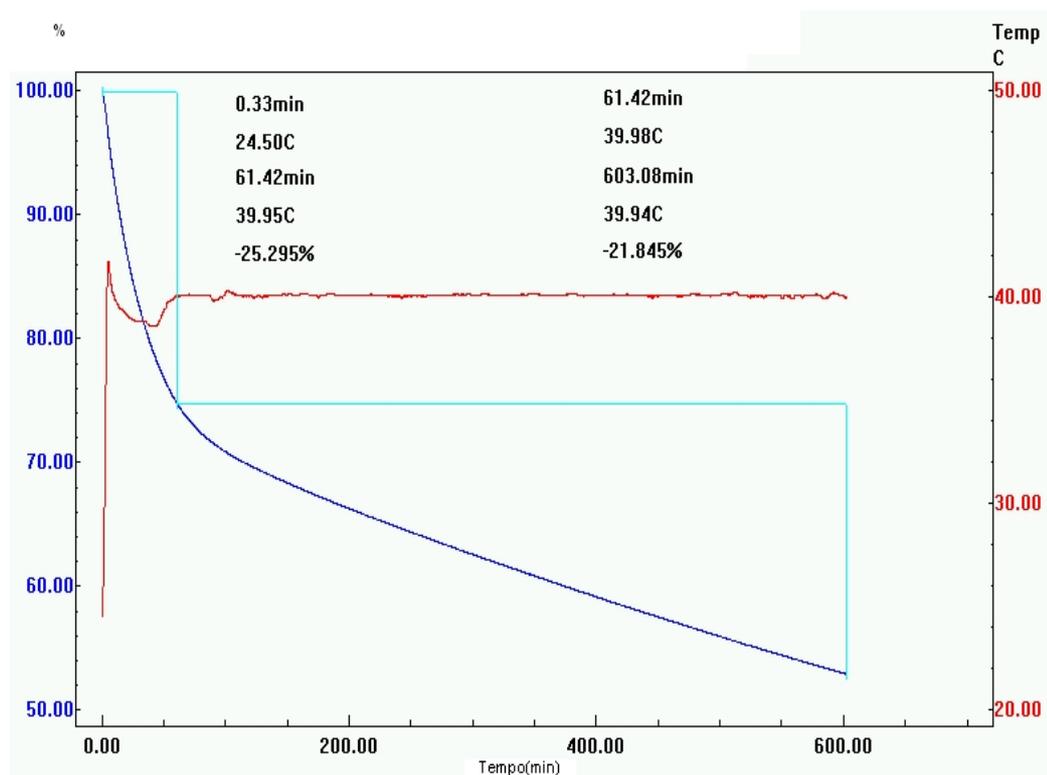


Figura 3.23: Curva TG isotérmica do óleo essencial da *Pimenta dioica* L.

O estudo da curva TG pelo método isotérmico do óleo essencial da *Pimenta dioica* L. mostrou-se importante quando se utiliza essências odoríferas como atrativo de abelhas, pois os resultados indicam o percentual de perda de massa da essência em função do tempo. Isso possibilita a reposição adequada da quantidade da substância, ou mistura, em estudo. Como a cada hora havia perda de massa de 25%, somente era repostado 0,25 mL do óleo essencial, pois era usado inicialmente apenas 1 mL da amostra. Este dado é relevante, pois atualmente a reposição da essência é feita de forma aleatória. Portanto, os dados obtidos no trabalho são inéditos e promissores para futuros estudos.

3.4.2. Calorimetria Exploratória Diferencial

A curva DSC obtida com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e 6,9 mg de amostra para o padrão de eugenol em cadinho de Al sem furo apresentou um único pico endotérmico, com temperatura de pico de 257,93 °C e entalpia de 319,4 J/g atribuída à volatilização e/ou decomposição do eugenol (figura 3.24).

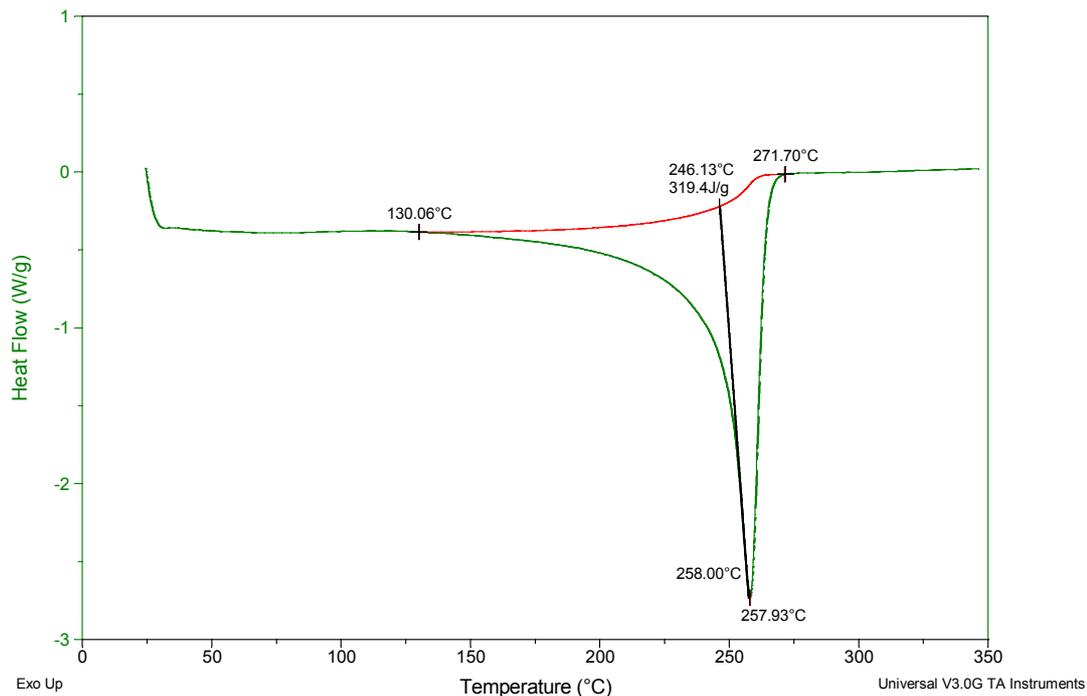


Figura 3.24: Curva DSC para padrão de eugenol em porta amostra de Al sem furo.

Já a curva DSC obtida com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e 6,84 mg de amostra para o óleo essencial da *Pimenta dioica* em cadinho de Al sem furo apresentou duas transições endotérmicas, a primeira com temperatura de pico de $108,54\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entalpia de $9,53\text{ J/g}$, e a segunda com temperatura de pico de $256,22\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entalpia de $218,7\text{ J/g}$, atribuída à volatilização do óleo essencial (figura 3.25).

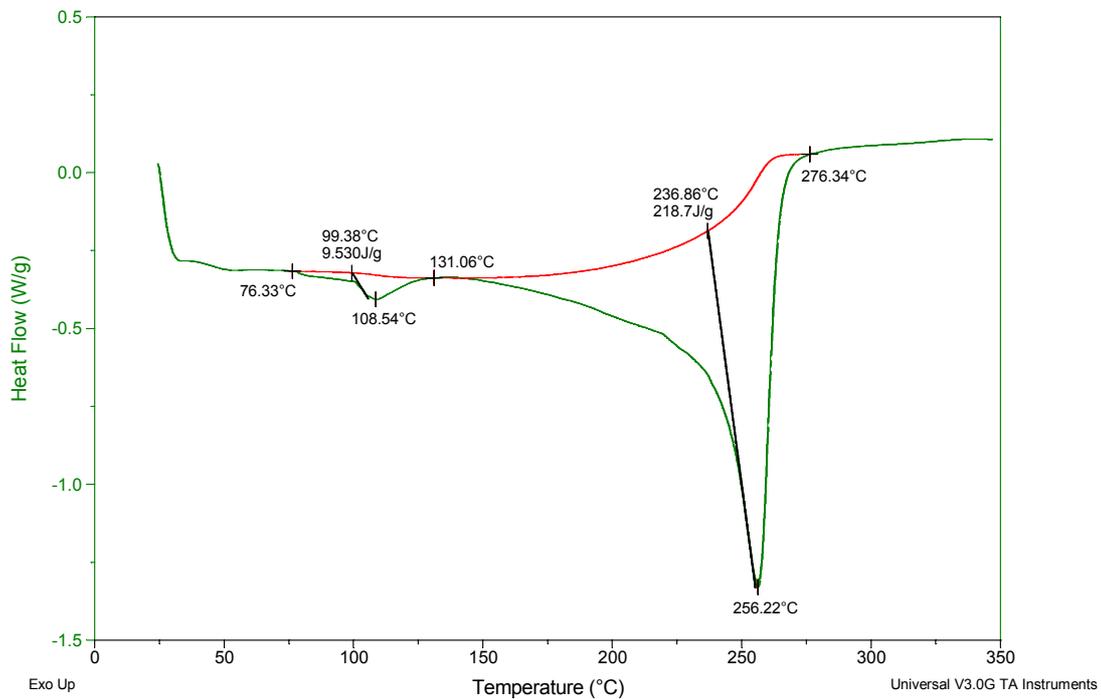


Figura 3.25: Curva DSC para o óleo essencial da *Pimenta dioica* em porta amostra de Al sem furo.

Já a curva DSC obtida com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e 6,00 mg de amostra para o eugenol puro em cadinho de Al com furo apresentou uma transição endotérmica com temperatura de pico de $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entalpia de $328,7\text{ J/g}$ (Figura 3.26).

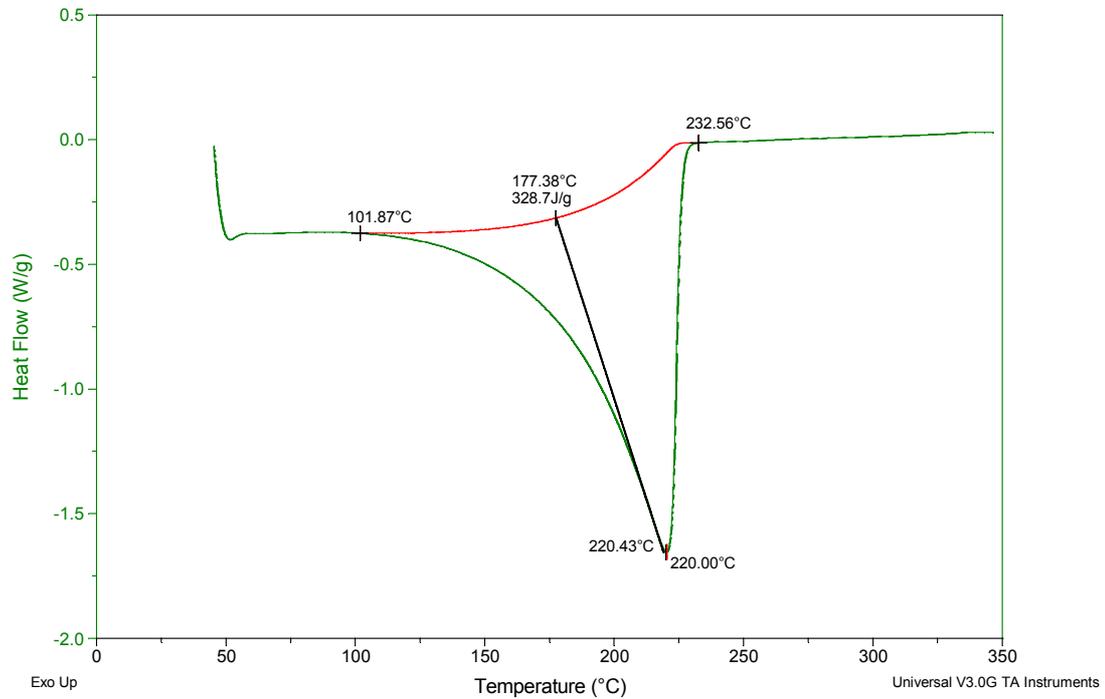


Figura 3.26: Curva DSC para padrão de eugenol em porta amostra de Al com furo.

As curva DSC obtida com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e 6,52 mg de amostra para o óleo essencial da *Pimenta dioica* em cadinho de Al com furo apresentaram duas transições endotérmicas, a primeira com temperatura de pico de $181,06\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entalpia de $174,1\text{ J/g}$, e a segunda com temperatura de pico de $222,04\text{ }^{\circ}\text{C}$ e entalpia de $12,78\text{ J/g}$, atribuída à volatilização do óleo essencial (figura 3.27).

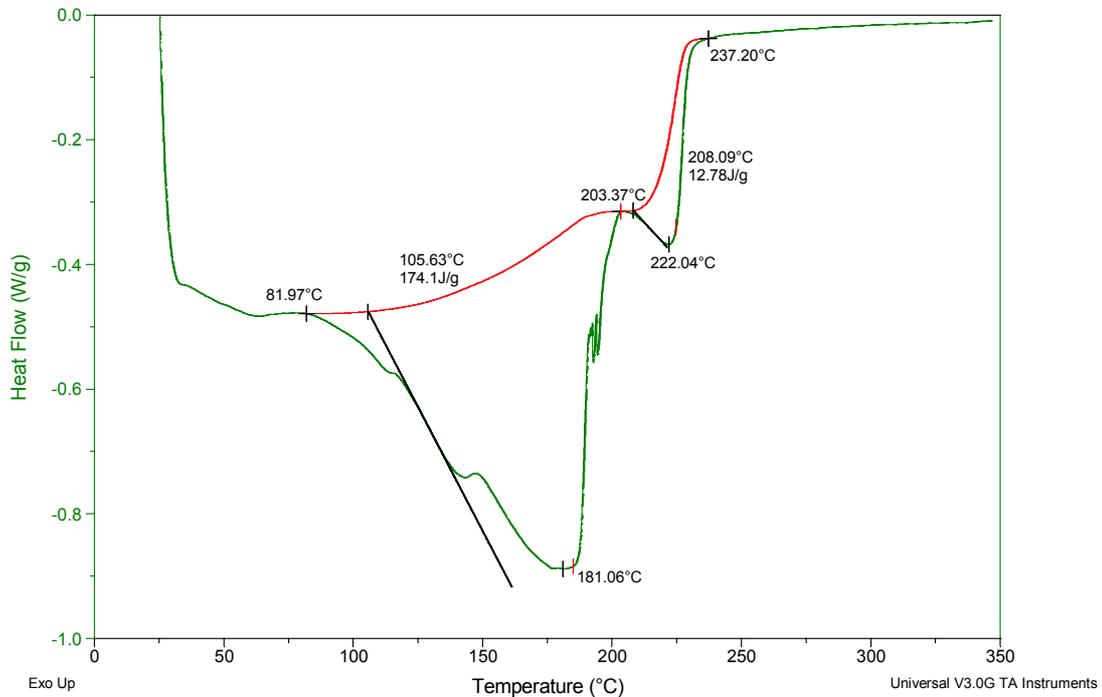


Figura 3.27: Curva DSC para o óleo essencial da *Pimenta dioica* em porta amostra de Al com furo.

Fica evidente que os melhores resultados foram aqueles onde as amostras foram acondicionadas em cadinhos de Al sem furos, mesmo levando-se em consideração que o número de transições foi o mesmo tanto para o padrão de eugenol quanto para o óleo essencial da *Pimenta dioica*. A melhor definição das curvas de DSC usando-se o porta amostra de Al sem furo pode ser atribuída à alta volatilidade dos óleos essenciais em geral. Portanto, para futuras análises, os resultados apontam para o uso desse tipo de porta amostra.

A alta correlação entre os valores da temperatura do óleo essencial da *Pimenta dioica* e do padrão de eugenol podem ser justificados pelo fato de o eugenol ser o componente majoritário no óleo. Além disso, a temperatura atribuída à temperatura de ebulição do óleo essencial (256,22 °C) aproxima-se bastante do encontrado na literatura, que é de 255 °C (MERK, 1996).

As curvas DSC também demonstraram que não há evidência de decomposição do eugenol e que também é clara a ausência de água de hidratação. Porém, as curvas DSC para o óleo essencial mostram que uma transição endotérmica em torno de 100 °C, pode evidenciar que o óleo essencial apresenta água de hidratação. Os resultados obtidos podem ser considerados inéditos, pois a literatura não apresenta trabalhos referentes à análise deste composto por DSC. Observa-se que o perfil das curvas da figura 3.24 aproxima-se do perfil da curva da figura 3.25. Pelos valores da quantificação do eugenol na TABELA 3.3, item 3.3.3, é possível concluir, pelo perfil das curvas, que quanto maior a concentração de eugenol no óleo essencial melhor resolvido fica o pico endotérmico, além de aproximar da temperatura de ebulição do padrão de eugenol. Isto abre a possibilidade para a determinação quantitativa do eugenol em função da temperatura de ebulição e até mesmo pela entalpia envolvida no sistema, pois novamente aqui a variação é no sentido da variação de eugenol no óleo. As diferenças entre os pontos de ebulição e entre as entalpias podem ser, então, justificadas pela existência de outros componentes e suas respectivas concentrações no óleo essencial.

Sendo esta uma técnica totalmente nova e eficiente para a determinação de temperaturas de ebulição de óleos essenciais, novos estudos podem ser feitos no sentido de viabilizá-la para a investigação científica de óleos essenciais. Os dados obtidos também podem ser usados para a certificação de óleos essenciais, tendo em vista que muitos óleos de alto valor econômico são freqüentemente adulterados.

3.5 Coletas de abelhas *Euglossina*

Foram coletados 216 indivíduos pertencentes a seis espécies nas três iscas odores. O EG1 (Eugenol, 2005-2006) atraiu o maior número de indivíduos, mas a riqueza de espécies foi igual ao EG (Eugenol, 2006-2007). Por outro lado, o OL (óleo essencial) atraiu menor número de espécies e de indivíduos (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Abelhas Euglossina coletadas no eugenol (EG) e no óleo essencial (OL) de agosto de 2006 a junho de 2007, e no eugenol (EG1) de agosto de 2005 a junho de 2006 em área de restinga do nordeste do Maranhão, Brasil.

Espécies	Odor	Meses						Total	%
		Período seco			Período chuvoso				
		Ago	Out	Dez	Fev	Abril	Jun		
<i>Eufriesea nigrescens</i> Friese (1899)	EG1			1		13	11	25	40
<i>Eufriesea ornata</i> Mocsary (1908)	EG1				2	8		10	16
<i>Eulaema cingulata</i> Fabricius (1804)	EG1	10	8	5			2	25	40
<i>Eulaema nigrita</i> Lepeletier (1841)	EG1		1					1	1,5
<i>Euglossa modestior</i> Dressler (1982)	EG1	1					1	2	3,2
Subtotal de indivíduos		11	9	6	2	21	14	63	100
Subtotal de espécies		2	2	2	1	2	3	5	-
<i>Eufriesea nigrescens</i> Friese (1899)	OL				3	32		35	81
<i>Eufriesea ornata</i> Mocsary (1908)	OL					3		3	6,9
<i>Eulaema cingulata</i> Fabricius (1804)	OL		1		2		2	5	12
Subtotal de indivíduos		0	1	0	5	35	2	43	100
Subtotal de espécies		0	1	0	2	2	1	3	-
<i>Eufriesea nigrescens</i> Friese (1899)	EG				17	70		87	79
<i>Eufriesea ornata</i> Mocsary (1908)	EG			1				1	0,9
<i>Eulaema cingulata</i> Fabricius (1804)	EG		3	2	2	9	1	17	15
<i>Eulaema nigrita</i> Lepeletier (1841)	EG		1	1				2	1,8
<i>Euglossa cordata</i> Linnaeus (1758)	EG		2				1	3	2,8
Subtotal de indivíduos		0	6	4	19	79	2	110	100
Subtotal de espécies		0	3	3	2	2	2	5	-
Total de indivíduos		11	16	10	26	135	18	216	-
Total de espécies		2	3	4	3	3	4	6	

A maioria dos indivíduos capturados nas três essências foi ativa no período chuvoso. Este resultado pode ter sido fortemente influenciado pelos indivíduos de *Eufriesea nigrescens*, que, além de ser uma espécie sazonal, compreendeu cerca de 80% dos indivíduos nas duas iscas.

Embora a média mensal do número de espécies e indivíduos tenha sido maior no EG que no OL, estas diferenças não foram significativas (para

média de espécies: $D = 0,50$; $p = 0,31$; para média de indivíduos: $D = 0,33$; $p = 0,80$) (Figura 3.28 1 e 2).

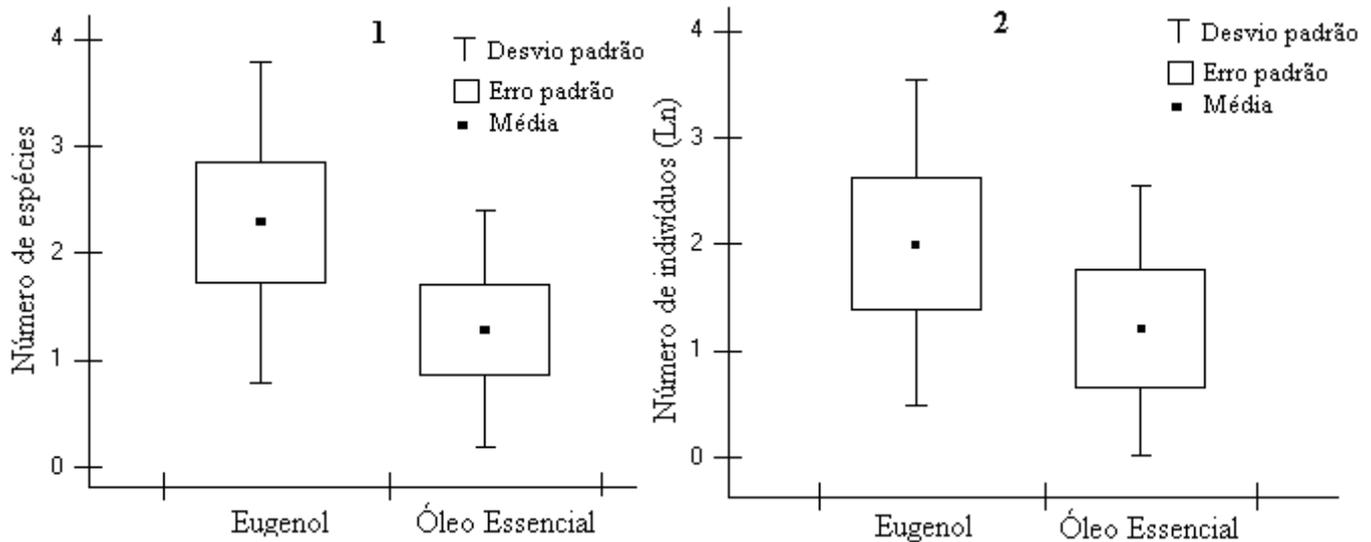


Figura 3.28. Média mensal do número de espécies (1) e de indivíduos (2) capturados no eugenol puro e no óleo essencial de eugenol, de agosto de 2006 a junho de 2007, no entorno do PNLM. Os valores em 2 estão transformados em logaritmo porque a variância no eugenol é quase nove vezes maior que a encontrada no óleo essencial, além do desvio padrão e a média serem proporcionais

Da mesma forma, quando foram consideradas apenas as espécies compartilhadas pelas duas essências, nenhuma diferença significativa foi encontrada no número de indivíduos de cada espécie de *Euglossina* capturados nas essências ($D = 0,33$; $p = 0,97$).

Estes resultados sugerem que o EG e OL apresentam igual probabilidade de atrair indivíduos de *Ef. nigrescens*, *El. cingulata* e *Ef. ornata*. Para medir a magnitude desta diferença foi utilizado o teste Risco Relativo (RR) para as duas primeiras espécies, que são as mais frequentes. Embora o resultado não tenha sido significativo, o valor de RR próximo da unidade sugere que o potencial de atração entre as duas iscas para estas espécies seja bastante similar ($RR = 0,95$; $p = 0,37$).

Entretanto, diferenças entre as essências tornaram-se evidentes quando as espécies coletadas no EG e no OL foram comparadas com as coletadas no EG1.

As três coletas apresentaram semelhança significativa tanto em relação ao número médio de espécies (Kruskal-Wallis $K = 4,28$; $p = 0,11$), quanto ao número médio de indivíduos amostrados a cada bimestre (Kruskal-Wallis $K = 2,97$; $p = 0,22$).

Entretanto, quando o número total de espécies é comparado através da curva de rarefação, observa-se que, se o número de indivíduos coletados no EG1 e no EG fosse igual ao coletado no OL (43 indivíduos), a riqueza de espécies ainda seria maior no EG1 e no EG (Figura 3.29).

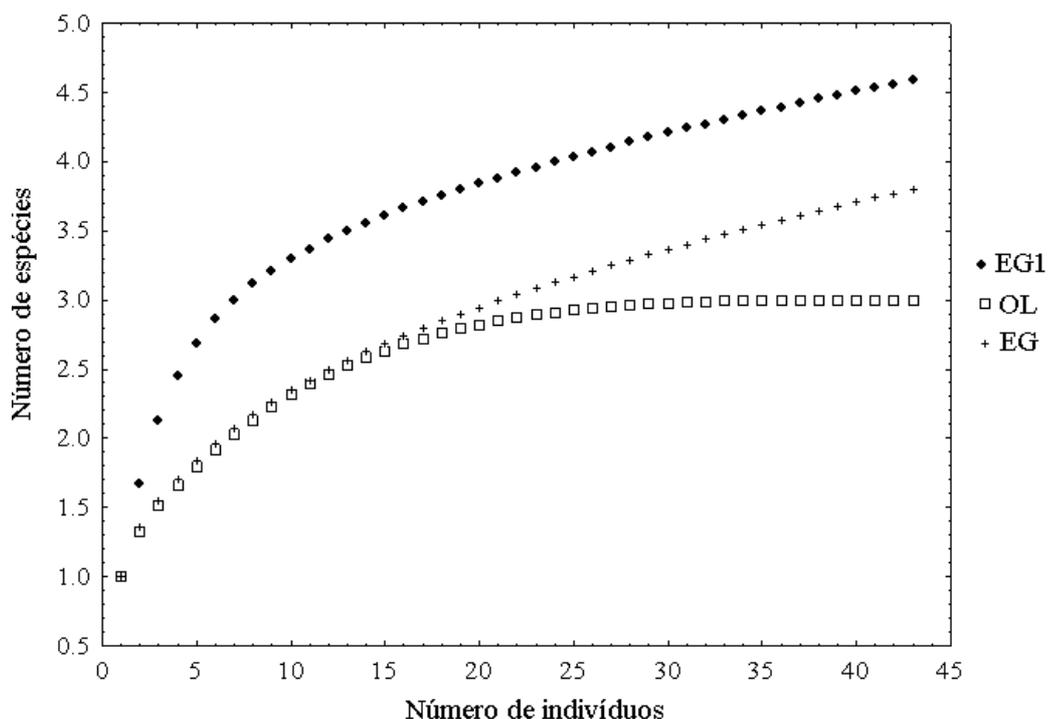


Figura 3.29. Curvas de rarefação do EG1 (eugenol estudado em 2005-2006), do EG (eugenol estudado em 2006-2007) e OL (óleo essencial, estudado em 2006-2007). Para um tamanho amostral de 43 indivíduos, a riqueza de espécies encontrada no OL foi 3, o número estimado de espécies no EG1 é 4,5 (desvio padrão: 0,54) e no EG é de 3,8 (desvio padrão: 0,79).

Além disso, quando a composição de espécies é comparada entre as três amostragens através do índice de similaridade de Jaccard, que não leva em consideração a abundância relativa, o resultado mostra uma evidência de que o OL apresenta uma especificidade diferenciada em relação ao EG e EG1 (Figura 3.30 A).

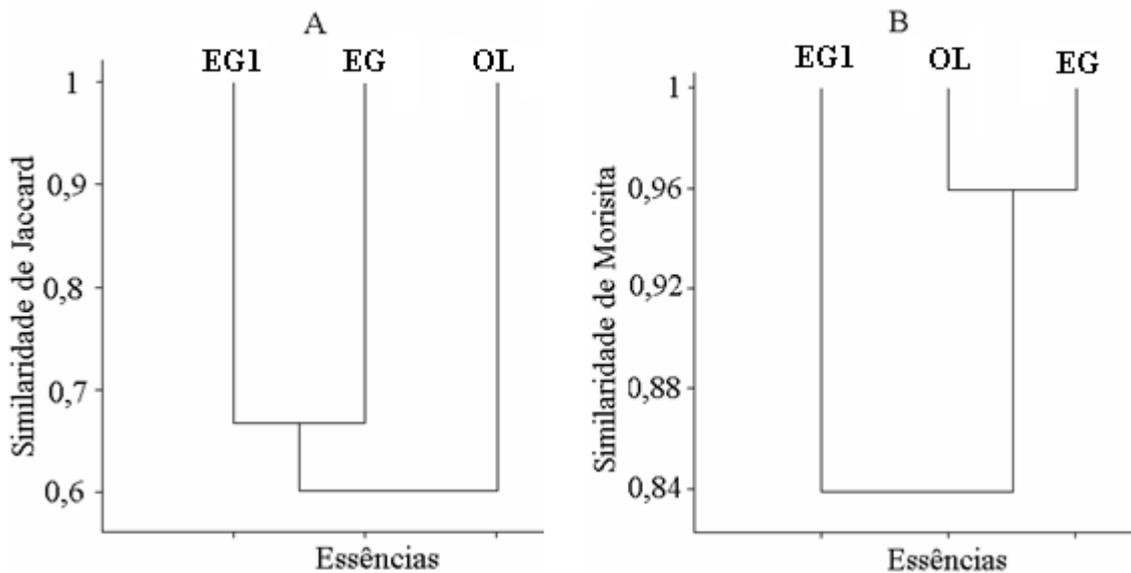


Figura 3.30. Similaridade faunística de abelhas Euglossina coletadas no eugenol puro e no óleo essencial de eugenol, no PNLN, Maranhão, Brasil, calculada através do índice de Jaccard (A) e de Morisita (B). EG1 = eugenol puro estudado de 2005 a 2006; EG = eugenol puro estudado de 2006 a 2007; ÓL = óleo essencial de eugenol.

Por outro lado, quando a abundância de indivíduos é considerada, o índice de similaridade de Morisita mostra maior semelhança na atratividade do EG e OL (Figura 3.30 B). Este resultado também foi reforçado pelo índice de similaridade Chao-Jaccard, onde o índice de Jaccard é modificado para dados de abundância (Tabela 3.5).

A estimativa da riqueza de espécies mostrou que pelo menos uma espécie poderia ser encontrada no EG1 em um esforço amostral adicional. A estimativa para EG e OL, bem como a estimativa da riqueza de espécies

compartilhada pelas essências não apresentaram resultados diferentes do observado (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Estimativa da riqueza de espécies de abelhas Euglossina através do Estimador de Cobertura baseado na Abundância (ACE), de espécies compartilhadas através do estimador Chao1 e similaridade de Jaccard baseado na abundância (Chao-Jaccard) entre as essências EG1 (eugenol estudado em 2005-2006), EG (eugenol estudado em 2006-2007) e o óleo essencial; S_{obs} – riqueza de espécies observada; S_{comp} – riqueza de espécies compartilhada observada; IC (95%) – Intervalo de Confiança de 95%.

Amostra 1	S_{obs}	ACE	IC (95%)	Amostra 2	S_{comp} entre as amostras 1 e 2	Estimativa Chao1	Similaridade Chao-Jaccard
EG1	5	6,24	5,1; 19,4	OL	3	3	0,95
EG	5	5,6	5,1; 11,7	EG1	4	4	0,96
OL	3	3	3; 3	EG	3	3	0,98

De modo geral, foi observada uma notável semelhança na composição de espécies coletadas no EG1, EG e OL. As três espécies capturadas no OL também foram amostradas no EG1 e EG, e estas duas últimas amostras diferiram em apenas uma espécie. As três amostras foram constituídas principalmente por *Eufriesea nigrescens* e *Eulaema cingulata*. Este resultado é esperado, uma vez que eugenol é o principal componente do OL.

Várias investigações mostram a forte atração do eugenol para *Eulaema cingulata* (JANZEN, 1981; JANZEN *et al.*, 1982; WILLIAMS & DODSON, 1972; PEARSON & DRESSLER, 1985; MORATO *et al.*, 1992; BRITO & RÊGO, 2001; CARVALHO *et al.*, 2006). Por outro lado, em alguns ambientes, o eugenol parece ser pouco atrativo para *Eufriesea nigrescens* (CARVALHO *et al.*, 2006).

Estas observações sugerem que, além da composição química, outros fatores podem está relacionados à menor riqueza de espécies coletadas no óleo. Uma vez que a variação geográfica na atratividade das fragrâncias

pelas abelhas *Euglossina* é bastante comum (ACKERMAN, 1989), investigações sobre a atratividade deste óleo em outros ambientes poderiam ajudar a testar a hipótese da maior seletividade do óleo em relação ao eugenol.

A semelhança entre EG1 e EG indica uma reduzida variação anual na atratividade do eugenol, mas a menor riqueza encontrada no OL sugere uma interação do eugenol com as substâncias minoritárias e a resultante influência na atratividade.

Entretanto, a possível influência parece ter um papel mais seletivo que de redução da atratividade. O óleo essencial atraiu menos espécies, mas a abundância de cada espécie atraída não foi significativamente diferente da encontrada no eugenol puro, sugerindo que o óleo essencial tenha uma especificidade de atração mais refinada.

Resultados semelhantes foram obtidos por DODSON, (1969). Eles mostraram que a combinação de dois atraentes modifica a atração potencial da fragrância total, e frequentemente esta combinação não atrai algumas espécies que são atraídas a um dos atraentes na forma pura. Durante cinco dias, estes autores coletaram 433 indivíduos pertencentes a 43 espécies no 1,8-cineol, e 113 indivíduos pertencentes a 6 espécies no acetato de benzila. Quando eles misturaram uma parte de 1,8-cineol para 39 partes de acetato de benzila, coletaram 49 indivíduos pertencentes a 8 espécies. Da mesma forma, quando adicionaram α -pineno à mistura de 1,8-cineol e acetato de benzila, apenas seis indivíduos de duas espécies foram coletados.

ADAMS (1968) (*apud* HILLS *et al.*, 1972) também encontrou algumas substâncias que agem como modificadores da atratividade. Quando ele misturou α -pineno e β -pineno com acetato de benzila e cineol em uma proporção semelhante à encontrada na fragrância da orquídea *Stanhopea tricornis* Lindl., o polinizador específico (*Eulaema meriana*) desta espécie foi atraído.

A ação de alguns modificadores da atratividade pode ser através da propriedade de repelir algumas espécies quando presentes numa combinação apropriada. WITTMAN (1986) encontrou o óxido trans-carvona como um

componente dominante em pelo menos nove espécies de *Catassetum* (Orquidaceae), todas polinizadas por várias espécies de *Eulaema*, incluindo *El. cingulata*. Quando estes autores testaram a atratividade do óxido trans-carvona sintético, coletaram muitos indivíduos de *Euglossa gorgonensis*, que não visitam nenhuma das espécies de *Catassetum*, sugerindo que as outras substâncias presentes na fragrância floral (acetato de benzila, carvona, α -pineno, camfeno e limoneno) provavelmente estariam repelindo várias espécies de *Euglossa*.

Por outro lado, WILLIAMS & DODSON (1972) mostraram que o mirceno e α -pineno e β -pineno reduziram a atratividade do 1,8-cineol, através da atração de menos espécies e menos indivíduos de cada espécie que o 1,8-cineol sozinho. Estes autores também mostraram que o eugenol, em combinação com o salicilato de metila, destrói a atração de todas as espécies que eram atraídas pelo salicilato sozinho, com exceção de um espécime de *Eulaema bombiformis*. Da mesma forma, o salicilato de metila destrói a atração de todas as espécies que eram atraídas pelo eugenol sozinho, ou seja, *Eulaema cingulata*.

ROUBIK & SHIESTL (2003) mostraram que esta atratividade reduzida pode, pelo menos em parte, ser devido à inibição da resposta de receptores por certos compostos, que podem influenciar a detecção da molécula pela abelha.

ROUBIK & SHIESTL (2003) não testaram o mirceno, mas encontraram uma redução na detecção eletroantegráfica por abelhas *Euglossina* de mistura de 1,8-cineol e acetato de benzila contendo α -pineno.

Nossos resultados sugerem, entretanto, que as substâncias minoritárias do óleo essencial não conduzem à atração de menor número de indivíduos de cada espécie que o eugenol puro.

De forma semelhante à combinação de compostos puros, a produção diferencial de componentes da fragrância por diferentes espécies de orquídeas limita o número de espécies de abelhas que são atraídas, mesmo quando

várias espécies de Euglossina estão presentes (DRESSLER, 1968; DODSON *et al.*, 1969).

Estas combinações apresentam um grande potencial em estudos da biologia das abelhas Euglossina. A polinização espécie-específica é comum em muitas espécies de orquídeas (DODSON & FRYMIRE, 1961), devido à especificidade da atração ao odor das flores, resultando, em alguns casos, na atração de apenas uma espécie (DRESSLER, 1968).

Assim, aproximando as combinações de odores daquelas ocorrendo na natureza, seria possível produzir um perfume que poderia atrair apenas um ou poucas espécies de Euglossina (DRESSLER, 1982).

Isto poderia ocorrer porque cada espécie de Euglossina é, possivelmente, atraída por um conjunto definido de compostos na forma pura (ACKERMAN *et al.*, 1989) e estocam na tíbia posterior uma mistura espécie-específica de substâncias químicas (ELTZ *et al.*, 2005).

A utilização de misturas de componentes químicos atrativos para abelhas Euglossina pode constituir mais uma ferramenta em inventários destas abelhas, auxiliando a compreensão da biologia e distribuição geográfica das espécies.

O óleo essencial estudado apresenta um potencial posterior de ser utilizado como fonte de β -pineno, 5-Indanol e limoneno para a realização de inventários de Euglossina. O limoneno é considerado um odor atrativo para estas abelhas (DODSON *et al.*, 1969) e tem sido utilizado em investigações sobre as Euglossina no Panamá (ACKERMAN, 1983; 1989).

DODSON *et al* (1969) sugeriu que este composto tenha o potencial de atrair fêmeas de Euglossina, observando duas fêmeas voando próximo à isca odor com esta substância. Se esta hipótese for demonstrada, um avanço grandioso será realizado em estudos destas abelhas, já que uma das maiores lacunas no conhecimento destes insetos é sobre a biologia das fêmeas. As informações sobre as fêmeas são tão escassas que não existe, até o momento, nenhuma chave taxonômica para este sexo de Euglossina.

Os testes com o limoneno podem revelar, talvez, uma seletividade maior a algumas espécies de Euglossina, o que pode auxiliar na amostragem de espécies raras em ambientes pouco estudados.

Os resultados do presente estudo revelam uma semelhança notável na atratividade do óleo essencial e do eugenol puro. Esta similaridade pode está associada à composição química comum a estas essências e ao fato de serem testadas no mesmo ambiente. Por outro lado, enquanto o óleo essencial tenha atraído menos espécies, o número de indivíduos em cada espécie não diferiu do encontrado no EG1 e EG.

CONCLUSÃO

As técnicas empregadas neste trabalho formam um conjunto imprescindível para o estudo analítico dos óleos essenciais. Somando as informações populares à química de bancada e à instrumentação analítica foi possível realizar um trabalho genuíno e original. Os resultados obtidos mostraram a eficiência das técnicas e dos métodos usados. Com as ferramentas disponíveis, foi possível caracterizar o óleo essencial da *Pimenta dioica* L.(Pimenta da Jamaica) cultivada no seu ambiente natural física e quimicamente. Na identificação do componente majoritário e dos demais componentes, bem como suas quantificações, as técnicas foram precisas e os métodos eficientes, proporcionando uma excelente performance analítica nas determinações. Ficou evidenciado, também, que uso do óleo essencial da *Pimenta dioica* L. como atrativo de abelhas euglossinas se mostrou promissor quando comparado ao eugenol puro. Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

1. As técnicas espectroscópicas foram eficientes para a confirmação e identificação do eugenol como componente majoritário, com teor de 76,98%, e de componentes

minoritários no óleo essencial da *Pimenta dioica*. A espectroscopia na região do infravermelho indicou a presença desses componentes, principalmente pelas vibrações moleculares de seus grupos funcionais contendo oxigênio. A espectroscopia de massas mostrou as fragmentações, intensidades e vizinhanças dos picos característicos das moléculas de eugenol e dos demais compostos;

2. A análise térmica do óleo essencial, pela técnica de Termogravimetria Isotérmica e calorimetria exploratória diferencial, abriu um novo caminho para análises de óleos essenciais. Os resultados obtidos foram inéditos para o óleo essencial da *Pimenta dioica* Lindl, possibilitando sugerir inclusive a determinação quantitativa de eugenol por DSC;
3. O estudo dos métodos de extração do óleo essencial possibilitou verificar os melhores parâmetros para o processo extrativo em função do melhor rendimento e da concentração de eugenol;
4. O presente estudo demonstrou que a espécie *Pimenta dioica*, forneceu um óleo essencial cujo rendimento foi de 2,8 %

(m/m), o qual foi considerado de valor elevado em relação à extração de outros óleos essenciais de plantas aromáticas;

5. Os estudos das constantes físicas do óleo essencial apresentaram valores semelhantes aos valores obtidos pela literatura e pelos padrões, usados para as suas comparações;
6. Os resultados sugerem que o eugenol e o óleo essencial da *Pimenta dioica* apresentam igual probabilidade de atrair indivíduos de abelhas Euglossina, sendo que o óleo essencial, apesar de ter atraído um número menor de indivíduos, apresentou maior seletividade atrativa de espécies, fator que pode ser atribuído à presença dos componentes minoritários do óleo;
7. Estes resultados sugerem que o óleo essencial tem uma maior especificidade na atração de abelhas Euglossina que o eugenol puro. Devido a conhecida variação geográfica na atratividade das essências, o teste do óleo essencial e posterior utilização em investigações sobre estas abelhas constitui uma ferramenta formidável para a maior compreensão da ecologia destes insetos, da estrutura e nível de conservação do habitat e para revelar a ocorrência de novas espécies em ambientes pouco estudados.

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Extrair o óleo essencial por extração com fluido supercrítico e verificar possíveis alterações na sua composição química e propriedades físicas;
2. Relacionar quantitativamente, por DSC, o teor de eugenol no óleo essencial em função de sua temperatura de ebulição;
3. Estudar novas metodologias eletroquímicas para a determinação qualitativas e quantitativas dos outros componentes dos óleos essenciais;
4. Testar o óleo metilado como atrativo de insetos (abelhas Euglossina), bem como ampliar a área de estudo do óleo essencial como atrativo de Euglossinas;
5. Promover a modificação química por fosforilação, formiação, nitração e sulfonação do eugenol, para obtenção de novos compostos com possíveis aplicações industriais;

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, J. D. 1983. Diversity and seasonality of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in central Panamá. *Ecology* **64**: 274-283.

ACKERMAN, J. D. 1989. Geographic and seasonal variation in fragrance choices and preferences of male euglossine bees. *Biotropica* **21**: 340-347.

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois: Allured, 1995. p. 118.

AGUIAR, C. M. L. 2003. Utilização de recursos florais por abelhas (Hymenoptera, Apidae) em uma área de Caatinga (Itatim, Bahia, Brasil). *Revista Brasileira de Zoologia* **20 (3)**: 457-467.

AGUIAR, C. M. L.; ZANELLA, F. C. V. 2005. Estrutura da Comunidade de Abelhas (Hymenoptera, Apidae, Apíformis) de uma Área na margem do Domínio da Caatinga (Itatim, Bahia). *Neotropical Entomology* **34 (1)**: 15-24.

AIZEN, M. A.; FEINSINGER, P. 1994. Habitat fragmentation, native insects pollinators and feral honey bees in Argentine "Chaco Serrano". *Ecological Applications* **4**: 378-392.

Allspice (*Pimenta dioica*). Disponível em: <<http://www.soupsong.com/fallspic.html>> Acesso: 18 abr. 2004.

Allspice, Pimento, Jamaica Pepper. Disponível em: <http://www.desert-tropicals.com/Plants/Myrtaceae/Pimenta_dioica.html> Acesso: 17 mar. 2004.

ALVES, R. **Filosofia da Ciência**. Introdução ao jogo de suas regras. São Paulo: Brasiliense, 1988. 199p.

Analytical Methods Committee. Application of Gas-Liquid Chromatography to the Analysis of Essential Oils. Part XIII. Determination of Octan-3-ol in Oils of Peppermint and Mint. **Analyst**, v.113, p. 657-659, 1988.

Analytical Methods Committee. Application of Gas-Liquid Chromatography to the Analysis of Essential Oils. Part XIV. Monographs for five Essential Oils. **Analyst**, v.113, p. 1125-1136, 1988.

Analytical Methods Committee. Application of Gas-Liquid Chromatography to the Analysis of Essential Oils. Part XV. Determination of "Rhodinol" in Oils of Geranium. **Analyst**, v.115, p. 459-463, 1990.

Analytical Methods Committee. Application of Gas-Liquid Chromatography to the Analysis of Essential Oils. Part IV. Determination of Eugenol in Oil of Bay (*Pimenta racenosa*, Miller). **Analyst**, v.100, p. 593-600, 1975.

ARAÚJO, D. S. D; LACERDA, L. D. 1987. A natureza das restingas. *Ciência Hoje*, **6 (33): 42-48**.

ARMBRUSTER W. S. 1986. Reproductive Interactions Between Sympatric Dalechampia Species: Are Natural Assemblages "Ramdon" or Organized? *Ecology* **67 (2): 522-533**.

ARMBRUSTER W. S.; WEBSTER, G. L. 1981. Sistemas da polinização de duas espécies simpátricas de *Delachampia* (Euphorbiaceae) no Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, **11: 15-17**.

ARMBRUSTER W. S.; WEBSTER, G. L. 1982. Divergent pollination systems in Sympatric Species American Dalechampia (Euphorbiaceae). *American Midland Naturalist* **180** (2): 325-337.

ARMBRUSTER, S. W. 1982. Seed production and dispersal in Dalechampia (Euphorbiaceae): Divergent patterns and ecological consequences. *American Journal of Botany* **69** (9): 1429-1440.

ARMBRUSTER, S. W. 1988. Multilevel comparative analysis of the morphology, function, and evolution of *Dalechampia* blossoms. *Ecology* **69** (6): 1746-1761.

ARMBRUSTER, W. S. 1984. The Role of Resin in Angiosperm Pollination: Ecological and Chemical Considerations. *American Journal of Botany* **71** (8): 1149-1160.

ARMBRUSTER, W. S. 1985. Patterns and Character Divergence and the Evolution of Reproductive Ecotypes of Dalechampia scandens (Euphorbiaceae). *Evolution*, **39** (4): 733-752.

ARMBRUSTER, W. S. 1993. Evolution of Plant Pollination Systems: Hypotheses and Tests with a Neotropical Vine Dalechampia. *Evolution* **47** (5): 1480-1505.

ARMBRUSTER, W. S.; HERZIG, A. L. 1984. Partitioning and sharing of pollinators by four sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **71**: 1-16.

ARMBRUSTER, W. S.; HERZIG, A. L.; CLAUSEN, T. P. 1992. Pollination of two Sympatric Species of Dalechampia (Euphorbiaceae) in Suriname by Male Euglossine Bees. *American Journal of Botany*, **79** (12): 1374-1381.

ARMBRUSTER, W. S.; KELLER, S.; MATSUKI, M.; CLAUSEN, T. P. 1989. Pollination of *Dalechampia magnoliifolia* (Euphorbiaceae) by male Euglossine bees. *American Journal of Botany* **76 (9): 1279-1285**.

ARMBRUSTER, W. S.; STEINER, K. E. 1992. Pollination Ecology of four *Dalechampia* species (Euphorbiaceae) in Northern Natal, South Africa. *American Journal of Botany* **79 (3): 306-313**.

ARMBRUSTER, W. S.; WEBSTER, G. L. 1979. Pollination of two species of *Delachampia* (Euphorbiaceae) in Mexico by euglossine bees. *Biotropica*, **11 (4): 278-283**.

ASHMAN, T. 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* **85: 2408-2421**.

ASTA on line. Allspice. Disponível em: <<http://www.astaspice.org/index.cfm>> Acesso em: 17 mar. 2004.

Atraso. Disponível em:

<http://www.globorural.globo.com/edic/185/rep_tradicao9.html>

Acesso em: 12 jul. 2002.

AYRES, M.; AYRES, M. Jr.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. 2005. **BIOSTAT** versão 4.0: aplicações estatísticas na área de ciências bio-médicas. Belém, Pará: Brasil.

BAKER, H. G. 1963. Evolutionary Mechanisms in Pollination Biology. *Science*, **139 (3558): 877-883**.

BAKER, H. G; HURD, P. D. 1968. Intrafloral ecology. *Annual Review of Entomology*. **13: 385-414**.

BAKER, R. R. 1983. Insect territoriality. *Annual Review of Entomology* **28**: 65-89.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. v.I. São Paulo: EDUSP, 1978. 255p.

BAWA, K. S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. *Evolution* **28**: 85-92.

BAWA, K. S. 1990. Plant-pollinator Interactions in Tropical Rain Forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**: 399-422.

BAWA, K. S.; PERRY, D. R.; BEACH, J. H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany* **72**: 331-345.

BECKER, P.; MOURE, J. S.; PERALTA, F. J. A. 1991. More about euglossine bees in Amazonian Forest Fragments. *Biotropica* **23**: 340-591.

BITTRICH, V.; AMARAL, M. C. E. 1996. Flower morphology and pollination biology of *Clusia* species from the Gran Sahana (Venezuela). *Kew Bolletim*, **51**: 681-691.

BITTRICH, V.; AMARAL, M. C. E. 1997. Floral biology of some *Clusia* species from Central Amazonia. *Kew Buletim*, **52**: 617-635.

BITTRICH, V.; AMARAL, M. C. E.; MACHADO, S. M. F.; MARSAIOLI, A. J. 2003. Floral resin of *Tovomitopsis saldanhae* (Guttiferae) and 7-epi-nemorosone: Strutural Revision. *Z. Naturforsch*, **58c**: 643-648.

BOHS, L. 1991. Crossing studies in *Cyphomandra* (Solanaceae) and their systematic and evolutionary significance. *American Journal of Botany* **78 (12): 1683-1693**.

BRAGA, P. I. S. 1976. Atração de abelhas polinizadoras de Orchidaceae com auxílio de iscas-odores na campina, campinarana e floresta tropical úmida da região de Manaus. *Ciência e Cultura*, **28: 767-773**.

BRAITHWAITE, A.; SMITH, F.J. **Chromatographic Methods**, 5.ed. New York: Blackie Academic, 1996. 559p.

BRITO, C. M. & REGO, M. M. C. 2001. Community of male Euglossina bees (Hymenoptera: Apidae) in secondary forest, Alcântara, MA, *Brazilian Journal of Biology* **61 (4): 631 – 638**.

BROWN, M. E.; **Introduction to Thermal Analysis - Techniques and Applications**. 1 ed, London, Chapman and Hall, 1988.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991. p.594.

BUCHMANN, S. L; BUCHMANN, M. D. 1981. Anthecology of Mouriri myrtiloides (Melastomataceae: Mymecyleae), an Oil flower of Panama. *Biotropica* **13 (2): 7-24**.

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERSSAI, C.; WILLIAMS, D.H. **Struture elucidation of natural products by mass spectrometry**. II: Steroids, Terpenoids, Sugars and Miscellaneous class. Amsterdam: Holden-Day, 1964. 306p.

BUENO, E. 1999. **Náufragos, Traficantes e Degradados. As primeiras expedições ao Brasil**. Editora Objetiva, Rio de Janeiro, 200 p.

BULLOCK, S. H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* **17**: 287-301.

BÚRQUEZ, A. 1997. Distributional limits of Euglossina and Meliponine bees (Hymenoptera, Apidae) in Northwestern Mexico. *Pan-Pacific Entomologist* **73** (7): 137-140.

BUSTAMANTE, M. F. L. **Plantas medicinales y aromáticas**: estudio, cultivo y processado: Madri: Mundi-Pensa, 1993.

CARMO, R. M.; FRANCESCHINELLI, E. V. 2002. Polinização e biologia floral de *Clusia arrudae* Plancon & Triana (Clusiaceae) na Serra da Calçada, município de Brumadinho, MG. *Revista brasileira de botânica*, **25** (3): 351-360.

CAVICCHIOLI, M. **Análise de óleos essenciais de frutas cítricas por cromatografia gasosa de alta resolução (colunas capilares)**. São Carlos, 1986. 38p. Monografia (Curso de Graduação) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. São Carlos, 2000, 150p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

CHAO, A., M. C. MA & M. C. K. YANG. 1993. Stopping rules and estimation for recapture debugging and unequal failure rates. *Biometrika* **80**: 193-201.

CHAO, A., R. L. CHAZDON, R. K. COWELL & T. J. SHEN. 2005. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters* **8**: 148-159.

CHAO, A., R. L. CHAZDON, R. K. COWELL & T. J. SHEN. 2006. Abundance-Based Similarity Indices and Their Estimation When There Are Unseen Species in Samples. *Biometrics* **62**: 361-371.

CHAO, A., T. J. SHEN. 2003. Program SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation). Persistent URL <<http://chao.stat.nthu.edu.tw>>.

CHAPMAN, G.P. **Floral biology and the fruitfulness of Jamaica Allspice (*Pimenta dioica* (L) Merrill)**. In: 2d Internatl. SYMPOSIUM ON POLLINATION, London, 1964. *Bee World*, 1964. p. 125- 30.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1978. 4.v.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1978. p.471.

CORREIA, M. C. R.; PINHEIRO, M. C. B.; LIMA, H. A. 2005. Biologia floral e polinização de *Arrabidaea conjugata* (Vell.) Mart. (Bignoniaceae). *Acta Botanica Brasilica*. **19 (3)**: 501-510.

COSTA, A .F. **Farmacognosia**. 5.ed., Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1994. v.1. 1031p.

COSTA, O. A. Plantas hipoglicemiantes brasileiras. **Lendra**, v.5, n.6. p. 95-103, dez. 1975.

COWELL, R. K. 2006. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8. Persistent URL <purl.oclc.org/estimates>.

CRACKER, L.E.; SIMON, J.E. **Herbs, Species and Medicinal Plants**. Phoenix: Onyx, 1987. v.1. 329p.

CRAVEIRO, A.A. et al. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**. Fortaleza: EUFC, 1981. 210p.

CRAVEIRO, A.A., MACHADO, M.I.L. De aromas, insetos e plantas. **Ciência Hoje**, v.4, n.23, p.54-63, 1986.

DAFNI, A. 1992 **Pollination Ecology: A practical approach**. Oxford University press Inc., New York.250p.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais**: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. 231p.

DODSON C. H. & HILLS, H. G. 1966. Gas chromatography of orchid fragrances. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **35**: 720 - 725.

DODSON, C. H., G. P. FRYMIRE. 1961. Preliminary Studies in the Genus *Stanhopea* (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **48**: 137-172.

DODSON, C. H., R. L. DRESSLER, H.G. HILLS, R. M. ADAMS & N. H. WILLIAMS. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* **164**: 1243 -1249.

DODSON, C. H.; DRESSLER, R. L.; HILLS, H.G.; ADAMS, R. M.; WILLIAMS, N. H. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science*, v. **164**, p. 1243 -49.

DOLLIMORE, D.; GAMLEN, G. A. & TAYLOR, T. J. **Mass Spectrometric Evolved Gas Analysis: An Overview**, *Thermochimica Acta*, 75 pág., 59-69, 1984.

DRESSLER, R. L. 1968. Pollination by euglossine bees. *Evolution* **22**: 202-210.

DRESSLER, R. L. 1982. Biology of orchid bees (Euglossina). *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**: 373-94.

DRESSLER, R. L. 1968. Pollination by Euglossine bees. *Evolution*, **22 (1)**: 202-210.

DUKE, J.A. **Handbook of Medicinal Herbs**. Florida: CRC, 1985. p.371.

EICKWORT, G.; GINSBERG, H. S. 1980. Foraging and mating behavior in Apoidae. *Annual Review of Entomology* **25**: 421-446.

ELTZ, T., D. W ROUBIK, K. LUNAU. 2005. Experience-dependence choice ensure species-specific fragrance accumulation in male orchid bee. *Behav Ecol Sociobiol* **59**: 149-156.

ELTZ, T.; WHITTEN, W. M.; ROUBIK, D. W.; LINSENMAIR, K. E. 1999. Fragrance collection, storage and accumulation by individual male orchid bees. *Journal of Chemistry Ecology* **25 (1)**: 157-176.

ESSINGER, L. N. 2005. **Euglossini (Hymenoptera, Apidae) no sul de Santa Catarina**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Centro Sul Catarinense. Criciúma. 63 p.

ESTEVES, F.A.; LACERDA, L. D. 2000. **Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras**. NUPEM/UFRJ, Macaé, Rio de Janeiro, Brasil, 446 p.

FAJARDO, G. et al. Comparative study of the oil and supercritical CO₂ extract of Mexican pimento (*Pimenta dioica* Merrill). **J. Essent. Oil Res.**, v.9. n.2, p. 181-185, 1997.

FONT QUER, P. **Plantas Medicinales**. El Discorides Renovados. Barcelona: Labor, 1967. 1033p.

FRANKIE, G. W.; NEWSTROM, L.; VINSON, S. B.; BARTELL, J. F. 1993. Nesting habitat preference of selected *Centris* bee species in Costa Rica dry forest. *Biotropica* **25**: 322-333.

FRANKIE, G. W.; OPLER, P. A.; BAWA, K. S. 1976. Foraging Behavior of Solitary Bees: Implications for Outcrossing of a Neotropical Forest Tree Species. *The Journal of Ecology* **64 (3)**: 1049-1057.

Frontier Natural Products. Allspice. <http://www.frontiercoop.com>> Acesso em: 17 mar. 2004.

FUH, M.R. et al. Preparative-scale supercritical-fluid extraction of essential oils from *Syzygium aromaticum* (Clove bud). **Int-Lab.**, p. 26, 1996.

GATHMANN, A.; TSCHARNTKE, T. 2002. Foraging ranges of solitary bees. *Journal of Animal Ecology*, **71**: 757-764.

GLASGOW, S.K. Incipient Dioecy in Pimento. *Nature*, v.**192**, p. 1205-1206, 1961.

GOMES, L. F.; LACERDA, L. M. 1992. Diversidade e flutuação de população de abelhas da sub-família Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) em dois ecossistemas de São Luís-Maranhão: Mata e restinga. *Naturalia*, nº especial : 187.

GONÇALVES-ALVIN, S. J. 2001. Resin-collecting bees (Apidae) on *Clusia palmicida* (Clusiaceae) in a riparian forest in Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, **17**: 119-153.

GOTTIEB, O. R.; KAPLAN, M.A. Amazônia: Tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje**, 1990. v.11, n.61, p. 19-21.

GOTTSBERGER, G.& CAMARGO J.M. F de. & SILBERBAUER-GOTTSBERGER I. 1989. A bee pollinated tropical community: the beach dunes vegetation of ilha de São Luís-MA, Brazil. *Bot. Jahrb. Syst.* **109 (4)**: 469-500.

GRACIE, C. 1993. Pollination of *Cyphomandra endopogon* var. *endopogon* (Solanaceae) by *Eufriesea* Ssp. in French Guiana. *Brittonia* **45 (1)**: 39-46.

GUENTHER, E. **The Essential Oils**. Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae. New York: D. Van Nostrand, 1950. v.4, p. 370-377.

GUIOCHON, G.; GUILLEMIN, C.L. **Quantitative gas chromatography for laboratory analyses and on-line process control**. New York: Elsevier Science, 1988. p. 653-655.

HAMMEL, B. E. 1999. Synopsis of *Chrysochlamys* (Clusiaceae: Clusioidae: Clusiaceae) in Mesoamerica. *Novon* **9**: 360-374.

HAMMER, O, D. A. T. HARPER & P. D. RYAN. 2007. PAST: Paleontological Statistics, ver 1.73. Persistent URL <<http://folk.uio.no/ohammer/past>>.

HEINRICH, B. 1975. Bee Flowers: A Hypothesis on Flower Variety and Blooming Times. *Evolution* **29 (2)**: 325-334.

HENLE, K.; LINDERMAYER, D. B.; MARGULES, C. R.; SAUNDERS, D. A.; WISSEL, C. 2004. Species survival in fragmented landscapes: where we are now? *Biodiversity and Conservation* **13**: 1-8.

HILLS, H. G., N. H. WILLIAMS, C. H DODSON. 1972. Floral Fragrances and Isolating Mechanisms in the Genus *Catasetum* (Orchidaceae). *Biotropica* **4**: 61-76.

HILLS, H. G.; WILLIAMS, N. M.; DODSON, C. H. 1968. Identification of some orchid fragrances components. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **37**: 967-971.

HORVITZ, C. C.; SCHEMSKE, D. W. 1990. Spatiotemporal variation in insect mutualists of a Neotropical herb. *Ecology* **71 (3)**: 1085-1097.

INOUYE, D. W. 1980. The Terminology of Floral Larceny. *Ecology* **61 (5)**: 1251-1253.

JANZEN, D. H. 1971. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science*, **171**: 203-205.

JANZEN, D. H.; DEVRIES, P. J.; HIGGINS, M. L.; KINSEY, L. S. 1982. Seasonal and site variation in Costa Rican euglossine bees at chemical baits in lowland deciduos and evergreen forests. *Ecology* **63**: 66-74.

KATZER, G. Allspice (*Pimenta dioica* [L.] Mer.). Disponível em: <<http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzer/eugl/pime-dio.html>> Acesso em: 17 mar. 2004.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. W.; WASER, N. M. 1998. Endangered Mutualisms: The Conservation of Plant-Pollinator Interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 85-112.

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Systematics*. **17**: 230-241.

KEVAN, P. G.; BACKER, H. G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology* **28**: 407-453.

KIMSEY, L. S. 1984. The behavioral and structural aspects of grooming and related activities in euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal Zoological of London*, **204**: 541-550.

KINSEY, L. S. 1982. Systematic of bees of the genus *Eufriesea* (Hymenoptera, Apidae). *Univ. California Publ. Entom.*, **95**: 1-25.

KIRK, A.; OTHMER, B. **Encyclopedia of Chemical Tecnology**. 3.ed., v.16, 1981, p.307-332.

KOLLMANNSBERGER, H.; NITZ, S. The flavour-composition of supercritical gas extracts: 2. Allpice (*Pimenta dioica*). **Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel**, p.116-126, 1993.

KOROLKOVAS, A.; BRUCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 783p.

KREBS, C. J. 1999. **Ecological Methodology**, 2 nd edn (Harper & Row, New York).

KREMER, C. N. M.; RICKETTS, T. 2000. Global perspectives on pollination disruptions. *Consevation Biology* **14**: 1226-1228.

LACERDA, L. D.; ARAÚJO, D. S. D.; MACIEL, S. D. 1993. **Dry coastal ecossystems of the tropical Brasiliam coast**. In: Van der Maarel E. (ed.). Dry coastal ecosystems: Africa, America, Asia, Oceania. Elsevier, Amsterdam, p. 477-493.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia Gasosa**. São Carlos: Suprema, 1993, 254p.

LANCASHIRE, R.J. Jamaican Pimento. Disponível em: <wwwchem.uwimona.edu.jm:1104/lectures/pimento.html> Acesso em: 17 mar. 2004.

LANGENHEIM, J. H. 1969. Amber: A botanical Inquiry. *Science* **163 (3872): 1157-1169.**

LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W. H. 1983. Variation on Leaf Resin Composition between Parent tree and Progeny in *Hymenaea*: Implications for Herbivory in the Humid Tropics. *Biochemistry Systematics and Ecology* **11 (2): 97-106.**

LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W. H.; LINCOLN, D. E.; FOSTER, C. E. 1978. Implications of Variation in Resin Composition among Organs, Tissues and Populations in the tropical Legume *Hymemaea*. *Biochemistry Systematics and Ecology*, **6: 229-313.**

LEMOS, T.L.G.et al. Antimicrobial ativity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, 1990, v.4, p. 82-84.

LINSLEY, E. G. 1958. The ecology of solitary bees. *Hilgardia* **27: 243-299.**

LONGINO, J. T., J. CODDINGTON & R. COLWELL. 2002. The ant fauna of a tropical rain forest: estimating species richness three different ways. *Ecology* **83: 689-702.**

LOPES, A. V.; MACHADO, L. C. 1998. Floral biology and reproductive ecology of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) in northeastern Brazil. *Plant Systematic and Evolution*, **27: 71-99.**

MALO, J. E.; LEIRANA-ALCOCER, J.; TABLA-PARRA, V. 2001. Population fragmentation, Florivory, and Effects of Flower Morphology Alterations on the Pollination Success of *Myrmecophilia tibicinis* (Orchidaceae). *Biotropica* **33** (3): 529-534.

MARTINI, P.; SCHLINDWEIN, C.; MONTENEGRO, A. 2003. Pollination, Flower Longevity and Reproductive Biology of *Gongorra quinquenervis* Ruíz and Pavón (Orchidaceae) in na Atlantic Forest Fragment of Pernanbuco, Brazil. *Plant. Biol* **5**: 495-503.

MARTINS, C. F.; SOUZA, A. K. P. 2005. Estratificação vertical de abelhas Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em uma área de Mata Atlântica, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **22** (4): 913-918.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: EUFC, 1988. 125p.

MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais**. Guia de seleção e emprego de plantas medicinais do Nordeste do Brasil. Fortaleza: EUFC, 1989. 164p.

MAY, M. L.; CASEY, T. M. 1983. Thermoregulation and heat exchange in euglossine bees. *Physiological Zoology* **56**: 541-551.

MESQUITA, R. C. G; FRASCISCON, C. H. 1995. Flower visitors of *Clusia nemorosa* G.F.W. Meyer (Clusiaceae) in an Amazonian white-sand campina. *Biotropica*, **27**: 251-257.

MINCKLEY, R. L.; REYERS, S. G. 1996. Capture of the Orchid bee, *Eulaema polychroma* (Fries) (Apidae: Euglossini) in Arizona, with notes on northern distributions of other mesoamerican bees. *Journal of the Kansas Entomological Society*, **69** (1) 102-104.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Óleos Essenciais**. Tecnologia: Analítica, Industrial e Econômica. Boletim 15. Rio de Janeiro: Instituto de Óleos, 1958. 284p.

MMA, 1996. *Macrodiagnóstico da Zona Costeira Brasileira*. Ministério do meio Ambiente e da Amazônia Legal, Brasília, DF.

MMA/IBAMA, 2002. Plano de Manejo do Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses. Ministério do meio Ambiente e da Amazônia Legal/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, Brasília, DF, 499 p.

MONTEIRO, Odair dos Santos. **Estudos analíticos do eugenol contido no óleo essencial extraído dos frutos da espécie *Pimenta dioica* e sua aplicação como agente bactericida**. São Luís, 2004. 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão.

MORATO, M. L.; CAMPOS, L. A O.; MOURE, J. S. 1992. Abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) coletadas na Amazônia Central. *Revista Brasileira de Entomologia* **36 (4): 767-771**.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Estudos Analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl**. São Carlos. 2000, 124p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, USP.

MOUCHREK FILHO, V. E. **Introdução à Química de Óleos Essenciais**. São Luís, 2001. 72p. Apostila.

MOURE, J. S. 1967. A checklist for the know euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica*, **5: 395-415**.

NARA, A. K.; WEBBER, A. C. 2002. Biologia floral e polinização de *Aechmea beeriana* (Bromeliaceae) em vegetação de baixo na Amazônia central. *Acta Amazônica* **32 (4): 571-588**.

NEVES, E. L.; VIANA, B. F. 1997. Inventário da fauna de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) do baixo sul da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* **14 (4): 831-837**.

NEVES, E. L.; VIANA, B. F. 1999. Comunidade de machos de Euglossina (Hymenoptera, Apidae) das Matas Ciliares da Margem Esquerda do Médio Rio São Francisco, Bahia. *Anais da Sociedade Entomológica Brasileira*, **28 (2): 201-210**.

OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO, A. M.; BITTRICH, V.; VENCATO, I.; MARSAIOLI, A. J. 1996. Floral resins of *Clusia spp.*: Chemical composition and Biological function. *Tetrahedron Letters*, **37 (36): 6427-6430**.

OLIVEIRA, M. L.; CAMPOS, L. A. O. 1995. Abundância, riqueza e diversidade de abelhas Euglossinae (Hymenoptera:Apidae) em florestas contínuas de terra firme na Amazônia Central, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **12 (3): 547-556**.

OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E. 2000. Reproductive biology of wood plants in a Cerrado community in Central Brazil. *Flora* **195: 311-329**.

OLIVEIRA-REBOUÇAS, P.; GIMENES, M. 2004. Abelhas (Apidae) Visitantes de Flores de *Comolia ovaliofolia* DR Triana (Melastomataceae) em uma área de Restinga da Bahia. *Neotropical Entomology* **33 (3): 315-320**.

OMS apóia estudo com plantas medicinais. Disponível em: <http://www.drashi/fitoterapia_oms_apoia_estudos_com_plantas_medicinais.ht> Acesso em: 17 jul. 2002.

OTERO, J. T. 1996. Biología de *Euglossa nigropilosa* Moure (Apidae: Euglossinae) I: Características de nidificación en la Reserva Natural la Planada. *Bull. Mus. Ent. Univ. Valle*, **4 (1): 1-19**.

PARRA-TABLA, V.; VARGAS, C. F.; MAGAÑA-RUEDA, S.; NAVARRO, J. 2000. Female and male pollination success of *Oncidium ascendens* Lindey (Orchidaceae) in two contrasting habitat patches: forest vs agricultural fields. *Biological Conservation* **94: 335-340**.

PARRY, J.W. **Spices**. New York: Chemical, 1969. v.I. p.163 - 165.

PARRY, J.W. **Spices**. New York: Chemical, 1969. v.II. p.7-11.

PAVILIK, B. M.; FERGUSON, N.; NELSON, M. 1993. Assessing limitations of the growth of endangered plant populations II: seed production and seed bank dynamics of *Erysimum capitatum* ssp. *Augustatum* and *Oenothera deltoides* ssp. *Hovelli*. *Biological Conservation* **65: 267-278**.

PEARSON, D. L.; DRESSLER, R. L. 1985. Two-year study of male orchid bee (Hymenoptera, Apidae, Euglossina) attraction to chemical baits in lowland south-eastern Peru. *Journal of Tropical Ecology* **1: 37-54**.

PERUQUETTI, R. C.; CAMPOS, L. A. O.; COELHO, C. D.; ABRANTES, C. V. M.; LISBOA, L. C. O. 1999. Abelhas Euglossina (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revista Brasileira de Zoologia* **16 (Supl. 2): 101-118**.

PERUQUETTI, R.C. 2003. Variação do tamanho corporal de machos de *Eulaema nigrita* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae,

Euglossina): Resposta materna à flutuação de recursos? *Revista Brasileira de Zoologia* **20 (2): 207-212.**

PIELOU, E. C. 1966. **An Introduction to mathematical ecology.** New York, John Wiley & Sons, 286 p.

PIELOU, E. C. 1975. **Ecological diversity.** New York, John Wiley & Sons, 165 p.

PINO, J.; ROSADO, A.; GONZALEZ, A. Analysis of the essential oil of pimento berry (*Pimenta dioica*). *Nahrung.*, **v.33, n.8, p. 717-720, 1989.**

PLANT IMAGES. *Pimenta dioica*. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com>> Acesso em: 10 jan. 2003.

PLANTS of the Myrtaceae Family. Disponível em: <http://www.desert-tropicals.com/Plants/Myrtaceae/Pimenta_dioica.html> Acesso em: 17 mar. 2004.

PLOWDEN, C.; UHL, C.; OLIVEIRA, S. A. 2004. *Alipumilio* (Diptera: Syrphidae) fly association with Burseraceae tree resins in the eastern Brazilian Amazon. *Journal of Natural History*, **38: 1941-1947.**

POWELL, A. H. & G. V. N. POWELL, 1987. Population dynamics of male euglossine bees Amazonian forest fragments. *Biotropica* **19: 176-179.**

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops.** Dicotyledons. Longman, 1960. p. 408-414.

PYLE, R.; BENTZIEN, M; OPLER, P. 1981. Insect Conservation. *Annual Review of Entomology* **26: 233-258.**

RALPH, L.S. et al. **Identificação sistemática de compostos orgânicos.** Manual de Laboratório. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983. p. 367-378.

RAMIREZ, B. W.; GOMEZ, L. D. 1978. Production of nectar and gums by flowers of *Monstera deliciosa* (Araceae) and some species of *Clusia* (Guttifera) collected by New World *Trigona* bees. *Brenesia*, **14-15: 407-412.**

RAMIREZ, N. 2004. Ecology of Pollination in a tropical Venezuelan Savanna. *Plant Ecology* **173: 171-183.**

RAW, A. 1989. The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern Brazilian wet forest (Hymenoptera:Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **33 (1): 103-107.**

REBÊLO, J. M .M.; SILVA, F. S. 1999. Distribuição das abelhas Euglossina (Hymenoptera: Apidae) no Estado do Maranhão, Brasil. *Annais da Sociedade Entomológica Brasileira* **28 (3): 389-401.**

REBÊLO, J. M. M.; CABRAL, A. J. 1997. Abelhas Euglossinae de Barreirinhas, Zona do litoral da Baixada Oriental Maranhense. *Acta Amazônica* **27: 145-152.**

REBÊLO, J. M. M.; GARÓFALO, C. A. 1991. Diversidade e sazonalidade de machos de Euglossina (Hymenoptera, Apidae) e preferências por iscas-odores em um fragmento de floresta no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* **51: 787-799.**

REIS, M. G.; PANSARIM, E. R.; SILVA, U. R.; AMARAL, M. C. E.; MARSAIOLI, A. J. 2004. Pollinator attraction devices (floral fragrances) of some Brazilian orchids. *Arkivoc* **VI: 89-97.**

ROBLES, C. et al. Essential Oil Composition of *Cistus Albidus* Leaves. **Phytochemistry**, v.48, n.8, p. 1343-1345, 1998.

RODRIGUEZ, M. et al. Antimicrobial activity of *Pimenta dioica*. **Alimentaria**, v.33, n.8, p. 107-110, 1996.

ROUBIK, D. W. 1993. Tropical pollinators in the canopy and understory – Field data and theory of stratum preferences. *Journal of Insect Behavior* **6 (6): 659-673**.

ROUBIK, D. W.; ACKERMAN, J. D. 1987. Long-term ecology of euglossine orchid-bees (Apidae: Euglossina) in Panamá. *Oecologia*, **73: 321-333**.

SAMEJIMA, H.; MARZUKI, M.; NAGAMITSU, T.; NAKASIZUKA, T. 2004. The effects of human disturbance on a stingless bees community in a tropical rain forest. *Biological Conservation* **120: 577-587**

SANTOS, F. M.; CARVALHO, C. A. L.; SILVA, R. F. 2004. Diversidade de abelhas (Hymenoptera, Apidae) em uma área de transição Cerrado-Amazônia. *Acta Amazônica* **34 (2): 319-328**.

SAZIMA, M.; SAZIMA, I.; CARVALHO-OKANO, R. M. 1985. Biologia floral de *Dalechampia stipulaceae* (Euphorbiaceae) e sua polinização por *Euglossa melanotrica* (Apidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **45: 85-93**.

SCHEMSKE, D. W. 1981. Floral Convergence and Pollinator Sharing in two Bee-pollinated Tropical Herbs. *Ecology* **62 (4): 946-954**.

SCHREIER, P. **Analysis of volatiles methods and applications**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. 469p.

SHESKIN, D. J. 2004. Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures. Third Edition. CRC Press Company.

SIGRIST, M. R.; SAZIMA, M. 2004. Pollination and Reproductive Biology of Twelve Species of Neotropical Malpighiaceae: Stigma Morphology, and its Implications for the Breeding System. *Annals of Botany*, **94**: 33-41.

SILVA, F. S. & REBÊLO, J. M. M. 2002. Population Dynamics of Euglossinae bees (Hymenoptera, Apidae) in a Early Second-Growth Forest of Cajual Island, in the State of Maranhão, Brasil. *Brazilian Journal of Biology* **62** (1): 15-23.

SILVA, R.A.D. Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil, São Paulo: Nacional, 1926. 1149p.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 5.ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1994. 387p.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, 1999. 821p.

SIMPSON, B.; NEFF, J. 1991. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of Missouri Botanical Garden*, **59**: 501-522.

SKOV, C.; WILEY, J. 2005. Establishment of the Neotropical orchid bee *Euglossa viridissima* (Hymenoptera, Apidae) in Florida. *Florida Entomologist* **88** (2): 225-227.

SOFIA, S. H.; SANTOS, A. M.; SILVA, R. M. 2004. Euglossine bees (Hymenoptera, Apidae) in a remnant of Atlantic Forest in Panamá State, Brazil. *Iheringia. Série Zool*, **94** (2): 217-222.

Spices and Flavorings. Allspice. Disponível em: <<http://www.gopher.mobot.org/MOBOT/education/feast/spices.html>> Acesso em: 18 abr. 2004.

Spices, herbs and perfumes. Disponível em: <<http://www.csd.tamu.edu/FLORA/328Fall98/spices.html>> Acesso em: 18 abr. 2004.

TAUBER, M. J.; TAUBER, C. A. 1976. Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and postdiapause development. *Annual Review of Entomology*, **21**: 81-107.

TENGÖ, J.; BERGSTRÖN, G. 1977. Cleptoparasitism and odor mimetism in bees: do *Nomada* males imitate the odor of *Andrena* females? *Science* **196**: 1117-1119.

The Merk Index, S. Budavari (ed), 12 ed. Merk and Co., Whitehouse Station, 1996.

The epicentre. Allspice. Disponível em: <<http://www.theepicentre.com/spices/allspices.htm>> Acesso em: 18 abr. 2004.

THOMSON, J. D. 2001. Using pollination deficits to infer pollinator declines: Can theory guide us? *Conservation Ecology* **5** (1): 6. [online] URL: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art6/>

TONHASCA JR., A. ; ALBUQUERQUE, G. S.; BLACKMER, J. L. 2003. Dispersal of Euglossina bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Tropical Ecology* **19**: 99–102.

VASCONCELOS, E.C. **Comparação entre métodos de extração, "clean-up" e análise cromatográfica de friedelan-3-ol e friedelina em folhas de *Maytenus aquifolium* Martius (Celastraceae)**. São Carlos, 1996. 80p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

VÉLEZ, D.; BARRIOS-PULLIDO, H. 2005. Observaciones sobre la estratificación vertical de abejas Euglossinas (Apidae: Euglossini)

en un bosque ripario de la orinoquía colombiana. *Caldasia* **27 (2): 267-270.**

VIANA, B. F.; KLEINERT, A. M. P.; NEVES, E. L. 2002. Comunidade de Euglossina (Hymenoptera, Apidae) das dunas litorâneas do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* **46 (4): 539-545.**

VIANA, B. F.; NEVES, E. L.; SILVA, S. O. 2001. Aspectos da biologia de nidificação de *Euplusia mussitans* (Fabricius) (Hymenoptera, Apidae, Euglossina). *Revista Brasileira de Zoologia*, **18 (4): 1081-1087.**

YOSHIDA, M. I.; **Cinética e Mecanismo de Reações de Decomposição Térmica no Estado Sólido.** UFMG, Belo Horizonte, 1993. Tese de Doutorado.

WCISLO, W. T.; CANE, J. H. 1996. Floral resource utilization by solitary bees (Hymenoptera, Apoidea) and exploitation of their stored foods by natural enemies. *Annual Review of Entomology* **41: 257-282.**

WEBSTER, G. L.; WEBSTER, B. D. 1972. The morphology and relationships of *Dalechampia scandens* (Euphorbiaceae) from Surinam. *American Journal of Botany* **59: 573-586.**

WEYERSTAHL, P. et al. Volatile Constituents of Eugenia Uniflora Leaf Oil. *Planta medica*, p. 546 - 549, 1998.

WILLIAMS, N. H.; DODSON, C. H. 1972. Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrance and its importance in long distance pollen flow. *Evolution*, **26: 84-95.**

WILLIAMS, N. H.; WITTHEN, W. M. 1983. Orchid floral fragrances and male euglossine bees. Methods and advances in the last sesquidecade. *Biol. Bull.* **164**: 355-395.

WILLIAMS, DAVID G. The chemistry of essential oils. England: Micelle, 1996. 334p.

WINFREE, R.; GRISWOLD, T.; KREMEN, C. 2007. Effect of Human Disturbance on Bee Communities in a Forested Ecosystem. *Conservation Biology* **21** (1): 213-233.

WITTMAN, D.; HOFFMANN, M.; SCHOLZ, E. 1988. Southern distributional limits of euglossine bees in Brazil linked to habitats of the Atlantic – and subtropical rain forest (Hymenoptera: Apidae: Euglossina). *Entomology General* **14** (1): 53-60.

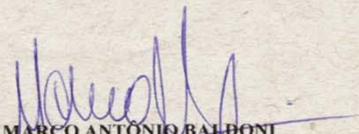
WOLDA, H. 1988. Insect Seasonality: Why? *Annual Review of Ecology and Systematics* **19**: 1-18.

ZIMMERMAN, J. K.; ROUBIK, D. W.; ACKERMAN, J. D. 1989. Asynchronous Phenologies of a Neotropical Orchid and Its Euglossine Bee Pollinator. *Ecology* **70** (4): 1192-1195.

ZUCCHI, R.; SAKAGAMI, S. F.; CAMARGO, J. M. F. 1969. Biological observations on a neotropical parassocial bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology of Euglossinae (Hymenoptera, Apidae). A comparative study. *J. Fac. Sci. Hokkaido. Univ., Ser. VI, Zool.*, **17**: 271-382.

APÊNDICE

Apêndice 1. Certificação da espécie *Pimenta dioica* emitido pelo IBD

		
<p>Rua Prudente de Moraes, 530 - Cep 18602-060 - Botucatu - SP Fone / Fax: + 55 (0) 14 3882 5066 ibd@ibd.com.br - www.ibd.com.br</p>		<p>Marca para produtos de Agricultura Orgânica</p>
<p>YEAR CERTIFICATE INTERNATIONAL MARKET</p>		
<p>CONFIRMAÇÃO DE CERTIFICAÇÃO PARA <u>ORGÂNICO</u> CERTIFICATION CONFIRMATION FOR <u>ORGANIC</u></p>		
<p>Production certified to IBD standards in compliance with EC 2092/91 Regulation and IFOAM Standards.</p>		
<p><u>IBD standards also cover Social and Environmental Criteria such as: Child Labor, Medical Care, Personnel Development Programs and the Preservation / Recuperation of native areas.</u></p>		
CERTIFICATE NUMBER:	CA0212/05	
VALIDITY:	AUGUST 24, 2005 TO AUGUST 24, 2006.	
CERTIFIED SINCE:	JANUARY / 2000	
CESSIONÁRIO - CESSIONARY	COOPERATIVA AGRÍCOLA MISTA DO PROJETO ONÇA LTDA. TAPEROÁ / BA BRAZIL	
CÓD. PROJETO:	BA 034	
PRODUTO - PRODUCT	<p>GUARANÁ / GUARANÁ, SERINGUEIRA / RUBBER TREE, PIACAÇA / PIASABA, DENDÊ / AFRICAN PALM, URUCUM / URUCUM, CRAVO / CLOVES, PIMENTA JAMAICA / ALLSPICE PEPPER, PIMENTA REINO / BLACK PEPPER, CACAU / COCOA, CASTANHA CAJU / CASHEW NUT, COCO / COCONUT, JENIAPAO / GENIPAP.</p>	
<p>Todos os produtos são produzidos sem o uso de organismos geneticamente modificados e/ou quaisquer produtos derivados de tais organismos. O produto não é oriundo de Agricultura Biodinâmica e não pode ser comercializado como produto Biodinamico ou Demeter. All products are produced without the use of genetically modified organisms and / or any products derived from such organism. This product is not of Biodynamic Agriculture and may not be traded as such nor as Demeter</p>		
<p><u>Para vendas no mercado interno ou de exportação este certificado somente terá validade acompanhado do Certificado de Transação T/C.</u> <u>For sales in the national market or for export products the certificate will only be valid when the Transaction Certificate T/C is issued.</u></p>		
<p>BOTUCATU AUGUST 24, 2005</p>		
<p> MARCO ANTONIO BALDONI</p>		
<p>IBD INSTITUTO BIODINÂMICO Rua Prudente de Moraes, 530 - CEP 18602-060 Fone/Fax+55(0) 14 3882 5066 - Botucatu/SP ibd@ibd.com.br www.ibd.com.br</p>		
1/4		
		
		

