

## Variabilidade química e resolução ótica do linalol no óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* (Lamiaceae)

### Chemical variability and optical resolution of linalool in the essential oil of *Aeollanthus suaveolens* (Lamiaceae)

<sup>1</sup>Monteiro, S. S.; <sup>1\*</sup>Siani, A. C.; <sup>1</sup>Garrido, I. S.; <sup>2</sup>Ramos, M. C. K. V.; <sup>2</sup>Aquino-Neto, F. R.

<sup>1</sup>Departamento de Produtos Naturais, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Far-Manguinhos, FIO-CRUZ, R. Sizenando Nabuco 100, 21041-250, Rio de Janeiro-RJ, Brasil; <sup>2</sup>LADETEC, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Bloco A, Sala 607, Rio de Janeiro, 21949-900, Brasil

\*Correspondência: E-mail: siani@far.fiocruz.br

**Unitermos:** *Aeollanthus suaveolens*, Lamiaceae, óleo essencial, linalol,  $\beta$ -farneseno, cromatografia quirál

**Key words:** *Aeollanthus suaveolens*, Lamiaceae, essential oil, linalool,  $\beta$ -farnesene, chiral chromatography

#### Resumo

O óleo essencial da espécie *Aeollanthus suaveolens* (rendimento entre 0,07-0,29%) manteve o mesmo perfil cromatográfico, em coletas por quatro semanas consecutivas, durante o período de floração; e por oito semanas consecutivas, durante o período com a planta sem flores. Os constituintes predominantes no óleo essencial, analisados por Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, foram o linalol, o trans-*-farneseno*, e a massoilactona. A variação dos rendimentos dos extratos ocorreu em um menor intervalo para as plantas em floração. A composição química dos óleos não variou qualitativamente, com a predominância do linalol. No entanto, durante o período de floração, o conteúdo de linalol decresceu e o de farneseno tomou sua posição como o sinal majoritário nas análises CG. A análise por Cromatografia Quiral em fase Gasosa demonstrou a presença de uma mistura de (l)- e (d)-linalol [(R)- e (S)-linalol (R)- e (S)-linalol respectivamente], numa proporção variando entre de 4:1 a 3:1 para todas as amostras, com as maiores diferenças sendo alcançadas durante os períodos de floração, ou próximos a esta. Experimentos de destilação a vácuo produziram frações mais leves, aonde o linalol chegou a 76% da composição dos constituintes. Traços de outros componentes também foram caracterizados no óleo, como acetato de linalila, acetato de *a*-terpinenila, acetato de geranila, *a*-santaleno e *cis*-*a*-bergamopteno.

#### Abstract

The essential oil of *Aeollanthus suaveolens* (0.07-0.29% yield) was shown to maintain the same chromatographic profile in four consecutive week extractions, during the flowering period, and in eight consecutive week extractions during the non-flowering period. Linalool, *-farnesene*, and massoilactone were the predominant constituents of the oil, when analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. The oil yield range was lower for the flowering plants. The composition of the oils did not vary qualitatively, linalool being the predominant compound. However, during the flowering period, the linalool content decreased, and *-farnesene* took its place as the principal signal in the chromatograms. GC chiral analysis showed the presence of a mixture of (l)- and (d)-linalool [(R)- and (S)-linalool respectively] in a proportion varying around 4:1 to 3:1 for all the samples; the higher values being reached during the flowering period, or close to that time. Vacuum distillation of the oil produced a lighter fraction containing up to 76 % of linalool. Other trace compounds were also characterized in the oil, as linalyl acetate, *a*-terpinenyl acetate, geranyl acetate, *a*-santalene and *cis*-*a*-bergamoptene. and more economical protocol did not affect ex



## Introdução

*Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng., uma espécie aromática de origem africana, conhecida no Brasil como “macaca” ou “catinga-de-mulata”, é utilizada pela medicina popular de alguns locais para afecções da pele e olhos, e também como anticonvulsivante. O perfil cromatográfico da fração volátil de *Aeollanthus suaveolens* revelou possuir o linalol e o trans- $\beta$ -farneseno como componentes majoritários (TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 2001). O óleo essencial também contém um derivado  $\delta$ -decalactona, ao qual, em conjunto com o linalol, é atribuída a propriedade sedativa da espécie (ELISABETSKY; MARSCHNER; SOUZA, 1995; SOUZA et al., 1997).

O álcool terciário linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) é uma das substâncias mais importantes na indústria de aromas, sendo um dos substitutos para o óleo de lavanda francesa ou da bergamota, pois sua forma levorotatória possui um odor similar a estes óleos. O linalol ocorre naturalmente em uma de suas formas óticas isoméricas, o 3R-(-)-linalol ou o 3S-(+)-linalol (Figura 1), que possuem odores distintos. O isômero levorotatório (licareol) possui um aroma de lavanda e flores frescas, com notas do lírio-do-vale, enquanto o dextrorotatório (coriandrol) possui um cheiro herbáceo, com tom de folhas envelhecidas; freqüentemente descrito como possuindo uma nota cítrica (KOPPENHOFER et al., 1994).

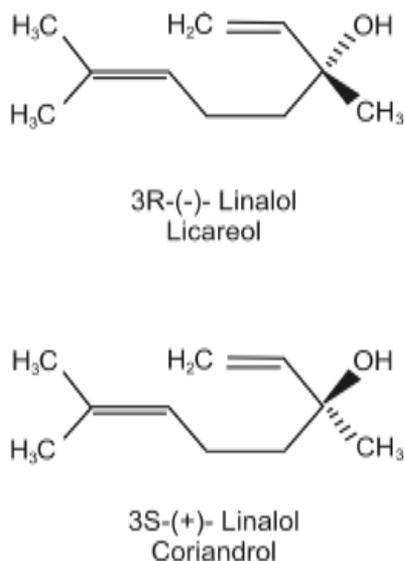


Figura 1 - Estruturas enantioméricas do linalol

A fonte natural mais importante de linalol ainda é a madeira do “pau-rosa”; termo popular pelo qual se designam espécies de lauráceas amazônicas do gênero *Aniba* (principalmente *Aniba duckei*). Estas árvores estão em alto risco de extinção devido à exploração irracional (COSTA; OHASHI; DANIEL, 1986; DIAS, 1998), e algumas alternativas de obtenção do linalol vêm sendo buscadas ultimamente (MAY; BARATA, 2004; SIANI et al., 2002). Ao lado do linalol sintético, de menor preço no mercado, outras fontes vegetais têm sido exploradas, como é o caso da espécie *Cinnamomum camphora*, originária do oriente, porém nenhuma delas atingindo a qualidade de aceitação do “pau-rosa” para o linalol. Entre as razões para isso, está a presença da cânfora como componente do óleo essencial, e as diferenças no buquê, muitas vezes determinadas por constituintes minoritários na essência. Por outro lado, as proporções variáveis entre as forma levo e a dextrorotatória do linalol presente também contribui decisivamente para a boa aceitabilidade do odor final (OHASHI et al., 1997).

O presente estudo aborda a constituição química do óleo essencial de *A. suaveolens*, assim como a resolução ótica do linalol como um de seus constituintes principais, visando a prospecção na fonte desta substância. O conteúdo e a pureza ótica do linalol no *A. suaveolens* foram avaliados através de amostras cultivadas no sudeste brasileiro. Os rendimentos foram medidos, e as composições químicas dos óleos essenciais foram analisadas por Cromatografia em Fase gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). A resolução enantiomérica do linalol foi efetuada por Cromatografia Quiral em fase Gasosa de Alta Resolução (CGAR-Quiral), após extração do óleo essencial durante quatro semanas consecutivas durante o período de floração, e oito semanas consecutivas no período não fértil (sem floração) do *A. suaveolens*. Também foram realizados experimentos de destilação a vácuo, com o objetivo de otimizar possíveis condições de recuperação de frações ricas em linalol.

## Materiais e Métodos

Material botânico, obtenção do óleo essencial e teor de água na planta. Um cultivar experimental de *A. suaveolens* foi constituído, no município do Rio de Janeiro, RJ (22° 56' 25" S; 43° 24' 18" W; altitude 8 m; pH do solo 5,5), a partir de mudas adquiridas no



mercado popular de Campo Grande, na periferia do município. Foram realizadas quatro coletas semanais consecutivas, da planta em floração, com cerca de seis meses de idade, atingindo cerca de 20-30 cm de altura. As coletas foram sempre efetuadas pela manhã, no mesmo horário do dia (8:00h). Estas coletas foram realizadas durante o mês de Maio de 2002, e foram denominadas C1, C2, C3 e C4, respectivamente. Os lotes de plantas frescas coletadas variaram entre 500 e 700 g. Oito lotes de plantas sem flores, variando entre 550 e 1100 g (C5 a C12), foram obtidos de um novo cultivar plantado no mesmo local, entre os meses de Novembro de 2001 e Fevereiro de 2002. Os lotes de plantas frescas, constituindo folhas e talos, foram destilados exaustivamente por arraste a vapor, durante 6 horas, seguidas de mais 2 horas no dia seguinte; usando-se um dispositivo de Clevenger modificado. Para cada amostra, o óleo foi separado da fase aquosa por centrifugação, selados em ampolas de cor âmbar, e armazenados em freezer (-5 °C) até a análise cromatográfica. Para o cálculo do teor de água na planta, vinte amostras frescas da planta foram secas em estufa a 50 °C durante 4 dias, até estabilização do peso do material, obtendo-se uma média de medidas em triplicatas. Em parte do experimento, os talos e as folhas foram separados previamente, antes do processo de secagem.

Índice de Refração e Destilação a vácuo. Uma seqüência de destilações a vácuo do óleo essencial de *A. suaveolens* foi efetuada, com o objetivo de se obter frações ricas em linalol. Para isso, foi utilizado um destilador de Kugelrohr (*ball-tube apparatus*, Aldrich), quando se variaram a temperatura (60 - 80 °C), a pressão (50 - 200 mbar) e o tempo de destilação (60 a 120 min), e utilizaram-se amostras entre 180 e 200 mg de óleo. Os índices de refrações das amostras foram obtidos em um equipamento Abbé termostaticado a 25 °C.

Análise por GC-EM. As amostras de óleo essencial foram analisadas em um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890 acoplado a um detector de massas, com uma coluna capilar HP-5 MS (30 m x d 0.32 mm x espessura de filme 0.25 µm). Foram injetadas alíquotas de 1 µL de uma solução de 2 mg de amostra em 500 µL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. As condições foram as seguintes: injetor a 250 °C, hélio como gás carreador (0.5 mL.min<sup>-1</sup>), fonte de íons a 250 °C e ionização por impacto de elétrons a 70 eV; temperatura do forno programada a partir de 70 °C, mantida por 5 min, seguida de elevação até 250 °C,

com de taxa de aquecimento to at 3 °C.min<sup>-1</sup>, e razão split/splitless 1:20. Os componentes individuais das amostras foram caracterizados por comparação dos espectros de massas gerados com a biblioteca eletrônica do equipamento (Library Software 59943B) e correspondência do Índice de Retenção, calculado conforme a literatura (ADAMS, 1995).

**Análise quiral do linalol.** Para a análise quiral do linalol presente nas amostras, foi utilizado um cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 serie II, equipado com um injetor splitless (260 °C), com detector por ionização de chama (280 °C). Os dados cromatográficos foram processados por uma Chemstation Plus Family (Agilent Technologies). A resolução enantiomérica do linalol foi efetuada usando-se uma coluna capilar quiral comercial BGB-176 (BGB Analytik AG) de 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm, com a temperatura do forno programada a partir de 100 °C (mantida por 8 minutos) até 170 °C (mantida por 10 minutos), com taxa de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup>. Foram injetadas alíquotas de 1 µL de soluções de 1 µL do óleo essencial in 300 µL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, com injetor a 260 °C e razão de split 1:50. Hidrogênio foi usado como gás carreador, a uma velocidade linear de 50 cm.s<sup>-1</sup>. Como padrões cromatográficos foram utilizados o linalol racêmico (Aldrich), l-linalol puro (Fluka), e d-linalol extraído e purificado de *Lippia alba* (SIANI et al., 2002). Os experimentos incluíram as co-injeções das doze amostras extraídas com cada padrão separadamente. Os excessos enantioméricos foram calculados considerando-se o pico total de linalol como 100%.

## Resultados e Discussão

O teor de água contido nas partes aéreas de *A. suaveolens* foi em média 91,4%, com a umidade das folhas excedendo a dos caules em 1,2%. Os rendimentos de óleo essencial, calculados a partir do total das partes aéreas frescas da planta ficou no intervalo de 0,07 a 0,29%. Este valor atinge um máximo de 0,11%, mas chega a atingir 0,43% quando apenas folhas são submetidas à extração; para as plantas com flores. Os rendimentos obtidos para os diversos experimentos realizados, assim como os respectivos Índices de Refrações, estão explícitos na Tabela 1. Os constituintes mais relevantes dos óleos estão sumarizados na Tabela 2. A predominância do linalol sobre o β-farnesene também foi observada na planta cultivada nos EUA (sementes provenientes da África) (TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 2001),





e também descrita em plantas frescas na região amazônica (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2003). No entanto, esta relação inverteu-se quando as plantas extraídas estavam no período de floração (Figuras 2 e 3). O fato desta inversão não ter sido causada pelo processo exaustivo de extração ficou aparente a partir da constatação de que amostras submetidas a um curto período de extração (2 h; rendimento 0,02%) produziram resultados similares (17% de linalol e 53% de farneseno). Embora os teores dos constituintes nas amostras tenham sido baseados nas proporções relativas das áreas nos cromatogramas, a utilização de condições uniformizadas de análise assegura as relações observadas entre linalol e  $\beta$ -farneseno nos diferentes períodos de coleta das plantas (Figura 3). Os valores de menor índice de refração corresponderam àqueles onde os conteúdos de massolactona foram os mínimos observados (< 3% para C11 e C12; Tabela 2; Figura 3); um ponto que pode ser importante para um futuro o controle de qualidade do óleo. Também as destilações Kugelrohr destas amostras (85% de rendimento do processo) permitiram a maior recuperação de linalol (76% a partir de C11) na fração mais leve. As melhores condições de destilação a vácuo foram aquelas realizadas sob temperatura de 60 °C e 50 mbar, durante 2h.

As análises quirais demonstraram ser o linalol do *A. suaveolens* constituído de uma mistura de R(-) e S-(+)-linalol nas proporções entre 2,8:1 (C4) a 3,4:1 (C1) para a planta em floração; e 2,4:1 a 3,2:1 para a planta sem flores. Um cromatograma típico dessas análises é exibido na Figura 4, onde se pode observar a ordem crescente de eluição no sentido (R) depois (S), ou l- depois d- linalol, com tempos de retenções 5,780 e 6,025 minutos, respectivamente, nas condições utilizadas; e resolução quiral  $RSch = 2,70$ . Também há evidências de que a produção do isômero R(-)-linalol aumenta, e conseqüentemente também o excesso enantiomérico (EE) (R):(S), con-

forme a planta se aproxima do período de floração. Este fato reflete o discreto aumento na proporção l:d, a partir da amostra C1 [EE (R:S) = 48,7] até a C4 [EE (R:S) = 54,5] (Tabela 2), com uma concomitante diminuição no rendimento do óleo. Por outro lado, durante o período não fértil da planta, há um aumento contínuo na relação l:d-linalol a partir de C5 [EE (R:S) = 38,5] até C8 [EE (R:S) = 48,8]; e de C9 [EE (R:S) = 43,1] a C12 [EE (R:S) = 52,2] (Tabela 2).

Tanto nas plantas com flores quanto naquelas sem flores, o aumento do rendimento de óleo essencial foi geralmente coincidente com o aumento do excesso enantiomérico, durante cada coleta semanal sucessiva. Estes resultados demonstram que a proporção de l-linalol [licareol, forma R(-)] sempre suplanta o d-linalol [coriandrol, forma S-(+)], de maneira análoga ao linalol proveniente do "pau-rosa", utilizado na perfumaria, e que possui a melhor qualidade e o valor de mercado mais alto (OHASHI et al., 1997). A inversão na produção de linalol e trans- $\beta$ -farneseno pela planta durante o período de floração poderia estar relacionado com alguns dos efeitos deste último, como estimulante alimentar de alguns tipos de insetos; fato que poderia ser útil no processo de polinização (TESH; GUZMAN; WILSON, 1992). Por outro lado, deve-se mencionar também que o linalol [especificamente sua forma S-(+)] age como feromônio de atração dos machos de determinada espécie de abelhas (BORG-KARLSON et al., 2003). Estes resultados, tomados em conjunto, demonstram que o período das plantas sem flores é o mais indicado para se obter os maiores teores de linalol na espécie *A. suaveolens*. O refinamento dos experimentos envolvendo o enriquecimento e a purificação do linalol a partir do óleo essencial desta espécie pode representar uma alternativa a ser explorada para o suprimento de linalol de qualidade altamente aceitável a partir de fontes naturais.

Tabela 1 - Rendimentos dos Óleos<sup>a</sup> para os diferentes períodos de coleta e respectivos Índices de Refrações.

Coleta	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10		
C11	C12											
<sup>b</sup> Rendimento do óleo (%)	0,09	0,10	0,11	0,07	0,13	0,11	0,16	0,17	0,17	0,25	0,22	0,29

<sup>a</sup>As coletas consecutivas C1 a C2 referem-se ao período de floração da planta; as coletas C8 a C12 referem-se ao período não-fértil da planta.

<sup>b</sup>Calculado com base na massa de plantas frescas.

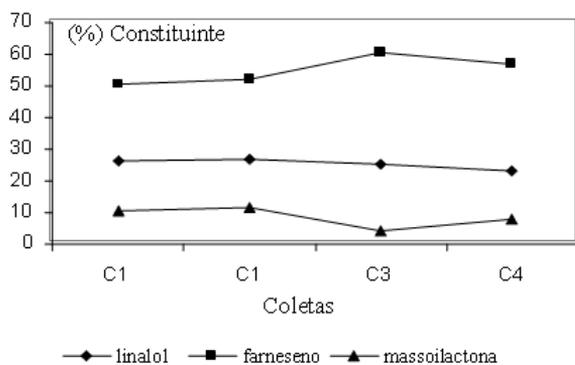
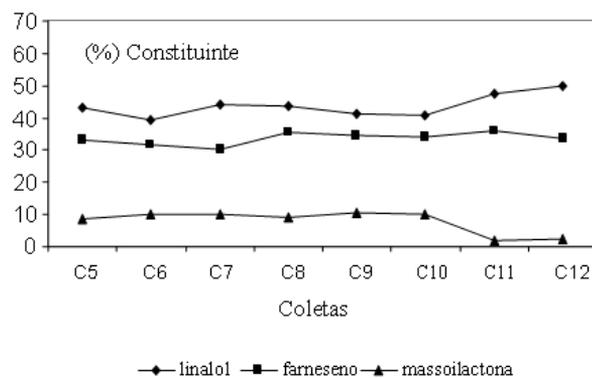
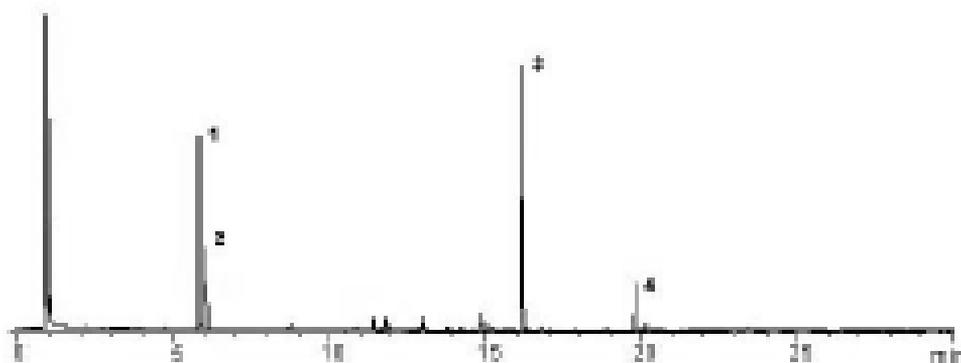
Tabela 2 - Abundância relativa<sup>a</sup> dos constituintes mais relevantes do óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* e cálculo do Excesso Enantiomérico (EE) na composição do linalol.

<sup>b</sup> Constituinte	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	IR/ <sup>c</sup> Lit.
Linalol	26,6	27,0	25,0	23,3	42,9	39,2	43,9	40,7	41,1	49,0	47,5	49,1	1100/1098
$\alpha$ -terpineol 1193/1189	2,46	3,06	4,03	4,95	3,51	3,12		3,23	3,05	3,00	3,07	3,03	3,07
trans-geraniol 3,76 1249/1255	4,71	2,23		0,98	1,05	2,88	2,93			3,45	3,04	2,70	2,56 2,94
trans- $\alpha$ - -bergamopteno 1429/1436	1,43	1,18		1,52	1,17	0,73	0,74	0,86	0,99	0,89	0,95	1,00	0,93
trans- $\beta$ - -farneseno	50,7	52,2	60,6	56,8	33,3	31,7	30,2	35,4	34,4	34,1	35,9	33,8	1453/1458
massoilactona	10,9	11,4	4,06	7,89	8,84	18,2	10,3	9,28	10,5	10,2	1,78	2,44	1469/nd <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Calculado com base nas áreas relativas dos sinais nos cromatogramas (injeções de 1  $\mu$ l de uma solução de 2 mg em 500  $\mu$ l de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

<sup>b</sup>Outros constituintes minoritários (< 1%) foram caracterizados: acetato de linalila, acetato de -terpinenila, acetato de geraniila, -santaleno e cis- -bergamopteno.

<sup>c</sup>IR: Índice de Retenção; ver Adams (1995);

Figura 2 - Variabilidade dos principais constituintes no óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* durante o período de floração.Figura 3 - Variabilidade dos principais constituintes no óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* durante o período não-fértil.Figura 3 - Resolução quiral do linalol no óleo de *Aeollanthus suaveolens* (amostra C5): 1 = R(-)-linalol; 2 = S-(+)-linalol, 3 = trans- $\beta$ -farneseno; 4 = massoilactona. Para as condições cromatográficas, ver seção de Materiais e Métodos.



## Referências

1. ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, 1995.
2. BORG-KARLSON, A.K.; TENGÖ, J.; VALTEROVÁ, I.; UNELIUS, C.R.; TAGHIZADEH, T.; TOLASCH, T.; FRANCKE, W. (S)-(+)-Linalool, a mate attractant pheromone component in the bee *Colletes cunicularius*. *Journal of Chemical Ecology*, v.29, p.1-14, 2003.
3. COSTA, L.G.S.; OHASHI, S.T.; DANIEL, O. Databook on endaged tree and shrub species and provenances. Roma: ed.FAO, Roma, p.60-68, 1986.
4. DIAS, B.F.S. Primeiro Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica do Brasil. Brasília: ed.COBIO: Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, p.283, 1998.
5. ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; SOUZA, D.O. Effects of Linalool on Glutamatergic System in the Rat Cerebral Cortex. *Neurochemical Research*, v.20, p.461-465, 1995.
6. KOPPENHOEFER, B.; BEHNISCH, R.; EPPERLEIN, U.; HOLZSCHUH, H.; BERNREUTHER, A. Enantiomeric odor differences and gas chromatographic properties of flavors and fragrances. *Perfumer & Flavorist*, v.19, p.1-14, 1994.
7. MAIA, J.G.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H. Essential oil of *Acollanthus suaveolens* Matt. Ex-Spreng. *Journal of Essential Oil Research*, v.15, p.86-87, 2003.
8. MAY, P.H.; BARATA, L.E.S. Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: options for sustainable production. *Economic Botany*, v.58, n.2, p.257-265, 2004.
9. OHASHI, S.T.; ROSA, L.S.; SANTANA, J.A.; GREEN, C.L. Brazilian Rosewood Oil: Sustainable Production and Oil Quality Management. *Perfumer and Flavorist*, v.22, p.1-5, 1997.
10. SIANI, A.C.; TAPPIN, M.R.R.; RAMOS, M.F.S.; MAZZEI, J.L.; RAMOS, M.C.K.V.; AQUINO-NETO, F.R.; FRIGHETTO, N. Linalool from *Lippia alba*: Study of the Reproducibility of the Essential Oil Profile and the Enantiomeric Purity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.50, p.3518-3521, 2002.
11. SOUZA, G.P.C.; ELISABETSKY, E.; NUNES, D.S.; RABELO, S.K.L.; SILVA, M.N. Anticonvulsant properties of  $\gamma$ -decanolactone in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.58, p.175-181, 1997.
12. TESH, R.B.; GUZMAN, H.; WILSON, M.L. Trans-beta-Farnesene as a feeding stimulant for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, v.29, p. 226-231, 1992.
13. TUCKER, A.O.; MACIARELLO, M.J.; ALKIRE, B. Essential oil of *Acollanthus suaveolens* Matt. Ex-Spreng (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v.13, p.198-199, 2001.

