

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Estudos da Classificação de Óleos Essenciais com
uso Combinado de Cromatografia Gasosa e Métodos
Quimiométricos**

**Dissertação de Mestrado
Gláucia Falleiros Pini**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Pires Valente
Campinas, 1995



UNIDADE	IG
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	P655e
V.	
TOMOS	26210
FRONTE	933/95
PREÇO	R\$ 12,00
DATA	02/12/95
N.º CPU	



CM-00081022-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA UNICAMP

Pini, Glaucia Falleiros
P655e Estudos da classificação de óleos essenciais com uso combinado de cromatografia gasosa e métodos quimiométricos
Glaucia Falleiros Pini. -- Campinas, [SP : s.n.], 1995.

Orientador: Antonio Luiz Pires Valente.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Cromatografia gasosa. 2. Óleos essenciais. 3. Quimiometria. I. Valente, Antonio Luiz Pires. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

*Aos meus pais, Estela e Hermano,
por tudo que me ensinaram e
que continuam ensinando.*

*Ao meu "maridão" Dimar,
por todo incentivo,apoio,compreensão e
principalmente, amor e paciência.*

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Antonio Luiz Pires Valente pela sua orientação, apoio, discussão e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.
- À Larisse, Eduardo e Fabio pelo incentivo.
- À todos os professores e funcionários do Instituto de Química, que de diversas maneiras contribuíram para a realização deste trabalho.
- À todos os amigos de dentro da UNICAMP e de fora que me ajudaram de alguma forma.
- Ao Instituto de Química da UNICAMP pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho.
- Ao CNPQ pela bolsa de estudos.

ÍNDICE GERAL

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iii
Índice Geral	iv
Índice de Figuras e Tabelas	v
Resumo	vii
Abstract	viii
I - Introdução e Objetivos	1
I.1 - Introdução	1
I.2 - Objetivos	2
II - Fundamentação do Trabalho	3
II.1 - Óleos Essenciais	3
II.2 - Análise Cromatográfica de Misturas Complexas	4
II.3 - Métodos Quimiométricos	4
II.3.1 - Método de Análise de Componentes Principais	6
II.3.2 - Métodos de Classificação	6
II.4 - Sistema de Índices de Retenção	7
II.5 - Cromatografia Gasosa Combinada com Espectroscopia de Massas	8
III - Trabalhos Prévios à Análise de Óleos Essenciais	9
III.1 - Adaptação e Operacionalização do Cromatógrafo PU-104 para uso do DIC com Colunas Capilares "Megabore"	9
III.2 - Calibrações do Cromatógrafo	9
III.3 - Teste de Desempenho do Cromatógrafo	11
IV - Análise por Cromatografia Gasosa e Tratamento dos Dados para o Cálculo dos Índices de Retenção Modificados	13
IV.1 - Análise Cromatográfica	13
IV.2 - Tratamento Estatístico dos Dados do Sistema de Índices de Retenção Modificados	14
IV.2.1 - Cálculo dos Índices de Retenção Modificados (IRM)	15
IV.2.2 - Método de Rejeição dos Dados de Retenção da Mistura de Referência, t'_R e $t_{(Raj)}$	16
IV.2.3 - Avaliação dos Dados de Retenção e Detecção de Problemas Instrumentais	18
V - Métodos de Reconhecimento de Padrões	20
V.1 - Definição dos Dados a serem usados na Metodologia Quimiométrica	20
V.2 - Medidas de Similaridade entre 38 Óleos Essenciais	23
V.3 - Aplicação dos Métodos de Classificação a um conjunto de 38 Óleos Essenciais	25
V.4 - Aplicação dos Métodos de Classificação a 53 Óleos Essenciais	27
V.4.1 - Reanálise Quimiométrica do Grupo 1 da Tabela V.5	29
V.4.2 - Avaliação dos Resultados das Classificações para os Grupos 2 a 6 da Tabela V.5	33
VI - Análise de Alguns Óleos Essenciais por CG-EM	35
VII - Comparação entre os Tempos de Retenção de Cromatógrafos	37
VIII - Conclusões	40
IX - Bibliografia	41
X - Apêndices	44

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figuras:

II.1 - Esquema de Montagem da Matriz de Dados	5
III.1 - Curva de Calibração: Vazão de Hidrogênio versus Pressão	10
III.2 - Curva de Calibração: Vazão de ar versus Pressão	10
III.3 - Curva de Calibração: Vazão de Hélio versus Pressão	11
III.4 - Curva de Van Deemter para o Álcool Benzílico	12
IV.1 - Curva da Mistura de Referência para o Cálculo de Índices de Retenção Modificados dos Óleos Utilizando o Tempo de Retenção Ajustado com Butano	15
IV.2 - Curva da Mistura de Referência para o Cálculo de Índices de Retenção Modificados dos Óleos Utilizando o Tempo de Retenção Ajustado pelo Solvente	16
IV.3 - Gráfico do Teste de Huber para Rejeição de Dados das Curvas da Mistura de Referência para o Cálculo dos Índices de Retenção Modificados	17
IV.4 - Comparação dos Cromatogramas dos Óleos de Laranja e Gerânio Algerian	18
V.1 - Estudo dos Perfis Cromatográficos dos Óleos Essenciais de Lavandin Abrialis e Lavandin Absoluto	21
V.2 - Fragmento da Matriz de Dados que Utiliza como Objeto os Óleos, como Variáveis as Substâncias e como Dados da Matriz os Valores de Área dos Picos Cromatográficos	23
V.3 - Organização da Matriz de Dados para Fins de Classificação	25
V.4 - Gráfico Bidimensional dos "Scores" Obtidos para as Categorias da Tabela V.4	26
V.5 - Figura Tridimensional dos Agrupamentos Apresentados na Tabela V.3	28
V.6 - Gráfico do Teste de Huber para Rejeição de Dados das Curvas da Mistura de Referência para o Cálculo dos Índices de Rejeição Modificados para os Óleos do Grupo 1	31
V.7 - Gráfico Tridimensional dos "Scores" dos Óleos Presentes no Grupo 1	32

Tabelas:

III.1 - Vazões Ótimas para o Máximo de Eficiência Cromatográfica	12
IV.1 - Condições Cromatográficas Utilizadas para a Análise dos 53 Óleos Essenciais	14
V.1 - Correlação entre os Índices de Retenção, os Picos Cromatográficos e as Porcentagens de Áreos Picos Cromatográficos	22
V.2 - Áreas das Substâncias de Quinze Picos Cromatográficos do Óleo de Lavandin Absoluto	22
V.3 - Agrupamentos por Categoria de Trinta Óleos Essenciais pelo Parâmetro Similaridade	24
V.4 - Agrupamento de Trinta e Oito Óleos Essenciais pela Análise Quimiométrica	25
V.5 - Agrupamento de Cinquenta e Cinco Óleos Essenciais pela Análise Quimiométrica	29
V.6 - Condições Cromatográficas para Análise dos 14 Óleos Essenciais do Grupo 1	30
V.7 - Constituintes Dominantes nos Óleos do Grupo 1 da Tabela V.5 e Reagrupamento Após Reanálise Quimiométrica	33
V.8 - Constituintes Dominantes nos Óleos do Grupo 2 da Tabela V.5	34
V.9 - Constituintes Dominantes nos Óleos do Grupo 5 da Tabela V.5	35

VI.1 - Condições Cromatográficas na Análise por CG-EM	35
VI.2 - CG-EM: Principais Fragmentos e suas Intensidades Relativas para os Compostos dos Óleos Essenciais	36
VI.3 - Identificação dos Compostos por Comparação de seus Espectro de Massas com Dados da Literatura	
VII.1 - Dados Obtidos com Cromatógrafo HP-5890 Acoplado a um EM	38
VII.2 - Dados Obtidos com Cromatógrafo HP-5890 com Detector por Ionização em Chama	38
VII.3 - Dados Obtidos com Cromatógrafo Pye-Unicam com Detector por Ionização em Chama....	38
VII.4 - Dados Obtidos com Cromatógrafo Pye-Unicam, após Rejeição de Dados	39

RESUMO

Estudou-se a classificação tentativa de óleos essenciais por meio de métodos de reconhecimento de padrões aplicados a dados de cromatografia gasosa de alta resolução. Os dados utilizados foram os Índices de Retenção Modificados segundo Kratz & Van Den Dool (IRM) e as áreas de picos representativos dos cromatogramas de cinquenta e três óleos.

Trinta e oito óleos foram selecionados para constituição do conjunto de treinamento, que foi tratado por análise de componentes principais (PCA) e cálculos de valores de Distância e Similaridade, resultando no agrupamento de trinta óleos em seis categorias. Após escalonamento dos dados pelo programa SCAL, os oito óleos restantes foram alocados pelo programa SIMCA nas categorias definidas e as alocações foram confirmadas pelo programa KNN. Os demais quinze óleos, considerados como conjunto de teste, foram alocados nas seis categorias definidas para o conjunto de treinamento após tratamento pelo mesmo procedimento.

A coerência das classificações foi verificada utilizando-se dados da literatura sobre os constituintes dos óleos essenciais utilizados. Os espectros de massas, obtidos por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM), para componentes de cinco óleos representativos dos agrupamentos definidos quimiometricamente, confirmou a presença de constituintes citados na literatura.

Os agrupamentos coerentes para os cinquenta e três óleos essenciais demonstra que a sistemática de tratamento quimiométrico de dados cromatográficos é potencialmente útil como método de pré-especação para classificações.

ABSTRACT

A study was undertaken to develop a method for the classification of fifty-three essential oils using data obtained with high resolution gas chromatography and data analysis through pattern recognition. Fifty-three essential oils and a mixture of eleven n-alkanes were chromatographed for the calculation of the Kratz and Van Den Dool Modified Retention Indices (MRI) of fifteen chromatographic peaks of each essential oil. The MRI and the areas of the chromatographic peaks were used as the classification parameters that were computationally treated by chemometric methods.

In a first approach, a principal components analysis (PCA) was applied to thirty-eight of the oils and thirty oils were grouped into six categories by similarity (e.g. the citric oils belonging to a same group). The remaining eight oils were also grouped among the pre-determined categories with the use of the programs Soft Independent Modeling of Class Analogies (SIMCA) and K-Nearest Neighbor (KNN). Consequently these thirty-eight oils were considered as the training set for the chemometric studies. The same chemometric programs were then applied to the test set made up of the remaining fifteen oils which were grouped amongst the same six categories as the training set.

The coherence of the chemometric classification of the studied essential oils was accessed by means of a literature search that revealed that for most cases the oils in each category are expected to have common chemical components. For five essential oils some of the expected chemical components were confirmed after their analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Thus, due to the coherence observed within the groupings generated for the 53 essential oils studied it may be concluded that the classification methodology employed may successfully be exploited as an auxiliary speciation tool in the analysis of essential oils.

I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.

I.1- Introdução.

Os propósitos da análise de óleos essenciais são numerosos; por exemplo, pode-se querer estabelecer a composição química parcial ou completa dos óleos ou testar suas qualidades e purezas, ou determinar as quantidades de certos de seus componentes e etc^[1]. A cromatografia gasosa de alta resolução tem sido usada com êxito em muitos destes casos, pela capacidade de resolução das amostras cromatograficamente complexas que são os óleos essenciais.

Entre as amostras "cromatograficamente complexas" encontram-se as que apresentam muitos picos e que, por isto, demandam realizar muitos ensaios para otimizar a resolução, objetivando tempos de análise curtos e obtenção de dados que permitam identificar e quantificar os componentes da amostra^[2]. Esta tarefa, que está longe de ser trivial, inclui o uso de programação da temperatura da coluna cromatográfica, para discriminar compostos cujos comportamentos cromatográficos não são muito diferentes. A programação da temperatura é necessária para análise dos óleos essenciais, que são misturas de muitos componentes^[3]. Também é importante para análise de óleos essenciais o uso de colunas cromatográficas de altas resoluções - tipicamente as colunas capilares^[2]. Outro auxílio importante é a adequação da seletividade (escolha da fase estacionária), pois os óleos essenciais podem ter componentes de polaridades e, conseqüentemente, comportamentos cromatográficos bastante variados^[4].

O detector mais utilizado para a análise dos óleos essenciais é o detector por ionização em chama, que é universal para compostos orgânicos. Utilizando-se um detector universal, o parâmetro cromatográfico fundamental de "identificação tentativa" é o tempo, ou volume, de retenção. O tempo de retenção é um parâmetro sujeito a incertezas devidas a vários fatores experimentais, entre eles a temperatura da coluna e a vazão do gás de arraste. Uma das formas de minimizar os problemas de repetibilidade do tempo de retenção é expressá-lo de forma relativa a um ou mais solutos de referência, como pelo Sistema de Índice de Retenção de Kováts^[1,5]. No sistema de Kováts os Índices de Retenção são baseados nos números de átomos de carbono dos compostos, porque são interpolados entre os Índices conhecidos de hidrocarbonetos de cadeia aberta e saturados, de séries homólogas, que são cromatografados nas mesmas condições da amostra. Os Índices de Kováts são definidos para separação cromatográfica isotérmica^[1].

O desenvolvimento da química analítica tem sido caracterizado por uma considerável interação com outros ramos da ciência^[1], como é o caso do uso combinado de técnicas cromatográficas com métodos estatísticos de quimiometria. Alguns exemplos de tais aplicações são: classificações de óleos essenciais de acordo com o grau de maturidade dos frutos^[6], identificação de óleos essenciais em perfumes^[7], classificação de petróleo de acordo com sua origem^[8], análise de petróleo de acordo com seus componentes^[9]. Esta associação de cromatografia com métodos quimiométricos foi utilizada neste trabalho com o propósito de classificação de óleos essenciais, por agrupamento dos mesmos em categorias que revelassem similaridades coerentes, como a presença de componentes químicos comuns aos óleos agrupados.

Os estudos foram desenvolvidos com 53 óleos essenciais. O parâmetro cromatográfico que foi utilizado nos ensaios de classificação é baseado no Sistema de Índice de Retenção Modificado (IRM), desenvolvidos para cálculos de retenção obtidos com temperatura programada do forno da coluna (Kratz & Van Den Dool ^[5,10]), o que foi utilizado para as análises cromatográficas deste trabalho.

Após realizar os ensaios para definição das condições analíticas e os trabalhos de caracterização do cromatógrafo, que foi adaptado para uso com colunas capilares, os 53 óleos e os hidrocarbonetos homólogos do sistema de referência foram cromatografados, os IRM foram calculados e classificações tentativas foram realizadas utilizando-se o método quimiométrico de reconhecimento de padrões ^[11, 12, 13] que, em sua aplicação química, utiliza um conjunto de amostras de diferentes categorias (amostras tendo uma mesma propriedade) e medidas feitas nas amostras. É possível encontrar e/ou prever propriedades das amostras que não sejam diretamente medidas. O termo propriedade pode se referir a cheiro, reatividade ou efeito carcinogênico de amostras ^[14]. As amostras com categorias conhecidas pertencem ao conjunto chamado de treinamento ou de referência, do qual informações são extraídas para tornar possível a classificação de novos objetos, chamadas de conjunto de teste, com base nas mesmas medidas feitas para estes objetos. Em algumas aplicações, estas informações são usadas para classificar um conjunto de objetos adicionais, onde se conhecem as medidas, mas as categorias não são conhecidas ^[11].

Os resultados sugeriram a necessidade de estudos de rejeição de resultados, por causa de variações dos IRM, para o que foram realizados vários ensaios com métodos estatísticos. Os resultados da reaplicação do método de reconhecimento de padrões aos IRM não rejeitados, confirmou a utilidade deste procedimento. Foi feita também uma classificação prévia dos óleos utilizando planilhas eletrônicas para cálculo de valores de Distância e Similaridade entre os óleos, para posterior análise utilizando os métodos quimiométricos propriamente ditos.

1.2 - Objetivos.

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Estudar a viabilidade de aplicação dos métodos de reconhecimento de padrões para classificação de óleos essenciais, com base na análise por cromatografia gasosa, utilizando como parâmetros cromatográficos os Índices de Retenção Modificados (IRM) e as áreas cromatográficas.
- b) Estabelecer um conjunto de categorias para os óleos estudados que possa ser usado para estabelecer se óleos essenciais de origem desconhecida pertencem a estas.
- c) Realizar identificações tentativas, através de recursos de CG-EM, de substâncias químicas dos óleos que sejam indicadoras do tipo de óleo estudado.

II- FUNDAMENTAÇÃO DO TRABALHO

II.1 - Óleos Essenciais

Sabe-se há muitos séculos que as fragrâncias de plantas estão associadas com líquidos voláteis, que podem ser extraídos das folhas, frutos, flores e outras partes das plantas. Estes líquidos são chamados de óleos voláteis, ou óleos essenciais. Estes óleos foram primeiramente isolados através de aquecimento brando e pressão; por volta do século XVI, através de destilação por arraste de vapor. Atualmente, estes materiais são obtidos por extração com solventes ^[15].

Os óleos essenciais são utilizados na fabricação de diversos produtos alimentícios (bolos, doces, gelatinas, sorvetes e etc), assim como em bebidas alcoólicas e não-alcoólicas. São também empregados em produtos farmacêuticos, loções, perfumes, águas de cheiro e produtos de higiene pessoal em geral (pastas de dentes, sabonetes, etc). Os óleos mais utilizados para estes fins são os óleos essenciais de limão, laranja, bergamota, lima, lavanda, menta e alcarávia ^[16].

O interesse pela constituição química dos óleos essenciais levou, no século XIX, à constatação de que eles são formados por misturas complexas de compostos acíclicos, alicíclicos, aromáticos e heterocíclicos, abrangendo uma larga faixa de grupos funcionais e volatilidades ^[15,17]. Existem similaridades entre os óleos essenciais que possibilitam classificar seus componentes em quatro grupos: a) o dos compostos contendo enxofre e nitrogênio; b) o dos compostos aromáticos; c) o dos compostos não ramificados e de cadeia longa e d) o dos terpenos. De fato, o termo terpenóide é mais apropriado do que terpenos, por abranger substâncias com grande variedade de grupos funcionais, que estão estruturalmente relacionados com os terpenos simples ^[15].

Os terpenóides formam um grupo extenso e de grande interesse químico dentre os produtos naturais. Eles são classificáveis, na base de unidades do composto isopreno, como monoterpenóides (C_{10}), sesquiterpenóides (C_{15}), diterpenóides (C_{20}), sesterpenóides (C_{25}), triterpenóides (C_{30}), tetraterpenóides (ou carotenóides) (C_{40}) e politerpenóides (borracha) ($>C_{40}$) ^[17]. Em 1887 Wallach propôs a Regra do Isopreno para distinguir entre monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que em poucos anos a estrutura de muitos compostos já era conhecida. Por exemplo: em 1893 foi definida a estrutura da cânfora por Bredt; a estrutura do α -pineno foi proposta por Wagner em 1894 e a do citral em 1895 por Tiemann e Semmler. Barbier e Bouveault sintetizaram pela primeira vez o citral em 1896 e Thorpe, em 1904, sintetizou a cânfora ^[17]. A Regra do Isopreno diz que para ser um terpenóide, o composto deve ter um esqueleto de carbono composto de unidades de isopreno (ou isopentano) ligadas na forma cabeça-cauda. No entanto, existem substâncias que, por origem e estrutura devem ser classificadas como terpenóides, apesar de não terem os números de carbonos múltiplos de 5, isto é, que não são formadas por unidades de isopentano. A existência desses terpenóides não-isoprenóides é explicada pela Regra do Isopreno Biogenético (1953) ^[17], segundo a qual tais substâncias são formadas nas plantas a partir de precursores isoprenóides, pela remoção ou adição de um ou mais segmentos, ou por um rearranjo molecular, ou pela combinação desses processos ^[1]. Atualmente é sabido que os terpenóides não se formam na Natureza a partir do isopreno (nunca encontrado como produto natural); o precursor dos terpenóides é o ácido mevalônico, um composto isolado em 1956 ^[18].

II.2 - Análise Cromatográfica de misturas complexas.

Para a análise cromatográfica de amostras cujos componentes possuem uma larga faixa de pontos de ebulição deve-se utilizar programação de temperatura, isto é, a mudança controlada de temperatura da coluna durante a análise. A programação de temperatura é utilizada para simplificar e/ou acelerar a separação, que é condição básica para quantificação e identificação dos componentes da amostra. Na análise de óleos essenciais é necessário iniciar com temperaturas baixas, para separar os componentes voláteis, que são aumentadas controladamente para a separação dos componentes de pontos de ebulição mais elevados ^[13].

Na análise de óleos essenciais o detector por ionização em chama (DIC) é o mais usado, porque responde a todos os compostos orgânicos com alta sensibilidade e é muito estável, sendo insensível a mudanças de vazão, pressão ou temperatura. Por isto o DIC requer poucos ajustes antes de sua utilização ^[12], o que o torna altamente conveniente para análises em que não existe interesse de discriminar picos por seletividade ou sensibilidade de detecção.

A cromatografia gasosa de alta resolução é, atualmente, o método mais indicado para a separação dos componentes das misturas complexas, como os óleos essenciais, devido às altas eficiências típicas desta técnica ^[1,2,6]. A eficiência de separação das substâncias presentes em uma amostra é medida em termos de número de pratos teóricos, que corresponde a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de pratos teóricos, maior será a eficiência (picos mais estreitos) ^[19]. Van Deemter^[20] desenvolveu uma equação (Equação II.1) que relaciona a altura equivalente a um prato teórico, H , (que é a razão entre o comprimento da coluna e o número de pratos teóricos), a velocidade linear do gás de arraste, u , e fatores que provocam o alargamento de picos, A , B e C :

$$H = A + B/u + Cu \quad (\text{equação II.1})$$

onde u é definido como sendo a razão entre o comprimento da coluna e o tempo gasto pela passagem de um gás inerte através dela ^[19].

Também é importante considerar o uso de tipos diferentes de fases estacionárias, porque os óleos essenciais podem ser não-polares e polares. Óleos não-polares são aqueles em que a quantidade de mono e sesquiterpenos é maior que 80% em relação aos outros componentes e os óleos polares aqueles em que predominam compostos oxigenados ^[4].

II.3 - Métodos Quimiométricos

Os recursos dos métodos computacionais que incorporam as técnicas instrumentais modernas, facilitam o tratamento de dados matemáticos e estatísticos, para relacionar os sinais obtidos com os resultados desejados. Muita ênfase tem sido dada aos Sistemas de Análise Multivariada que, por permitirem processar e correlacionar muitas variáveis simultaneamente, são muito poderosos para a interpretação dos dados e aquisição do máximo de informações sobre o sistema analítico^[11].

A quimiometria é a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experiências e, também, permitir a obtenção do máximo de informações a partir da análise de dados químicos. Aplicações de métodos quimiométricos, como simplex e reconhecimento de padrões, para avaliação qualitativa e quantitativa de cromatogramas de misturas complexas, tem sido estudadas ^[13].

De maneira geral, o conjunto de dados químicos (em nosso caso, cromatográficos) consiste de n objetos, descritos por p variáveis. Os objetos químicos típicos são amostras analisadas (no nosso caso, os óleos essenciais) e as variáveis são as medidas efetuadas sobre os constituintes químicos dos objetos (por exemplo as alturas de picos cromatográficos, as concentrações de componentes, etc). Um aspecto importante é que as medidas (variáveis) efetuadas sobre as amostras (objetos) devem ser do mesmo tipo para todos os objetos ^[11].

O conjunto de dados pode ser representado na forma de uma matriz com n linhas e p colunas, figura II.1, onde cada elemento da matriz, X_{ki} , representa o valor da i -ésima variável para o k -ésimo objeto.

	1	2	i		p
1	X_{11}	X_{12}	X_{1i}		X_{1p}
2	X_{21}	X_{22}	X_{2i}		X_{2p}
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$		$\vdots$
k	X_{k1}	X_{k2}	X_{ki}		X_{kp}
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$		$\vdots$
n	X_{n1}	X_{n2}	X_{ni}		X_{np}

Figura II.1: Matriz de dados. O elemento X_{ki} corresponde ao valor da variável i para a amostra k .

A medida de Similaridade constitui uma grandeza fundamental nos métodos de reconhecimento de padrões. Para se obter uma estimativa da semelhança entre dois pontos k e j no espaço p basta calcular a Distância euclidiana simples entre eles definida pela equação II.2.

$$d_{kj} = \left[\sum_{i=1}^p (x_{ki} - x_{ji})^2 \right]^{1/2} \quad (\text{equação II.2})$$

onde o somatório é feito sobre as p medidas. Considera-se que quanto menor a Distância entre os pontos, maior a Similaridade entre as amostras representadas por eles. A similaridade é convenientemente definida pela equação II.3.

$$S_{kj} = 1 - d_{kj} / (d_{kj})_{\text{máx.}} \quad (\text{equação II.3})$$

onde $(d_{kj})_{\text{MÁX}}$ é a maior distância entre dois pontos quaisquer no espaço p -dimensional. Para objetos idênticos $S_{kj} = 1$, enquanto que $S_{kj} = 0$ corresponde a dois pontos separados pela maior distância constatada no conjunto estudado ^[11].

Na análise de reconhecimento de padrões em termos de modelos de classe (categorias), admite-se que os objetos situados em uma mesma classe sejam similares. Chama-se conjunto de treinamento os objetos que formam a classe de mesma similaridade e de conjunto de teste aqueles que serão classificados, sendo ajustados para todos os modelos de classe já parametrizados e classificados de acordo com o modelo que melhor os ajusta. A possibilidade de que o objeto não classificado não se ajuste a nenhum dos modelos de classe previamente estabelecidos não deve ser descartada ^[12].

II.3.1 - Método de Análise de Componentes Principais

Entre os métodos de reconhecimento de padrões convém distinguir o método de Análise de Componentes Principais (PCA) dos métodos de classificação. A finalidade do PCA é gerar novas variáveis (chamadas de componentes principais) a partir das variáveis originais; então as novas variáveis são usadas para analisar os dados por meio de algum tipo de projeção geométrica ou representação. Os dados originais são algumas vezes redundantes, porque contém várias correlações entre as variáveis e entre objetos. Em PCA as novas variáveis são calculadas levando em conta as correlações presentes nos dados, mas elas mesmas não são correlacionadas entre si. Com isso, a estrutura dos dados torna-se aparente no espaço destas novas variáveis, podendo ser mais facilmente interpretada ^[11]. Por outro lado, a finalidade dos métodos de classificação é desenvolver regras de decisão ou funções de classificação ^[11]. Desta forma, pode-se concluir que o PCA tem o poder de estimar a estrutura da correlação existente entre variáveis. O PCA foi introduzido na química por Malinowski em 1960^[21] e a partir de 1970 um grande número de trabalhos sobre aplicações químicas foram publicados, principalmente por Kowalski^[22]. Em geral quase todas as matrizes de dados podem ser simplificadas por PCA, desde que estejam devidamente escalonadas.

II.3.2 - Métodos de Classificação

Um método de reconhecimento de padrões baseia-se em componentes (estatísticos) principais típicos de classes de objetos. Novos objetos são probabilisticamente classificados de acordo com seus ajustes (e separados pela falta de ajuste) aos modelos de classe^[12]. Esta é a base do método SIMCA ("Soft Independent Modeling of Class Analogies"), que apresenta notáveis vantagens em relação a métodos de classificação como a Análise de Discriminante Linear (LDA), a Máquina de Aprendizagem Linear (LLM) e a Regra do Vizinho mais Próximo (KNN). Um título mais descritivo para o SIMCA seria "Modelos Independentes de Similaridade Utilizando Componentes Principais".

No método SIMCA os dados do conjunto de treinamento são utilizados para determinar o modelo de cada categoria. Para a determinação do número apropriado de componentes principais para cada categoria pode-se utilizar técnicas de "Cross Validation", sendo que o número de componentes necessários para descrever os dados pode variar de uma categoria para a outra, dependendo do grau de complexidade da estrutura dos dados em cada caso. O modelo aplicado a cada categoria é totalmente independente dos modelos das outras. O SIMCA é capaz de localizar quando um ponto referente a uma amostra não pertence a nenhuma das categorias classificadas,

indicando-o como um ponto deslocado, ou anômalo ("outlier"), ou membro potencial de uma categoria ainda não definida. O SIMCA pode ser empregado em casos onde o número de amostras, n , é bem menor que o de variáveis, p ^[23].

Convém salientar outro método de classificação, o KNN (K-Nearest Neighbor), que geralmente é utilizado como um método complementar, para confirmar as classificações realizadas pelo SIMCA. No KNN utiliza-se um conjunto de treinamento para distribuir os pontos entre as classes, sendo cada ponto classificado na mesma categoria do seu vizinho mais próximo. É interessante utilizar mais do que um vizinho mais próximo, pelo que as rotinas de classificação dos programas de computador determinam normalmente o "K vizinho mais próximo" com onde K variando de 1 a 10. O KNN não é capaz de sugerir que uma amostra possa pertencer a uma categoria ainda não definida. Este método é um exemplo de modelo de similaridade, onde as amostras do conjunto de treinamento mais similares à amostra em estudo servem como referência para sua classificação ^[23].

II.4 - Sistema de Índices de Retenção

Em cromatografia expressar os dados de retenção não é trivial, porque estes são muito dependentes de condições operacionais. Vários sistemas foram desenvolvidos, sendo um dos mais lógicos para generalizar os dados de retenção o de expressá-los em uma escala de índices de retenção, proposto pela primeira vez por E. Kováts ^[24] em 1958.

O Índice de Retenção de Kováts expressa a retenção da substância de interesse em uma escala uniforme, determinada por uma série de substâncias padrão, que são hidrocarbonetos normais e saturados (aqui denominados como "mistura de referência"). A quantidade de carbonos de cada um dos hidrocarbonetos da mistura é multiplicada por 100 e uma escala logarítmica é utilizada no cálculo do índice de retenção, porque, quando se opera em temperaturas isotérmicas do forno da coluna^[5], o logaritmo do tempo de retenção ajustado de hidrocarbonetos normais aumenta linearmente com o comprimento da cadeia (equação II.4). O Índice de Retenção de Kováts funciona bastante bem para temperaturas isotérmicas do forno. Ele é utilizado para adequar de uma maneira uniforme os dados cromatográficos (tempos de retenção) para todos os cromatogramas, possibilitando uma comparação entre os dados extraídos de cada análise diária, desconsiderando assim, variações nas vazões do aparelho, temperaturas, ajuste de sinal e etc.

O índice de retenção de Kováts pode ser determinado pelo gráfico do número de átomos de carbono de alcanos saturados normais versus o logaritmo dos tempos de retenção ajustados destes alcanos, ou com a equação II.4 ^[19].

$$I = 100z + 100 \frac{\log t'_{Rx} - \log t'_{Rz}}{\log t'_{R(z+1)} - \log t'_{Rz}} \quad (\text{equação II.4})$$

onde, z = número de átomos de carbono de cada alcano normal da mistura; t'_{Rz} e $t'_{R(z+1)}$ = tempos de retenção ajustados dos alcanos normais; t'_{Rx} = tempo de retenção ajustado do composto x (t'_{Rx} é sempre intermediário a t'_{Rz} e $t'_{R(z+1)}$).

Quando se trabalha com programação de temperatura a escala logarítmica não é obedecida, mas um tratamento similar ao de Kováts pode ser usado, pelo uso na equação II.4 dos valores de t'_R (tempo de retenção ajustado), ao invés de seus logaritmos. Segundo a definição, t'_R é calculado subtraindo-se o tempo de retenção de uma substância de interesse do tempo de retenção de uma substância não retida pela fase estacionária^[25]. Esta modificação para temperatura programada, que foi proposta por H. Van Den Dool e P. Dec. Kratz^[10] em 1962, será citada neste trabalho como **Sistema de Índices de Retenção Modificado, IRM**, (segundo Kratz e Van Den Dool).

II.5 - Cromatografia Gasosa Combinada com Espectrometria de Massas.

A combinação de cromatografia gasosa com detecção por espectrômetro de massas (CG-EM) facilita sobremaneira a análise qualitativa de misturas complexas, exigindo quantidades razoavelmente pequenas da mistura (amostra) para a análise^[26].

Na indisponibilidade de detectores que como o EM, fornecem informações estruturais da amostra, a análise qualitativa por CG limita-se essencialmente ao uso do tempo de retenção de uma substância desconhecida e, por isto, é extremamente limitada. Uma outra limitação é que qualquer índice de retenção não é unívoco para um dado composto; ou ainda pode-se afirmar que o índice de retenção é um dado extremamente pobre para sugerir ao químico qual o padrão para comparação com sua amostra.

De muitos instrumentos analíticos, CG-EM oferece ótima combinação de compatibilidade, sensibilidade e especificidade dos dados; infelizmente é caro e necessita de técnico especializado para operá-lo^[26].

Uma grande dificuldade da combinação CG-EM é a diferença de pressão na operação dos aparelhos, pois o CG é operado a pressão atmosférica ambiente (760 torr), enquanto que o EM opera a baixas pressões (10^{-4} - 10^{-8} torr). Com isto, o sistema de interface deve reduzir a pressão do gás de arraste e introduzir uma fração considerável da amostra orgânica ao EM^[26].

O funcionamento de um EM pode ser descrito, resumidamente, da seguinte forma: a substância de interesse é bombardeada com um feixe de elétrons, ocorrendo sua fragmentação na forma de íons positivos. Estes íons possuem relação massa/carga (m/z) específica. São então direcionados ao analisador de massas onde, devido à diferença na relação m/z , são diferentemente acelerados e com isto separados. Existem muitos aceleradores de massas: quadrupolo, focalização simples, focalização dupla, etc. A função do detector é coletar os íons e amplificar o sinal gerado por eles, geralmente utilizando um multiplicador de elétrons. O registro de sinais é chamado de espectro de massas. A intensidade do sinal é proporcional a quantidade de íons formados. Outra informação importante obtida através do espectro de massas é a massa da molécula e as massas de seus fragmentos (m/z , onde geralmente a carga é igual a 1)^[27, 28].

A informação sobre o valor m/z pode ser transformada em informação estrutural a partir de estudos sobre mecanismos de fragmentação de classes de compostos^[27, 28, 29].

III - TRABALHOS PRÉVIOS À ANÁLISE DE ÓLEOS ESSENCIAIS.

III.1 - Adaptação e Operacionalização do Cromatógrafo PU-104 para uso do DIC com Colunas Capilares "Megabore".

Foi utilizado um cromatógrafo Pye Unicam, modelo PU-104 (1971) para uso com colunas empacotadas, equipado com detector por ionização em chama (DIC). Foram feitas adaptações para a instalação de coluna capilar "megabore" de 0,53 mm de diâmetro interno. Foram projetados e construídos conectores de latão na oficina mecânica do IQ; um deles conecta a coluna no injetor do cromatógrafo, permitindo injeção "on column"; o outro liga a coluna ao DIC. As linhas de gases do cromatógrafo (hidrogênio, ar comprimido e hélio) tiveram que ser refeitas. O aparelho tinha problemas no sistema de aquecimento do forno do detector, que foi solucionado ligando-se a manta de aquecimento do cromatógrafo a um variômetro. Para fazer a aquisição de dados do DIC com o sistema de aquisição de dados cromatográficos LECROM (software desenvolvido no grupo de pesquisa^[30]), foi utilizado para ampliação dos sinais um eletrômetro Pye-Unicam 12306, que tem uma saída de sinal na faixa de 0 a 10 V, adequada para alimentação de um conversor analógico digital (ADC). Pequenos trabalhos, como refazer o cabo coaxial de conexão entre o eletrômetro e o cartão ADC, também foram necessários. Foi instalado um "sistema de cargas" na alimentação das válvulas controladoras, para aumentar a resistência à passagem dos gases e permitir controle das vazões na faixa de 5 a 10 ml/min, necessárias para operação com as colunas capilares de 0,53 mm de diâmetro interno.

III.2 - Calibrações do Cromatógrafo.

Curvas de temperatura versus tempo de aquecimento foram levantadas para a verificação do funcionamento dos módulos de controle de temperatura do cromatógrafo. Houve a constatação de flutuações desprezíveis da temperatura com o tempo, o que indicou bom funcionamento desses módulos de controle. Foram obtidos dados de calibração de pressão versus vazão (figuras III.1, III.2 e III.3) para os gases do detector e o gás de arraste, respectivamente hidrogênio, ar comprimido e hélio. Os termopares sensores de temperatura do cromatógrafo foram calibrados. Foi constatada variação da vazão do gás de arraste durante o aquecimento do forno por programação de temperatura, que foi minimizada com a instalação das cargas já referidas no item III.1. Com as cargas foi possível controlar as vazões em torno de 5 ml.min⁻¹, mas não se conseguiu um controle satisfatório para as vazões de 1-2 ml.min⁻¹.

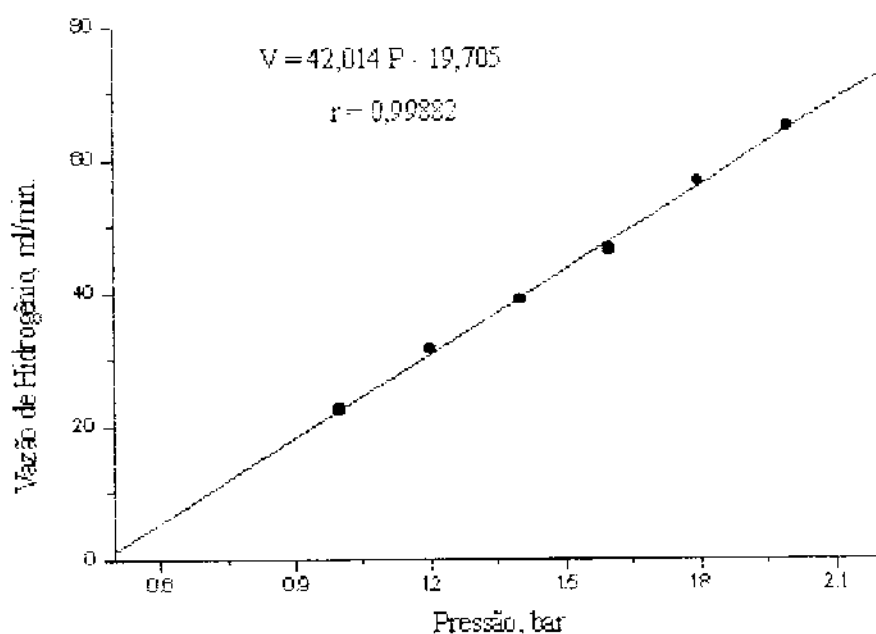


Figura III.1 - Calibração da Alimentação de Hidrogênio do Cromatógrafo: Curva de Vazão versus Pressão.

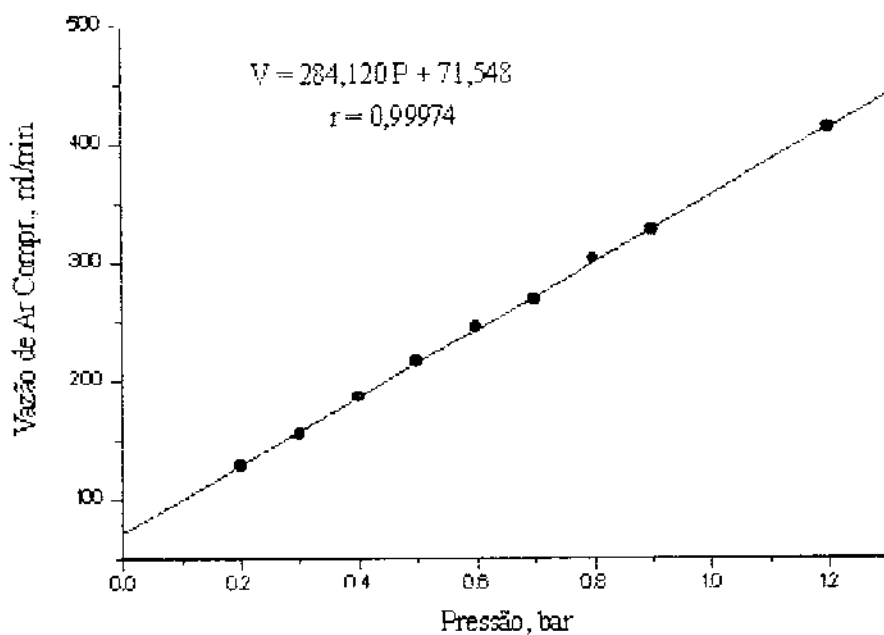


Figura III.2 - Calibração da Alimentação de ar do Cromatógrafo: Curva de Vazão versus Pressão.

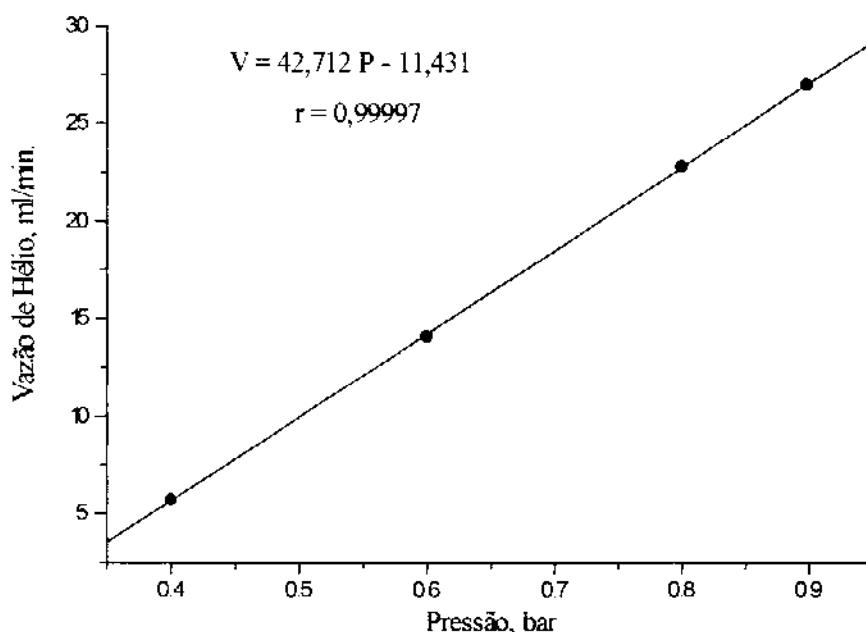


Figura III.3 - Calibração da Alimentação de Hélio do Cromatógrafo: Curva de Vazão versus Pressão.

III.3 - Teste de Desempenho do Cromatógrafo.

O desempenho do cromatógrafo foi testado com o levantamento de curvas de van Deemter, utilizando-se como sistemas de teste compostos orgânicos de diversas funções orgânicas e com pontos de ebulição em faixas próximas das esperadas para os óleos essenciais. Para calcular as eficiências otimizadas e plotar as curvas de van Deemter foi desenvolvido um programa, na planilha eletrônica Quattro-pro (apêndice A), a partir de um programa escrito em Turbo Pascal^[31]. A planilha calcula, a partir da altura equivalente de um prato, H , e correspondente velocidade linear do gás de arraste, u , os coeficientes A, B e C da equação II.1, assim como a velocidade do gás de arraste para o máximo de eficiência, u_{opt} , equação III.1.

$$u_{opt} = (B/C)^{1/2} \quad (\text{equação III.1})$$

Os compostos utilizados, seus pontos de ebulição e as vazões ótimas estabelecidas estão na Tabela III.1.

compostos ^a	PE / °C	abreviação	u_{opt} (cm/s)	vazões (ml / min)
isooctano	98-99	ISO	13,8	1,83
éter diisopropílico	68-69	ETH	16,3	2,15
undecano	196	UND	17,8	2,35
tolueno	110	TOL	17,9	2,37
benzaldeído	179	BZL	12,5	1,65
álcool benzílico	205	BOL	14,2	1,88

Tabela III.1 - Vazões ótimas para o máximo de eficiência cromatográfica estabelecidas para os compostos de teste

a - Condições cromatográficas: 1) Temperaturas: Detector = 180°C para ISO, ETH e TOL; 280°C para UND; 300°C para BOL e BZL; Injetor = 180°C para ISO, ETH e TOL; 280°C para UND; 300°C para BOL e BZL; Coluna = 85°C para ISO, ETH e TOL; 170°C para UND; 300°C para BOL e BZL. 2) Vazões: hidrogênio=30 ml x min⁻¹; ar = 350 ml x min⁻¹. 3) Coluna cromatográfica: LM-1 (metil silicone), 25 metros de comprimento, 0,53 mm de diâmetro interno, espessura de filme igual a 2,0 µm.

Observou-se comportamento adequado do aparelho para todos os compostos testados, pois suas curvas apresentaram o formato esperado, mostrado na figura III.4. Assim, concluiu-se que o aparelho apresentava um bom desempenho para análise de compostos similares aos esperados em óleos essenciais. No apêndice B deste trabalho encontram-se os gráficos das curvas de Van Deemter para benzaldeído, éter diisopropílico, isooctano, tolueno e undecano

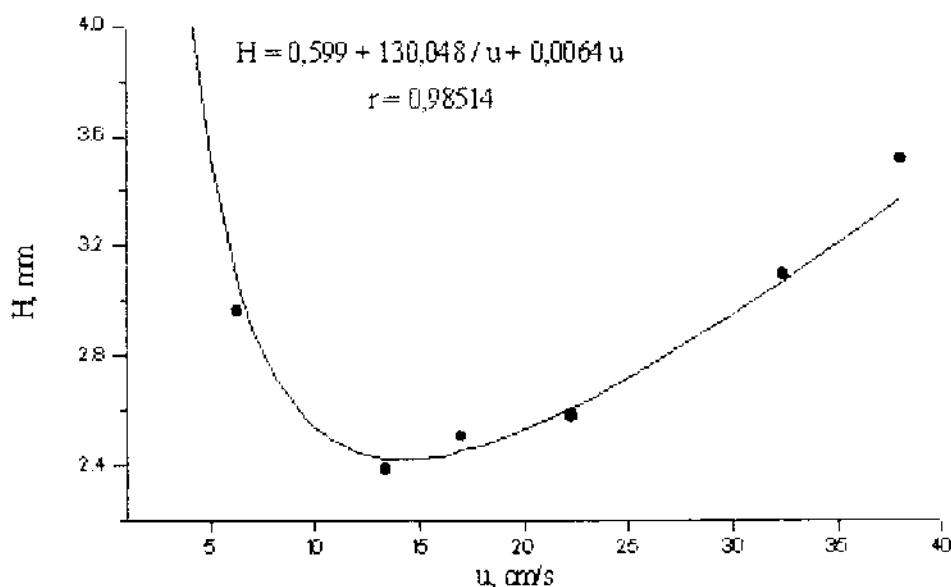


Figura III.4 - Curva de Van Deemter para o Álcool Benzílico.

Os resultados da tabela III.1 sugerem que é muito difícil estabelecer uma vazão ótima de gás de arraste que otimize a eficiência cromatográfica para os diversos componentes de cada óleo essencial, pois as vazões ótimas variam com os compostos.

Na literatura é sugerido que em colunas com diâmetro interno de 0,53 mm sejam utilizadas vazões do gás de arraste em torno de $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ^[4]. Após estudos realizados com soluções de alguns dos óleos essenciais disponíveis, optou-se pela vazão de $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, como forma de adequar o compromisso entre resolução dos picos cromatográficos e tempo de duração dos cromatogramas.

IV - ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA E TRATAMENTO DOS DADOS PARA O CÁLCULO DOS ÍNDICES DE RETENÇÃO MODIFICADOS.

IV.1 - Análise Cromatográfica.

Os 53 óleos essenciais analisados e agrupados neste trabalho são os seguintes, em ordem alfabética:

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| - óleo de alcarávia | - óleo de lavandin ordinário |
| - óleo de alecrim | - óleo de lemongrass |
| - óleo de alfazema | - óleo de levítico |
| - óleo de aniz | - óleo de lima |
| - óleo de artemisia | - óleo de limão |
| - óleo de aspic | - óleo de louro |
| - óleo de bay | - óleo de menta arvensis |
| - óleo de bergamota | - óleo de menta piperita |
| - óleo de cananga | - óleo de menta spearmint |
| - óleo de canela | - óleo de neroli |
| - óleo de caneleiro (folhas) | - óleo de noz moscada |
| - óleo de cedro | - óleo de orégano |
| - óleo de cedro (folhas) | - óleo de patchouli |
| - óleo de cistus | - óleo de pau rosa |
| - óleo de coriandro | - óleo de pinho siberiano |
| - óleo de cravo bruto | - óleo de rosa |
| - óleo de eucalipto | - óleo de sálvia |
| - óleo de gálbano | - óleo de sálvia officinale |
| - óleo de gerânio algerian | - óleo de sândalo |
| - óleo de gerânio da África | - óleo de sândalo mysore |
| - óleo de gomenol | - óleo de sassafrás |
| - óleo de hortelã | - óleo de tagete |
| - óleo de laranja | - óleo de tomilho branco |
| - óleo de lavanda | - óleo de tomilho vermelho |
| - óleo de lavandin abrialis | - óleo de vetiver bourbon |
| - óleo de lavandin absoluto | - óleo de ylang ylang |
| - óleo de lavandin grosso | |

Os testes para estabelecer as condições de análise cromatográfica dos óleos foram baseados nos óleos de laranja, neroli, patchouli e menta arvensis. Como estes quatro óleos possuem

grandes quantidades de compostos de tempos de retenção bastante variados, as condições cromatográficas (tabela IV.1) estabelecidas para eles foram tomadas como adequadas para os demais.

temperaturas	coluna	inicial	80 °C
		final	300 °C
		taxa de aquecimento	6 °C / min
	injetor	280 °C	
	detector ^b	300 °C	
coluna ^a	fase estacionária	LM-1(metil silicone)	
	comprimento	25 metros	
	diâmetro interno	0,53 mm	
	diâmetro do filme	2,0 µm	
vazões	hidrogênio	30 ml / min.	
	ar comprimido	350 ml / min.	
	hélio (arraste)	5 ml / min.	
volume de injeção	0,1 µl		

Tabela IV.1 - Condições cromatográficas utilizadas para a análise dos 53 óleos essenciais.

a - Coluna LM-1 - S. Carlos - S.P.

b - Outros detalhes cromatográficos: condicionamento do sinal foi realizado por um eletrômetro Pye Wide Range Amplifier (Pye Unicam Ltd.) conectado ao conversor A/D de 12 bit DACA (IBM Corp., Boca Raton, FL) com taxa de aquisição de 18 elementos de sinal.s⁻¹: cromatogramas coletados com o programa LECROM ^[30] e analisados pelo programa ANA5.PAS, com os seguintes parâmetros, limite mínimo de inclinação para detecção de picos: 0 mV/s; largura mínima para a confirmação de pico: 0 s; filtro de ruído: média móvel.

Foram preparadas soluções etanólicas dos 53 óleos essenciais e da mistura de referência, formada por onze hidrocarbonetos saturados normais: nonano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, octadecano, eicosano e docosano. A mistura de referência foi utilizada para o cálculo dos Índices de Retenção Modificados (IRM) dos picos selecionados de cada cromatograma.

Todas as amostras foram injetadas em triplicata e devido à duração dos cromatogramas - em torno de 40 minutos para os hidrocarbonetos e de 25 a 30 minutos para os óleos - por dia foram cromatografados dois óleos e uma mistura de referência.

IV.2 - Tratamento Estatístico dos Dados da Curva do Sistema de Índices de Retenção Modificados (IRM).

Neste trabalho o ajuste do tempo de retenção foi feito de duas maneiras:

- subtraindo-se de cada tempo de retenção um "tempo morto", obtido a partir da injeção de butano;
- subtraindo-se de cada tempo de retenção o tempo de retenção do etanol (solvente). Estes

"parâmetros ajustados" foram simbolizados como t'_R para o ajuste com o gás e $t_{(Raj)}$ para o ajuste com o solvente.

IV.2.1 - Cálculo dos Índices de Retenção Modificados (IRM).

Com a planilha eletrônica Excel 4.0 foram calculados os Índices de Retenção Modificados (IRM) de 15 picos cromatográficos de cada óleo essencial. Os picos foram selecionados após inspeção visual daqueles que seriam os mais distintos em cada cromatograma dos óleos, para que houvesse alocação dos óleos em agrupamentos¹ quando da aplicação dos programas quimiométricos^[32].

Para obter os Índices de Retenção Modificados dos picos selecionados, foram calculadas, para a "mistura de referência", as equações das retas $t'_R \times 100nC$ e $t_{(Raj)} \times 100nC$ (nC é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto, que multiplicado por 100 torna-se o IRM), mostradas respectivamente nas figuras IV.1 e IV.2. Os IRM dos 15 picos de cada óleo foram interpolados com a equação da reta de t'_R (ou $t_{(Raj)}$) em função de IRM, arranjada na forma da equação IV.1, na qual $t_R = t'_R$ ou $t_{(Raj)}$, a = coeficiente angular e b = coeficiente linear.

$$IRM = \frac{t_R - b}{a} \quad (\text{equação IV.1})$$

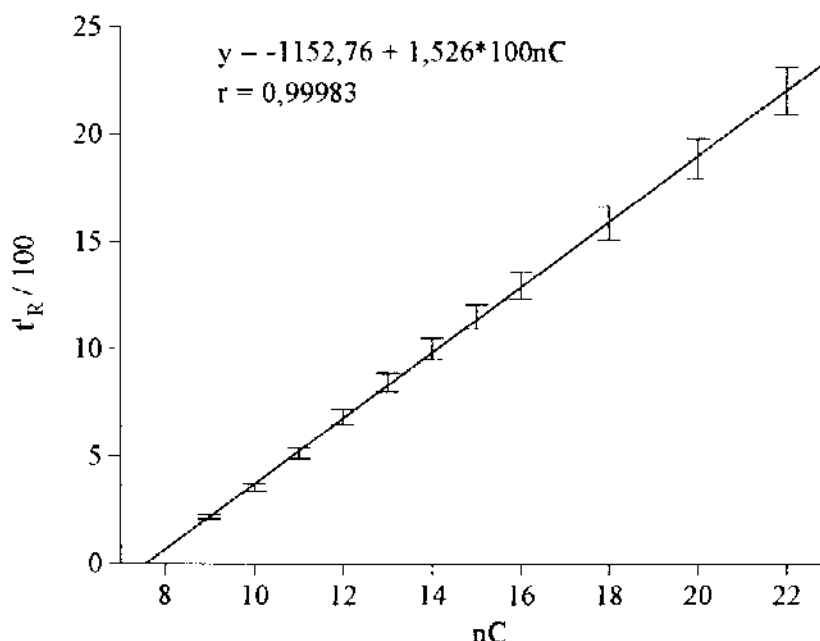


Figura IV.1 - Curva da mistura de referência para cálculo de Índices de Retenção Modificados dos óleos utilizando o tempo de retenção ajustado com butano (t'_R).

¹Os critérios de seleção dos picos são discutidos no item V.1.

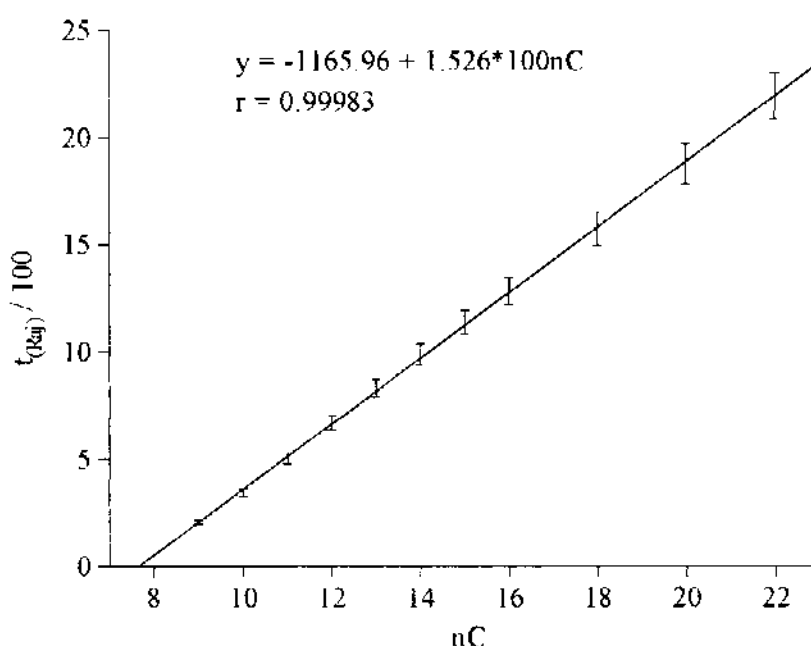


Figura IV.2 - Curva da mistura de referência para cálculo de Índices de Retenção Modificados dos óleos utilizando o tempo de retenção ajustado ($t_{(Raj)}$) pelo solvente (etanol).

IV.2.2 - Método utilizado para rejeição dos dados de retenção da mistura de referência, t'_R e $t_{(Raj)}$.

Dados experimentais são sujeitos a erros de várias origens, que podem resultar em "outliers", ou valores anômalos, que devem ser removidos. Os anômalos podem ser estatisticamente identificados por procedimentos adequados de tratamento dos dados^[33,34], destes procedimentos, os métodos de estatística robusta são bastante adequados^[35]. Para rejeição dos IRM anômalos, que poderiam interferir nos resultados deste trabalho, foi utilizado o teste de eliminação de Huber, que é um método de estatística robusta^[30,36,37].

A regra da eliminação de Huber é realizada da seguinte maneira^[33]: calcula-se a mediana, x_{median} , dos valores (no caso os Índices) da amostra, $x_1, \dots, x_n$ e os resíduos, $r_1 = x_1 - x_{median}, \dots, r_n = x_n - x_{median}$. A seguir são calculados os valores absolutos dos resíduos, $u_1 = |r_1|, \dots, u_n = |r_n|$ e a mediana u_{median} dos resíduos absolutos. Então são considerados anômalos todos os valores x_i que satisfizerem a condição:

$$|x_i - x_{median}| \geq k u_{median}$$

O parâmetro k é arbitrário, de forma que é sugerido que ele seja escolhido após simulações com dados similares aos experimentais^[33] e interpretação da significância das sucessivas rejeições obtidas com os últimos. Estas simulações foram realizadas em planilha eletrônica Excel 4.0,

sendo determinado o valor 3 para o parâmetro k , pois forneceu uma diminuição expressiva do desvio padrão entre as triplicatas dos IRM calculados para a mistura de referência. Portanto, a regra de eliminação de Huber é uma estatística que depende da participação do experimentalista, com a sua experiência do sistema em estudo.

Foram construídos gráficos que mostram os limites de confiança (superior e inferior) do referido teste, figura IV.3, indicando que para a mistura de referência, alguns valores de tempos de retenção ajustados pelo butano, encontram-se fora destes limites; portanto, eles são anômalos e devem ser eliminados.

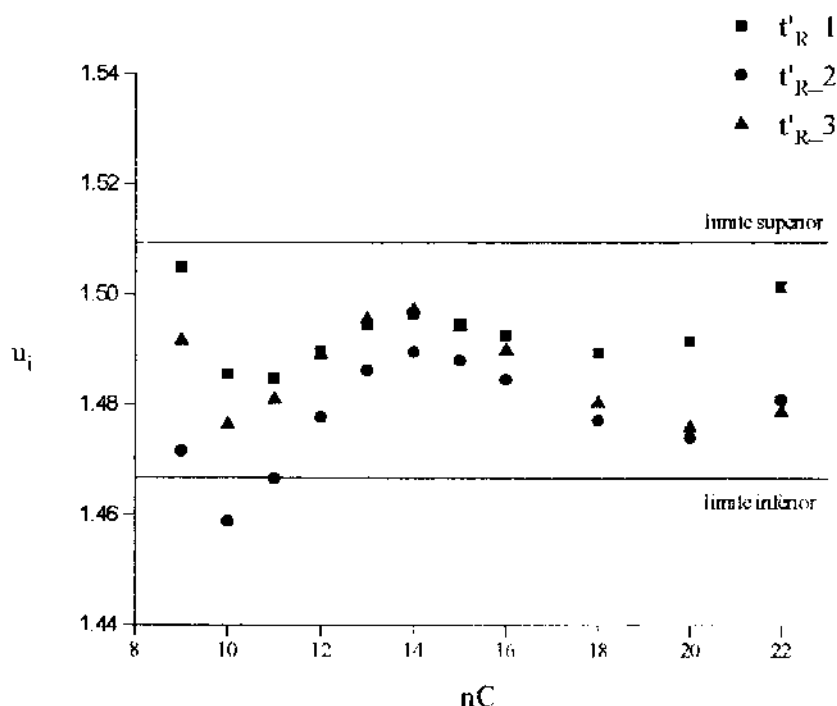


Figura IV.3 - Gráfico do Teste de Huber para rejeição de dados das curvas da mistura de referência para o cálculo dos Índices de Retenção Modificados.

Os limites superiores e inferiores da figura IV.3 foram calculados utilizando a expressão $x_{median} \pm k u_{median}$. Como sugerido pela figura IV.3, para aplicar o teste de Huber os dados tem que ter grandezas similares. Como este não é o caso com os tempos de retenção ajustados (t'_R ou t_{Raj}), estes foram reduzidos obtendo-se os valores X_i pela equação IV.2, que é outra forma da equação das retas de $t_{Raj} = f(100nC)$.

$$X_i = \frac{t_{Raj} - b}{100nC} \quad (\text{equação IV.2})$$

IV.2.3 - Avaliação dos dados de retenção e detecção de problemas instrumentais.

Os desvios padrão das triplicatas dos dados de retenção (IRM) obtidos por curvas como as das figuras IV.1 e IV.2, revelaram-se muito elevados, mesmo após a aplicação dos testes estatísticos, a ponto de não se poder definir se grupos de valores referiam-se a uma única substância. Este problema, que pode ter diversas origens, era agravado pela grande concentração de picos na faixa de 7 a 17 minutos para a maioria dos óleos. A sobreposição de dois cromatogramas de dois óleos mostrada na figura IV.4 permite uma avaliação visual do problema.

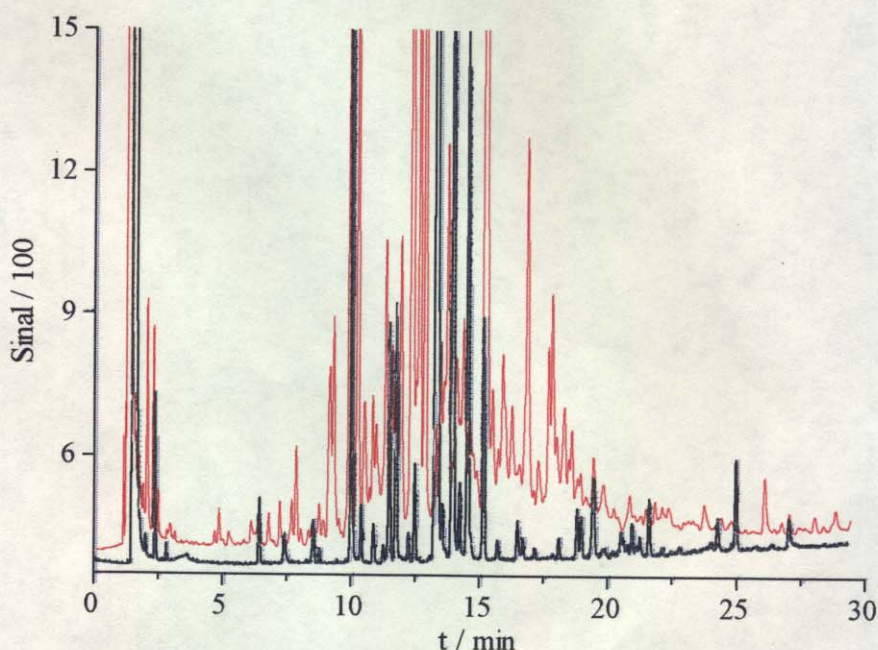


Figura IV.4 - Comparação dos cromatogramas dos óleos de Laranja e Gerânio Algerian.

Uma primeira tentativa de contornar o problema foi a de aplicar filtragem de ruídos sobre os dados cromatográficos originais - disponível no software de análise de dados - na tentativa de diminuir os desvios entre os tempos de retenção, pois o uso adequado de filtros pode diminuir os efeitos dos ruídos e tornar a alocação dos tempos de retenção mais consistente^[30]. Os testes com várias combinações de parâmetros de filtragem não resultou em diminuição considerável dos desvios entre os tempos de retenção e, consequentemente, entre os IRM. Uma segunda tentativa foi a de calcular os Índices de Retenção Modificados (IRM) pela sua equação de definição (equação IV.3).

$$I = 100z + 100 \frac{t'_{Rx} - t'_{Rz}}{t'_{R(z+1)} - t'_{Rz}} \quad (\text{equação IV.3})$$

onde: z = número de átomos de carbono de cada alceno normal da mistura; t'_{Rx} = tempo de retenção ajustado do composto x ; t'_{Rz} e $t'_{R(z+1)}$ = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal, sendo que t'_{Rx} é intermediário a t'_{Rz} e $t'_{R(z+1)}$.

Para valores de IRM calculados desta forma foi adotada a representação I_{calc} , e comparados com os valores obtidos pelas interpolações nas retas, I_{itp} . No apêndice C são mostrados, para oito óleos essenciais, os desvios padrão relativos (dpr) das triplicatas dos I_{calc} e dos I_{itp} , tanto para tempos de retenção ajustados pelo butano quanto para os ajustados pelo etanol. As comparações entre estes valores basearam-se no critério de que, aos valores de dpr poderia ser aplicado o teste t ^[34] para se verificar se os I_{calc} e I_{itp} não diferem significativamente, ou seja, se são estatisticamente iguais.

A tarefa para estas comparações não é simples, porque trata-se de estabelecer se, para todos os picos de todos os óleos (15 X 53 = 795 picos), deve-se usar I_{calc} ou I_{itp} ; além disto, convém confirmar se o IRM deve ser baseado no tempo de retenção ajustado pelo butano (t'_R) ou ajustado pelo solvente ($t_{(Raj)}$). Por isto foram selecionados oito óleos representativos do conjunto. Cada tabela do apêndice C está dividida em dois blocos, cada um com três colunas, no bloco da esquerda estão os valores de desvios padrão relativos das triplicatas dos I_{calc} e dos I_{itp} com os tempos ajustados pelo butano e no bloco da direita os correspondentes valores ajustados pelo solvente. Em cada bloco das tabelas, nas primeira e segunda colunas estão, respectivamente, os dpr (I_{calc}) e dpr (I_{itp}) e na terceira coluna a diferença porcentual entre os desvios padrão relativos das triplicatas de I_{calc} e I_{itp} ; estas diferenças são representadas, respectivamente, como $E\% I(t'_R)$ para o bloco da esquerda e $E\% I(t_{(Raj)})$ para o bloco da direita.

Como pode ser constatado por simples inspeção visual das tabelas, os $E\% I(t'_R)$ e $E\% I(t_{(Raj)})$ oscilam substancialmente entre 5 e 10% nos picos com baixos valores de tempos de retenção e 45% ou mais nos picos com altos valores. A não linearidade nos pontos iniciais das curvas do tipo das figuras IV.1 e IV.2 é prevista^[25], explicando os valores obtidos entre 5 e 10%. Isto se deve ao fato da temperatura do injetor ser bastante alta para os compostos voláteis, que eluem primeiro, neste tipo de análise. Submetendo os valores obtidos para os 8 óleos ao teste de Huber (detalhado no item IV.2.2), todos os valores superiores a 6,6 ($k=3$) foram rejeitados. Existe uma consistência nas rejeições, porque os $E\% I(t'_R)$ e $E\% I(t_{(Raj)})$ são rejeitados aos pares correspondentes - por exemplo, para o óleo de Gerânio Algerian os dois primeiros valores rejeitados, 10,7 % e 11,3 % correspondem ao mesmo pico cromatográfico, o mesmo ocorrendo com os demais óleos. Isto sugere que seria indiferente utilizar os IRM com base no tempo de retenção ajustado pelo butano ou os baseados no tempo de retenção ajustado pelo solvente. O teste F bilateral^[34] descrito abaixo confirma estatisticamente este fato. Portanto como os $E\% I(t'_R)$ e $E\% I(t_{(Raj)})$ são rejeitados aos pares e não só nas extremidades, mas também para valores intermediários (como exemplo o óleo de rosa), admite-se que suas oscilações são devidas a desempenho inadequado do cromatógrafo, tais como a não repetibilidade das temperaturas do forno da coluna, ou das vazões do gás de arraste, que refletiriam nos tempos de retenção e, conseqüentemente nos IRM. Esta suposição foi posteriormente confirmada pelas comparações de dados de retenção obtidos com o cromatógrafo usado neste trabalho e outros dois mais modernos (discutida com mais detalhes no item VIII).

Com a utilização do teste t , que compara os valores médios das duas amostras, nenhuma comparação diferiu de maneira significativa, sendo razoável admitir que é indiferente utilizar os I_{calc} ou os I_{itp} , ou seja, indiferentemente deles terem sido calculados com a equação IV.3 ou interpolados das retas de $t'_R \times 100 \text{ nC}$ (ou $t_{(Raj)} \times 100 \text{ nC}$). Esta afirmação é válida tanto para o

tempo de rejeição calculado pelo butano quanto pelo etanol. Com isto, por opção, resolveu-se trabalhar com os IRM calculados através da interpolação das retas.

O teste F bilateral ^[34] foi aplicado aos dados como segue, objetivando decidir quais valores de IRM são mais precisos: os interpolados na reta $t'_R \times 100 \text{ nC}$ ou na reta $t_{(Raj)} \times 100 \text{ nC}$. Primeiramente, para $I_{ip}(t'_R)$ e $I_{ip}(t_{(Raj)})$ (IRM calculado pelo butano e pelo etanol, respectivamente), calculou-se separadamente a diferença entre os valores de IRM dois a dois. Para estes valores, foi calculado o desvio padrão e aplicado o teste F para cada conjunto de Índices de cada um dos 8 óleos essenciais. Este teste comprovou que tanto $I_{ip}(t'_R)$ quanto $I_{ip}(t_{(Raj)})$ são estatisticamente iguais. Como são obtidos valores de desvios padrão relativos menores entre triplicatas de $I_{ip}(t_{(Raj)})$, optou-se por trabalhar com IRM calculados desta maneira. Ainda, utilizando estes valores, foi aplicado o teste F óleo a óleo, não havendo diferenças significativas inter-óleos.

Com tudo isto, por escolha, os dados daqui para a frente discutidos foram os IRM calculados por interpolação e baseados em tempos de retenção ajustados pelo tempo de retenção do solvente.

V - MÉTODOS DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES.

Os métodos de reconhecimento de padrões utilizados foram PCA e SIMCA. A Análise de Componentes Principais (PCA) usa combinações lineares das variáveis, ocorrendo a redução do número de variáveis sem perder as informações mais importantes contidas anteriormente. A vantagem desta análise é que se pode usar somente as primeiras 'a' componentes principais para representar a matriz de dados. Estas 'a' componentes são escolhidas de tal forma que consigam explicar a parte mais importante da informação estatística, ou seja, a maior parte da variância total^[11,23,38]. Posteriormente o programa SIMCA foi utilizado.

V.1 - Definição dos Dados a serem usados na Metodologia Quimiométrica.

O objetivo inicial era considerar que IRM pertencentes a uma faixa de valores bastante próximos, pudessem representar alguns dos picos cromatográficos de cada óleo; no entanto não se obteve uma correlação clara entre conjuntos de IRM e os correspondentes picos cromatográficos nos óleos analisados. Este tipo de resultado, em princípio, pode ser esperado em cromatografia, pois um tempo de retenção - e consequentemente o IRM calculado - não corresponde inequivocamente a um componente da amostra. No presente estudo, a situação foi agravada pelo fato de que os desvios padrão das triplicatas de índices para cada óleo era muito alto.

Como não foi possível determinar um grupo de índices que claramente pudessem representar picos de uma mesma substância, foi feita uma análise visual dos cromatogramas dos óleos essenciais, ou seja, um estudo dos perfis cromatográficos na tentativa de contornar esta situação. Os cromatogramas de alguns óleos são mostrados no Apêndice D.

Desta forma, foi arbitrado que faixas de alguns cromatogramas eram coincidentes. Foram selecionados os picos cromatográficos que aparentavam serem os melhores representantes dos óleos estudados. Um exemplo ilustrativo desta análise é mostrado pelos dois cromatogramas da figura V.1, onde os picos A, B, C e D são arbitrados como representativos dos dois óleos. Com isso, nesta fase, foram selecionados 38 dos 53 óleos essenciais.

Esta análise visual foi embasada em dados da literatura ^[16] referentes aos constituintes dos óleos presentes em maior quantidade. Foram comparados os perfis de óleos cujo nome já indicasse certa semelhança. Por exemplo: os óleos de menta, lavanda e lavandin, sândalo, tomilho e etc. A literatura indicou ainda que, óleo de cananga e ylang-ylang são formados pelos mesmos compostos, mas em quantidades diferentes ^[39,40].

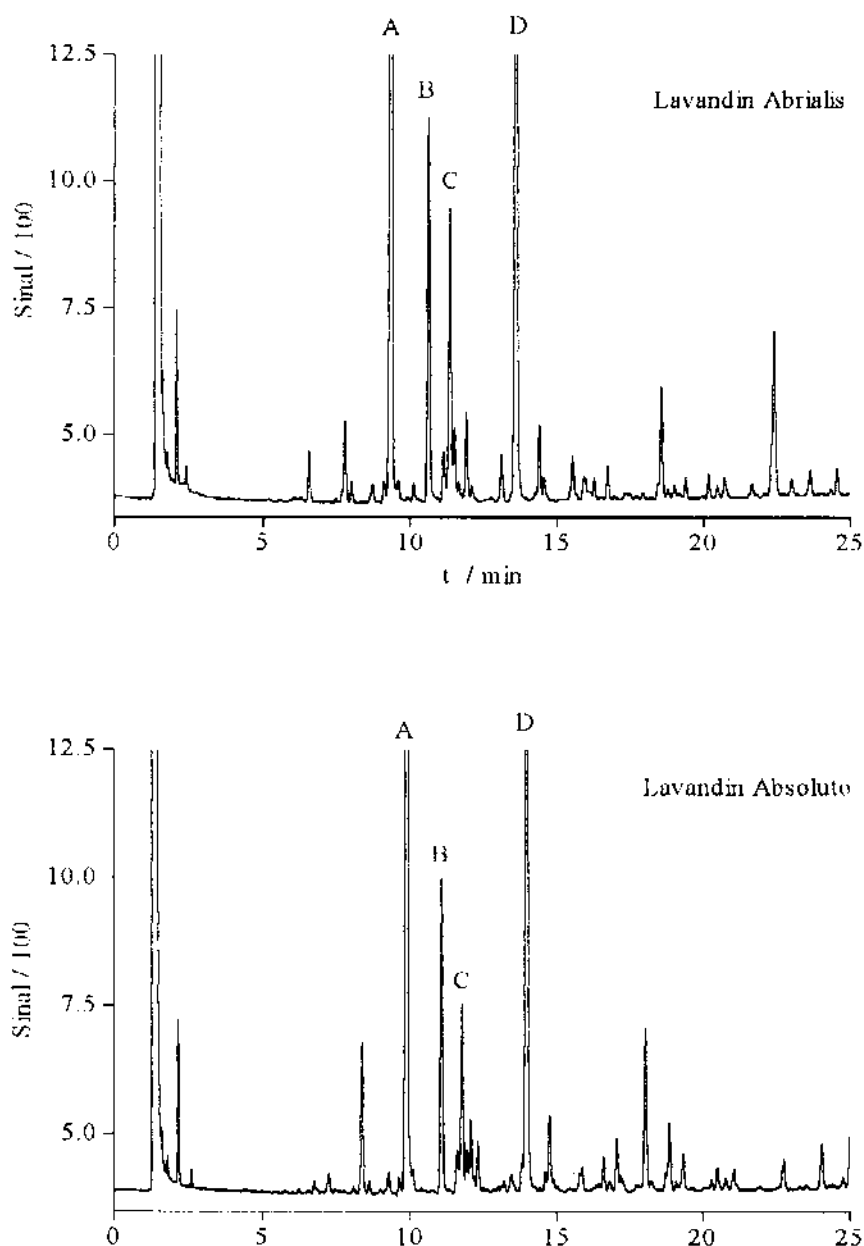


Figura V.1 - Estudo dos perfis cromatográficos dos óleos essenciais de Lavandin Abrialis e Lavandin Absoluto.

Os compostos considerados visualmente como coincidentes para os cromatogramas da figura V.1 possuem uma defazagem de pelo menos 10% em seus valores de tempos de retenção, devido aos problemas de excessiva oscilação dos IRM.

Após a análise visual, foram montadas planilhas para ordenação dos IRM; então, faixas de valores, como 1131,2 - 1135,1 mostrados na tabela V.1, foram consideradas como possivelmente representativas do mesmo pico cromatográfico. Ainda considerando o "pico b", afirma-se que ele corresponde a um "aglomerado" de picos que foram considerados de determinados óleos e que este aglomerado foi denominado de P (na tabela V.1 aparece na coluna variável). Foi considerado que este grupo de índices é representativo de uma mesma substância, chamada de substância P. Isto foi repetido para os demais Índices. A porcentagem de área correspondente a cada pico também foi relacionada nesta planilha.

Índice	Pico	Área (%)	Óleo	Variável
1084,9	a	33,83	lav. abs.	M
1084,9		5,84	salv. esp.	M
1086,8	a	51,11	alfazema	M
1086,8		31,19	lav. abr.	M
1131,2	b	10,26	lav. abs.	P
1131,5		16,89	alfazema	P
1132,5		17,31	ment. pip.	P
1132,6		0,48	ment. arv.	P
1135,1		10,29	lav. abr.	P

Tabela V.1 - Correlação entre os Índices de Retenção, os picos cromatográficos e as porcentagens de área dos picos cromatográficos.

Os dados foram rearranjados em ordem alfabética de óleos essenciais, tabela V.2. Para o óleo de Lavandin Absoluto (lav. abs.), o primeiro pico de importância do cromatograma (área igual a 4,93%), representa a substância **G**; o segundo pico representa a substância **I**, e assim por diante até o último pico, que representa a substância **OO**. Estas correlações foram realizadas para cada um dos 38 óleos essenciais.

Picos	Área (%)	Óleo	Variável
1	4,93	lav. abs.	G
2	0,69	lav. abs.	I
3	0,93	lav. abs.	J
4	33,83	lav. abs.	M
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
14	1,83	lav. abs.	MM
15	4,02	lav. abs.	OO

Tabela V.2 - Áreas das substâncias de 15 picos cromatográficos do óleo de lavandin absoluto, obtido a partir da planilha apresentada na figura V.2

Nesta fase preliminar, após o tratamento dos dados através da planilha, foi montada a matriz de dados, figura V.2, que foi utilizada para medidas de similaridade entre 38 óleos essenciais (item V.2), sendo os objetos da matriz os óleos essenciais e o conjunto de IRM dos picos pré-selecionados representados por 49 variáveis. Como elementos da matriz foram utilizadas as áreas (em porcentagem) de cada pico cromatográfico. Após este procedimento, conseguiu-se melhor coerência entre os picos cromatográficos e seus IRM.

		M	N	O	P		
lav		31,55	0,00	0,00	3,46		
labr		31,19	0,00	0,00	10,29		
labs		33,83	0,00	0,00	10,26		

Figura V.2 - Fragmento da matriz de dados que utiliza como objeto os óleos, como variáveis as substâncias e como dados da matriz os valores de área dos picos cromatográficos.

V.2 - Medidas de similaridade entre 38 óleos essenciais.

Os dados originais são algumas vezes redundantes, porque contém várias correlações entre as variáveis e entre objetos^[11]. À matriz de dados gerada na fase preliminar (figura V.2) foi aplicado o programa de componentes principais fornecido pelo Prof. Dr. William Dunn, obtendo-se os "scores" desses dados. "Scores" são novas variáveis calculadas levando em consideração as correlações presentes nos dados, mas elas mesmas não são correlacionadas entre si. Desta forma a estrutura dos dados torna-se aparente no espaço destas novas variáveis, podendo ser mais facilmente interpretada^[11]. Foram utilizados estes novos valores para montar, com a ajuda de planilha eletrônica, uma nova matriz de dados com dimensão reduzida. A matriz original possuía 49 variáveis sendo reduzida para uma matriz contendo 10 variáveis (componentes principais).

Foram utilizadas as equações II.2 e II.3, para calcular os valores de Distância e Similaridade entre pontos (apêndice E). Na própria planilha eletrônica que contém a nova matriz de dados, foram calculadas as Distâncias euclidianas simples entre dois óleos essenciais (amostra), onde o elemento X_{ki} corresponde ao valor da variável i para a amostra k e X_{ji} corresponde ao valor da variável i para a amostra j . Considera-se que quanto menor a distância entre os pontos, maior a similaridade entre as amostras representadas por eles. A partir destes valores de Distância, calculou-se a Similaridade pela equação II.3^[11].

Para o agrupamento dos óleos e posterior formação de categorias, foi adotado como limite de corte o valor de Similaridade igual a 0,550. Aos agrupamentos foram atribuídas categorias, formando o conjunto de treinamento mostrado na tabela V.3. Nesta tabela constam 30 óleos

essenciais: 8 foram excluídos porque na comparação com os demais os valores de Similaridade foram inferiores ao limite de corte.

categoria	óleos essenciais
1	bergamota
1	louro
1	alecrim
1	limão
1	gerânio da África
1	gerânio algerian
1	rosa
1	laranja
1	lima
2	canela
2	pinho siberiano
2	orégano
2	tomilho vermelho
3	pau rosa
3	coriandro
3	neroli
3	sálvia oficinale
4	caneleiro
4	cravo
4	bay
5	alfazema
5	aspic
5	lavanda
5	lavandin abrialis
5	lavandin absoluto
6	sândalo
6	sândalo mysore
6	cananga
6	ylang-ylang
6	patchouli

Tabela V.3 - Agrupamentos por categoria de 30 óleos essenciais pelo parâmetro Similaridade.

Os óleos da tabela V.3 foram admitidos como conjunto de treinamento, ou seja, um subconjunto do conjunto de dados tendo propriedades e categorias conhecidas, usadas para desenvolver regras de classificação. Categoria é um conjunto de objetos que possuem a mesma propriedade. Conjunto de teste é um subconjunto dos dados, que tem propriedades e categorias conhecidas, que são usadas para testar a habilidade das regras de classificação desenvolvidas sobre o conjunto de treinamento^[38] ou, ainda, classificar amostras com características desconhecidas em alguma das categorias já definidas^[11]. Os oito óleos excluídos pelo procedimento anterior, foram considerados o conjunto de teste, o qual foi submetido à fase seguinte, de classificação.

V.3 - Aplicação dos Métodos de Classificação a um conjunto de 38 óleos essenciais.

Os dados dos 30 óleos do conjunto de treinamento foram arranjados em uma matriz, como na figura V.3. Com base neste conjunto de treinamento foram desenvolvidas as regras de classificação, que permitiram classificar os oito objetos (óleos) do conjunto de teste nas respectivas classes. Os resultados obtidos após esta análise estão na tabela V.4 que, comparada com a tabela V.3, permite verificar as alocações do total de 38 óleos.

	1	2		i		p		
1	X_{11}	X_{12}		X_{1i}		X_{1p}	classe 1	conjunto de treinamento
2	X_{21}	X_{22}		X_{2i}		X_{2p}	classe 2	
:	:	:		:		:		
k	X_{k1}	X_{k2}		X_{ki}		X_{kp}	classe Q	
:	:	:		:		:		
n	X_{n1}	X_{n2}		X_{ni}		X_{np}		
n-1	:	:		:		:	amostras adicionais	conjunto de teste
:	:	:		:		:		
m	X_{m1}	X_{m2}		X_{mi}		X_{mp}		

Figura V.3 - Organização da matriz de dados para fins de classificação.

categoria	óleos essenciais	categoria	óleos essenciais
1	alecrim	4	caneleiro
1	bergamota	4	cravo
1	lima	4	bay
1	louro	5	alfazema
1	limão	5	aspic
1	gerânio algerian	5	hortelã
1	gerânio da África	5	menta piperita
1	laranja	5	menta arvensis
1	sálvia espinha	5	lavanda
1	rosa	5	lavandin abrialis
1	lavandin ordinário	5	lavandin absoluto
2	pinho siberiano	6	sândalo
2	tomilho vermelho	6	sândalo mysore
2	orégano	6	cananga
2	canela	6	ylang-ylang
2	tomilho branco	6	patchouli
2	lavandin grosso		
3	pau rosa		
3	coriandro		
3	neroli		
3	sálvia officinale		
3	folha de cedro		

Tabela V.4 - Agrupamentos de 38 óleos essenciais pela análise quimiométrica.

O programa SIMCA, que faz classificações usando modelos de componentes principais determinados pelo programa Karlov^[32], foi capaz de classificar 100% das amostras. A análise de componentes principais mostrou que as **quatro** primeiras componentes explicam somente 40% da variância total, sendo a variância da primeira, segunda e terceira componente principal igual a 14,4%, 23,7% e 32,2%, respectivamente. O método KNN^[32] foi utilizado para confirmação das alocações realizadas pelo programa SIMCA. O método KNN foi capaz de classificar corretamente para 1NN 76,7 % dos óleos; para 2NN 80 % e para 3NN 70%. Antes de utilizar o KNN foi empregado o programa DISTAN^[32], que calcula a matriz de distâncias entre pontos (amostras). Sem ele, o KNN não funciona. A figura V.4 mostra o gráfico que fornece uma visualização bidimensional das categorias mostradas na tabela V.4, utilizando os componentes principais 1 e 3.

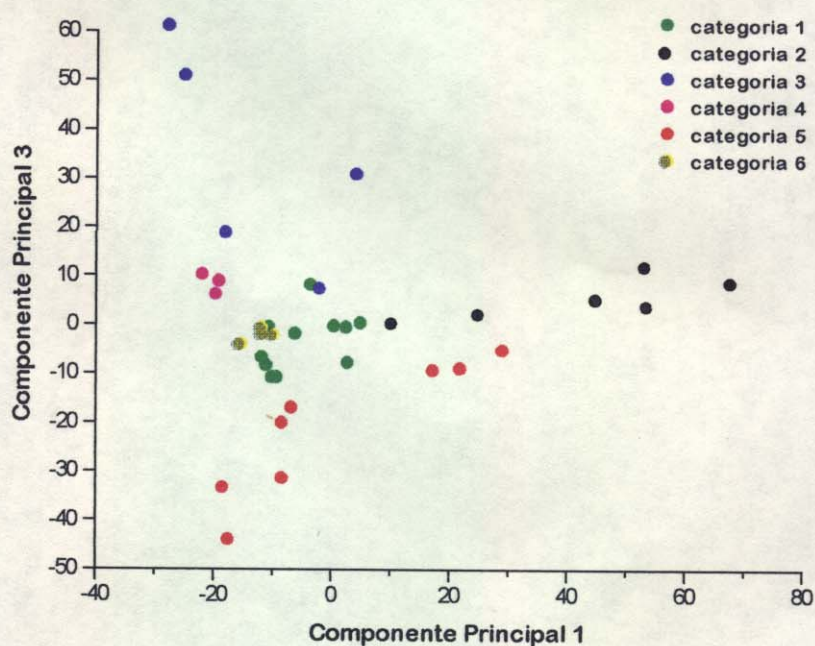


Figura V.4 - Gráfico bidimensional dos "scores" obtidos para as categorias da tabela V.2.

V.4 - Aplicação dos métodos de classificação aos 53 óleos essenciais.

Foram refeitas as planilhas de cálculo, agora correlacionando-se e intercalando-se os IRM dos picos cromatográficos dos 15 óleos restantes com os 38 óleos já agrupados. Uma nova matriz de dados foi montada com os 53 objetos (óleos) e com 35 variáveis, que foram definidas agora como "faixas de tempos de retenção".

Os 38 óleos essenciais agrupados conforme os métodos de classificação (item V.3), foram considerados como conjunto de treinamento, sendo o conjunto de teste os 15 óleos essenciais restantes, não incluídos em nenhuma categoria pela análise visual realizada no item onde foram definidos os dados a serem usados na metodologia quimiométrica (item V.1). Estes 15 óleos são: óleo de alcarávia, aniz, artemisia, cedro, cistus, eucalipto, galbano, gomenol, lemongrass, levítico, menta spearmint, noz moscada, sassafrás, togete e vetiver bourbon. Eles se agruparam com 100% de alocações corretas para o programa SIMCA e estes agrupamentos foram confirmados pelo programa KNN, com índices de correção de 78,9 % para 1NN, 81,6 % para 2NN e 71,1% para 3NN. A análise de componentes principais mostrou que as **quatro** primeiras componentes explicam somente 38 % da variância total. Este valor é um pouco menor se comparado com o obtido com a aplicação dos métodos de classificação ao conjunto de 38 óleos essenciais (item V.3), pois foram acrescentados outros objetos à matriz de dados, diminuindo a eficiência do método.

Na tabela V.5 estão relacionados todos os agrupamentos encontrados para os 53 óleos após o tratamento estatístico, com indicação dos óleos que mantiveram os mesmos agrupamentos (Grupo 1 a 6) da Tabela V.4, a realocação do óleo de folha de cedro, do Grupo 3 para o Grupo 2 e de como os 15 óleos adicionais foram incluídos nos seis grupos. Nove óleos foram alocados com base nos resultados do SIMCA, quatro óleos pelos resultados do KNN, pois os resultados do SIMCA foram dúbios, e dois óleos foram alocados por inspeção visual do gráfico da Figura V.5. Um gráfico tridimensional dos "scores" gerados pelo programa é mostrado na figura V.5. Percebe-se alguns agrupamentos distintos, como os de cor amarela, azul claro e rosa.

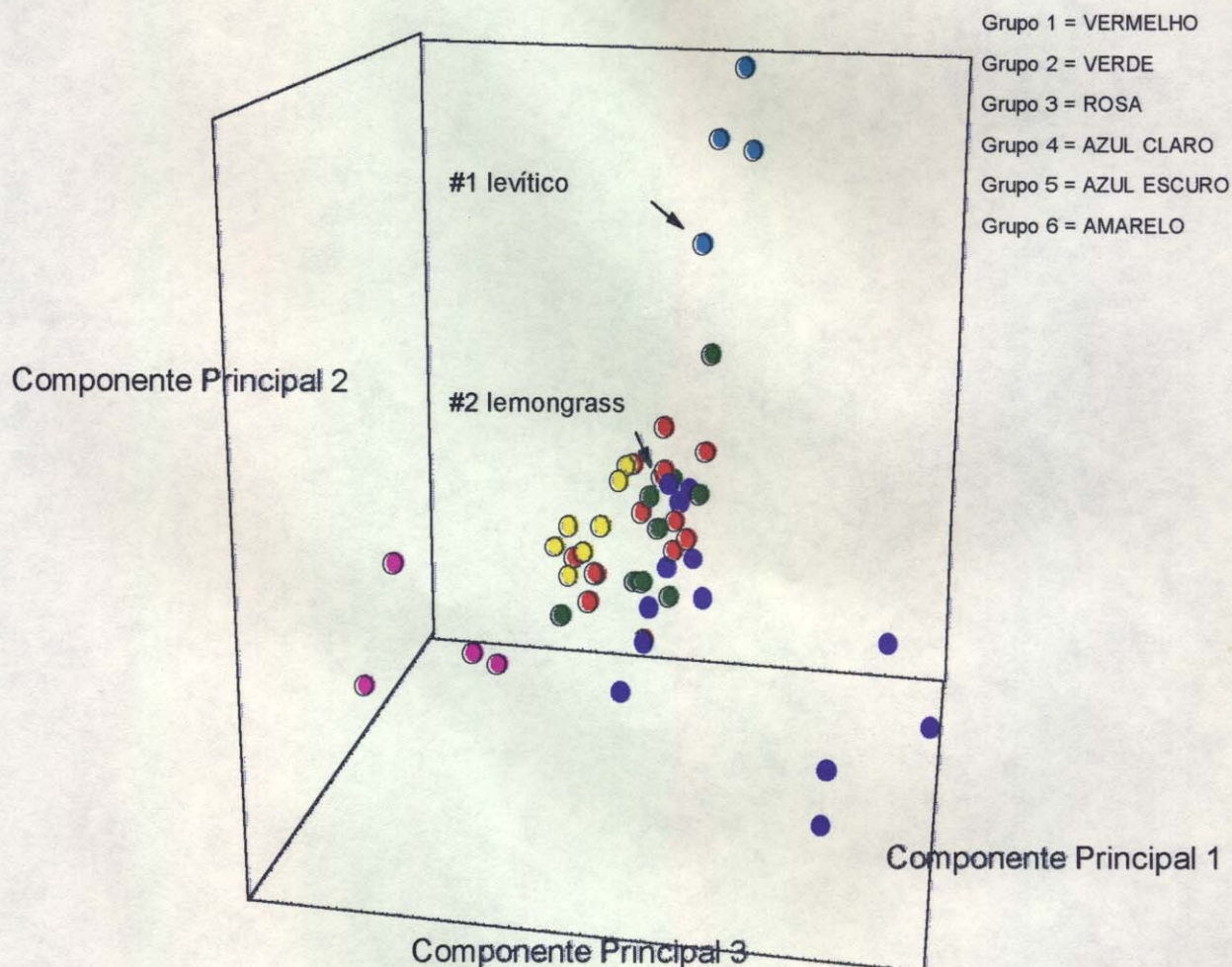


Figura V.4 - Figura Tridimensional dos agrupamentos apresentados na tabela V.5.

Como sugerido no exame de qualificação, na tentativa de melhorar a separação das categorias apresentadas no gráfico da figura V.5, foi realizado um estudo dos Pesos de Fisher. Da forma como os dados foram tratados neste trabalho, não surtiu resultados este estudo, pois diversos elementos da matriz de dados eram iguais a zero.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 5
alecrim (V4) ^(a) bergamota (V4) gerânio algerian (V4) gerânio da África (V4) laranja (V4) lavandin ordinário (V4) lima (V4) limão (V4) louro (V4) rosa (V4) sálvia espinha (V4) alcarávia (SC) lemongrass (vis) sassafrás (KNN) togete (SC)	canela (V4) lavandin grosso (V4) orégano (V4) pinho siberiano (V4) tomilho branco (V4) tomilho vermelho (V4) aniz (SC) folha de cedro (SC*) noz moscada (KNN)	alfazema (V4) aspic (V4) hortelã (V4) lavanda (V4) lavandin abrialis (V4) lavandin absoluto (V4) menta arvensis (V4) menta piperita (V4) artemisia (SC) cistus (SC) eucalipto (SC) galbano (SC) gomenol (SC) menta spearmint (SC)
	Grupo 3	
	pau rosa (V4) coriandro (V4) neroli (V4) sálvia officinale (V4)	
	Grupo 4	Grupo 6
	bay (V4) caneleiro (V4) cravo (V4) levítico (vis)	cananga (V4) patchouli (V4) sândalo (V4) sândalo mysore (V4) ylang-ylang (V4) cedro (KNN) vetiver bourbon (SC)

Tabela V.5 - Agrupamentos dos 53 óleos essenciais pela análise quimiométrica.

a: (V4) = confirmada alocação da Tabela V.4; (SC) = alocado por SIMCA; (KNN) = alocado por KNN;

(vis) = alocação visual com Figura V.4; (*) = realocado (SIMCA) do Grupo 3 para o Grupo 2.

Para os óleos essenciais de alcarávia, aniz, cistus, eucalipto, artemisia, galbano, gomenol, tagete e vetiver bourbon, o programa SIMCA realizou as alocações, confirmadas através do programa KNN. Para cedro, noz moscada, menta spearmint e sassafrás o programa KNN realizou as alocações, pois a resposta fornecida pelo SIMCA foi dúbia. Por último, para os óleos de levítico e lemongrass, pontos 1 e 2 respectivamente no gráfico da figura V.5, foi feita uma análise gráfica, possibilitando visualizar a proximidade destes óleos a alguns dos agrupamentos.

V.4.1 - Reanálise Quimiométrica do Grupo 1 da Tabela V.5.

O primeiro grupo de óleos da Tabela V.5 é formado por 15 óleos essenciais (lemongrass, bergamota, lima, laranja, limão, gerânio algerian, gerânio da África, rosa, lavandin ordinário, sassafrás, tagete, alecrim, louro, alcarávia e sálvia espinha) e, potencialmente, é excessivamente grande para uso em metodologia de classificação. Por isto, foi feita uma nova análise quimiométrica para verificação de possíveis subagrupamentos dentro deste grupo. Esta possibilidade

apoiou-se nos problemas de desvio padrão entre as triplicatas dos Índices de Retenção Modificados (IRM). Não foi possível reanalisar o óleo de limão, devido a quantidade deste óleo ser insuficiente para a preparação de uma nova solução.

Para esta análise foram preparadas soluções dos referidos óleos, com concentrações de 80 g/L. Foi utilizado nonano como padrão interno. As soluções foram injetadas juntamente com a "mistura de referência" em um cromatógrafo modelo HP-5890 gentilmente cedido pela Profa. Dra. Anita Marsaioli, do IQ-UNICAMP. As condições cromatográficas utilizadas para esta análise são as listadas na tabela V.6.

temperaturas	coluna	inicial	80 °C
		final	300 °C
		taxa de aquecimento	6 °C / min
	injetor	280 °C	
	detector	300 °C	
coluna	fase estacionária	HP-101(metil silicone)	
	comprimento	25 metros	
	diâmetro interno	0,20 mm	
	diâmetro do filme	0,2 µm	
vazões	hidrogênio (detector)	30 ml / min.	
	ar comprimido	350 ml / min.	
	hidrogênio (arraste)	0,9 ml / min.	
razão de divisão (injetor)	$\frac{1}{100}$		
volume de injeção	0,1 µl		

Tabela V.6 - Condições cromatográficas para análise dos 14 óleos essenciais do grupo 1.

Foram novamente aplicados todos os procedimentos descritos no item IV.2.1. Planilhas foram montadas para o tratamento estatístico dos dados cromatográficos da "mistura de referência" utilizando o teste de Huber. Percebeu-se que, com o aparelho HP-5890 poucos dados foram rejeitados (figura V.5), o que indica boas repetibilidades entre as triplicatas de tempos de retenção, e logo, dos IRM. Foram calculadas as correspondentes curvas t'_R (ajustado pelo butano) $\times$ 100nC e $t_{(Raj)}$ (ajustado pelo etanol) $\times$ 100nC. Novamente utilizaram-se os IRM interpolados com a equação da reta $t_{(Raj)}$ $\times$ 100nC, pois estes, baseados no tempo de retenção do etanol, eram mais repetíveis do que os dos baseados no butano.

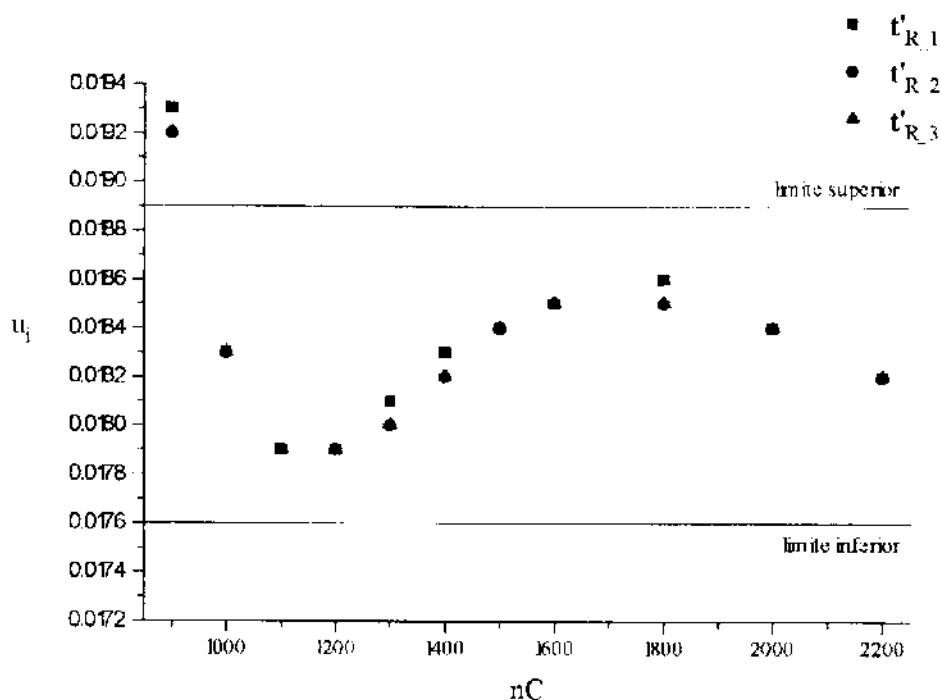


Figura V.6 - Gráfico do teste de Huber para rejeição de dados das curvas da mistura de referência para o cálculo dos Índices de Rejeição modificados para os óleos do Grupo 1.

Comparando-se o gráfico da figura V.6 com o da figura IV.3, nota-se que os desvios padrão entre as triplicatas é bem menor para os dados obtidos com o aparelho HP-5890 do que para os dados obtidos com o aparelho Pye-Unicam.

Foi montada nova matriz de dados para aplicação dos programas SIMCA e KNN - também precedida pela autoescalonagem através do programa SCAL. Esta matriz é formada por 14 linhas onde estão os óleos (objetos) e 59 colunas que correspondem às variáveis (ou substâncias) presentes em cada um dos cromatogramas. Os dados da matriz são as áreas relativas ao padrão interno, calculadas dividindo-se o valor de área do pico de interesse e a área do pico do padrão interno.

O programa mostrou que subgrupos são encontrados dentro do referido Grupo 1, os quais são observáveis no gráfico da figura V.7. Os óleos essenciais de sassafrás e de lavandin ordinário (pontos 2 e 10, respectivamente na figura V.7) encontram-se isolados dos demais óleos. Também nota-se a formação de outro grupo, dos pontos 11, 12 e 13, respectivamente os óleos de gerânio algerian e da África e rosa. Os resultados também definiram um grupo grande, com oito óleos (alecrim, togete, sálvia espinha, louro, bergamota, lemongrass, lima e laranja), que foi reanalisado quimiometricamente, mas não houve separação em novos grupos.

Portanto, a reanálise, a partir dos dados obtidos com um cromatógrafo mais moderno, que possibilita maior repetibilidade dos IRM, demonstra que o Grupo 1 da Tabela V.5 pode ser considerado como composto dos seguintes subgrupos:

Subgrupo 1.1: óleos de gerânio algerian, gerânio da África e rosa;

Subgrupo 1.2: óleos de alecrim, togete, sálvia espinha, louro, bergamota, lemongrass, lima e laranja,

e que dois óleos devem pertencer a categorias distintas das existentes entre os 15 óleos originalmente classificados como de um único grupo.

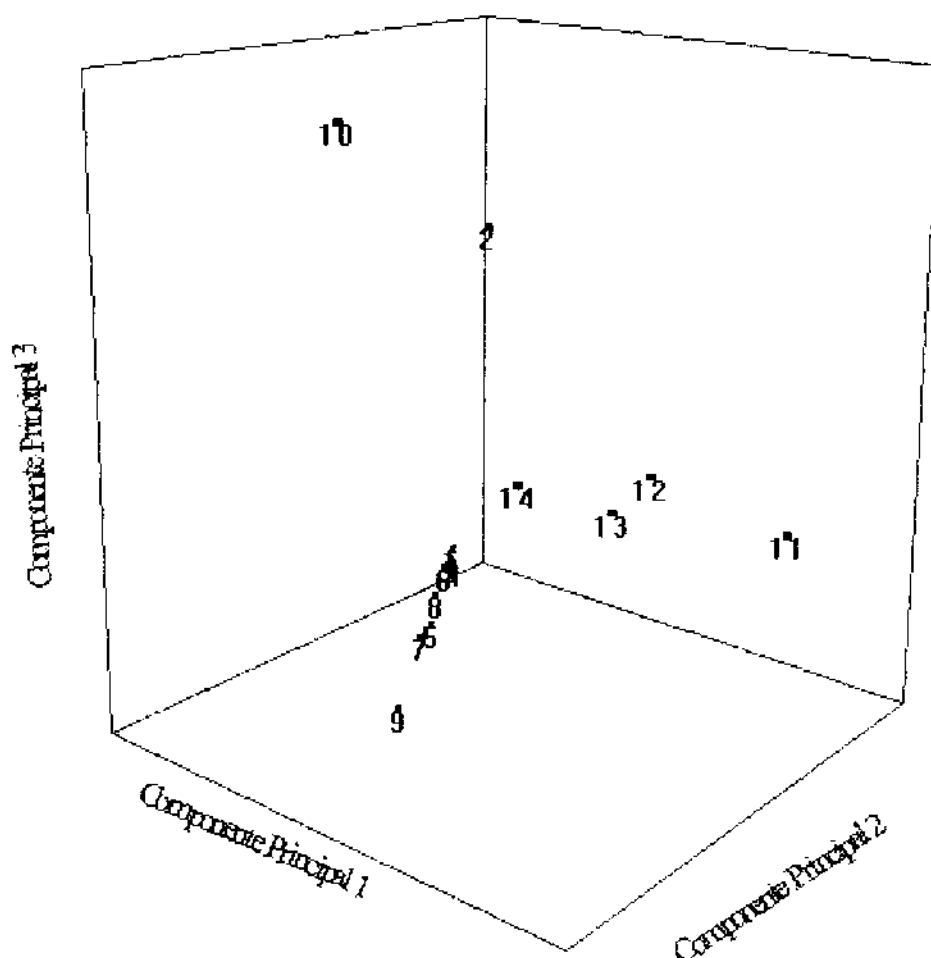


Figura V.7 - Gráfico tridimensional dos "scores" dos óleos presentes no grupo 1.

Com base na literatura^[16,39], foi realizado um levantamento de constituintes dos óleos do Grupo 1 da Tabela V.5. A relação entre os óleos e constituintes, mostrada na Tabela V.7, indica que o reestudo dos 14 óleos resultou em sub-grupos coerentes. Como pode ser visto, na Tabela V.7, para os pontos 11, 12 e 13, aparentemente isolados dos demais na figura V.7, o composto principal é o geraniol. Quanto ao sub-grupo de oito óleos, não reagrupados quimiometricamente, a análise baseada em componentes esperados sugere que ele poderia ter dois conjuntos. Um seria o dos óleos cítricos, que possivelmente englobe o óleo de alcarávia - o qual pode ter sido destacado pela análise quimiométrica devido à presença da carvona. Outro conjunto seria o dos óleos de alecrim, sálvia espinha, louro. Para o óleo de tagete não encontrou-se referência sobre possíveis constituintes. A Tabela V.7 também sugere que a distribuição dos óleos de sassafrás e lavandin ordinário, mostrada na Figura V.7 pelo afastamento dos pontos 2 e 10 dos demais, tem coerência, já que seus constituintes predominantes não são comuns com outros óleos.

	Óleos	nº na Fig. V.6	Constituintes Predominantes
sub-grupo 1 possíveis	alecrim	1	1,8-cineol; cânfora; α -pineno
	sálvia espinha	4	1,8-cineol; cânfora; α -pineno
	louro	5	1,8-cineol; linalool; eugenol
	tagete	3	não localizados
sub-conjuntos (a)	bergamota	6	limoneno
	lemongrass	7	neral (citrál b); geranial (citrál a)
	lima	8	limoneno; citrál
	laranja	9	limoneno
(b)	alcarávia	14	limoneno; carvona
sub-grupo 2	gerânio algerian	11	geraniol; citranelol; linalool
	gerânio da África	12	geraniol; citranelol; linalool
	rosa	13	geraniol; citranelol
isolados	lavandin ordinário	10	linalool; acetato de linalila; cânfora; 1,8-cineol
	sassafrás	2	safrol

Tabela V.7 - Constituintes dominantes^[16,39] nos óleos do grupo 1 da Tabela V.5 e reagrupamentos após reanálise quimiométrica

(a) Com base na inspeção de constituintes comuns.

(b) O óleo de alcarávia pode ter sido deslocado do sub-grupo 1 pela carvona.

V.4.2 - Avaliação dos Resultados das Classificações para os Grupos 2 a 6 da Tabela V.5.

A reanálise do Grupo 1 da Tabela V.5 foi feita com novos dados experimentais, obtidos em outro cromatógrafo; esta experimentação não pode ser repetida com os demais óleos, restando avaliar a coerência das atribuições nos demais grupos da Tabela V.5 a partir dos dados da literatura sobre possíveis constituintes destes óleos.

A partir de dados de livros e artigos^[39-46] verificou-se que nos óleos do grupo 3 há predominância dos compostos linalool e acetato de linalila. Já para os óleos do grupo 4 o composto em maior quantidade é o eugenol e em quantidades menores o acetato de eugenila, sendo única exceção o óleo levítico, para o qual não se conseguiu nenhuma referência.

A respeito dos óleos do Grupo 6, segundo Stashenko e colaboradores^[47,48] o óleo de ylang-ylang possui grandes quantidades de linalool, mas também é formado por sesquiterpenóis e sesquiterpenos, que possuem grande peso molecular e conseqüentemente elui mais devagar pela coluna, apresentando alto tempo de retenção. Este óleo apresenta ainda em sua constituição benzoato de benzila, que possui alto ponto de ebulição. No grupo 6, do qual cananga e ylang-ylang

fazem parte, há ainda a presença de sândalo, patchouli e vetiver bourbon, todos formados por sesquiterpenos e/ou sesquiterpenóis. O óleo de cedro possui como composto principal o cedrol (90%), um sesquiterpeno (álcool tricíclico). Com isto, percebe-se que este grupo tem coerência, pois é caracterizado por compostos com altos Índices de Retenção Modificados.

Em grupos onde há quantidades maiores de óleos, é possível que se encontre subgrupos, como no grupo 1. Para os grupos 2 e 5 não localizou-se referência a um componente que pudesse ser característico, como mostrado na tabela V.8, onde estão listados os compostos mais prováveis dos óleos do grupo 2. Nota-se que os óleos de tomilho branco e vermelho e orégano possuem os compostos carvacrol e timol em comum; que os óleos de pinho e folhas de cedro também estão juntos de acordo com seus compostos predominantes e que os de canela e de aniz são formados primordialmente por cinamaldeído e anetol. Contudo a classificação dos nove óleos da Tabela V.8 num mesmo grupo não tem uma evidência clara, a não ser a muito genérica (e vaga) de todos terem componentes aromáticos.

Óleos	Constituintes Predominantes
pinho siberiano	α -pineno; acetato de bornila; α -tujeno
folha de cedro	α -pineno; acetato de bornila; α -tujeno
tomilho vermelho	carvacrol; timol; p-cimeno
tomilho branco	carvacrol; timol; p-cimeno
orégano	carvacrol; timol
noz moscada	canfeno; α -pineno
canela	cinamaldeído
aniz	anetol
lavandin grosso	linalool; acetato de linalila; cânfora

Tabela V.8 - Constituintes dominantes nos óleos do grupo 2 da Tabela V.5.

Na Tabela V.9 encontram-se os constituintes provavelmente predominantes dos óleos do Grupo 5. Os óleos de alfazema e aspic possuem em comum com o de lavanda e os de lavandin, o álcool terpênico linalool. O 1,8-cineol está presente em quatro dos óleos, os de artemisia, eucalipto, alfazema e aspic. O óleo de hortelã faz parte da família das labiadas e do gênero *Mentha* (segundo a classificação botânica^[49]), e deve ter constituintes em comum com as mentas. Sobre os óleos de gomenol e cistus não se obteve referência.

No grupo 5, formado por um total de 14 óleos essenciais, percebe-se que ocorre a predominância de terpenos oxigenados. Foi muito difícil a formação deste agrupamento, pois o programa indicava similaridade entre esses óleos e os do grupo 1. Acredita-se que esta confusão entre os dois grupos seja devido aos problemas já referidos no item avaliação dos dados de retenção e detecção de problemas instrumentais (IV.2.3).

Óleos	Constituintes Predominantes
alfazema	1,8-cineol; linalool; cânfora
aspic	1,8-cineol; linalool; cânfora
artemisia	cânfora; α -pineno; 1,8-cineol
lavanda	linalool; acetato de linalia
lavandin abrialis	linalool; acetato de linalia
lavandin absoluto	linalool; acetato de linalia
menta piperita	mentol; mentona
menta arvensis	mentol; mentona
hortelã	não localizados
menta spearmint	carvona; mentol
eucalipto	1,8-cineol
galbano	α -pineno; β -pineno

Tabela V.9 - Constituintes dominantes nos óleos do grupo 5 da Tabela V.5.

VI - ANÁLISE DE ALGUNS ÓLEOS ESSENCIAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADO A UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.

Cinco dos cinquenta e três óleos essenciais utilizados neste trabalho foram analisados por CG-EM para estudos de alguns de seus constituintes. Os óleos analisados foram os de lavanda, bay, menta arvensis e rosa. Nas análises foi utilizado um cromatógrafo gasoso HP5890 acoplado a um detector seletivo de massas do tipo HP5970 e a um microcomputador, para a identificação, por espectrometria de massas, dos componentes de maior abundância dos cromatogramas de lavanda, de bay, de menta arvensis e de rosa. As condições utilizadas nesta análise são indicadas na tabela VI.1.

temperaturas	coluna	inicial	80 °C
		final	280 °C
		taxa de aquecimento	6 °C / min
	injetor	320 °C	
	detector	285 °C	
coluna	fase estacionária	HP-5(5% fenil metil silicone)	
	comprimento	25 metros	
	diâmetro interno	0,20 mm	
	diâmetro do filme	0,2 μ m	
vazão do gás de arraste	hidrogênio	1 ml / min.	
razão de divisão (injetor)	$1/60$		
volume de injeção	0,1 μ l		

Tabela VI.1 - Condições cromatográficas na análise por CG-EM.

A amostra foi ionizada por impacto de elétrons, sendo a energia de ionização dos elétrons de 70eV. Os espectros de massas foram obtidos por varredura automática na faixa de 50 - 550 m/z. As análises dos espectros de massas foram feitas por comparação com a biblioteca de padrões Wiley/NBS⁽⁵⁰⁾. Para o óleo de lavanda, 2 picos cromatográficos foram analisados por espectro de massas; para o de bay, 4 picos; para o de menta arvensis, 3 picos e para o de rosa, 3 picos. A tabela VI.2 indica as razões m/z dos fragmentos mais representativos e suas respectivas intensidades.

Óleo	Composto	Fragmentos e Intensidades Relativas					
Lavanda	1	m/z55	m/z69	m/z71	m/z80	m/z93	m/z121
		68	43	100	29	64	17
	2	m/z55	m/z69	m/z71	m/z80	m/z93	m/z121
		28	29	23	43	100	23
Bay	3	m/z77	m/z91	m/z107	m/z115	m/z133	m/z134
		54	22	60	18	89	100
	4	m/z77	m/z91	m/z103	m/z131	m/z149	m/z164
		63	47	51	40	45	100
	5	m/z55	m/z69	m/z71	m/z80	m/z93	m/z121
		68	43	100	29	64	17
	6	m/z77	m/z91	m/z107	m/z147	m/z163	m/z178
		35	59	50	37	35	100
Menta Arvensis	7	m/z55	m/z69	m/z83	m/z97	m/z112	m/z139
		96	100	32	38	98	42
	8	m/z55	m/z69	m/z71	m/z81	m/z95	m/z112
		98	100	69	44	48	96
	9	m/z71	m/z81	m/z95	m/z109	m/z123	m/z138
		100	85	69	15	28	13
Rosa	10 ^(a)	m/z59	m/z67	m/z81	m/z94	m/z111	m/z137
		100	31	15	38	20	5
	11 ^(a)	m/z59	m/z68	m/z81	m/z94	m/z111	m/z137
		100	32	18	40	21	4
	12	m/z55	m/z69	m/z71	m/z80	m/z93	m/z121
		68	43	100	29	64	17

Tabela VI.2 - CG-EM: Principais fragmentos e suas intensidades relativas para os compostos dos óleos essenciais.

a: não encontrados na biblioteca de padrões.

Os compostos identificados pelo espectro de massas, para cada um dos óleos essenciais analisados, estão indicados na tabela VI.3.

Óleos Essenciais	Composto	Nome
Lavanda	1	linalool
	2	acetato de linalila
Bay	3	chavicol
	4	eugenol
	5	linalool
	6	metil eugenol
Menta Arvensis	7	isomentona
	8	mentona
	9	mentol
Rosa	12	linalool

Tabela VI.3 - Identificação dos compostos por comparação de seus espectros de massas com dados da literatura.

Os resultados obtidos com CG-EM indicam que os levantamentos de literatura sobre componentes predominantes e característicos dos óleos essenciais é coerente e, portanto, apoiam nossos resultados de classificações obtidos a partir das informações da literatura. Com tais informações experimentais, a metodologia de classificação por quimiometria, baseada em dados cromatográficos poderia ser reciclada e, conseqüentemente, melhor consubstanciada.

VII - COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS DE RETENÇÃO DE CROMATÓGRAFOS.

Os problemas de repetibilidade dos IRM obtidos com o antigo cromatógrafo Pye-Unicam, que revelaram-se menos graves com o HP-5890, levou a um ensaio de comparação de tempos de retenção obtidos por três cromatógrafos gasosos. Como amostra de teste, foi usada uma mistura de hidrocarbonetos formada por n-alcenos com 9 a 22 átomos de carbono. Para todas as análises foi utilizada a mesma programação de temperatura; as vazões do gás de arraste foram diferentes, porque os cromatógrafos estavam equipados com colunas capilares de diâmetro interno 0,53 mm ou 0,20mm. O primeiro cromatógrafo utilizado foi um modelo Pye-Unicam, cujo injetor "splitless", somente permite o uso de coluna de diâmetro interno 0,53 mm. O segundo cromatógrafo utilizado foi um HP-5890, acoplado a um espectrômetro de massas e o terceiro foi um HP-5890 com DIC. Os aparelhos HP-5890 possuem injetores "split" e neles são utilizadas as colunas de diâmetro interno 0,20 mm.

Os resultados para estas análises estão demonstrados nas tabelas VII.1-3, onde estão relacionados os tempos de retenção e, para as suas triplicatas, as médias, os desvios padrão e desvios padrão relativos (em porcentagem).

número de carbonos	tempos de retenção (min)			média das triplicatas	dp	dpr %
	t _{R1}	t _{R2}	t _{R3}			
C9	3,43	3,423	3,431	3,428	0,004	0,13
C10	5,018	5	5,006	5,008	0,009	0,18
C11	6,956	6,932	6,952	6,947	0,013	0,19
C12	9,085	9,051	9,069	9,068	0,017	0,19
C13	11,24	11,202	11,229	11,224	0,020	0,17
C14	13,331	13,303	13,332	13,322	0,016	0,12
C15	15,36	15,333	15,357	15,350	0,015	0,10
C16	19,188	19,145	19,175	19,169	0,022	0,12
C18	22,648	22,613	22,64	22,634	0,018	0,08
C20	23,957	23,932	23,967	23,952	0,018	0,08
C22	25,818	25,784	25,818	25,807	0,020	0,08

Tabela VII.1 - Dados obtidos com cromatógrafo HP-5890 acoplado a um E.M.

número de carbonos	tempos de retenção ajustados (min)			média das triplicatas	dp	dpr %
	t _{R1}	t _{R2}	t _{R3}			
C9	1,204	1,195	1,195	1,198	0,005	0,43
C10	2,167	2,158	2,156	2,160	0,006	0,27
C11	3,567	3,557	3,553	3,559	0,007	0,20
C12	5,339	5,326	5,322	5,329	0,009	0,17
C13	7,338	7,322	7,318	7,326	0,011	0,14
C14	9,414	9,397	9,393	9,401	0,011	0,12
C15	11,475	11,456	11,452	11,461	0,012	0,11
C16	13,482	13,461	13,455	13,466	0,014	0,11
C18	17,269	17,243	17,240	17,251	0,016	0,09
C20	20,731	20,702	20,700	20,711	0,017	0,08
C22	23,902	23,873	23,871	23,882	0,017	0,07

Tabela VII.2 - Dados obtidos do cromatógrafo HP-5890 com detector por ionização em chama.

número de carbonos	tempos de retenção ajustados (min)			média das triplicatas	dp	dpr %
	t _{R1}	t _{R2}	t _{R3}			
C9	3,12	3,97	4,43	230,5	40,0	17,34
C10	5,3	6,36	6,7	367,2	43,8	11,93
C11	8,08	9,03	9,22	526,7	36,7	6,97
C12	10,95	11,74	11,82	690,1	29,0	4,20
C13	13,73	14,40	14,43	851,1	23,8	2,80
C14	16,36	16,95	16,97	1005,7	20,9	2,08
C15	18,84	19,41	19,41	1153,2	19,7	1,71
C16	21,27	21,83	21,81	1298,1	19,2	1,48
C18	26,03	26,67	26,63	1586,7	21,4	1,35
C20	30,77	31,6	31,54	1878,3	27,7	1,47
C22	35,74	36,81	36,73	2185,5	35,6	1,63

Tabela VII.3 - Dados obtidos cromatógrafo Pye-Unicam com detector por ionização em chama.

Para os dados da tabela VII.1, não foram calculados os tempos de retenção ajustados, devido ao acoplamento com o espectrômetro de massas, que estava programado para coletar sinais a partir de um certo tempo, não sendo possível a detecção do sinal do gás butano, de tempo de retenção reduzido. Os dados das três tabelas VII.1-3 não foram submetidos a testes de rejeição. Aplicando-se teste para eliminação de anomalias, nota-se uma considerável diminuição dos desvios padrão entre as triplicatas, mas mesmo assim, para o aparelho Pye-Unicam, tabela VII.4, os valores de desvios padrão relativos permanecem elevados comparativamente àqueles obtidos com os HP-5890 (tabelas VII.1 e 2).

número de carbonos	tempos de retenção ajustados (min)			média das triplicatas	dp	dpr %
	t _{R1}	t _{R2}	t _{R3}			
C9		238,4	266	252,2	19,5	7,74
C10		381,6	402	391,8	14,4	3,68
C11		542	553,2	547,6	7,9	1,45
C12		704,4	709,2	706,8	3,4	0,48
C13	823,6	864	865,6	851,1	23,8	2,80
C14	981,6	1017,2	1018,4	1005,7	20,9	2,08
C15	1130,4	1164,8	1164,4	1153,2	19,7	1,71
C16	1276	1309,6	1308,8	1298,1	19,2	1,48
C18	1562	1600,4	1597,6	1586,7	21,4	1,35
C20	1846,4	1896	1892,4	1878,3	27,7	1,47
C22	2144,4	2208,4	2203,6	2185,5	35,6	1,63

Tabela VII.4 - Dados obtidos com cromatógrafo Pye-Unicam, após rejeição de dados.

Portanto, como discutido no item detecção de problemas instrumentais (item IV.2.3), já se cogitava a existência de problemas instrumentais durante o trabalho com o Pye-Unicam, que comprometeram os cálculos dos IRM. Feita a comparação entre o cromatógrafo antigo e o de geração mais moderna, confirmou-se os problemas de reprodutibilidade do aparelho Pye-Unicam. Como descrito na reanálise quimiométrica do Grupo 1 da Tabela V.5 (item V.3.3), com o uso do HP-5890 conseguiu-se a separação do grupo 1 em dois grupos distintos. Esta separação não foi perceptível com a utilização do aparelho Pye-Unicam, fornecendo evidências maiores da ocorrência de problemas do aparelho, que devem ter de certa forma prejudicado a formação de agrupamentos, e consequentemente a "classificação tentativa".

VIII - CONCLUSÕES.

Através de combinação de técnicas de cromatografia gasosa de alta resolução e métodos quimiométricos é possível realizar agrupamentos de óleos essenciais, coerentes quanto à presença de compostos, ou ainda, à estrutura destes.

Neste trabalho não se obteve as classificações exclusivamente a partir dos programas quimiométricos, pois foi necessário recorrer a rejeição de resultados e inspeção visual para seleção de dados. Contudo, pode-se concluir que o enfoque Químico-Analítico explorado tem potencialidade para gerar banco de dados, nos quais óleos desconhecidos seriam classificados, para posterior confirmação com outras técnicas de especificação. Portanto, a classificação como aqui estudada abreviaria o tempo de aplicação dos ensaios que levariam às identificações e, por isto, foi mencionada neste trabalho como método de pré-especificação.

Foi verificado estatisticamente que não é relevante o fato de se trabalhar com dados calculados a partir de tempos de retenção ajustados pelo butano ou pelo etanol (solvente); também é indiferente que os Índices de Retenção Modificados (IRM) sejam calculados com a equação que os define (equação IV.1) ou por interpolação das retas $t'_R \times 100 \text{ nC}$ ou $t_{Raj} \times 100 \text{ nC}$.

Dentro da parte quimiométrica deste trabalho, o método KNN se mostrou como uma ferramenta bastante útil e complementar ao método SIMCA, assim como a análise visual do gráfico dos agrupamentos formados durante a aplicação do programas quimiométricos.

Os resultados obtidos por CG-EM demonstram que é possível realizar estudos mais aprofundados de identificação de constituintes dos óleos essenciais, que poderiam ser aplicados aos 53 óleos para melhor fundamentação da metodologia de classificação.

IX - BIBLIOGRAFIA.

1. Sandra, P.; Bicchi, C.; "Capillary Gas Chromatography in Essential Oils Analysis"; Huethig; Nova York (1987).
2. Mc Nair, H.M.; Bonelli, E.J. ; "Basic Gas Chromatography"; 4 edição; Varian; Berkeley, Califórnia (1968).
3. Jennings, W.; Journal of Chromatographic Science (1979), 17, 1979, 636.
4. Godefroot, M.; Sandra, P.; Verzele, M.; Journal of Chromatography (1981), 203, 325.
5. Ettre, L. S.; Analytical Chemistry (1964), 36, 31A.
6. Cotroneo, a.; Dugo, G.; Favretto, L.; Favretto, G.; Journal of Chromatography 1988, 449, 183.
7. Tomás, X.; Sabaté, L.G.; Analytica Chimica Acta (1986), 191, 439
8. Duewer, D.L., Kowalski, B.R.; Schatzki, T.F.; Analytical Chemistry, (1975), 47, 1573.
9. Kosman, J.J.; Lukco, R.G.; Journal of Chromatography Science, (1993), 31, 88.
10. Van Den Dool, H.; Kratz, P.D.; Journal of Chromatography, (1963), 2, 463.
11. Scarminio, I.S.; "Desenvolvimento de um Sistema Quimiométrico para Microcomputadores e Algumas Aplicações"; tese de doutorado, Unicamp, Campinas, S.P (1989).
12. Wold, S.; Pattern Recognition, (1976), 8, 127.
13. Deming, S.N.; Morgan, S.L.; Journal of Chromatography (1975), 112, 267.
14. Kryger, L.; Talanta (1981), 28, 871.
15. Templeton, W. "An Introduction to the Chemistry of Terpenoids and Steroids"; Butterworth & Co. (1969).
16. Guenther, E.; "The Essential Oils"; van Nostrand, Nova York, volumes I, II, III, IV, V, VI, (1972).
17. Newman, A.A.; "Chemistry of Terpenes and Terpenoids"; Academic Press; Londres; (1972).
18. Roberts, J.D.; Caserio, M.C.; "Basic Principles of Organic Chemistry"; W.A. Benjamin, Inc.; Nova York (1965); pág. 1165.
19. Bonato, P.S.; "Cromatografia gasosa", in Collins, C.H.; Braga, G.L. (coordenadores). Introdução a Métodos Cromatográficos; Editora da UNICAMP; Campinas; 1987.

20. Van Deemter, J.J.; Zuiderweg, F.J.; Klinkenberg, A.; Chemical Engenniring Science, (1956), 5, 271.
21. Malinowski, F.; Howery, D.; "Factor Analysis in Chemistry"; Wiley, Nova York (1980).
22. Kowalski, B.R.; Ramos, L.S.; Beebe, K.R.; Carey, W.P.; Erickson, B.E.; Wilson, B.E.; Wangen, L.E.; Analytical Chemistry, (1986), 58, 294R.
23. Bruns, R.E.; Faigle, J.F.G.; Quimica Nova (1985), 8, 84
24. Kováts, E.; Helvetica Chimica Acta; (1958), 41, 1915.
25. Grob, R.L.; "Modern Practice of Gas Chromatography"; John Wiley, Nova York (1977).
26. McFadden, W.; "Techniques of Combined Gas Chromatography/ Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis"; John Wiley, Nova York (1973).
27. Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C.; "Spectrometric Identification of Organic Compounds"; John Wiley, Nova York (1980).
28. Skoog, D.A.; Leary, J.J.; "Principles of Instrumental Analysis"; 4ª edição; Saunders; Filadélfia (1992); pág. 420.
29. McLafferty, F.W.; "Interpretation of Mass Spectra: an Introduction"; W.A. Benjamin, Inc.; Nova York (1967).
30. Augusto, F.; "Desenvolvimento e Aplicação de Software para Cromatografia gasosa, tese de mestrado, Unicamp, Campinas, S.P (1990).
31. Valente, A.L.P.; Augusto, F.; Laboratory Microcomputer (1992), 11, 21.
32. Pacote de progamas quimiométricos fornecidos pelo Prof. Dr. Roy E. Bruns.
33. Davies, P.I.; Fresenius Zeitschrift Analytical Chemistry (1988), 331, 513.
34. Miller, J.C.; Miller, J.N.; "Estatística para Química Analítica"; 2ª edição; Addison-Wesley Iberoamericana; Delaware, USA (1993).
35. Meier, P.C. e Zünd, R.E.; "Statistical Methods in Analytical Chemistry"; Wiley; N.Y. (1993); pág. 49 a 51.
36. Barnett, V.; Lewis, T.; "Outliers in Statistical Data"; segunda edição; John Wiley & Sons, Nova York (1984).
37. Huber, P.J.; "Robust Statistics"; John Wiley , Nova York (1981).
38. Wold, S. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (1987), 2, 37.
39. Formavcek, V.; Kubeczka, K.H.; "Essential Oils Analysis by HRGC and C-13 RMN Spectroscopy"; John Wiley & Sons, Nova York (1982).

40. Borges, P.; Pino, J. e Sánchez, E.; *Die Nahrung*, (1992), 36, 494.
41. Kawabe, S.; Fujiwara, H.; Murakami, K.; Hosomi, K; *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, (1993), 57, 657.
42. Lawrence, B.M.; *Perfumer & Flavorist*, (1993), 18, 53.
43. Tateo, F.; Salvatore, G. e Nicoletti, M.; *Industrie Alimentari*, (1993), 32, 373.
44. Borges, P.; Pino, J. e Roncal, E.; *Die Nahrung*, (1993), 37, 119.
45. Hawthorne, S.B. e colaboradores; *Journal of Chromatography*, (1993), 634, 297.
46. Comité de Métodos Analíticos; *Analyst*, (1993), 118, 1089.
47. Stashenko, E.; Martinez, J.R., Macku, C.; Shibamoto, T.; *Journal of High Resolution Chromatography*, (1993), 16, 441.
48. Stashenko, E.; Torres, W.; Morales, J.R.M.; *Journal of High Resolution Chromatography*, (1995), 18, 101.
49. Correa, M.P.; "Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas"; volume IV; Imprensa Nacional; Rio de Janeiro (1984); pág. 168.
50. Wiley/NBS Database (PBM Format), John Wiley, Nova York (1986).

XI - Apêndices

Apêndice A

Na montagem da planilha para cálculo da velocidade de gás de arraste de maior eficiência da coluna, tinha-se como dados experimentais os tempos de retenção do composto de interesse e a largura da base do pico cromatográfico, em duplicata. Com isto, foi calculado o número de pratos teóricos, n , de cada pico (equação XI.1) e, conhecendo-se o comprimento da coluna, L , igual a 2500 cm, a altura equivalente do prato teórico, h , (equação XI.2).

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (\text{equação XI.1})$$

$$H = \frac{L}{n} \quad (\text{equação XI.2})$$

Os cálculos, assim como a montagem da planilha para o benzaldeído, estão demonstrados nas tabelas que se seguem:

númerodas duplicatas N	largura da base (s) W_b	tempo de retenção(s) t_R	HETP (cm) H
1	18,5	626,2	0,1364
	18	625,2	0,1295
2	14,3	490,8	0,1326
	14,3	490,8	0,1326
3	11,7	390,1	0,1406
	11,7	390,5	0,1403
4	9,6	317,5	0,1428
	9,7	318,2	0,1452
5	8,4	264,8	0,1572
	8,1	264,5	0,1465
6	7,4	233,4	0,1571
	7,3	232,8	0,1536
7	6,5	196,4	0,1711
	6,5	196,4	0,1711
8	5,7	169,8	0,1761
	5,8	169,7	0,1825

tempo de retenção do gás (s)
199,8
154,6
124,6
99,1
85,6
75
60,4
54,2

veloc, gás na coluna (mm/s)	HETP(mm) (média)	$\frac{1}{\text{velocidade}}$	$(\frac{1}{\text{velocidade}})^2$	$\frac{HETP}{\text{velocidade}}$	HETP*veloc.	(veloc.) ²
125,125	1,329	7,99E-03	6,39E-05	125,1	1,57E+04	1,57E+04
161,708	1,326	6,18E-03	3,82E-05	161,7	2,61E+04	2,61E+04
200,642	1,404	4,98E-03	2,48E-05	200,6	4,03E+04	4,03E+04
252,270	1,440	3,96E-03	1,57E-05	252,3	6,36E+04	6,36E+04
292,056	1,519	3,42E-03	1,17E-05	292,1	8,53E+04	8,53E+04
333,333	1,554	3,00E-03	9,00E-06	333,3	1,11E+05	1,11E+05
413,907	1,711	2,42E-03	5,84E-06	413,9	1,71E+05	1,71E+05
461,255	1,793	2,17E-03	4,70E-06	461,3	2,13E+05	2,13E+05
2240,297	12,077	4,46E-04	1,74E-04	2240,3	5,75E+03	7,26E+05

matriz A					
N	1/veloc.	veloc.	8	3,41E-02	2,24E+03
1/veloc.	1/veloc.2	N	3,41E-02	1,74E-04	8
veloc.	N	veloc.2	2,24E+03	8	7,26E+05

matriz D	
HETP	12,077
HETP/veloc.	2,24E+03
HETP*veloc.	7,26E+05

INV.A		
2,11E+01	-2,33E+03	-3,95E-02
-2,33E+03	2,68E+05	4,22E+00
-3,95E-02	4,22E+00	7,67E-05

$$HETP = A + B/\text{veloc.} + C*\text{veloc.}$$

0,854874 =coef.A

29,48672 =coef.B

0,001889 =coef.C

$$\text{velocidade máxima eficiência} = \sqrt{\frac{B}{C}} = 124,944 \text{ (mm/s)}$$

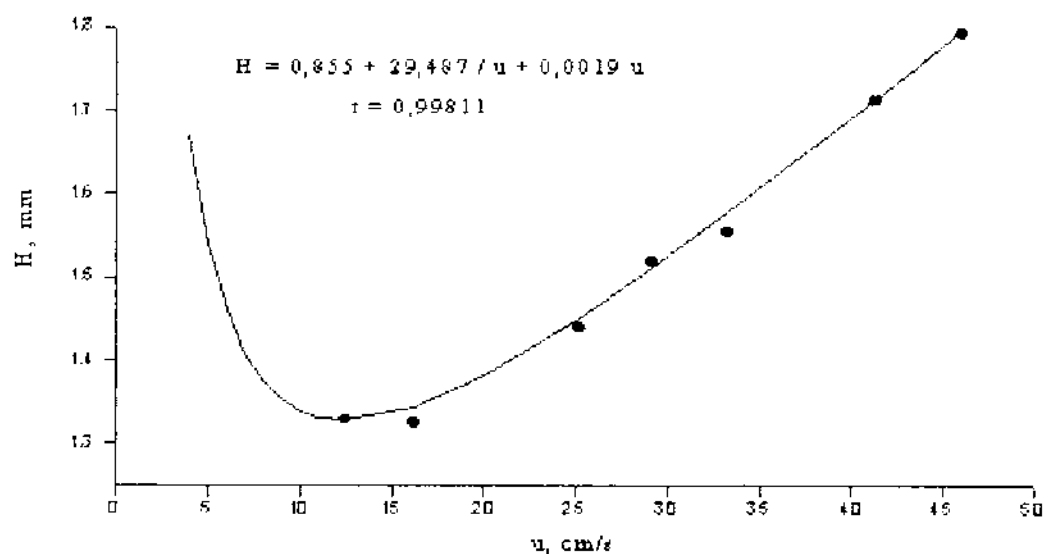
$$12,4944 \text{ (cm/s)}$$

veloc.gás na coluna (cm/s)	HETP(mm) (média)	HETP(mm) (interpol.)	(Resíduo) ²
12,513	1,329	1,327	6,72E-06
16,171	1,326	1,343	2,64E-04
20,064	1,404	1,381	5,42E-04
25,227	1,440	1,448	6,44E-05
29,206	1,519	1,507	1,29E-04
33,333	1,554	1,573	3,77E-04
41,391	1,711	1,708	1,25E-05
46,125	1,793	1,790	8,62E-06

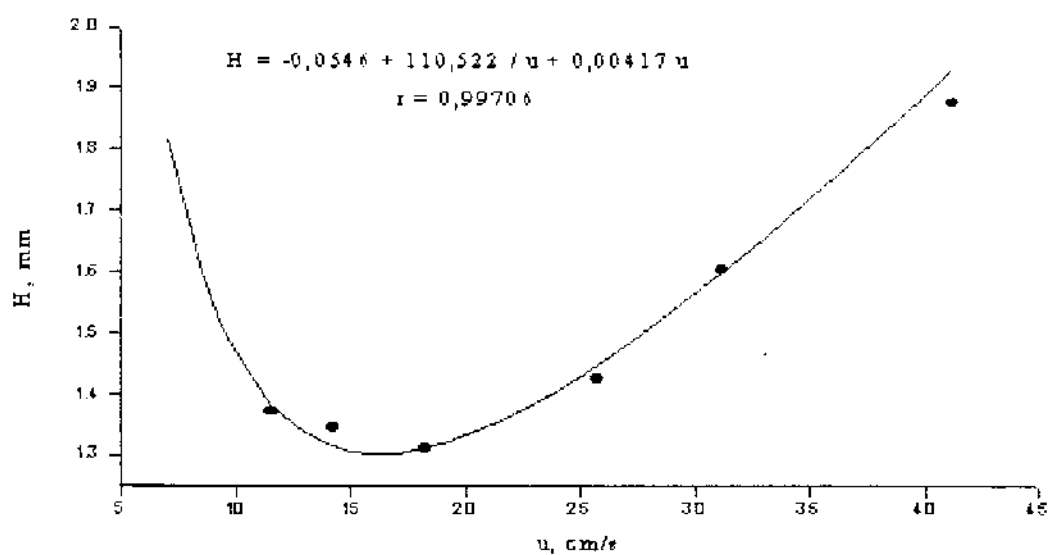
Para o cálculo dos coeficientes A, B e C da equação de Van Deemter, foram montadas as matrizes **A** (3x3) e **D** (3x1) de acordo com o quadro acima, onde seus elementos foram calculados a partir dos dados experimentais. A matriz **B** (3x1) nos fornece justamente os valores dos coeficientes da equação. Para o cálculo desta matriz foi utilizada a seguinte relação: $\mathbf{B} = \text{INVA} * \mathbf{D}$.

Apêndice B

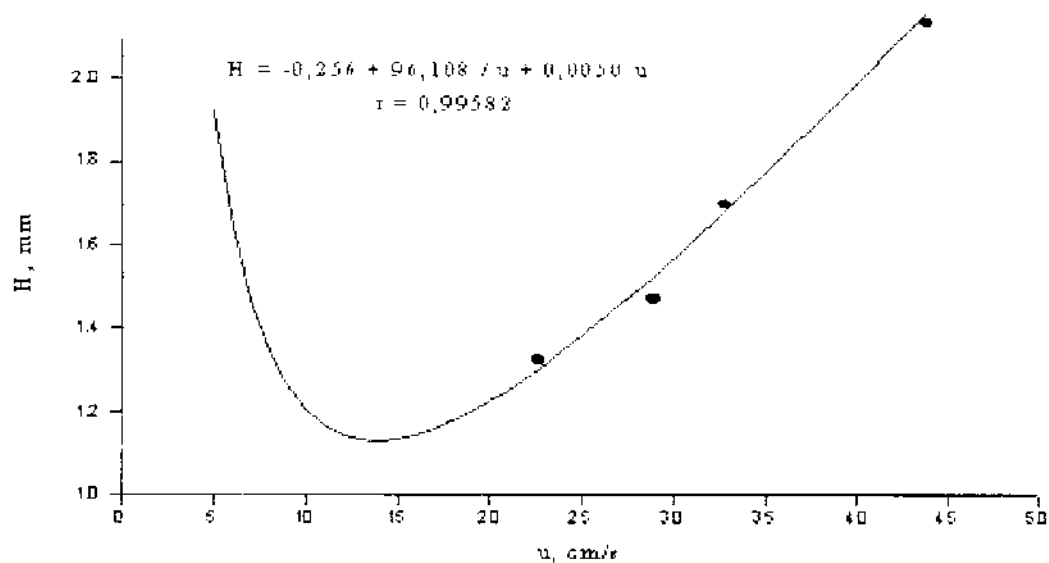
Curvas de Van Deemter para o benzaldeído, éter diisopropílico, isooctano, tolueno e undecano, realizadas durante o levantamento da melhor vazão do gás de arraste para a análise dos óleos essenciais (item III.4). Acompanham as respectivas equações de Van Deemter e o coeficiente de correlação, r .



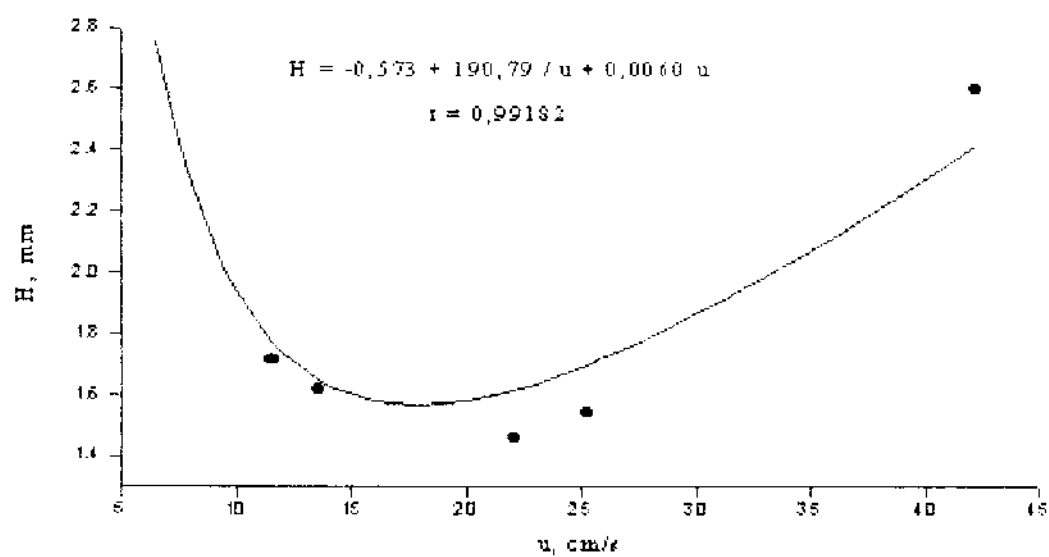
Curva de Van Deemter para o Benzaldeído.



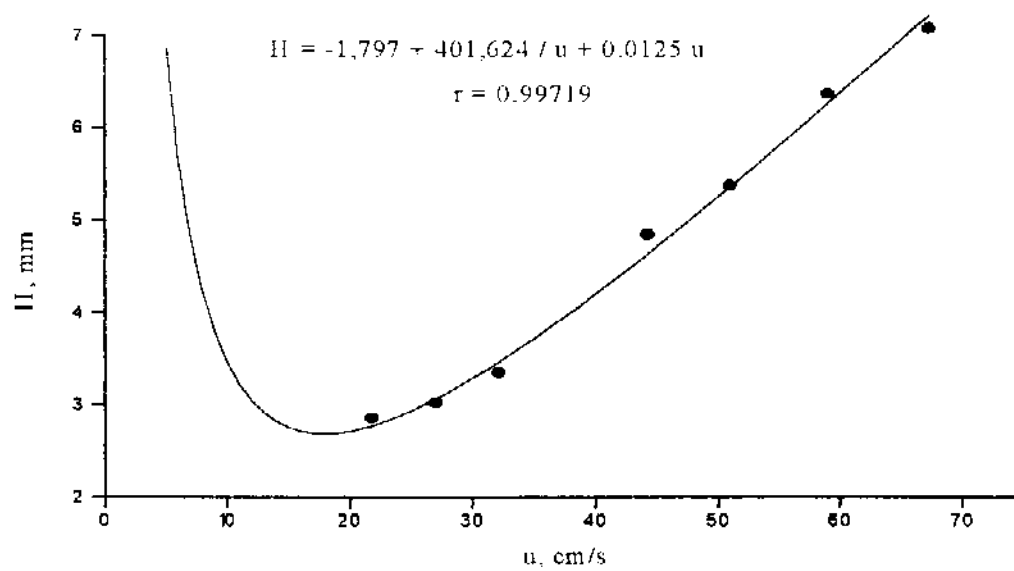
Curva de Van Deemter para o Éter Diisopropílico.



Curva de Van Deemter para o Isooctano.



Curva de Van Deemter para o Tolueno.



Curva de Van Deemter para o Undecano.

Apêndice C

Os valores de Índices foram comparados em termos de seus desvios padrão relativo (dpr). Foram calculados os dpr dos Índices de Retenção Modificados utilizando a equação de Kratz e Van Den Dool ($dpr(I_{calc})$) e os dpr dos IRM interpolando os tempos de retenção ajustados de cada pico na equação da reta formada pela mistura de referência ($dpr(I_{ip})$). A porcentagem entre as diferenças de dpr para os dois casos foi calculada, ($E\% I(t'_R)$), para os tempos de retenção ajustados pelo butano e, ($E\% I(t'_{Raj})$), para os tempos ajustados pelo etanol.

Óleo Essencial de Aspic					
t' _R pelo butano:			t' _R pelo etanol:		
dpr(I _{calc})	dpr(I _{ip})	E% I(t' _R)	dpr(I _{calc})	dpr(I _{ip})	E% I(t' _{Raj})
0,83	0,84	1,4	0,67	0,67	0,0
0,76	0,77	1,3	0,61	0,61	0,0
0,74	0,75	1,3	0,60	0,60	0,0
0,72	0,73	1,3	0,58	0,58	0,0
0,70	0,71	1,3	0,56	0,56	0,0
0,65	0,68	4,3	0,52	0,53	3,2
0,61	0,64	4,3	0,48	0,50	3,1
0,59	0,61	4,2	0,46	0,48	3,1
0,58	0,61	4,2	0,46	0,47	3,0
0,55	0,57	4,1	0,43	0,45	3,0
0,55	0,58	4,1	0,44	0,45	3,0
0,52	0,55	4,1	0,41	0,43	3,0
0,49	0,51	3,4	0,39	0,40	2,3
0,44	0,46	3,3	0,36	0,37	2,3

Óleo Essencial de Gerânio Algerian					
t' _R pelo butano:			t' _R pelo etanol:		
dpr(I _{calc})	dpr(I _{ip})	E% I(t' _R)	dpr(I _{calc})	dpr(I _{ip})	E% I(t' _{Raj})
2,68	2,42	10,7	2,49	2,24	11,3
2,49	2,26	10,2	2,34	2,09	11,9
1,52	1,54	1,3	1,38	1,38	0,0
1,42	1,44	1,3	1,28	1,28	0,0
1,27	1,30	2,0	1,15	1,15	0,2
1,11	1,16	4,3	0,98	1,01	3,1
1,06	1,11	4,3	0,93	0,96	3,1
0,95	0,99	4,1	0,82	0,84	3,0
0,79	0,82	4,0	0,66	0,68	3,2
0,72	0,75	3,4	0,60	0,61	2,3
0,71	0,73	3,4	0,58	0,60	2,3
0,66	0,68	3,3	0,53	0,55	2,3
0,59	0,61	3,3	0,47	0,48	2,2
0,51	0,52	0,8	0,40	0,40	0,2
0,33	0,32	3,7	0,23	0,22	4,7

Óleo Essencial de Noz Moscada					
t' _R pelo butano:			t' _R pelo etanol:		
dpr(I _{calc})	dpr(I _{exp})	E% I(t' _R)	dpr(I _{calc})	dpr(I _{exp})	E% I(t' _{Raj})
0,99	0,92	8,0	1,00	0,92	8,8
0,92	0,85	7,7	0,93	0,85	8,5
0,90	0,83	7,7	0,91	0,84	8,4
0,74	0,73	0,7	0,74	0,73	1,3
0,63	0,63	0,7	0,64	0,63	1,3
0,54	0,56	3,0	0,54	0,56	2,5
0,50	0,51	2,9	0,50	0,51	2,4
0,50	0,51	2,9	0,50	0,51	2,4
0,41	0,43	2,9	0,42	0,43	2,4
0,38	0,38	0,9	0,38	0,38	0,4
0,36	0,36	0,9	0,36	0,36	0,4
0,32	0,32	1,7	0,33	0,32	2,1
0,32	0,32	1,6	0,32	0,32	2,0
0,33	0,32	1,9	0,33	0,32	2,4

Óleo Essencial de Rosa					
t' _R pelo butano:			t' _R pelo etanol:		
dpr(I _{calc})	dpr(I _{exp})	E% I(t' _R)	dpr(I _{calc})	dpr(I _{exp})	E% I(t' _{Raj})
1,32	1,30	1,3	1,37	1,31	4,6
1,04	1,06	2,3	1,05	1,07	1,4
0,82	0,87	4,7	0,84	0,87	3,9
0,71	0,74	4,5	0,72	0,74	3,7
0,67	0,70	4,5	0,68	0,71	3,7
0,63	0,66	4,3	0,64	0,66	3,6
0,57	0,59	4,3	0,57	0,60	3,5
0,48	0,45	7,1	0,48	0,45	7,9
0,45	0,42	7,0	0,45	0,42	7,8
0,45	0,42	6,9	0,45	0,42	7,7
0,38	0,38	1,1	0,38	0,38	1,7
0,38	0,38	1,0	0,38	0,38	1,7
0,17	0,33	47,6	0,18	0,34	47,4
0,19	0,37	49,7	0,19	0,37	49,5
0,20	0,39	49,4	0,20	0,39	49,2

Óleo Essencial de Pau-Rosa					
t _R pelo butano:			t _R pelo etanol:		
dpr(I _{calc})	dpr (I _{tp})	E% I(t _R)	dpr(I _{calc})	dpr (I _{tp})	E% I(t _{Raj})
1,43	1,43	0,1	1,32	1,30	1,1
1,33	1,34	0,4	1,23	1,21	1,0
1,28	1,29	0,4	1,18	1,17	1,0
1,26	1,27	0,4	1,16	1,15	1,0
1,24	1,24	0,4	1,13	1,12	1,0
1,11	1,15	3,4	1,01	1,04	2,2
1,06	1,10	3,4	0,97	0,99	2,1
1,05	1,08	3,3	0,95	0,97	2,1
1,01	1,04	3,3	0,91	0,93	2,1
0,94	0,97	3,2	0,84	0,86	2,0
0,90	0,93	3,1	0,81	0,83	2,0
0,89	0,92	3,1	0,80	0,81	2,0
0,60	0,59	0,9	0,52	0,51	1,9
0,59	0,58	1,1	0,51	0,50	1,9
0,24	0,45	47,2	0,20	0,38	46,9

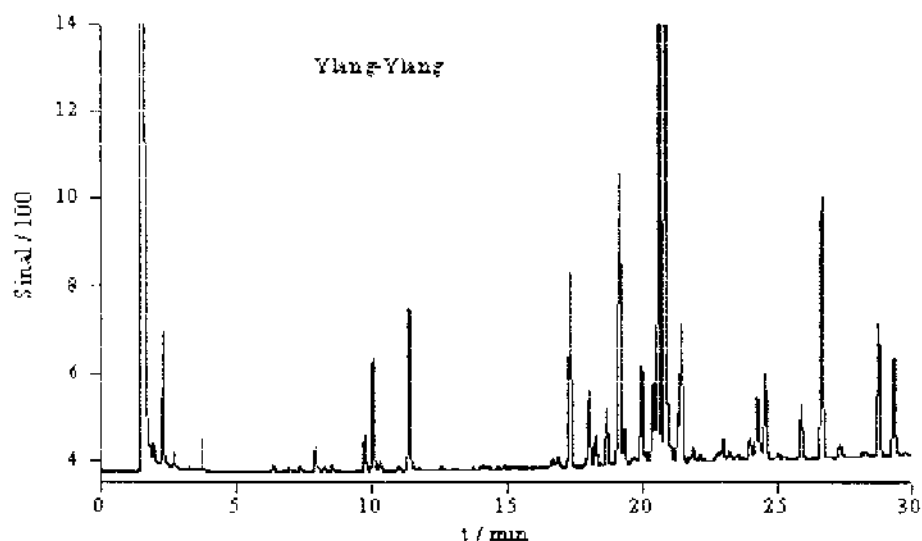
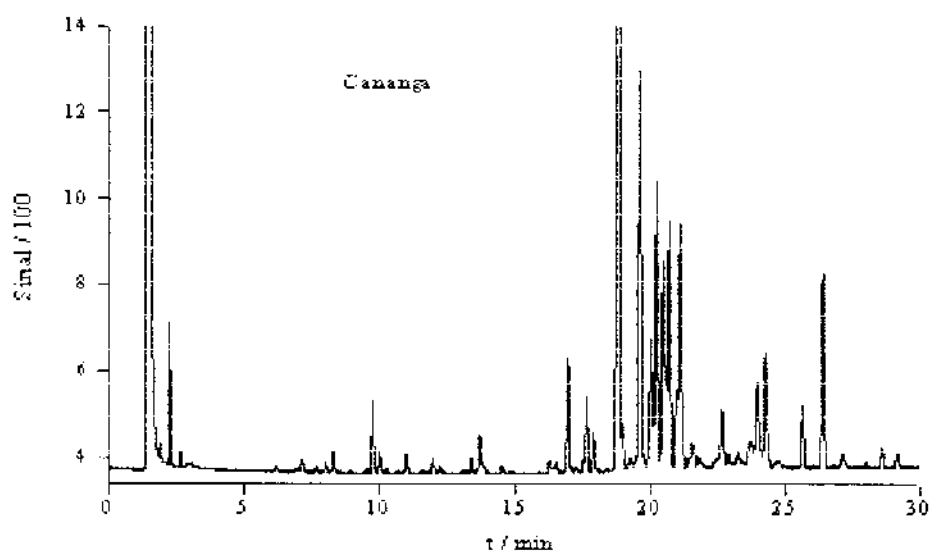
Óleo Essencial de Levítico					
t _R pelo butano:			t _R pelo etanol:		
dpr(I _{calc})	dpr (I _{tp})	E% I(t _R)	dpr(I _{calc})	dpr (I _{tp})	E% I(t _{Raj})
1,02	0,92	10,8	0,87	0,86	1,1
1,02	0,92	10,3	0,87	0,86	1,1
0,97	0,89	10,0	0,83	0,82	1,1
0,86	0,85	0,6	0,8	0,79	1,1
0,84	0,84	0,4	0,79	0,79	1,0
0,82	0,82	0,4	0,77	0,77	1,0
0,76	0,76	0,4	0,71	0,71	1,0
0,64	0,66	3,3	0,60	0,61	2,1
0,60	0,62	3,3	0,56	0,57	2,1
0,60	0,62	3,3	0,55	0,57	2,1
0,36	0,35	2,2	0,32	0,31	3,3
0,36	0,35	2,1	0,32	0,31	3,3
0,12	0,24	48,8	0,11	0,21	48,5
0,15	0,28	47,9	0,13	0,25	47,6

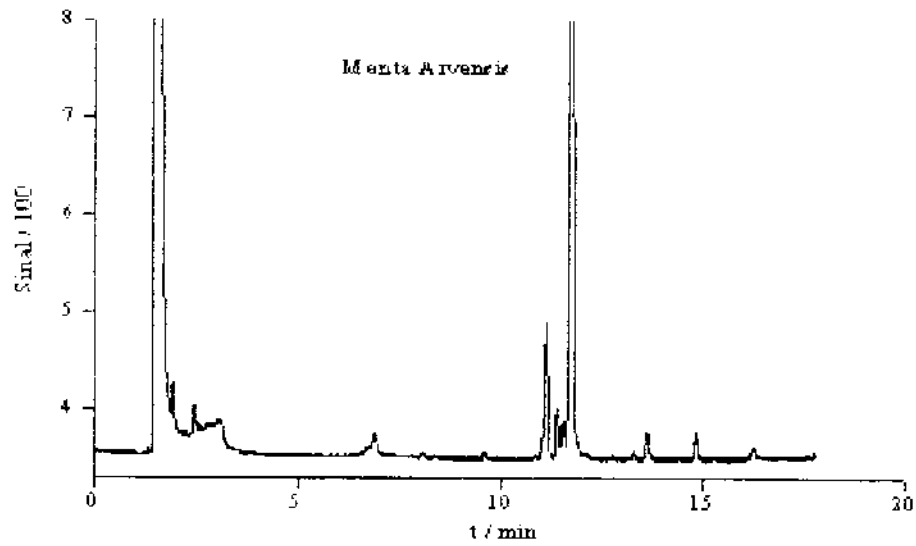
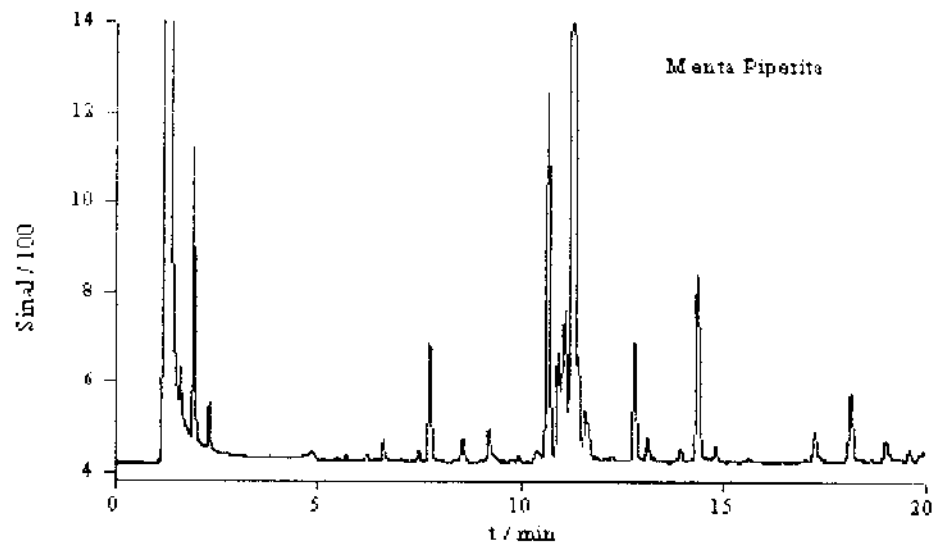
Óleo Essencial de Cravo					
t _R pelo butano:			t _R pelo etanol:		
dpr(I _{calc})	dpr (I _{tp})	E% I(t _R)	dpr(I _{calc})	dpr (I _{tp})	E% I(t _{Raj})
1,41	1,40	0,7	1,27	1,26	1,4
1,22	1,21	0,7	1,09	1,08	1,3
1,18	1,18	0,7	1,05	1,04	1,3
1,03	1,06	3,0	0,90	0,93	2,5
0,51	0,52	0,9	0,41	0,41	0,4
0,34	0,34	0,9	0,38	0,38	0,4
0,43	0,43	1,7	0,33	0,32	2,1
0,40	0,39	1,6	0,29	0,29	2,1
0,34	0,33	1,6	0,24	0,24	2,0
0,29	0,28	1,9	0,20	0,20	2,3
0,58	0,57	1,8	0,48	0,47	2,2
0,16	0,32	49,8	0,09	0,18	49,8
0,16	0,32	49,6	0,09	0,18	49,5
0,15	0,29	49,4	0,08	0,16	49,3

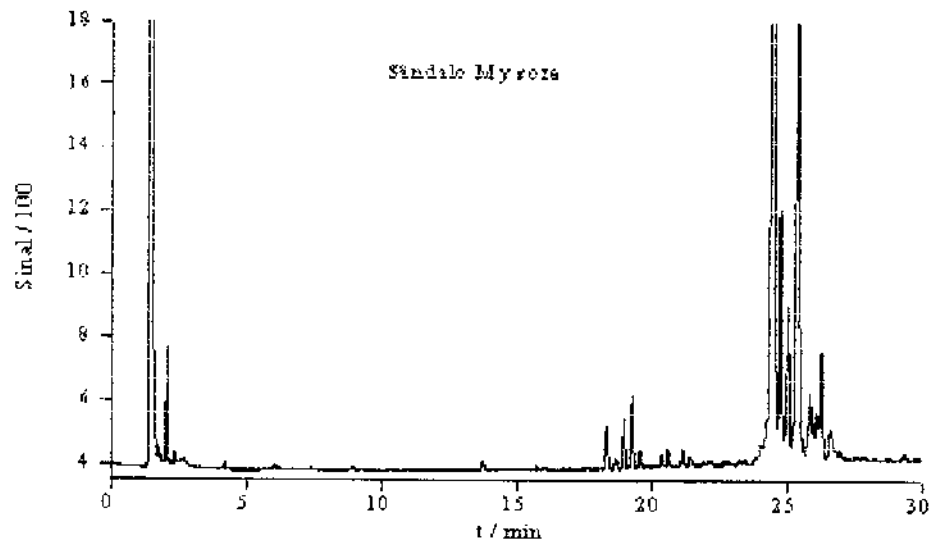
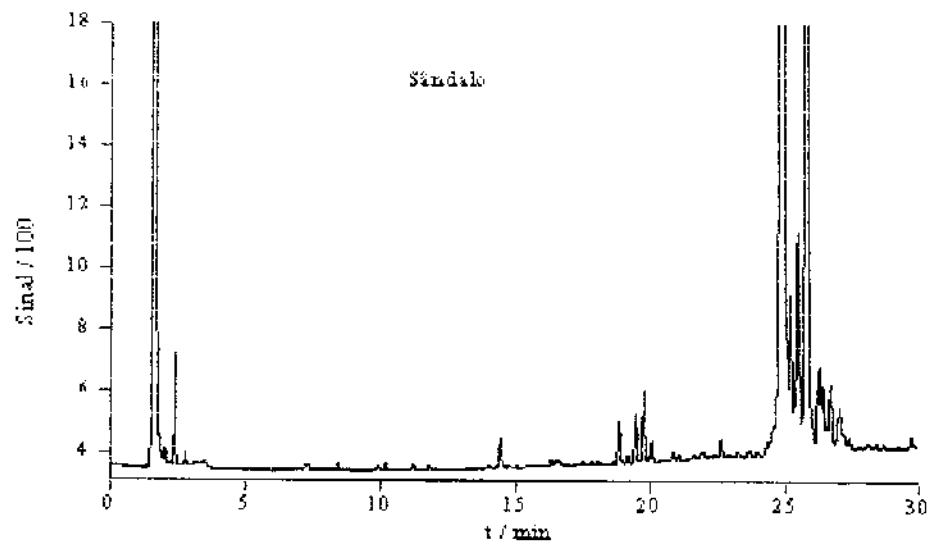
Óleo Essencial de Alcarávia					
t _R pelo butano:			t _R pelo etanol:		
dpr(I _{calc})	dpr (I _{tp})	E% I(t _R)	dpr(I _{calc})	dpr (I _{tp})	E% I(t _{Raj})
2,40	2,31	3,7	2,36	2,22	6,1
1,92	1,96	2,3	1,85	1,88	1,4
1,78	1,83	2,3	1,72	1,75	1,4
1,71	1,75	2,2	1,66	1,67	1,1
1,61	1,67	3,1	1,56	1,59	1,9
1,53	1,60	4,0	1,48	1,52	2,8
1,26	1,32	4,5	1,20	1,25	3,7
1,16	1,21	4,4	1,11	1,15	3,6
1,12	1,17	4,3	1,07	1,10	3,6
1,03	1,08	4,3	0,98	1,01	3,5
0,95	0,99	4,2	0,90	0,93	3,5
0,80	0,82	2,2	0,73	0,76	4,7
0,81	0,75	7,1	0,76	0,70	7,9

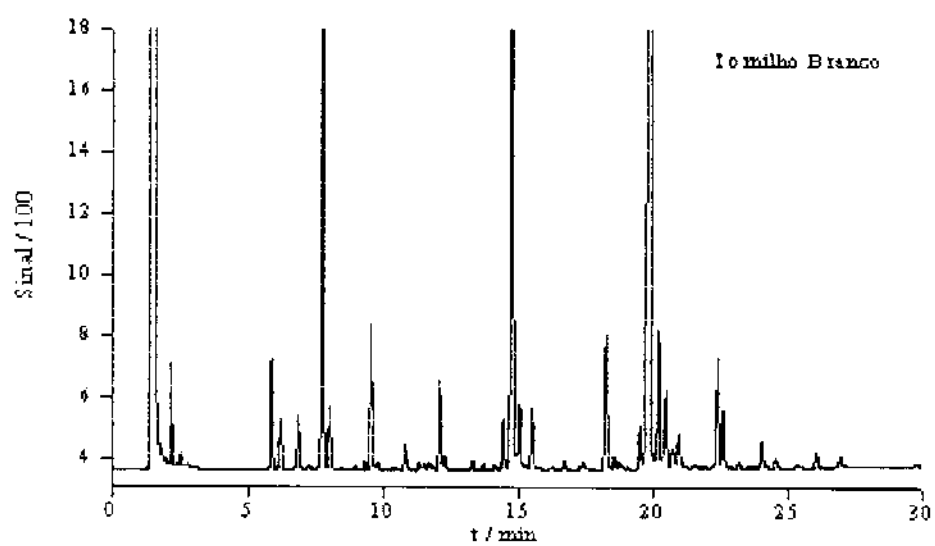
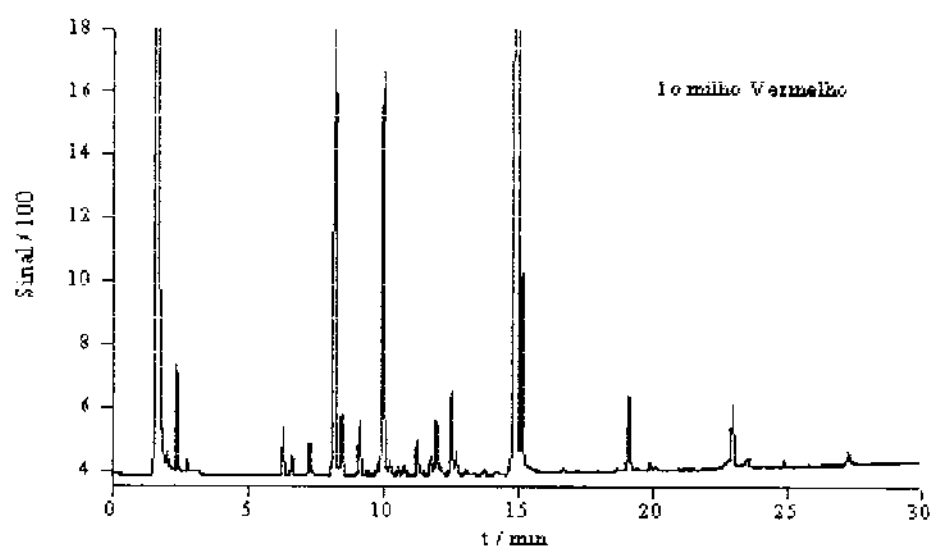
Apêndice D

Através destes poucos cromatogramas apresentados, pode-se ter uma idéia da análise visual realizada para alguns dos óleos essenciais. Comparando os cromatogramas dois a dois, pode-se perceber certa semelhança. Esta análise visual foi realizada com fundamentação teórica,









Apêndice E

Planilhas montadas para o agrupamento preliminar, utilizando o cálculo da Distância entre os óleos essenciais.

	ALECRIM	ALFAZEMA	ASPIC	BAY	BERGAMO	CANANGA	CANELA	CANELEIRO
ALECRIM	0.000	47.127	52.742	64.263	29.071	32.933	74.648	72.842
ALFAZEMA	47.127	0.000	10.468	82.885	60.472	69.105	91.793	89.548
ASPIC	52.742	10.468	0.000	85.302	63.085	71.944	93.803	91.558
BAY	64.263	82.885	85.302	0.000	61.135	73.358	81.397	11.185
BERGAMO	29.071	60.472	63.085	61.135	0.000	43.132	61.950	70.282
CANANGA	32.933	69.105	71.944	73.358	43.132	0.000	84.942	80.333
CANELA	74.648	91.793	93.803	81.397	61.950	84.942	0.000	84.385
CANELEIRO	72.842	89.548	91.558	11.185	70.282	80.333	84.385	0.000
CORIAND	83.832	96.304	98.951	102.277	86.981	91.863	109.581	107.548
CRAVO	82.616	96.953	98.794	21.209	80.811	89.853	91.264	10.784
GERALGER	44.508	68.441	71.576	72.301	33.768	62.134	74.067	82.017
GERAFRIC	44.281	68.727	71.809	71.576	33.515	61.394	75.680	81.398
LARANJA	27.371	60.123	64.239	62.459	24.725	46.659	72.642	72.305
LAVANDA	46.757	46.082	47.660	79.775	45.022	64.850	49.323	85.639
LAVABRIAL	41.069	38.929	41.643	76.697	42.911	61.619	54.600	82.973
LAVABSOL	39.326	33.453	35.611	76.696	42.840	60.129	60.332	83.134
LAVGROS	50.985	70.656	72.523	77.745	30.859	65.912	54.058	85.123
LAVORDIN	40.203	62.310	65.236	71.000	31.121	60.789	85.322	80.861
LIMA	22.816	45.625	49.984	65.746	22.343	47.595	65.655	74.176
LIMÃO	24.571	60.042	63.344	66.412	24.534	33.090	68.885	74.889
NEROLI	50.110	71.642	75.463	77.030	47.212	63.976	64.955	83.786
ÓREGANO	82.281	98.256	100.250	102.846	69.285	92.426	25.717	107.046
PATCHO	29.402	64.408	67.342	70.075	41.894	31.305	80.248	76.502
PAUROSA	74.074	88.771	92.207	95.023	77.466	83.293	102.297	100.923
ROSA	48.090	71.590	74.429	71.505	41.395	61.415	87.202	81.317
YLANG	35.201	70.113	73.014	73.040	42.759	12.098	84.521	80.413
FOLCEDRO	61.335	79.852	81.652	80.675	47.334	70.776	87.707	88.435
HORTELÃ	47.735	67.661	77.086	82.140	63.527	73.740	95.141	90.286
LOURO	30.349	54.068	58.085	58.073	29.532	48.664	78.303	66.780
PINHO	68.280	86.371	89.527	93.076	58.645	80.988	24.373	97.995
SALVESP	30.561	49.569	53.190	70.327	37.334	54.850	80.640	78.748
SALVOFIC	46.918	57.976	60.880	78.387	51.364	66.049	87.837	85.938
SÂNDALO	64.114	85.151	87.449	89.185	70.939	69.723	97.488	94.644
SANDMYS	61.669	83.201	85.531	87.426	68.804	67.556	96.159	92.960
TOMBRA	43.267	71.727	74.505	76.951	46.933	50.006	68.576	82.128
TOMVER	59.613	79.638	82.009	85.075	45.978	71.745	29.205	90.547
MENPIPER	45.494	65.651	75.085	82.754	59.748	72.028	86.981	90.793
MENARVE	69.343	85.770	95.882	99.921	85.512	91.225	108.115	106.890

	CORIAND	CRAVO	GERALGER	GERAFRIC	LARANJA	LAVANDA	LAVABRIAL	LAVABSOL
ALFCRIM	83.832	82.616	44.508	44.281	27.371	46.757	41.069	39.326
ALFAZEMA	96.304	96.953	68.441	68.727	60.123	46.082	38.929	33.453
ASPIC	98.951	98.794	71.576	71.809	64.239	47.660	41.643	35.611
BAY	102.277	21.209	72.301	71.576	62.459	79.775	76.697	76.696
BERGAMO	86.981	80.811	33.768	33.515	24.725	45.022	42.911	42.840
CANANGA	91.863	89.853	62.134	61.394	46.659	64.850	61.619	60.129
CANELA	109.581	91.264	74.067	75.680	72.642	49.323	54.600	60.332
CANELEIRO	107.548	10.784	82.017	81.398	72.305	85.639	82.973	83.134
CORIAND	0.000	113.742	91.423	91.095	83.811	95.762	93.719	92.752
CRAVO	113.742	0.000	92.109	91.524	82.559	94.071	91.433	91.643
GERALGER	91.423	92.109	0.000	2.561	20.403	56.660	55.803	55.092
GERAFRIC	91.095	91.524	2.561	0.000	19.862	58.128	57.077	56.193
LARANJA	83.811	82.559	20.403	19.862	0.000	52.821	49.779	48.826
LAVANDA	95.762	94.071	56.660	58.128	52.821	0.000	8.974	13.394
LAVABRIAL	93.719	91.433	55.803	57.077	49.779	8.974	0.000	7.267
LAVABSOL	92.752	91.643	55.092	56.193	48.826	13.394	7.267	0.000
LAVGROS	94.557	94.687	51.428	52.041	50.625	44.399	45.398	47.083
LAVORDIN	90.663	90.530	43.986	43.100	36.298	63.458	59.009	57.302
LIMA	84.563	84.016	42.340	42.517	32.857	36.853	32.336	31.186
LIMÃO	73.737	84.830	44.336	44.058	27.988	49.767	46.408	46.081
NEROLI	48.680	92.323	55.205	55.670	48.811	54.232	53.614	54.711
ÓREGANO	116.045	114.712	79.310	81.200	80.683	53.110	59.609	65.362
PATCHO	88.074	85.859	54.858	54.433	41.187	58.994	56.457	54.010
PAUROSA	13.517	107.725	82.607	82.267	74.876	87.639	85.299	84.499
ROSA	93.276	91.281	17.809	15.843	26.888	67.626	66.054	64.117
YLANG	91.386	89.866	62.710	61.954	47.185	65.661	62.175	61.050
FOLCEDRO	92.051	97.643	62.940	62.117	62.299	72.560	71.189	70.067
HORTELÃ	99.374	97.827	70.098	70.187	58.440	74.711	67.767	68.312
LOURO	85.633	76.489	49.423	48.635	39.502	54.933	50.281	48.417
PINHO	105.713	106.028	69.244	71.124	68.182	43.135	48.184	54.248
SALVESP	87.090	87.645	51.682	51.543	37.191	53.670	47.801	45.658
SALVOFIC	53.223	93.926	62.350	62.099	50.358	63.045	58.364	56.408
SÂNDALO	104.083	101.897	77.371	77.138	69.936	81.454	79.647	76.594
SANDMYS	102.549	100.335	75.359	75.113	67.654	79.636	77.763	74.657
TOMBRA	93.352	91.142	59.038	59.398	50.408	54.287	54.218	54.150
TOMVER	100.567	99.323	59.964	61.526	59.370	37.972	43.020	47.806
MENPIPER	98.325	98.676	66.619	67.026	56.306	67.260	60.911	62.167
MENARVE	113.455	113.418	89.873	90.160	80.766	91.100	84.962	86.265

	LAVGROS	LAVORDIN	LIMA	LIMÃO	NEROLI	ÓREGANO	PATCHO	PAUROSA
ALECRIM	50.985	40.203	22.816	24.571	50.110	82.281	29.402	74.074
ALFAZEMA	70.656	62.310	45.625	60.042	71.642	98.256	64.408	88.771
ASPIC	72.523	65.236	49.984	63.344	75.463	100.250	67.342	92.207
BAY	77.745	71.000	65.746	66.412	77.030	102.846	70.075	95.023
BERGAMO	30.859	31.121	22.343	24.534	47.212	69.285	41.894	77.466
CANANGA	65.912	60.789	47.595	33.090	63.976	92.426	31.305	83.293
CANELA	54.058	85.322	65.655	68.885	64.955	25.717	80.248	102.297
CANELEIRO	85.123	80.861	74.176	74.889	83.786	107.046	76.502	100.923
CORIAND	94.557	90.663	84.563	73.737	48.680	116.045	88.074	13.517
CRAVO	94.687	90.530	84.016	84.830	92.323	114.712	85.859	107.725
GERALGER	51.428	43.986	42.340	44.336	55.205	79.310	54.858	82.607
GERAFRIC	52.041	43.100	42.517	44.058	55.670	81.200	54.433	82.267
LARANJA	50.625	36.298	32.857	27.988	48.811	80.683	41.187	74.876
LAVANDA	44.399	63.458	36.853	49.767	54.232	53.110	58.994	87.639
LAVABRIAL	45.398	59.009	32.336	46.408	53.614	59.609	56.457	85.299
LAVABSOL	47.083	57.302	31.186	46.081	54.711	65.362	54.010	84.499
LAVGROS	0.000	44.452	31.744	48.409	51.612	54.580	59.696	84.856
LAVORDIN	44.452	0.000	33.776	41.500	61.230	90.880	54.937	81.947
LIMA	31.744	33.776	0.000	32.455	45.537	71.330	40.084	74.196
LIMÃO	48.409	41.500	32.455	0.000	40.448	76.576	37.990	65.477
NEROLI	51.612	61.230	45.537	40.448	0.000	70.681	58.460	39.333
ÓREGANO	54.580	90.880	71.330	76.576	70.681	0.000	87.604	108.537
PATCHO	59.696	54.937	40.084	37.990	58.460	87.604	0.000	79.912
PAUROSA	84.856	81.947	74.196	65.477	39.333	108.537	79.912	0.000
ROSA	61.769	49.091	48.977	50.695	62.797	93.791	55.093	84.336
YLANG	66.485	60.740	49.404	31.398	63.773	92.405	40.249	82.835
FOLCEDRO	40.514	50.387	45.785	62.605	62.805	90.666	66.912	81.192
HORTELA	73.588	57.599	52.242	62.784	71.834	101.088	68.891	88.714
LOURO	41.005	34.039	20.947	40.619	53.265	86.674	43.133	74.692
PINHO	48.033	79.839	59.088	63.878	59.340	16.623	75.995	97.636
SALVESP	53.565	28.750	33.475	35.051	58.716	87.826	46.039	79.873
SALVOFIC	62.399	46.126	46.489	40.694	40.952	94.760	59.170	48.001
SÂNDALO	81.453	78.441	69.476	70.699	80.465	103.846	56.657	97.224
SANDMYS	79.646	76.272	67.184	68.515	78.637	102.630	53.737	95.628
TOMBRA	53.367	61.900	43.092	48.393	58.120	73.466	30.285	85.232
TOMVER	31.630	67.743	46.978	55.654	53.333	25.838	64.928	91.880
MENPIPER	67.051	57.858	47.491	60.238	66.703	91.592	66.934	87.221
MENARVE	91.572	83.566	72.908	85.113	87.540	112.227	87.711	102.091

	ROSA	YLANG	FOLCEDRO	HORTELA	LOURO	PINHO	SALVESP
ALECRIM	48.090	35.201	61.335	47.735	30.349	68.280	30.561
ALFAZEMA	71.590	70.113	79.852	67.661	54.068	86.371	49.569
ASPIC	74.429	73.014	81.652	77.086	58.085	89.527	53.190
BAY	71.505	73.040	80.675	82.140	58.073	93.076	70.327
BERGAMO	41.395	42.759	47.334	63.527	29.532	58.645	37.334
CANANGA	61.415	12.098	70.776	73.740	48.664	80.988	54.850
CANELA	87.202	84.521	87.707	95.141	78.303	24.373	80.640
CANELEIRO	81.317	80.413	88.435	90.286	66.780	97.995	78.748
CORIAND	93.276	91.386	92.051	99.374	85.633	105.713	87.090
CRAVO	91.281	89.866	97.643	97.827	76.489	106.028	87.645
GERALGER	17.809	62.710	62.940	70.098	49.423	69.244	51.682
GERAFRIC	15.843	61.954	62.117	70.187	48.635	71.124	51.543
LARANJA	26.888	47.185	62.299	58.440	39.502	68.182	37.191
LAVANDA	67.626	65.661	72.560	74.711	54.933	43.135	53.670
LAVABRIAL	66.054	62.175	71.189	67.767	50.281	48.184	47.801
LAVABSOL	64.117	61.050	70.067	68.312	48.417	54.248	45.658
LAVGROS	61.769	66.485	40.514	73.588	41.005	48.033	53.565
LAVORDIN	49.091	60.740	50.387	57.599	34.039	79.839	28.750
LIMA	48.977	49.404	45.785	52.242	20.947	59.088	33.475
LIMÃO	50.695	31.398	62.605	62.784	40.619	63.878	35.051
NEROLI	62.797	63.773	62.805	71.834	53.265	59.340	58.716
ÓREGANO	93.791	92.405	90.666	101.088	86.674	16.623	87.826
PATCHO	55.093	40.249	66.912	68.891	43.133	75.995	46.039
PAUROS	84.336	82.835	81.192	88.714	74.692	97.636	79.873
ROSA	0.000	62.744	62.677	74.790	49.811	83.905	59.018
YLANG	62.744	0.000	72.045	73.993	50.542	80.917	55.562
FOLCEDRO	62.677	72.045	0.000	80.440	35.977	84.141	69.300
HORTELA	74.790	73.993	80.440	0.000	54.250	85.616	52.593
LOURO	49.811	50.542	35.977	54.250	0.000	75.313	42.068
PINHO	83.905	80.917	84.141	85.616	75.313	0.000	74.675
SALVESP	59.018	55.562	69.300	52.593	42.068	74.675	0.000
SALVOFIC	68.154	65.744	70.110	65.322	51.827	82.148	36.721
SÂNDALO	77.611	70.455	86.930	88.466	70.717	94.288	71.054
SANDMYS	75.580	68.631	85.202	86.636	68.473	92.896	68.684
TOMBRA	63.755	58.981	68.147	74.126	50.955	63.581	55.303
TOMVER	73.277	72.846	67.660	82.292	61.803	19.081	66.402
MENPIPER	72.843	72.366	76.910	11.415	52.303	76.244	53.049
MENARVE	93.373	91.734	95.332	28.828	73.883	97.384	80.095

	SALVOFIC	SÂNDALO	SANDMYS	TOMBRA	TOMVER	MENPIPER	MENARVE
ALECRIM	46.918	64.114	61.669	43.267	59.613	45.494	69.343
ALFAZEMA	57.976	85.151	83.201	71.727	79.638	65.651	85.770
ASPIC	60.880	87.449	85.531	74.505	82.009	75.085	95.882
BAY	78.387	89.185	87.426	76.951	85.075	82.754	99.921
BERGAMO	51.364	70.939	68.804	46.933	45.978	59.748	85.512
CANANGA	66.049	69.723	67.556	50.006	71.745	72.028	91.225
CANELA	87.837	97.488	96.159	68.576	29.205	86.981	108.115
CANELEIRO	85.938	94.644	92.960	82.128	90.547	90.793	106.890
CORIAND	53.223	104.083	102.549	93.352	100.567	98.325	113.455
CRAVO	93.926	101.897	100.335	91.142	99.323	98.676	113.418
GERALGER	62.350	77.371	75.359	59.038	59.964	66.619	89.873
GERAFRIC	62.099	77.138	75.113	59.398	61.526	67.026	90.160
LARANJA	50.358	69.936	67.654	50.408	59.370	56.306	80.766
LAVANDA	63.045	81.454	79.636	54.287	37.972	67.260	91.100
LAVABRIAL	58.364	79.647	77.763	54.218	43.020	60.911	84.962
LAVABSOL	56.408	76.594	74.657	54.150	47.806	62.167	86.265
LAVGROS	62.399	81.453	79.646	53.367	31.630	67.051	91.572
LAVORDIN	46.126	78.441	76.272	61.900	67.743	57.858	83.566
LIMA	46.489	69.476	67.184	43.092	46.978	47.491	72.908
LIMÃO	40.694	70.699	68.515	48.393	55.654	60.238	85.113
NEROLI	40.952	80.465	78.637	58.120	53.333	66.703	87.540
ÓREGANO	94.760	103.846	102.630	73.466	25.838	91.592	112.227
PATCHO	59.170	56.657	53.737	30.285	64.928	66.934	87.711
PAU ROSA	48.001	97.224	95.628	85.232	91.880	87.221	102.091
ROSA	68.154	77.611	75.580	63.755	73.277	72.843	93.373
YLANG	65.744	70.455	68.631	58.981	72.846	72.366	91.734
FOLCEDRO	70.110	86.930	85.202	68.147	67.660	76.910	95.332
HORTELÂ	65.322	88.466	86.636	74.126	82.292	11.415	28.828
LOURO	51.827	70.717	68.473	50.955	61.803	52.303	73.883
PINHO	82.148	94.288	92.896	63.581	19.081	76.244	97.384
SALVESP	36.721	71.054	68.684	55.303	66.402	53.049	80.095
SALVOFIC	0.000	81.308	79.184	66.292	74.712	65.362	88.970
SÂNDALO	81.308	0.000	3.138	79.097	86.987	86.858	103.577
SANDMYS	79.184	3.138	0.000	76.252	85.323	85.060	102.115
TOMBRA	66.292	79.097	76.252	0.000	51.842	69.661	90.557
TOMVER	74.712	86.987	85.323	51.842	0.000	73.552	96.431
MENPIPER	65.362	86.858	85.060	69.661	73.552	0.000	28.549
MENARVE	88.970	103.577	102.115	90.557	96.431	28.549	0.000

Utilizando os valores de distância mostrados nas tabelas acima, calculou-se os valores do parâmetro Similaridade entre os óleos. Os óleos foram agrupados de acordo com sua similaridade em relação a outros óleos. Note que para óleos essenciais iguais, o valor de Similaridade é igual a 1,0. Foi usado como limite de corte o valor igual a 0,55.

	SALVOFIC		PATCHO		CANANGA		ALFAZEMA		ASPIC
SALVOFIC	1.000	PATCHO	1.000	CANANGA	1.000	ALFAZEMA	1.000	ASPIC	1.000
SALVESP	0.684	ALECRIM	0.747	YLANG	0.896	ASPIC	0.910	ALFAZEMA	0.910
LIMÃO	0.649	TOMBRA	0.739	PATCHO	0.730	LAVABSOL	0.712	LAVABSOL	0.693
NEROLI	0.647	CANANGA	0.730	ALECRIM	0.716	LAVABRIAL	0.663	LAVABRIAL	0.641
LAVORDIN	0.603	LIMÃO	0.673	LIMÃO	0.715	LIMA	0.607	LAVANDA	0.589
LIMA	0.599	LIMA	0.655	BERGAMO	0.628	LAVANDA	0.603	LIMA	0.569
ALECRIM	0.596	YLANG	0.653	LARANJA	0.598	ALECRIM	0.594		
PAUROS	0.586	LARANJA	0.645	LIMA	0.590	SALVESP	0.573		
LARANJA	0.566	BERGAMO	0.639	LOURO	0.581	LOURO	0.534		
BERGAMO	0.557	LOURO	0.628	TOMBRA	0.569				
LOURO	0.553	SALVESP	0.603						

	CANELEIRO		CORIANO		CRAVO		BAY		MENARVE
CANELEIRO	1.000	CORIANO	1.000	CRAVO	1.000	BAY	1.000	MENARVE	1.000
CRAVO	0.907	PAUROS	0.884	CANELEIRO	0.907	CANELEIRO	0.904	MENPIPER	0.754
BAY	0.904	NEROLI	0.581	BAY	0.817	CRAVO	0.817	HORTELÃ	0.752

	MENPIPER		HORTELÃ		CANELA		PAUROS		OREGANO
MENPIPER	1.000	HORTELÃ	1.000	CANELA	1.000	PAUROS	1.000	OREGANO	1.000
HORTELÃ	0.902	MENPIPER	0.902	PINHO	0.790	CORIANO	0.884	PINHO	0.857
MENARVE	0.754	MENARVE	0.752	OREGANO	0.778	NEROLI	0.661	CANELA	0.778
ALECRIM	0.608	ALECRIM	0.589	TOMVER	0.748	SALVOFIC	0.586	TOMVER	0.777
LIMA	0.591	LIMA	0.550	LAVANDA	0.575				

	GERALGER		GERAFRIC		TOMVER		TOMBRA		ROSA
GERALGER	1.000	GERAFRIC	1.000	TOMVER	1.000	TOMBRA	1.000	ROSA	1.000
GERAFRIC	0.978	GERALGER	0.978	PINHO	0.836	PATCHO	0.739	GERAFRIC	0.863
ROSA	0.847	ROSA	0.863	OREGANO	0.777	LIMA	0.629	GERALGER	0.847
LARANJA	0.824	LARANJA	0.829	CANELA	0.748	ALECRIM	0.627	LARANJA	0.768
BERGAMO	0.709	BERGAMO	0.711	LAVGROS	0.727	BERGAMO	0.596	BERGAMO	0.643
LIMA	0.635	LIMA	0.634	LAVANDA	0.673	LIMÃO	0.583	ALECRIM	0.586
LAVORDIN	0.621	LAVORDIN	0.629	LAVABRIAL	0.629	CANANGA	0.569	LIMA	0.578
LIMÃO	0.618	LIMÃO	0.620	BERGAMO	0.604	LARANJA	0.566	LAVORDIN	0.577
ALECRIM	0.616	ALECRIM	0.618	LIMA	0.595	LOURO	0.561	LOURO	0.571
LOURO	0.574	LOURO	0.581	LAVABSOL	0.588	TOMVER	0.553	LIMÃO	0.563
LAVGROS	0.557	SALVESP	0.556	TOMBRA	0.553				
SALVESP	0.555	LAVGROS	0.552						

	LIMA		ALECRIM		BERGAMO		LIMÃO
LIMA	1.000	ALECRIM	1.000	LIMA	1.000	LIMÃO	1.000
LOURO	0.819	LIMA	0.803	GERAFRIC	0.807	BERGAMO	0.789
BERGAMO	0.807	LIMÃO	0.788	CANANGA	0.789	ALECRIM	0.788
ALECRIM	0.803	LARANJA	0.764	BERGAMO	0.787	LARANJA	0.759
LAVABSOL	0.731	BERGAMO	0.749	ALFAZEMA	0.749	YLANG	0.729
LAVGROS	0.726	PATCHO	0.747	SANDMYS	0.746	LIMA	0.720
LAVABRIAL	0.721	LOURO	0.738	HORTELÃ	0.734	CANANGA	0.715
LIMÃO	0.720	SALVESP	0.737	GERALGER	0.732	SALVESP	0.698
LARANJA	0.717	CANANGA	0.716	LARANJA	0.711	PATCHO	0.673
SALVESP	0.712	YLANG	0.697	LIMÃO	0.709	NEROLI	0.651
LAVORDIN	0.709	LAVABSOL	0.661	MENARVIC	0.678	LOURO	0.650
LAVANDA	0.682	LAVORDIN	0.654	TOMBRA	0.643	SALVOFIC	0.649
PATCHO	0.655	LAVABRIAL	0.646	ROSA	0.639	LAVORDIN	0.642
GERALGER	0.635	TOMBRA	0.627	TOMVER	0.632	GERAFRIC	0.620
GERAFRIC	0.634	GERAFRIC	0.618	MENPIPER	0.631	GERALGER	0.618
TOMBRA	0.629	GERALGER	0.616	PATCHO	0.630	LAVABSOL	0.603
NEROLI	0.608	MENPIPER	0.608	LAVANDA	0.628	LAVABRIAL	0.600
ALFAZEMA	0.607	LAVANDA	0.597	LAVORDIN	0.612	TOMBRA	0.583
FOLCEDRO	0.605	SALVOFIC	0.596	CORIANO	0.604	LAVGROS	0.583
SALVOFIC	0.599	ALFAZEMA	0.594	CANELA	0.596	LAVANDA	0.571
TOMVER	0.595	HORTELÃ	0.589	YLANG	0.593	ROSA	0.563
MENPIPER	0.591	ROSA	0.586	FOLCEDRO	0.592		
CANANGA	0.590	NEROLI	0.568	PINHO	0.557		
ROSA	0.578	LAVGROS	0.561				
YLANG	0.574						
ASPIC	0.569						
HORTELÃ	0.550						

	LARANJA		LOURO		LAVGROS		SALVESP
LARANJA	1.000	LOURO	1.000	LAVGROS	1.000	SALVESP	1.000
GERAFRIC	0.829	LIMA	0.819	BERGAMO	0.734	LAVORDIN	0.752
GERALGER	0.824	BERGAMO	0.746	TOMVER	0.727	ALECRIM	0.737
BERGAMO	0.787	ALECRIM	0.738	LIMA	0.726	LIMA	0.712
ROSA	0.768	LAVORDIN	0.707	FOLCEDRO	0.651	LIMÃO	0.698
ALECRIM	0.764	FOLCEDRO	0.690	LOURO	0.647	SALVOFIC	0.684
LIMÃO	0.759	LARANJA	0.660	LAVANDA	0.617	LARANJA	0.680
LIMA	0.717	LIMÃO	0.650	LAVORDIN	0.617	BERGAMO	0.678
LAVORDIN	0.687	LAVGROS	0.647	LAVABRIAL	0.609	LOURO	0.637
SALVESP	0.680	SALVESP	0.637	LAVABSOL	0.594	LAVABSOL	0.607
LOURO	0.660	PATCHO	0.628	PINHO	0.586	PATCHO	0.603
PATCHO	0.645	LAVABSOL	0.583	LIMÃO	0.583	LAVABRIAL	0.588
CANANGA	0.598	GERAFRIC	0.581	LARANJA	0.564	ALFAZEMA	0.573
YLANG	0.593	CANANGA	0.581	ALECRIM	0.561	GERAFRIC	0.556
NEROLI	0.579	GERALGER	0.574	GERALGER	0.557	GERALGER	0.555
LAVABSOL	0.579	ROSA	0.571	NEROLI	0.555		
LAVABRIAL	0.571	LAVABRIAL	0.567	GERAFRIC	0.552		
SALVOFIC	0.566	YLANG	0.564				
TOMBRA	0.566	TOMBRA	0.561				
LAVGROS	0.564	SALVOFIC	0.553				

	LAVABRIAL		LAVORDIN		LAVABSOL		LAVANDA
LAVABRIAL	1.000	LAVORDIN	1.000	LAVABSOL	1.000	LAVANDA	1.000
LAVABSOL	0.937	SALVESP	0.752	LAVABRIAL	0.937	LAVABRIAL	0.923
LAVANDA	0.923	BERGAMO	0.732	LAVANDA	0.885	LAVABSOL	0.885
LIMA	0.721	LIMA	0.709	LIMA	0.731	LIMA	0.682
ALFAZEMA	0.665	LOURO	0.707	ALFAZEMA	0.712	TOMVER	0.673
ALECRIM	0.646	LARANJA	0.687	ASPIC	0.693	PINHO	0.628
ASPIC	0.641	ALECRIM	0.654	ALECRIM	0.661	LAVGROS	0.617
BERGAMO	0.630	LIMÃO	0.642	BERGAMO	0.631	BERGAMO	0.612
TOMVER	0.629	GERAFRIC	0.629	SALVESP	0.607	ALFAZEMA	0.603
LAVGROS	0.609	GERALGER	0.621	LIMÃO	0.603	ALECRIM	0.597
LIMÃO	0.600	LAVGROS	0.617	LAVGROS	0.594	ASPIC	0.589
SALVESP	0.588	SALVOFIC	0.603	TOMVER	0.588	CANELA	0.575
PINHO	0.585	ROSA	0.577	LOURO	0.583	LIMÃO	0.571
LARANJA	0.571	FOLCEDRO	0.566	LARANJA	0.579		
LOURO	0.567						

	NEROLI		YLANG		PINHO		FOLCEDRO
NEROLI	1.000	YLANG	1.000	PINHO	1.000	FOLCEDRO	1.000
PAUROSOSA	0.661	CANANGA	0.896	OREGANO	0.857	LOURO	0.690
LIMÃO	0.651	LIMÃO	0.729	TOMVER	0.836	LAVGROS	0.651
SALVOFIC	0.647	ALECRIM	0.697	CANELA	0.790	LIMA	0.605
LIMA	0.608	PATCHO	0.653	LAVANDA	0.628	BERGAMO	0.592
BERGAMO	0.593	BERGAMO	0.632	LAVGROS	0.586	LAVORDIN	0.566
CORIAND	0.581	LARANJA	0.593	LAVABRIAL	0.585		
LARANJA	0.579	LIMA	0.574				
ALECRIM	0.568	LOURO	0.564				
LAVGROS	0.555						

	SÂNDALO		SANDMYS
SÂNDALO	1.000	SANDMYS	1.000
SANDMYS	0.973	SÂNDALO	0.973