



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS
UTILIZANDO SPME E GC-MS DE *Echinodorus*
spp. (CHAPÉU-DE-COURO) COMERCIALIZADO
NO MERCADO CENTRAL DE BELO HORIZONTE**

Hebert Vinicius Pereira

**Belo Horizonte - MG
2014**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS
UTILIZANDO SPME E GC-MS DE *Echinodorus*
spp. (CHAPÉU-DE-COURO) COMERCIALIZADO
NO MERCADO CENTRAL DE BELO HORIZONTE**

Hebert Vinicius Pereira

Monografia apresentada ao Curso de Química Tecnológica do CEFET-MG como parte das exigências da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II).

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Maria de Resende Machado.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Ana Maria de Resende Machado (orientadora)

Prof^a. Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Prof^a. Dra. Andréa Rodrigues Marques Guimarães

Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia

Monografia aprovada em 17 de fevereiro de 2014

Belo Horizonte – MG

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, especialmente ao meu pai Clayton Vinicius Pereira, e aos meus amigos que me deram apoio nos momentos difíceis e me incentivaram a lutar por esta conquista.

Meus agradecimentos a todos os professores e funcionários do CEFET-MG que me ajudaram nesta jornada e deram todo o suporte necessário durante o transcorrer do curso.

Sou imensamente grato às Instituições e profissionais com os quais tive oportunidades de colaborar, os quais contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Meus agradecimentos ao mestre Gilson Ronaldo Guimarães, Dr. Wagner Sade (CETEC-MG); Dr. Adílson Cândido da Silva (CEFET-MG); Dra Miriam Cristina Santos Amaral e Dra Lisete Celina Lange (DESA/UFMG); Dr. Roberto Bentes (PAM - Membranas Seletivas) e à Química de petróleo na pessoa de Elisa Mara (PETROBRAS).

Por fim, agradecimentos especiais à Dra. Ana Maria, Dra. Fátima de Cássia, Dra. Andréa Rodrigues e ao Dr. Cleverson Garcia do CEFET-MG que contribuíram imensamente para o desenvolvimento deste trabalho.

*"Nada a temer senão o correr da luta
Nada a fazer senão esquecer o medo
Abrir no peito a força, numa procura
Fugir às armadilhas da mata escura"*

Caçador de mim

Sergio Magrão e Luiz Carlos Sá.

LISTA DE ABREVIATURAS

Cs – Célula Subsidiária.

EI - Electron Impact.

eV – Elétron Volts.

GC - Gas Chromatography.

HP5-MS – Fase estacionária 5% Fenil e 95% Polidimetilsiloxano.

IR – Infra-Red.

LRI – Linear Retention Indices.

m/z – Razão Massa/Carga.

MS – Mass Spectrometry.

n - Número de Carbonos do Hidrocarboneto Anterior.

NMR – Nuclear Magnetic Resonance.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PCA – Principal Components Analysis.

PCs – Principal Components.

SPME – Solid Phase Microextraction.

spp. – Espécies Não-Especificadas.

tc - Tempo de Retenção do Composto de Interesse.

tn+1 - Tempo de Retenção do Hidrocarboneto Posterior.

UV – Ultraviolet Spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS E FLUXOGRAMAS

Figura 1 - Hábito do Chapéu-de-Couro: (a) Visão geral, (b) Folha e (c) Flor.	5
Figura 2 - Flores <i>Echinodorus</i> spp: (a) <i>E. macrophyllus</i> , (b) <i>E. grandiflorus</i>	6
Figura 3 - Metabólitos Chapéu-de-couro: (1) Echinodol e (2) ácido echinóico.	8
Figura 4 - Metabólitos Chapéu-de-couro: (3) ácido octadecanóico, (4) hexadecanóico, (5) fitol, (6) ácido hardwickiico e (7) novo derivado cleoredano.	8
Figura 5- Metabólitos Chapéu-de-couro: (8) echinofilina A, (9) echinofilina B, (10) echinofilina C, (11) echinofilina D, (12) echinofilina E e (13) echinofilina F.	9
Figura 6 - Metabólitos Chapéu-de-couro: (14) echinolida A e (15) echinolida B.	10
Figura 7 - Metabólitos Chapéu-de-couro: (16) (E)-cariofileno, (17) α -humuleno e (18) nerolidol.	10
Figura 8 - Metabólitos Chapéu-de-couro: (19) ácido caféico e (20) isoorientina.	11
Figura 9- Metabólitos Chapéu-de-couro: (19) éster metílico do ácido hexadecanóico e (20) éster etílico do ácido hexadecanóico.	11
Figura 10 - Estruturas anatômicas do <i>Echinodorus macrophyllus</i> : (a) Pelos tectores e (b) Células subsidiárias (cs) presentes nos estômatos na espécie (LEITE <i>et al.</i> , 2007).	13
Figura 11 - Etapas de execução da SPME: (a) Perfuração do septo, (b) Adsorção dos analitos na fibra exposta, (c) Final da extração, (d) Inserção no injetor do cromatógrafo, (e) Dessorção dos analitos na fibra exposta e (f) Retirada do injetor.	15
Figura 12 - Cromatograma típico obtido pela técnica de SPME e GC-MS para o Chapéu-de-couro.	17

Figura 13 - Observações microscópicas para amostra fresca de Chapéu-de-couro: (a) Tricomas e (b) estômatos.....	24
Figura 14 - Pontos secretores translúcidos observados na amostra fresca de <i>E. grandiflorus</i>	25
Figura 15 - Estrutura de um ducto na folha da amostra de referência de <i>E. grandiflorus</i> pós-secagem.	25
Figura 16 - Vestígios de um ducto e de um tricoma tector na amostra comercial #8 de Chapéu-de-couro.	26
Figura 17 - Biossíntese de terpenos	37
Figura 18 - Formação de fenilpropanóides e cumarinas.....	38
Figura 19 - Formação de compostos por clivagem de carotenoides.....	39
Figura 20 - Resultado da análise de componentes principais dos compostos identificados nas amostras comerciais e de referência de Chapéu-de-couro.	44

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Valores das áreas (%) dos picos, tempos de retenção e identificação da amostra dos compostos identificados.....	28
Quadro 1 - Resultados dos estudos histológicos.....	27
Quadro 2 – Nome, estrutura e função orgânica dos compostos identificados por SPME GCMS.	30
Quadro 3 - Resultado da matriz de covariância de Eigen	43

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR GC-MS E SPME DE *Echinodorus* spp. (CHAPÉU-DE-COURO) COMERCIALIZADO NO MERCADO CENTRAL DE BELO HORIZONTE

PEREIRA, H. V.; MACHADO, A. M. R.;

Neste trabalho avaliaram-se a resposta de estudos histológicos, microextração em fase Sólida (SPME), Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) e da análise estatística multivariada de componentes principais (PCA) como ferramentas alternativas para a identificação de dez amostras comerciais de Chapéu-de-couro (*E. grandiflorus* / *E. macrophyllus*) e para descrição dos compostos químicos voláteis desta planta medicinal. Os exames histológicos tiveram o objetivo de identificar estruturas anatômicas chaves para a identificação do Chapéu-de-couro e avaliação dos efeitos do processo de secagem sobre essas estruturas anatômicas. Os resultados da SPME e de GC-MS indicaram um total de 57 compostos distribuídos em sete classes orgânicas: terpenos (36), derivados de carotenoides (10), aldeídos (5), ésteres (2), fenilpropanóides (2), álcool (1) e cumarina (1). Estes compostos voláteis, em sua maioria, foram descritos na literatura para outras espécies de plantas, entretanto, não foram descritos para o Chapéu-de-couro o que evidencia a contribuição do trabalho na ampliação do conhecimento acerca da composição química do Chapéu-de-couro. Por fim, a PCA foi utilizada para verificar a existência de padrões na composição química dos componentes voláteis de amostras de referência e comerciais, que resultou na identificação de 9 amostras comerciais como *E. grandiflorus*. Por fim, concluiu-se que a microextração em fase sólida, a GC-MS e PCA podem ser utilizadas para a diferenciação, avaliação dos efeitos da secagem e as diferenças presentes no material vegetal de amostras de Chapéu-de-couro devido a grande capacidade em extrair, identificar e discriminar os compostos voláteis presentes em amostras de Chapéu-de-couro.

Palavras-chave: Chapéu-de-couro, GC-MS, SPME.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 PROCESSAMENTOS DE ERVAS MEDICINAIS.....	4
2.2 CHAPÉU-DE-COURO.....	5
2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	7
2.4 ESTUDOS HISTOLÓGICOS	12
2.5 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	13
2.6 CROMATOGRAFIA GASOSA.....	15
2.7 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	17
2.8 ÍNDICES DE KOVATS E ÍNDICE DE RETENÇÃO LINEAR.....	19
2.9 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	19
3. METODOLOGIA DA PESQUISA	21
3.1 ESTUDOS ANATÔMICOS HISTOLÓGICOS DAS FOLHAS DE CHAPÉU- DE-COURO.....	21
3.2 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	22
3.3 CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	22
3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS.....	23
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA (PCA).....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 ESTUDOS HISTOLÓGICOS DAS FOLHAS DE CHAPÉU-DE-COURO	24
4.2 IDENTIFICAÇÕES DOS METABÓLITOS.....	28
4.3 AMOSTRAS DE REFERÊNCIA FRESCAS	39
4.4 AMOSTRAS DE REFERÊNCIA SECAS.....	40

4.5 AMOSTRAS COMERCIAIS.....	42
4.6 ANALÍSE ESTATÍSTICA (PCA).....	43
5. CONCLUSÃO.....	46
6. REFERÊNCIAS.....	47
7. ANEXOS.....	53

1. INTRODUÇÃO

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (CORRÊA *et al.*, 2006).

As plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades, além de fundamentais para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (CORRÊA *et al.*, 2006).

Apesar da enorme demanda por espécies de uso medicinal, ainda existe carência de informações por parte dos produtores, nos setores da indústria, comércio e dos consumidores. O Brasil, ao contrário do que ocorre nos países europeus, asiáticos e nos Estados Unidos, praticamente não dispõe de estatísticas que expliquem o mercado, o consumo e os costumes de uso de plantas medicinais tradicionais (SOUZA *et al.*, 2012).

O aumento do uso e comércio das ervas medicinais, aliados à falta de fiscalização efetiva que garanta desde a exploração racional dos recursos naturais empregados como matéria-prima até a disponibilização do produto final ao consumidor, contribui para o acesso a produtos muitas vezes sem condições adequadas ao uso, sem garantia da qualidade, segurança e eficiência, características fundamentais para a recuperação ou preservação da saúde do consumidor (BUGNO, 2006).

A qualidade adequada das matérias-primas vegetais deve ser realizada de acordo com bases científicas e técnicas. Nos procedimentos rotineiros de análise de qualidade, geralmente é preconizado o emprego de metodologias química, física ou físico-química e biológica e objetivam a verificação da identidade botânica do material, pureza e a caracterização dos constituintes químicos da espécie, especialmente aqueles envolvidos na

atividade terapêutica, bem como as suas quantificações (SIMÕES *et al.*, 2010).

Os parâmetros da qualidade para fins farmacêuticos são, em princípio, estabelecidos nas farmacopeias e códigos oficiais. No caso das matérias-primas vegetais oriundas de plantas clássicas, ou seja, aquelas estudadas tanto do ponto de vista químico, quanto farmacológico, existem monografias definindo critérios de identidade, pureza e de teor dependendo da origem do vegetal (SIMÕES *et al.*, 2010).

No âmbito morfológico, muitas espécies vegetais têm enorme similaridade entre si, de modo que sua simples visualização a olho nu muitas vezes não é suficiente para o consumidor saber ao certo se a planta que é vendida é realmente a espécie desejada. Por intermédio das análises macroscópicas observam-se características externas da planta, que podem ser comparadas com o descrito na literatura. Por exemplo, pelo estudo foliar obtém-se detalhes estruturais da morfologia, os quais podem ser comparados aos padrões botânicos descritos como os da família e do gênero a qual a espécie pertence (DORES e CASALI, 2007).

Muitas vezes, contudo, não é possível realizar uma análise macroscópica adequada. Isso pode ocorrer devido a diversos fatores, como por exemplo, a amostra ter passado por processos de secagem, o que pode dificultar o manuseio e estudo correto. Em tais casos, recorre-se à análise microscópica e química da planta (REIS, 2009).

O estudo de técnicas analíticas alternativas para análise de ervas medicinais, além daquelas descritas nas farmacopeias, é importante porque permite avaliar com maior rapidez e precisão os efeitos do processamento do material vegetal, a autenticidade, compreensão das propriedades terapêuticas e outros aspectos que possam impactar na qualidade destas plantas.

Como exemplo, pode-se citar LOPES *et al.* (2012) que desenvolveu e validou um método espectrofotométrico para ser utilizado na quantificação de derivados do ácido *o*-hidroxicinâmico em folhas de *Echinodorus grandiflorus*. A metodologia cumpriu todas as exigências para a validação e mostrou ser rápida e com baixo custo, podendo ser aplicada por farmácias de manipulação e laboratórios de pequeno porte para avaliação de amostras

de *Echinodorus grandiflorus*. Esta planta, conhecida como Chapéu-de-couro, possui grande expressão na medicina popular no tratamento de várias doenças e se encontra entre as espécies medicinais com maior consumo.

Os objetivos deste trabalho são avaliar os efeitos do processamento (secagem) e a presença de adulterações em 10 amostras comerciais de Chapéu-de-couro comercializadas como droga vegetal no Mercado Central de Belo Horizonte.

Em amostras frescas e secas de referência de Chapéu-de-couro (*E. macrophyllus* e *E. grandiflorus*) serão avaliados os efeitos da secagem sobre as estruturas anatômicas das folhas e identificadas àquelas que podem ser utilizadas para averiguação da autenticidade e diferenciação de espécies das amostras comerciais.

Pelo uso da extração por SPME e da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas serão identificados os metabólitos secundários presentes na fração volátil do Chapéu-de-couro através da análise dos espectros de massa e pelo cálculo do índice de Retenção Linear (IRL). Os perfis obtidos para as amostras frescas e secas serão avaliados para verificar o efeito da secagem sobre a composição dos compostos voláteis.

Por fim, os perfis químicos obtidos para as amostras de referência e comerciais também serão utilizados para averiguação da autenticidade e diferenciação de espécies pelo emprego da análise estatística multivariada de componentes principais (PCA).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Processamento de ervas medicinais

As etapas envolvidas no processamento de ervas medicinais consistem basicamente na coleta, secagem e armazenamento. Duas estratégias básicas têm sido empregadas historicamente para a obtenção de matéria-prima de plantas medicinais: cultivo e extrativismo. A primeira se refere ao cultivo propriamente dito e a segunda se constitui na possibilidade de retirada do produto diretamente do seu ambiente natural. Alguns parâmetros essenciais para a qualidade da matéria-prima vegetal podem variar dependendo da procedência do material. As variações, principalmente na composição química e, em alguns casos, na pureza e mesmo nas características fenotípicas, ressaltam a importância dos estudos de caracterização farmacognóstica, correlacionados com a atividade farmacológica (SIMÕES *et al.*, 2010).

A partir do momento da colheita, inicia-se um processo de degradação enzimática na planta que leva também à degradação dos princípios ativos. O menor período de tempo entre a coleta e a secagem é crucial para a manutenção da integridade máxima dos princípios ativos (SIMÕES *et al.*, 2010).

A secagem pode aumentar o número de modificações físicas e químicas negativas, alterando a qualidade da matéria-prima para a sua comercialização como, por exemplo, mudanças em aparência (coloração), cheiro e possíveis perdas de constituintes voláteis. A secagem diminui a velocidade de deterioração do material, por meio da redução no teor de água, atuando regressivamente na ação das enzimas, possibilitando a conservação das plantas por maior tempo. Com a redução da quantidade de água, aumenta-se, também, a quantidade de princípios ativos em relação à massa seca (SILVA E CASALI, 2000).

A secagem ao sol, para muitas plantas medicinais, é totalmente desaconselhável, visto que o processo de fotodecomposição ocorre, intensamente, degradando os componentes químicos e ocasionando alterações de odor, cor e sabor (MARTINS, 2000).

Na última etapa, o armazenamento deve ser realizado no menor período possível, pois com o passar do tempo podem ocorrer perdas qualitativas e/ou quantitativas das substâncias ativas das plantas. O local destinado ao armazenamento deve ser seco, escuro, arejado e isolado da presença de pragas (SIMÕES *et al.*, 2010).

2.2 Chapéu-de-couro

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal encontram-se plantas do gênero *Echinodorus* pertencente à Família *Alismataceae* que ocorrem, predominantemente, em terrenos brejosos e ácidos de todo o continente Americano. Em meio a quase 27 espécies de *Echinodorus*, as mais amplamente estudadas do ponto de vista químico e biológico são a *Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus*, ambas conhecidas popularmente no Brasil como chapéu-de-couro (LORENZI, 2000). A Figura 1 ilustra um espécime de Chapéu-de-couro.

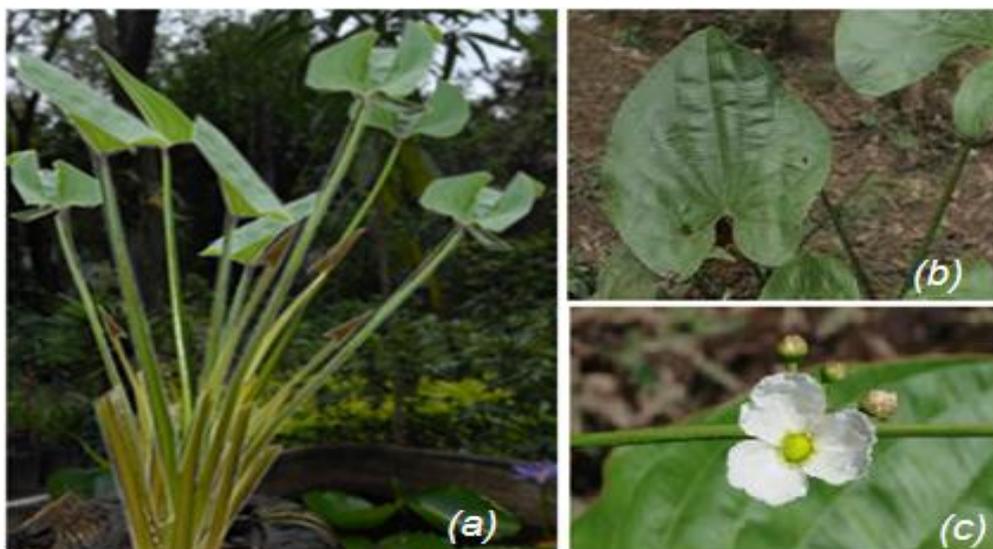


Figura 1 - Hábito do Chapéu-de-Couro: (a) Visão geral, (b) Folha e (c) Flor.

MATIAS (2007) realizou um estudo taxonômico de 10 espécies do gênero *Echinodorus* encontradas em áreas alagadas presentes no domínio da caatinga, cujo objetivo foi evidenciar os padrões de variabilidade fenotípica que as populações apresentam frente às peculiaridades

ambientais da região. Neste estudo, observou-se que as espécies *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* apresentam hábitos semelhantes, mas que a forma e o tamanho das flores de ambas as espécies são fatores chave para diferenciação das espécies, como pode ser visto na figura 2.

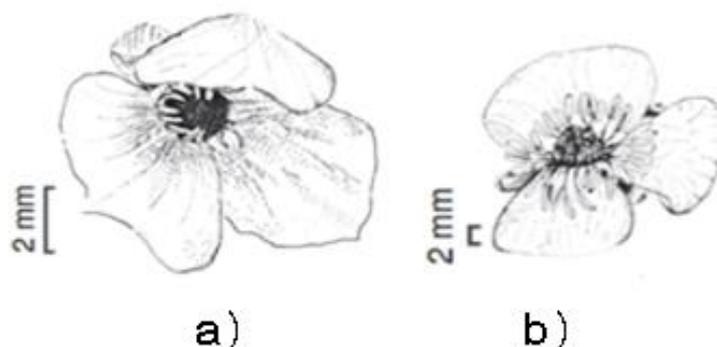


Figura 2 - Flores *Echinodoros* spp: (a) *E. macrophyllus*, (b) *E. grandiflorus* (MATIAS, 2007).

Esta planta possui grande expressão na medicina popular. As folhas são utilizadas como adstringentes, gargarejos ou banhos, contra inflamações de garganta e úlceras dermatológicas. Já o infuso de folhas é levemente laxante usado contra artrite, reumatismo e sífilis e ainda contra certas doenças de pele e do fígado, cistite, depurativo de sangue e eliminador de ácido úrico (MARTINS *et al.*, 1994).

Em algumas regiões, o chá também é utilizado não só por suas propriedades medicinais, mas também como bebida refrescante de ampla aceitação popular, como componente do produto Mineirinho® e de outro refrigerante chamado Mate-Couro®. Os outros nomes populares utilizados são "chá-mineiro", "erva-de-pântano", "erva-de-bugre", "congonha-do-brejo", "erva-do-brejo" (LEITE *et al.*, 2007).

REIS (2009) analisou a qualidade de ervas medicinais comercializadas no Mercado Central de Belo Horizonte por ensaios químicos, físicos e biológicos descritos pela 4ª edição da Farmacopeia Brasileira. O estudo indicou o Chapéu-de-couro como a planta medicinal mais comercializada dentre os dez estabelecimentos pesquisados do Mercado Central e que as amostras analisadas não se encontravam nos padrões ideais de qualidade. O estudo apontou a necessidade do aumento na

regulamentação e fiscalização do processo produtivo e de comercialização das plantas medicinais por parte dos órgãos competentes para garantir a qualidade do produto comercializado nestes estabelecimentos.

2.3 Metabólitos secundários

Vegetais, microrganismos e, em menor escala, animais, apresentam rotas metabólicas capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias não relacionadas diretamente à manutenção da vida do organismo, ao contrário dos metabólitos primários (açúcares, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos). Esses compostos são chamados metabólitos secundários e são responsáveis por garantir vantagens para a sobrevivência e perpetuação de uma espécie em seu ecossistema (SIMÕES *et al.*, 2010).

O elevado número e a grande diversidade dos metabólitos secundários vegetais têm despertado o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que veem neles uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem. Diversos trabalhos descrevendo a composição química do chapéu-de-couro podem ser encontrados na literatura.

MANNIS e HARTMANN (1993) isolaram das folhas de *E. grandiflorus* um novo cembrano chamado Echinodol (Figura 3 – página 8) e elucidaram sua estrutura química por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (NMR). TANAKA *et al.* (1997) isolaram e identificaram o ácido echinoico (Figura 3) como composto majoritário da espécie *E. grandiflorus*. O trabalho identificou esse composto a partir de um extrato etanoico dos pecíolos da folha e de técnicas espectrométricas como MS, NMR, Infravermelho (IR) e análise cristalográfica.

LEITE *et al.* (1998) analisaram a composição química de extratos de *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus* por análises cromatográficas e verificaram a ausência de alcaloides e a presença de cardenólideos, cumarinas, flavonoides e a ocorrência abundante de terpenóides nos extratos das duas espécies.

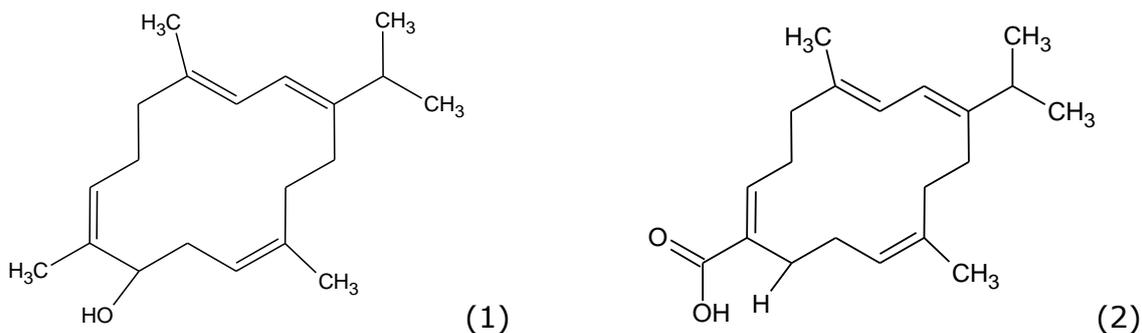


Figura 3 – Metabólitos Chapéu-de-couro: (1) Echinodol e (2) ácido echinóico.

COSTA *et al.* (1999) utilizaram a GC-MS para verificar a presença de derivados cleoredanos em extratos etanólicos das folhas e pecíolos de *Echinodorus grandiflorus* após derivatização dos compostos com bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida e diazometano seguido por agente de silição. Identificaram-se a presença de derivados siliados do ácido Echinóico (metabólito secundário majoritário), ácido octadecanóico, hexadecanóico e fitol (Figura 4). Também isolaram como metabólitos minoritários o ácido hardwickiico e um novo derivado cleoredano que foi isolado e identificado por MS e por NMR.

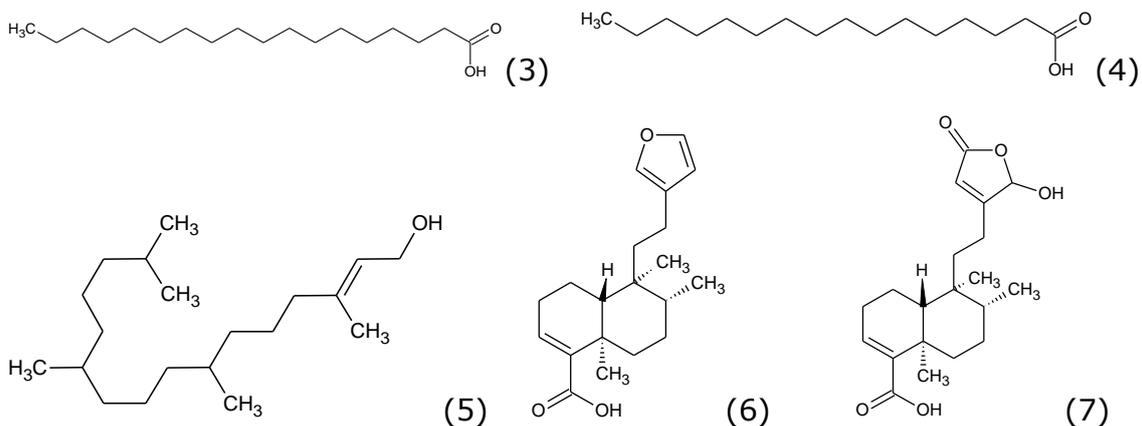


Figura 4 – Metabólitos Chapéu-de-couro: (3) ácido octadecanóico, (4) hexadecanóico, (5) fitol, (6) ácido hardwickiico e (7) novo derivado cleoredano.

Em uma série de três trabalhos, KOBAYASHI *et al.* (2000 a,b,c) analisaram um extrato metanólico das folhas de *Echinodorus macrophyllus* utilizando as técnicas de cromatografia em coluna, MS, NMR, IR e UV. Desta forma eles isolaram 3 novos derivados diterpenóides labdanos, 6 novos derivados diterpenicos cleoredanos nitrogenados que foram identificados como echinofilina A, echinofilina B, echinofilina C, echinofilina D, echinofilina E e echinofilina F (Figura 5).

TANAKA (2000) Isolou e identificou 11 metabólitos secundários presentes nos pecíolos e folhas de *Echinodorus grandiflorus*: fitol, ácido hardwickico, ácido echinóico, quatro derivados clerodânicos, dois derivados esteroidais e dois ácidos graxos. Além disso, comparou os extratos de *E. grandiflorus* com *E. macrophyllus*, *E. tenellus*, *E. longipetalus* e *E. aschersonianus* e concluiu-se que os cleoredanos e cembranos são substâncias características de *E. grandiflorus* enquanto que em *E. macrophyllus* estes estão presentes em quantidades pequenas ou traços.

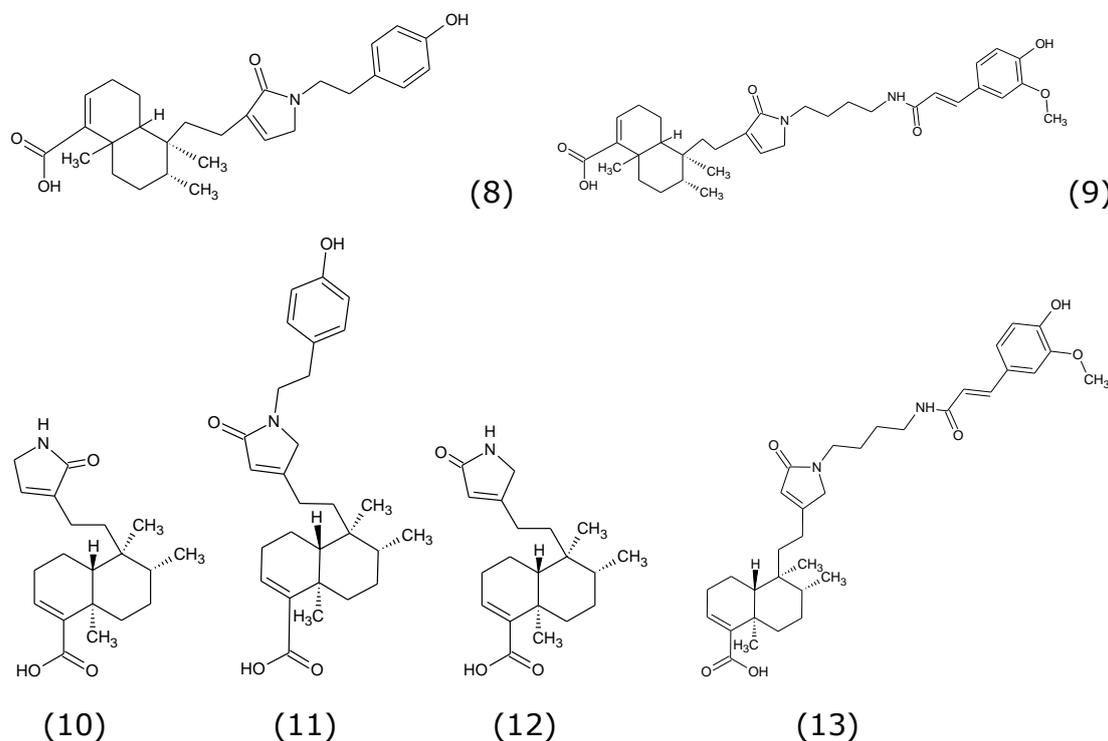


Figura 5– Metabólitos Chapéu-de-couro: (8) echinofilina A, (9) echinofilina B, (10) echinofilina C, (11) echinofilina D, (12) echinofilina E e (13) echinofilina F.

DIAS *et al.*, (2013) identificou a presença de ácido caféico e isoorientina (Figura 8) em amostras de *E. grandiflorus* provenientes de fornecedores com o objetivo de identificar a autenticidade das mesmas.

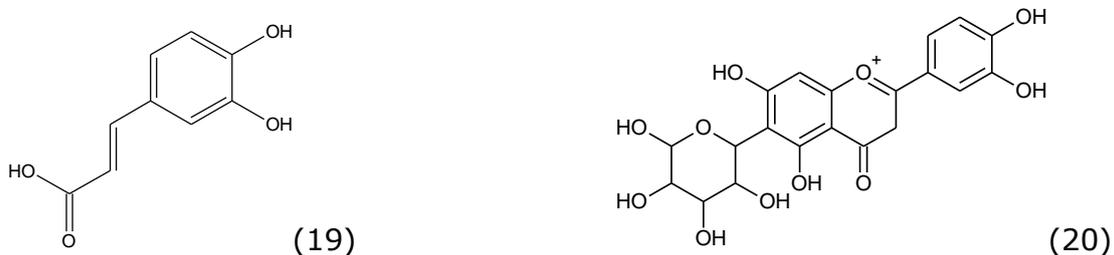


Figura 8 – Metabólitos Chapéu-de-couro: (19) ácido caféico e (20) isoorientina.

SILVA *et al.* (2013) avaliou a mudança na composição do óleo essencial de *E. macrophyllus* exposto a radiação γ por análises em GC/FID e identificou compostos tais como éster metílico do ácido hexadecanóico e éster etílico do ácido hexadecanóico (Figura 9).

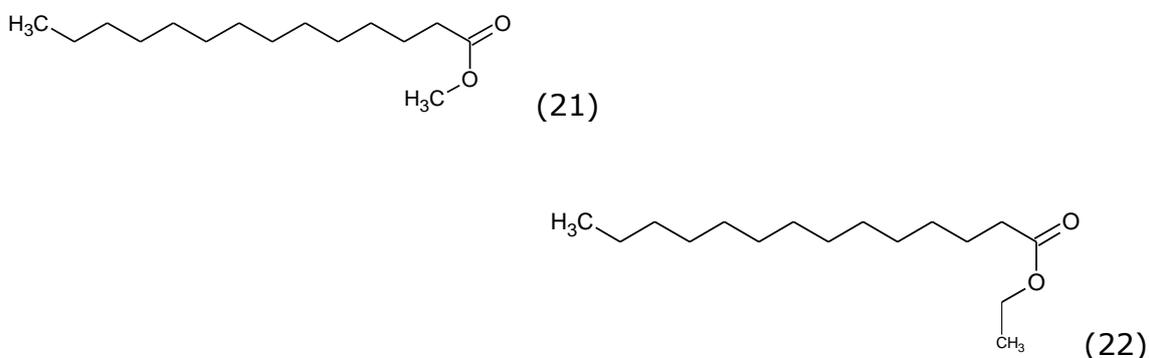


Figura 9– Metabólitos Chapéu-de-couro: (19) éster metílico do ácido hexadecanóico e (20) éster etílico do ácido hexadecanóico.

A revisão exposta acima mostra que a maior parte dos trabalhos buscou avaliar o óleo essencial ou extratos de ambas as espécies utilizando técnicas espectrométricas (IR, NMR e UV-VIS) e cromatográficas (GC). Grande parte dos autores identificaram metabólitos secundários inéditos, tais como novos cembranos e cleoredanos. O restante dos trabalhos avaliaram o efeito de condições de cultivo ou preparo de amostras na

composição química das sob diversas condições que evidenciaram a predominâncias de compostos terpênicos como metabolitos majoritários de ambas as espécies.

2.4 Estudos histológicos

A histologia é o ramo da anatomia que estuda os tecidos dos animais e das plantas. Em seu sentido mais amplo, a palavra *histologia* é usada como se fosse sinônimo de anatomia microscópica, por seu campo englobar não somente a estrutura microscópica dos tecidos, mas também a das células, órgãos e sistemas de órgãos. Várias técnicas foram desenvolvidas para preparar os tecidos a serem estudados para manterem um aspecto muito próximo de seu estado natural vivo. Neste processo são importantes as etapas de fixação, desidratação e diafanização, inclusão em um meio apropriado, microtomia, corte em fatias finas, que permitam a visualização por transiluminação, montagem em uma superfície que facilite o seu manuseio, e coloração de modo a possibilitar a diferenciação dos vários componentes teciduais e celulares (GARTNER e HIATT, 2003).

A Família *Alismataceae* é composta por ervas aquáticas ou semi-aquáticas com uma distribuição mundial e estão intimamente relacionadas evolutivamente às Famílias *Limnocharitaceae*, *Butomaceae* e *Hydrocharitaceae* (SOLTIS *et al.*, 2005) . Historicamente, as plantas aquáticas apresentaram desafios taxonômicos devido à convergência, redução morfológica e plasticidade fenotípica, que também foi o caso para a *Alismataceae* (LES e HAYNES , 1995).

A família é tratada como possuindo 14 Gêneros (HAYNES *et al.*, 1998) e cerca de cem espécies, mas as classificações das espécies são normalmente conflitantes entre os diferentes autores (ROGERS , 1983) e circunscrições genéricas não são consideradas satisfatórias (HEYWOOD *et al.*, 2007) .

HAYNES e HOLM-NIELSEN (1994) citaram a presença de marcas translúcidas foliares em forma de pontos para *E. grandiflorus* subsp. *aureus* e em forma de linhas para *E. grandiflorus* subsp. *grandiflorus* como caracteres diagnósticos para estas subespécies

LEITE *et al.* (2007) realizaram observações morfológicas e histológicas em amostras frescas das folhas, flores e pecíolos de *E. macrophyllus* afim de definir parâmetros para a identificação da espécie visando o controle de qualidade e análise farmacognóstica. Eles concluíram que a presença de células diafragmáticas nos pecíolos e de pelos tectores nas folhas, ambas ilustradas na Figura 10, são estruturas chaves no diagnóstico da espécie *E. macrophyllus*.

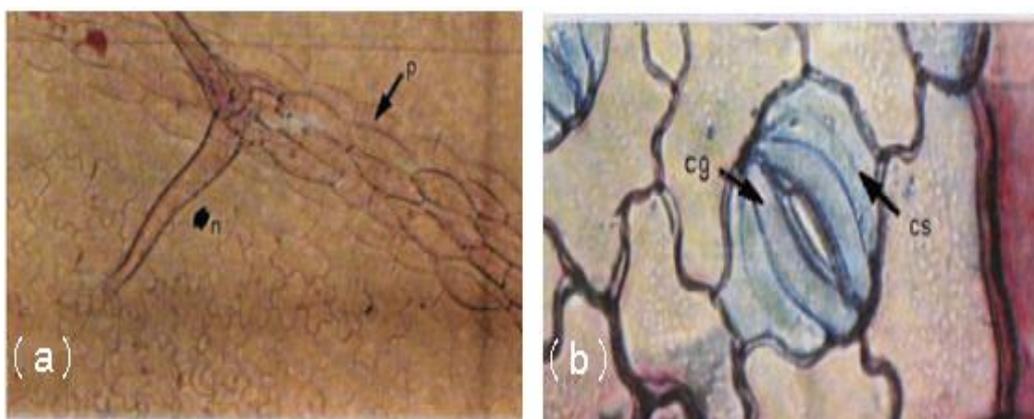


Figura 10 - Estruturas anatômicas presentes em *Echinodorus macrophyllus*: (a) Pelos tectores e (b) Células subsidiárias (cs) presentes nos estômatos na espécie (LEITE *et al.*, 2007).

O posicionamento dos estômatos nas folhas de Chapéu-de-couro é um parâmetro para a diferenciação das duas espécies. TOMLINSON (1982) descreveu a presença de estômatos em ambas as epidermes de folhas de *E. macrophyllus*, predominando em grande número na epiderme abaxial, ou seja, folhas hipostomáticas. Já a farmacopeia brasileira cita na monografia da espécie *E. grandiflorus* que as folhas são anfistomáticas (estômatos em ambas as faces da folha).

2.5 Microextração em fase sólida

A viabilização da análise por cromatografia gasosa depende de um método adequado de preparo da amostra. Um destes métodos é a SPME, porque não utiliza solvente, tem alto poder de concentração (adequando-se com as sensibilidades dos detectores de GC), é aplicável a muitos tipos de analitos e facilita o transporte do material extraído para o cromatógrafo (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

A SPME é uma técnica, em que os processos de extração e pré-concentração de analitos ocorrem numa escala dimensional que não é das mais usuais. O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de fibra ótica de sílica fundida recoberta com um filme fino de um polímero ou sólido adsorvente (SUPELCO, 1996).

Numa extração por SPME, os analitos têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento da fibra e, para isto, resistências a transferências de massas devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. Portanto, a teoria de SPME baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas (VALENTE E AUGUSTO, 2000). Na extração, a seção recoberta com o material sorvente (polímeros ou sólidos adsorventes) pode ser colocada diretamente em contato com a amostra (modo direto) ou no seu espaço confinante (headspace), onde irá ocorrer sorção das espécies de interesse presentes na amostra.

Realizada a extração, a fibra é retirada da amostra e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso, onde os analitos são termicamente dessorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica. As fibras extraem pequenas quantidades de analito, o que facilita sua dessorção e subsequente separação cromatográfica (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

A Figura 11 (página 15) ilustra as etapas típicas para a realização da SPME.

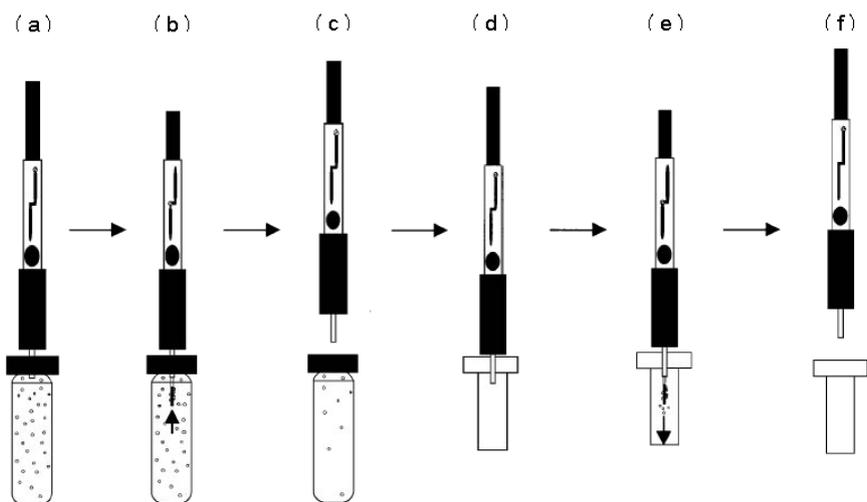


Figura 11 - Etapas de execução da SPME: (a) Perfuração do septo, (b) Adsorção dos analitos na fibra exposta, (c) Final da extração, (d) Inserção no injetor do cromatógrafo, (e) Dessorção dos analitos na fibra exposta e (f) Retirada do injetor. Fonte: SUPELCO (1996).

Os principais parâmetros envolvidos para o desenvolvimento e otimização de um método de SPME são: tipo e dimensões do recobrimento, temperatura de extração, tipo de agitação, força iônica da solução com a amostra, modo de extração (direto ou "headspace"), tempo de exposição da fibra, volumes do frasco, amostra e "headspace" e tempo de exposição para adsorção e dessorção (WAKTE *et al.*, 2009).

2.6 Cromatografia gasosa

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela (COLLINS *et al.*, 2006).

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra volatilizados são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Em contraste, com muitos outros tipos de cromatografia, a fase

móvel não interage com as moléculas do analito e sua única função é transportar o analito através da coluna (SKOOG *et al.*, 2006).

Esta técnica possui um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra com baixos limites de detecção. A análise cromatográfica, isoladamente é rápida, podendo ser efetuada até mesmo em segundos. No entanto, na maioria das vezes há necessidade de etapas de preparação da amostra, antes que ela possa ser analisada, para que não haja interferências durante a análise e contaminações da coluna cromatográfica. Às vezes, essa etapa de preparação é longa e complexa, aumentando em muito o tempo e o custo da análise (COLLINS *et al.*, 2006).

Os componentes básicos de um equipamento de cromatografia gasosa são:

- 1) Suprimento de gás de arraste: o gás de arraste utilizado é definido pelo tipo de detector utilizado. Associados ao cilindro de gás há reguladores de pressão, válvulas e medidores de fluxo.
- 2) Sistema de injeção de amostra: promove a vaporização da amostra e sua injeção na coluna no tamanho adequado.
- 3) Coluna: contém a fase estacionária responsável pela separação dos componentes da amostra. As colunas podem ser de dois tipos genéricos (tubular aberta ou capilar).
- 4) Forno para coluna: o uso de temperaturas na coluna possibilita a vaporização dos compostos da amostra, que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos diferentes.
- 5) Sistema de detecção: o uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação dos compostos eluídos.

O resultado da cromatografia pode ser visualizado colocando-se o sinal do detector em uma curva em função do tempo, obtendo-se assim um gráfico chamado cromatograma. As posições dos picos no eixo do tempo podem ser utilizadas para identificar os componentes da amostra e as áreas sob os picos dão uma medida quantitativa. A Figura 12 (página 17) ilustra um cromatograma típico do Chapéu-de-couro por SPME GC-MS.

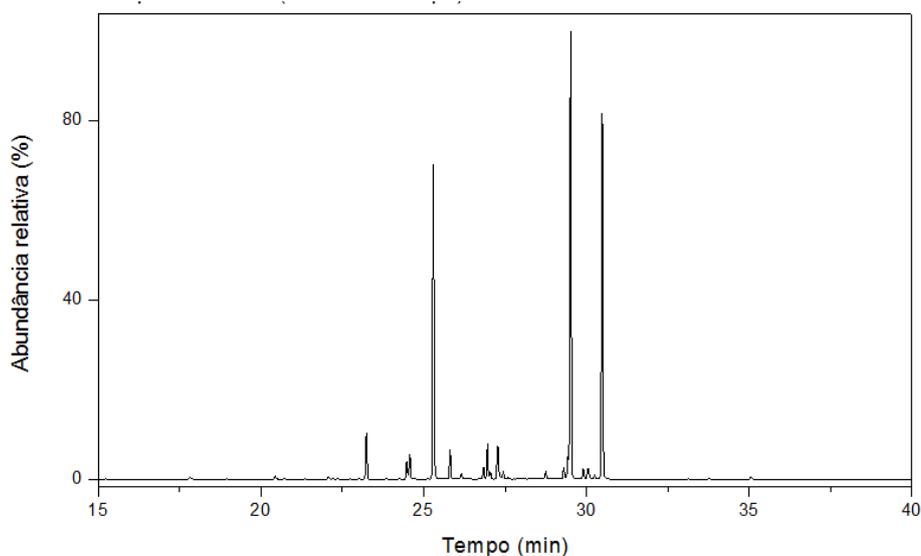


Figura 12 - Cromatograma típico obtido pela técnica de SPME e GC-MS para o Chapéu-de-couro.

A cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjuntos com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrometria de massas.

2.7 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Na espectrometria de massas, um composto é ionizado (método de ionização), os íons são separados (método de separação) em função de sua razão massa/carga e o número de íons que correspondem a cada "unidade" de m/z é registrado na forma de um espectro (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). No caso de um cromatógrafo gasoso, a amostra está na forma de vapor e a entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de GC e a baixa pressão do sistema do espectrômetro de massas. Um sistema complexo de vácuo é necessário para manter a pressão baixa. No espectrômetro de massas, as moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização que ioniza a amostra (SKOOG *et al.*, 2006).

O método de impacto de elétrons é a técnica mais utilizada na geração de íons na espectrometria de massas para GC-MS, pois apresenta alta sensibilidade, geração de espectros únicos e existência de bancos de espectros de massas extensos. No método por impacto eletrônico (EI), as moléculas da amostra são bombardeadas na fase gasosa com elétrons de alta energia (70 eV), que removem um elétron da molécula para produzir um cátion-radical, conhecido como íon-molecular. Como o potencial de ionização dos compostos orgânicos típicos é, geralmente, menor do que 15 eV, os elétrons que estão bombardeando as moléculas-alvo acrescentam energia da ordem de 50 eV ao íon molecular. Essa energia é dissipada, em parte, pela quebra de ligações covalentes. A quebra das ligações é normalmente extensiva e muito reproduzível, o que a torna característica do composto. Por fim, o analisador de massas separa a mistura de íons formados durante a etapa de ionização segundo a razão m/z para gerar um espectro (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Na técnica GC-MS, o espectrômetro de massas varre as massas repetidamente durante o experimento cromatográfico. Os dados podem ser analisados pelo sistema de dados de diversas formas. Primeira, a abundância dos íons em cada espectro pode ser somada e colocada em um gráfico em função do tempo para fornecer um cromatograma do total de íons. Pode-se também mostrar o espectro de massas em um tempo particular durante o cromatograma para identificar-se as espécies que estão eluindo naquele momento. Finalmente, pode-se selecionar um valor único de m/z e monitorá-lo durante o experimento cromatográfico, uma técnica que é denominada monitoramento de íon selecionado (SKOOG *et al.*, 2006).

Para análise de compostos conhecidos, o equipamento executa uma busca computadorizada e compara o espectro de massas do composto em questão com uma biblioteca de espectros de massas. A coincidência dos espectros de massas é uma evidência convincente da identificação que é, muitas vezes, aceita em procedimentos legais (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

2.8 Índice de Kovats e índice de retenção linear

Os índices de Kovats (IK) e retenção linear (IRL) são parâmetros, amplamente divulgados na literatura e que são utilizados na identificação de compostos por cromatografia. O índice de retenção de um composto é um número, obtido por interpolação, que relaciona o tempo de retenção do componente em estudo ao tempo de retenção de dois padrões (geralmente hidrocarbonetos) eluidos antes e após o pico do composto de interesse, ou seja, obtêm-se um tempo relativo de eluição de um determinado componente em relação a uma série de alcanos (INCZEDY *et al.*, 1998).

O índice Kovats é sempre calculado em condições de análise isotérmicas da temperatura do forno do cromatógrafo. Quando se utilizam temperaturas programadas de coluna, um valor similar é calculado utilizando os números extraídos de seus algoritmos, sendo que este valor é o índice de retenção linear (LRI). O LRI é calculado utilizando-se a Equação 1 (página 27).

$$LRI = 100 \left(\frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right) \quad (1)$$

onde:

LRI: índice de retenção linear;

t_c : tempo de retenção do composto de interesse;

t_{n+1} : tempo de retenção do hidrocarboneto posterior;

n : nº de carbonos do hidrocarboneto anterior.

2.9 Análise de componentes principais

O número de parâmetros analisados (variáveis) nos estudos de reconhecimento de padrões é elevado e a representação gráfica de todo o conjunto de dados facilita a interpretação dos resultados. Alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos, entre eles destaca-se a análise de PCA (CORREIA e FERREIRA, 2007).

A utilização da PCA visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs). Organizadas em ordem crescente de importância, as PCs são combinações lineares das variáveis originais. Os gráficos obtidos representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PCs (CORREIA e FERREIRA, 2007).

3. METODOLOGIA DA PESQUISA

Coletaram-se amostras frescas de *E. grandiflorus* em Itatiaiuçu situado na região metropolitana de Belo Horizonte - MG, a 953 m de altitude, latitude 20° 13' S e longitude 44° 30' O. As amostras frescas de *E. macrophyllus* foram coletadas no Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG em Belo Horizonte-MG (19° 89'S e 43° 91' O e 705 m de altitude). Em seguida, realizou-se a secagem com parte do material coletado de cada espécie em uma estufa a 40°C com recirculação de ar por 24 horas. Posteriormente realizaram-se os estudos anatômicos e histológicos para identificação das espécies e executaram-se as corridas cromatográficas utilizando a extração por SPME e análise dos compostos por GC-MS. Estas amostras foram tomadas como padrões de referências.

Na segunda etapa foi feita a aquisição de amostras comerciais de chapéu-de-couro (AL; A.F; AM; A.N; S.C; HO; BH; C.C; C.E; P.E) em dez estabelecimentos do Mercado Central de Belo Horizonte. Repetiram-se as análises realizadas para as amostras de referência para identificar as estruturas anatômicas específicas de cada espécie por estudos histológicos, caracterização dos compostos voláteis por SPME e GC-MS, a influência do processo de secagem sobre a composição das amostras e a discriminação das espécies das amostras comerciais pelo tratamento estatístico multivariado de PCA.

3.1 Estudos anatômicos histológicos das folhas de Chapéu-de-couro

Cortaram-se, com auxílio de uma tesoura de aço inox, seções de aproximadamente, 1 cm² das amostras frescas, pós-secagem e comerciais de chapéu-de-couro e as mergulharam, por aproximadamente 1 hora, em uma solução aquosa de 20% de glicerol a 60°C para hidratação das folhas secas. Em seguida, mergulharam-se, separadamente, as seções reidratadas em 50 mL de solução de hipoclorito de sódio 20% até despigmentação total das folhas (diafanização).

As lâminas para observação foram preparadas da pigmentação dos cortes diafanizados com os corantes azul-de-astra, fucsina e fixando-as as seções em gelatina glicerinada. As estruturas das folhas foram observadas com a utilização de um microscópio óptico Microbell.

3.2 Microextração em fase sólida

Para as amostras pós-secagem e comerciais, trituraram-se as folhas utilizando uma tesoura de aço inox e adicionou-se 0,5 g destes materiais em vials contendo 10 mL de solução 17% de NaCl . Submeteram-se os vials a temperatura de 70°C, sob agitação, por 20 min. Em seguida, inseriu-se a fibra PDMS 100 µm, com suporte manual, (Supelco, Bellefonte, PA, USA) no modo "*headspace*", por 20 min para a extração dos analitos. Por fim, inseriu-se a fibra no injetor do aparelho mantendo-a por um período de 15 minutos para a dessorção dos compostos adsorvidos.

Já as amostras frescas passaram pelo mesmo procedimento descrito anteriormente, entretanto trabalhou-se com a massa de 1,0 g para compensar a massa de água presente no material.

As condições utilizadas para a execução da microextração em fase sólida tomaram como base os trabalhos de DAMASCENO (2007), SOUZA (2010) e GOMES (2003).

3.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

A injeção da fibra de SPME ocorreu no modo "*splitless*" em um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A acoplado a um espectrômetro de massas Agilent 5975C MSD triplo polo com temperatura do injetor igual a 230°C, temperatura inicial da coluna HP5-MS (30 m X 0,25 mm I.D e espessura de filme de 25 µm) de 70°C e temperatura final de 230°C com uma taxa de aquecimento de 3°C/min e hélio como gás carreador a um fluxo de 1,3 mL/min. Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas foram: Energia de ionização eletrônica igual a 70 eV e temperatura da fonte

de íons igual a 250°C. As condições utilizadas foram baseadas no método empregado por (PIMENTA *et al.*, 2006).

3.4 Identificação dos metabólitos

Além dos espectros de massas obtidos a partir dos cromatogramas tratados utilizando o software Chemstation, uma mistura padrão de n-Alcanos (Sigma-Aldrich C₈-C₂₀) foi utilizada para verificar o desempenho do sistema GC-MS e calcular os índices de retenção linear (LRI).

Injetou-se uma solução do padrão de alcanos (1 µL) em hexano nas mesmas condições utilizadas para a análise das amostras. Posteriormente, os tempos de retenção de todos os alcanos foram utilizados em conjunto com os tempos de retenção dos compostos de interesse para a determinação dos respectivos IRL, usando-se a equação 1 .

Para auxiliar na identificação e caracterização dos compostos voláteis, os espectros de massa e os índices de retenção linear foram comparados ao banco de dados da biblioteca do espectrômetro de massas (NIST 2005).

3.5 Análise estatística (PCA)

A identificação das espécies também foi realizada por meio da análise multivariada PCA executada no pacote estatístico computacional Minitab ® 6.0. Inicialmente construiu-se uma matriz com o valor das áreas dos picos dos cromatogramas na qual foram indicadas a origem das amostras nas linhas e os compostos identificados por SPME e GC-MS nas colunas.

Em seguida, verificou-se a correlação entre as áreas dos compostos majoritários (picos de maior área) do conjunto de dados através da determinação do coeficiente de Pearson. As variáveis cuja comparação fosse possível (variabilidade do conjunto de dados mantida de maneira satisfatória) foram selecionadas para a submissão à matriz de covariância para elaboração das componentes principais.

Por fim, representaram-se as componentes principais em um gráfico para melhor visualização dos resultados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos histológicos da folha de Chapéu-de-couro

O exame das folhas das amostras frescas revelou que a superfície das células epidérmicas adaxial e abaxial apresentam paredes sinuosas e a presença de tricomas, por vezes ramificados, localizados próxima as nervuras de ambas as espécies de *Echinodorus*.

A identificação das espécies das amostras de referência de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* foi confirmada pela verificação do hábito das flores conforme MATIAS (2007) e o posicionamento dos estômatos nas faces das folhas conforme TOMLINSON (1982).

LEITE *et al.* (2007) observou estas estruturas em estômatos localizados nos pecíolos da espécie *E. macrophyllus*. A microscopia não revelou a presença de células subsidiárias nos estômatos da folha de nenhuma das duas espécies. O resultado não contradiz a literatura, visto que houve diferenças no método utilizado do material analisado. A Figura 13 ilustra os tricomas e os estômatos (sem a evidência da célula subsidiária) observados para as amostras frescas de referência do Chapéu-de-couro.

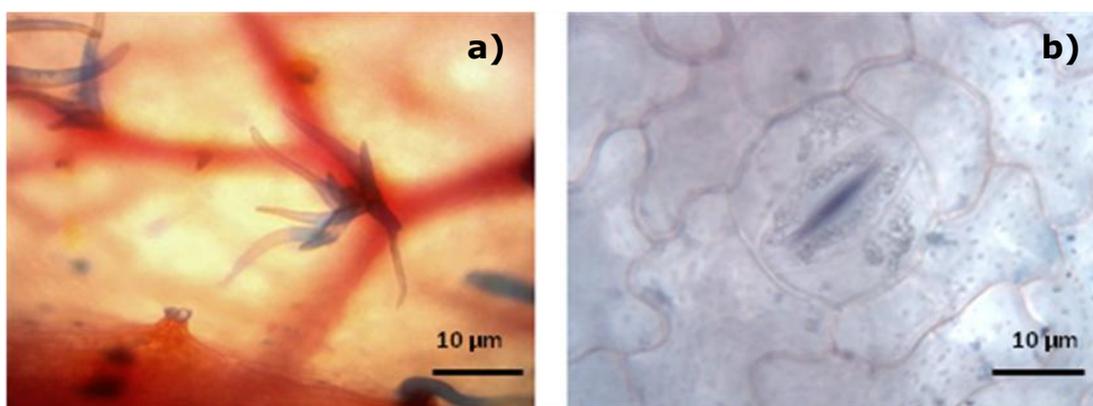


Figura 13 - Observações microscópicas para amostra fresca de Chapéu-de-couro: (a) Tricomas e (b) estômatos (aumento 10x).

O estudo histológico também identificou a presença de ductos secretores translúcidos na superfície das folhas frescas de *E. grandiflorus* como descrito por MATIAS (2007), apresentando-se como pontos de

marcações nas folhas. A Figura 14 ilustra o aspecto destas estruturas na amostra da folha de *E. grandiflorus* coletada *in natura*.

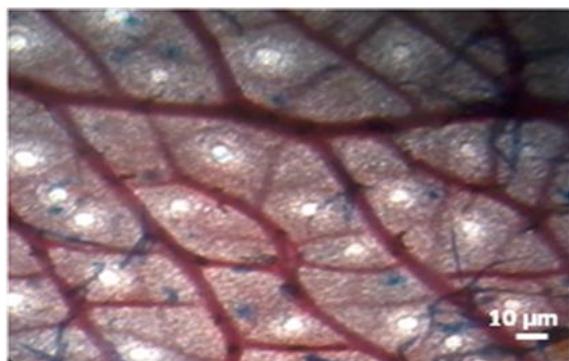


Figura 14 - Pontos secretores translúcidos observados na amostra fresca de *E. grandiflorus* (aumento 4x).

Entretanto, os pontos translúcidos não foram observados na amostra de referência de *E. grandiflorus* pós-secagem, o que impossibilitou a definição desta estrutura como um parâmetro de diferenciação destas espécies devido aos danos causados pela secagem do material vegetal causou que promoveram o rompimento das paredes celulares das células pela perda excessiva de água. A Figura 15 ilustra o vestígio de um ducto da amostra de *E. grandiflorus* pós-secagem.



Figura 15 – Estrutura de um ducto na folha da amostra de referência de *E. grandiflorus* pós-secagem (aumento 10x).

Para as amostras comerciais, a microscopia também apresentou vestígios de ductos nas amostras processadas. Entretanto, os ductos

observados após o processo de secagem não ser utilizado como característica de diferenciação das espécies de chapéu-de-couro visto que a presença de ductos é uma característica das plantas aquáticas e semiaquáticas da Família *Alismatacea*. A Figura 16 ilustra a presença do ducto em uma das amostras comerciais de Chapéu-de-couro.

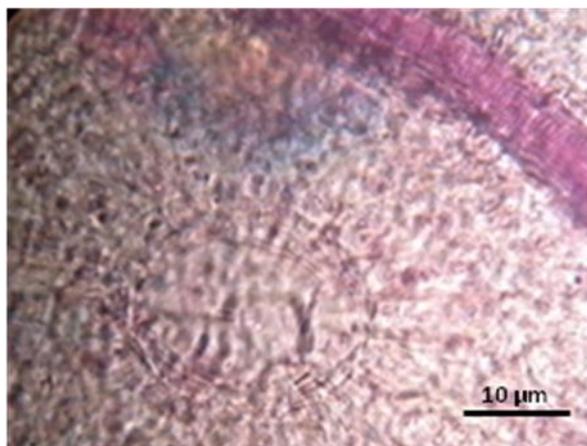


Figura 16 – Vestígios de um ducto na amostra comercial #8 de Chapéu-de-couro (aumento 10x).

Os resultados do estudo histológico, (Quadro 1 – página 27) mostram que não foram visualizadas células subsidiárias nos estômatos de nenhuma das amostras comerciais. A presença de tricoma tector em todas as amostras de referência e em seis das amostras comerciais o que também inviabiliza o uso deste parâmetro para a diferenciação devido à possibilidade de ocorrência mútua nas duas espécies.

A presença de ductos translúcidos, característicos de *E. grandiflorus*, foram visualizados apenas na amostra de referência fresca. Entretanto, não se visualizou a presença de ductos translúcidos nas amostras secas, o que impossibilita confirmar a presença da espécie *E. grandiflorus* dentre as espécies comerciais devido à dificuldade de visualização das estruturas anatômicas em razão do processamento das amostras.

Entretanto, a posição dos estômatos foi um parâmetro eficaz para a diferenciação das espécies das amostras comerciais de Chapéu-de-couro, visto que os estômatos podem ser observados mesmo após o processo de secagem.

Quadro 1 - Resultados dos estudos histológicos.

#	Amostra	Tricoma tector	Estômatos paracíticos	Ductos translúcidos	Posição dos estômatos
1	AL	x	-	-	Anfistomática
2	A.F	-	-	-	Anfistomática
3	AM	-	-	-	Anfistomática
4	A.N	x	-	-	Anfistomática
5	S.C	x	-	-	Anfistomática
6	HO	-	-	-	Anfistomática
7	BH	-	-	-	Anfistomática
8	C.C	x	-	-	Anfistomática
9	C.E	x	-	-	Anfistomática
10	P.E	x	-	-	Anfistomática
11	<i>E. grandiflorus</i> Seca	x	-	-	Anfistomática
12	<i>E. macrophyllus</i> Seca	x	-	-	Hipostomática
13	<i>E. grandiflorus</i> Fresca	x	-	X	Anfistomática
14	<i>E. macrophyllus</i> Fresca	X	-	-	Hipostomática

(X) Presença

(-) Ausência

Portanto, os exames histológicos realizados para as amostras secas de referência e comerciais de Chapéu-de-couro apresentaram evidências capazes de diferenciar as espécies devido ao posicionamento dos estômatos nas folhas das amostras. A visualização de outras estruturas foi prejudicada pelos danos expressivos causados ao tecido vegetal pelo processo de secagem.

4.2 Identificação dos metabólitos

Os resultados da SPME e GC-MS possibilitaram a identificação de 57 compostos distribuídos aleatoriamente entre as amostras. A Tabela 1 (páginas 28 a 30) apresenta os valores de tempos de retenção dos cromatogramas e as áreas percentuais dos picos de todas as amostras.

Tabela 1 – Valores das áreas (%) dos picos, tempos de retenção (min) e identificação das amostras.

TR (min)	Amostras													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
10,7	0,0	0,0	4,8	2,1	0,0	0,0	1,6	2,9	3,3	1,8	3,0	0,0	0,0	0,0
14,4	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14,6	0,0	2,5	3,0	0,0	1,8	2,4	1,5	2,4	2,2	2,5	2,0	0,0	7,2	0,0
15,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	2,9	0,0	0,0
17,8	3,2	0,0	2,2	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9	3,5	0,0	0,0	0,0	3,9	0,0	4,7	0,0
18,6	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	1,5	2,4	0,0	0,0	3,2	0,0	5,7
20,8	0,0	0,8	1,8	1,1	0,7	0,0	1,9	1,9	1,2	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0
21,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0
21,5	0,8	1,2	0,0	1,0	0,0	1,3	1,7	2,6	1,0	3,9	2,1	0,0	0,0	0,0
22,0	0,0	4,1	0,0	2,7	0,0	2,1	3,9	7,2	11,2	3,3	1,3	0,0	0,0	0,0
22,1	1,9	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	1,0	0,0	0,0
22,2	1,5	1,6	1,5	3,9	0,6	0,0	1,6	9,4	2,3	0,9	1,5	0,0	4,7	0,0
22,4	0,7	1,2	0,0	0,8	0,9	3,2	1,2	1,6	0,9	1,4	1,5	0,0	0,0	0,0
22,6	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	1,6	3,9	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0
22,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	2,7	0,0	4,2
23,0	0,0	2,7	0,0	1,9	0,0	0,0	1,5	2,8	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23,2	2,6	0,0	0,0	1,2	7,9	0,0	1,5	1,3	0,0	0,9	0,0	37,7	7,7	31,1
23,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23,8	0,0	11,2	0,0	3,8	0,7	5,3	6,5	4,8	12,4	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	2,8
24,5	11,8	13,2	28,1	27,3	3,5	11,2	18,1	19,6	12,5	25,3	19,4	0,0	1,8	0,0

Tabela 2 – Valores das áreas (%) dos picos, tempos de retenção (min) e identificação das amostras (cont.).

TR (min)	Amostras													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
24,6	3,0	0,0	0,0	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	2,1	0,0	0,0
25,3	2,8	11,7	16,0	23,3	11,8	11,4	4,6	5,4	9,6	6,9	5,4	0,0	20,3	0,0
25,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0
25,7	0,0	3,2	0,0	2,8	0,5	3,4	3,9	4,1	3,0	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0
25,8	4,5	6,8	16,8	5,4	6,9	12,1	6,7	4,7	5,0	6,8	21,0	0,0	7,3	0,0
25,9	3,6	1,8	7,0	2,0	3,5	7,5	0,9	3,7	3,0	0,8	5,7	24,6	2,6	10,1
26,2	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	5,2
26,3	0,6	2,4	0,0	0,8	0,6	1,0	1,6	1,3	1,5	1,9	1,2	0,0	2,3	0,0
26,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	0,0	20,4	3,0
26,7	0,0	3,5	2,1	1,1	0,8	2,6	1,2	1,1	3,1	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0
26,9	0,0	9,9	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6	0,0	0,0	0,0	0,0	11,9	0,0	22,1
27,0	1,2	0,0	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
27,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	3,5	0,0
27,6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0
27,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28,0	0,0	1,7	0,0	0,0	0,8	0,0	1,1	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28,5	46,6	0,0	0,0	0,4	0,5	1,8	0,0	0,0	0,0	5,8	0,0	0,0	0,0	0,0
28,6	0,0	0,8	2,3	0,4	0,0	0,9	1,6	1,2	1,3	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0
28,8	0,0	1,3	0,0	0,0	3,4	0,0	1,3	0,0	0,5	0,0	2,0	0,0	5,8	0,0
29,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,9	0,0	0,0	1,6	0,0	2,3
29,4	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	1,7	0,8	1,3	1,7	2,1	0,0	0,0	0,0	2,4
29,5	4,2	1,8	0,0	4,4	13,8	8,8	3,1	3,3	2,0	5,4	2,8	2,1	0,0	3,0
29,7	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30,5	4,0	4,0	3,2	4,2	13,3	8,1	2,7	3,6	5,2	6,1	1,6	0,0	5,6	0,0
30,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3
35,1	3,4	4,5	9,0	4,6	3,9	6,5	2,6	4,8	4,8	3,5	7,8	0,0	2,7	0,0
35,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	5,8

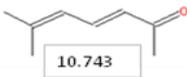
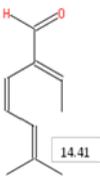
Tabela 3 – Valores das áreas (%) dos picos, tempos de retenção (min) e identificação das amostras (cont.).

TR (min)	Amostras													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
40,5	0,0	1,2	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
40,7	0,0	1,6	0,0	0,9	0,6	1,3	3,3	1,5	1,0	1,2	2,5	0,0	0,0	0,0
43,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
45,8	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Nº comp.	20	27	14	26	29	23	37	26	29	28	25	14	15	13

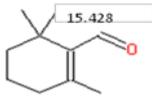
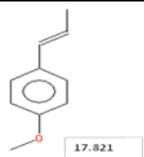
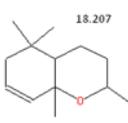
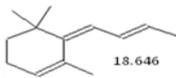
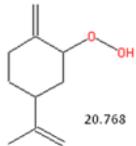
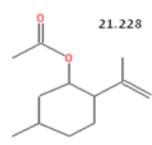
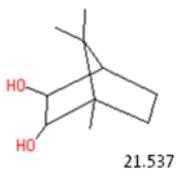
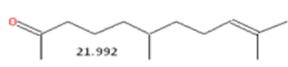
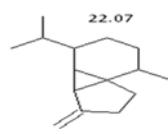
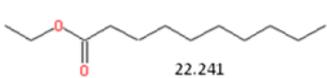
TR– tempo de retenção

O Quadro 2 (página 30 a 36) apresenta os índices de retenção calculados e teóricos (erro aceitável de 5%), nomes, estruturas químicas e a função orgânica dos compostos identificados por SPME e GC-MS para todas as amostras de Chapéu-de-couro.

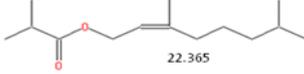
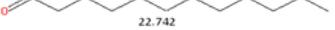
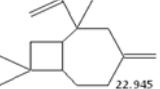
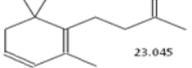
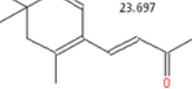
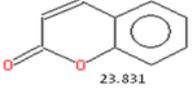
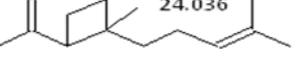
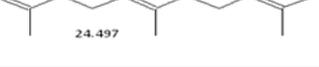
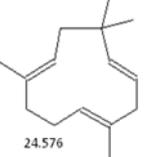
Quadro 2 – Nome, estrutura e função orgânica dos compostos identificados por SPME GCMS.

IRL Cal	IRL Tab	Compostos	Estrutura	Função Orgânica
1093	1074	(E)-6-metil-3,5- Heptadien-2-ona		Terpeno
1187	1182	2-etilideno-6-metil- 3,5-heptadienal		Terpeno
1191	1183	Decanal		Aldeído

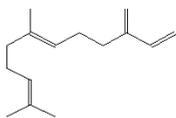
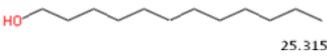
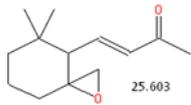
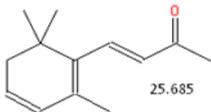
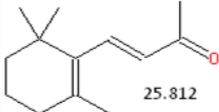
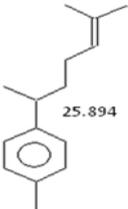
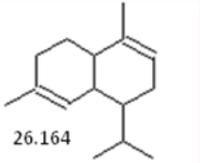
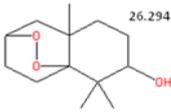
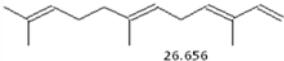
Quadro 3 – Nome, estrutura e função orgânica dos compostos identificados por SPME GCMS (cont.).

IRL Cal	IRL Tab	Compostos	Estrutura	Função Orgânica
1213	1196	2,6,6-trimetil-1-ciclohexeno-1-carboxaldeído		Terpeno
1274	1269	1-metóxi-4-(1-propenil)-benzeno		Fenilpropanóide
1284	1290	3,4,4a,5,6,8a-hexahidro-2,5,5,8a-tetrametil-(2a,4a,8a)-2H-1-Benzopirano		Derivado de carotenoide
1295	1317	8(E)-trieno Megastigma-4,6(Z)		Derivado de carotenoide
1350	1338	2-hidroperóxido (2R,4R)-p-Menta-[1(7),8]-dieno		Terpeno
1362	1335	Acetato de isopulegol		Terpeno
1369	1326	1,7,7-trimetil-,(exo,exo)-Biciclo[2.2.1]heptano-2,3-diol,		Terpeno
1381	1424	6,10-dimetil-9-undecen-2-ona		Derivado de terpeno
1383	1384	β -Cubebeno		Terpeno
1387	1382	Éster etílico do ácido decanóico		Éster

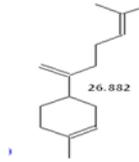
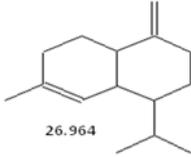
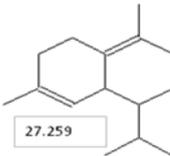
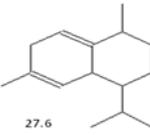
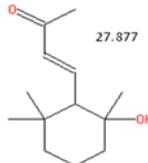
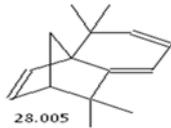
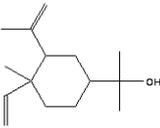
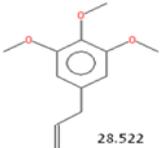
Quadro 4 – Nome, estrutura e função orgânica dos compostos identificados por SPME GCMS (cont.).

IRL Cal	IRL Tab	Compostos	Estrutura	Função Orgânica
1391	1437	(Z)-3,7-dimetil-, isobutirato-2-Octen-1-ol		Terpeno
1397	1391	6,10-dimetil- Undecanona		Derivado de terpeno
1400	1386	Dodecanal		Aldeído
1406	1407	4-metileno-2,8,8- trimetil-2-vinil- Biciclo[5.2.0]nonano		Terpeno
1408	1424	4-(2,6,6-trimetil-1,3- ciclohexadien-1-il)-2- Butanona		Derivado de carotenoide
1413	1424	Cariofileno		Terpeno
1425	1440	4-(2,4,4-Trimetil- ciclohexa-1,5-dienil)- but-3-en-2-ona		Derivado de carotenoide
1428	1414	2H-1-Benzopiran-2-ona		Cumarina
1433	1433	trans-α-Bergamoteno		Terpeno
1445	1453	(E)-6,10-dimetil-5,9- Undecadien-2-ona		Terpeno
1447	1456	α-Cariofileno		Terpeno

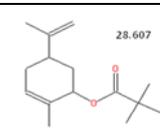
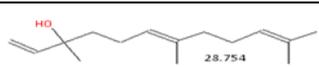
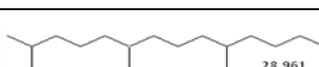
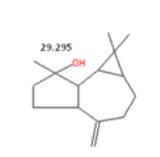
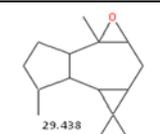
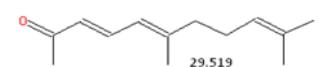
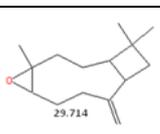
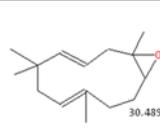
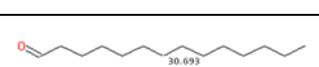
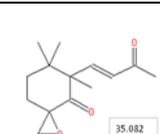
Quadro 5 – Nome, estrutura e função orgânica dos compostos identificados por SPME GCMS (cont.).

IRL Cal	IRL Tab	Compostos	Estrutura	Função Orgânica
1449	1449	(Z)-7,11-dimetil-3-metileno-1,6,10-Dodecatrieno		Terpeno
1466	1457	1-Dodecanol		Álcool
1474	1501	4-(5,5-dimetil-1-oxaspiro[2.5]oct-4-il) 3-buten-2-ona		Derivado de carotenoide
1476	1460	4-(2,6,6-Trimetilciclohexa-1,3-dienil)but-3-en-2-ona		Derivado de carotenoide
1479	1486	4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)- 3-Buten-2-ona		Derivado de carotenoide
1481	1472	1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil Benzeno		Terpeno
1488	1479	1,2,4a,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-Naftaleno		Terpeno
1491	1507	2-Hidroxi-1,1,10-trimetil-6,9-epidioxidecalino		Derivado de carotenoide
1501	1499	α-Farneceno		Terpeno
1502	1490	Tridecanal		Aldeído

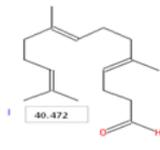
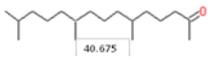
Quadro 6 – Nome, estrutura e função orgânica dos compostos identificados por SPME GCMS (cont.).

IRL Cal	IRL Tab	Compostos	Estrutura	Função Orgânica
1506	1500	(S)- 1-metil-4-(5-metil-1-metileno-4-hexenil)-Cyclohexeno		Terpeno
1508	1505	1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4-metileno-1-(1-metiletil)Naftaleno		Terpeno
1516	1514	1,2,3,5,6,8 α - hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-, (1S)-Naftaleno		Terpeno
1525	1515	1,2,3,4,4α,7-hexahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-Naftaleno		Terpeno
1532	1569	4-(2-hidróxi-2,6,6-trimetilciclohexil)-3-Buten-2-ona		Derivado de carotenoide
1535	1554	4,5,9,10-dihidro-Isolongifoleno		Terpeno
1541	1535	4-etenil- α, α,4-trimetil-3-(1-metiletenil)-, [1R-(1 α,3 α,4 α)]-Ciclohexanometanol		Terpeno
1548	1531	1,2,3-trimetóxi-5-(2-propenil)-benzeno		Fenilpropanóide

Quadro 7 – Nome, estrutura e função orgânica dos compostos identificados por SPME GCMS (cont.).

IRL Cal	IRL Tab	Compostos	Estrutura	Função Orgânica
1551	1560	Pivalato Limonen-6-ol		Terpeno
1554	1545	3,7,11-trimetil-1,6,10-Dodecatrien-3-ol		Terpeno
1560	1557	2,6,10-trimetil-Tetradecano		Terpeno
1568	1569	[1ar-(1aa,4aa,7a,7aa,7ba)]-1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno		Terpeno
1572	1590	Isoaromadendreno epóxido		Terpeno
1574	1562	(E,E)-6,10-dimetil-3,5,9-Undecatrien-2-ona		Terpeno
1579	1576	Óxido de cariofileno		Terpeno
1599	1601	1,5,5,8-tetrametil- 1R-1R*,3E 12-Oxabiciclo[9.1.0]dodeca-3,7-dieno		Terpeno
1604	1592	Tetradecanal		Aldeído
1599	1746	5,6,6-Trimetil-5-(3-oxobut-1-enil)-1-oxaspiro[2.5]octan-4-ona		Derivado de carotenoide
1722	1702	Pentadecanal		Aldeído

Quadro 8 – Nome, estrutura e função orgânica dos compostos identificados por SPME GCMS (cont.).

IRL Cal	IRL Tab	Compostos	Estrutura	Função Orgânica
1854	1855	5,9,13-trimetil-4,8,12-Tetradecatrienal		Terpeno
1860	1838	6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona		Terpeno
1926	1895	6,10,14-trimetil-, (E,E)-5,9,13-Pentadecatrien-2-ona		Terpeno
1990	1966	Éster etílico do ácido hexadecanóico		Éster

IRL_{cal} Índice de retenção calculado

IRL_{tab} Índice de retenção teórico

Os 57 compostos identificados podem ser classificados em sete classes orgânicas: terpenos (36), derivados de carotenoides (10), aldeídos (5), ésteres (2), fenilpropanóides (2), álcool (1) e cumarina (1). A tabela 1A, em anexo, apresenta os parâmetros utilizados para a identificação dos compostos, tais como: IRL calculado, IRL teórico, Erro % IRL e probabilidade.

Os terpenos constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo que esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem Biosintética deriva de unidades de isopreno. Os compostos terpênicos mais frequentes são os monoterpenos (cerca de 90% de óleos voláteis), e os sesquiterpenos. Outros terpenos são encontrados apenas em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos (SIMÕES *et al.*, 2010)

A comparação dos terpenos identificados por SPME GC-MS com aqueles descritos por PIMENTA *et al.* (2006) resulta na concordância de 7 dos 13 terpenos descritos por este autor: dihidroedulano (3,4,4a,5,6,8a-hexahidro-2,5,5,8a-tetrametil-(2a,4aa,8aa)-2H-1benzo-pirano); cariofileno; humuleno (α -cariofileno); α -farneceno; δ -cadineno (1,2,3,5,6,8 α -hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-(1S)-naftaleno); óxido de humuleno e

óxido de cariofileno. A concentração destes compostos não apresentou nenhuma similaridade quando comparados aos perfis de todas as amostras. Isto possivelmente se deve a fatores extrínsecos ambientais diversos aos quais cada amostra foi submetida durante o seu cultivo e processamento (SIMÕES *et al.*, 2010).

PIMENTA *et al.* (2006) verificou este efeito de alteração da composição química em extratos de Chapéu-de-couro cultivado sob condições distintas e análises mensais no período de 15 meses.

A rota Biosintética de terpenóides está associada a via mevalonato que se inicia pela formação do mevalonato a partir de uma molécula de acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise originando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzida a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é então convertido em isopentenil-pirofosfato, ou isopreno ativo, unidade básica na formação dos terpenos e esteroides (Figura 17) (SIMÕES *et al.*, 2010).

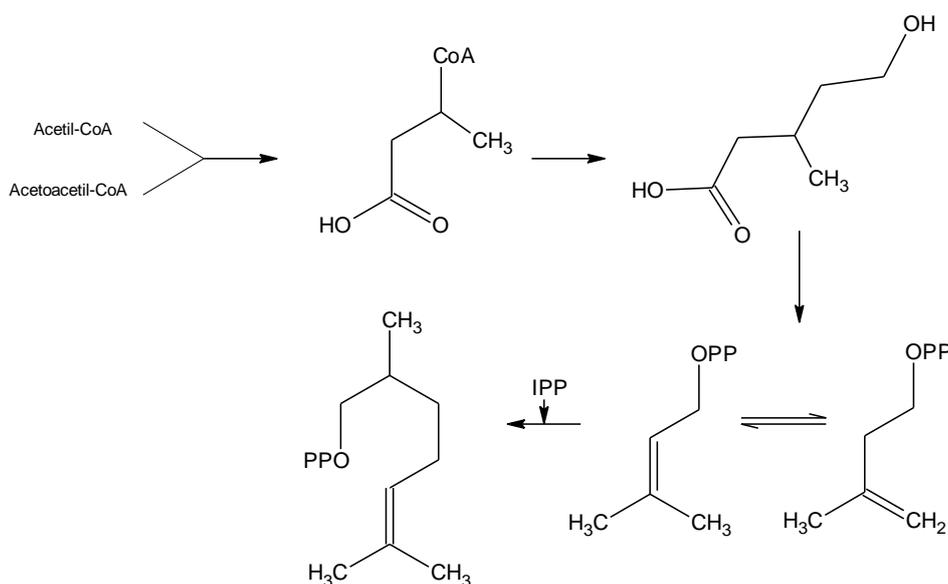


Figura 17 - Biosíntese de terpenos (SIMÕES *et al.*, 2010)

Os compostos da classe fenilpropanóides tem sua origem a partir do ácido chiquímico que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico. Estes últimos, por meio de reduções enzimáticas produzem propenilbenzenos ou alilbenzenos e, por meio de oxidações com degradação

das cadeias laterais, geram aldeídos aromáticos. Ciclizações enzimáticas intramoleculares produzem cumarinas (Figura 18) (SIMÕES *et al.*, 2010).

LEITE *et al.* (1998) verificaram a presença de cumarinas nos extratos das duas espécies de Chapéu-de-couro. Esta classe é derivada de fenilpropanóides, que foi identificada por DIAS *et al.* (2013) que identificou o ácido caféico em *E. grandiflorus*. Observou-se também que estas classes foram identificadas apenas nas amostras comerciais, o que pode sugerir que estes possam se encontrar em maior quantidade nas amostras secas devido ao processo de secagem e/ou formados por reações de oxidação.

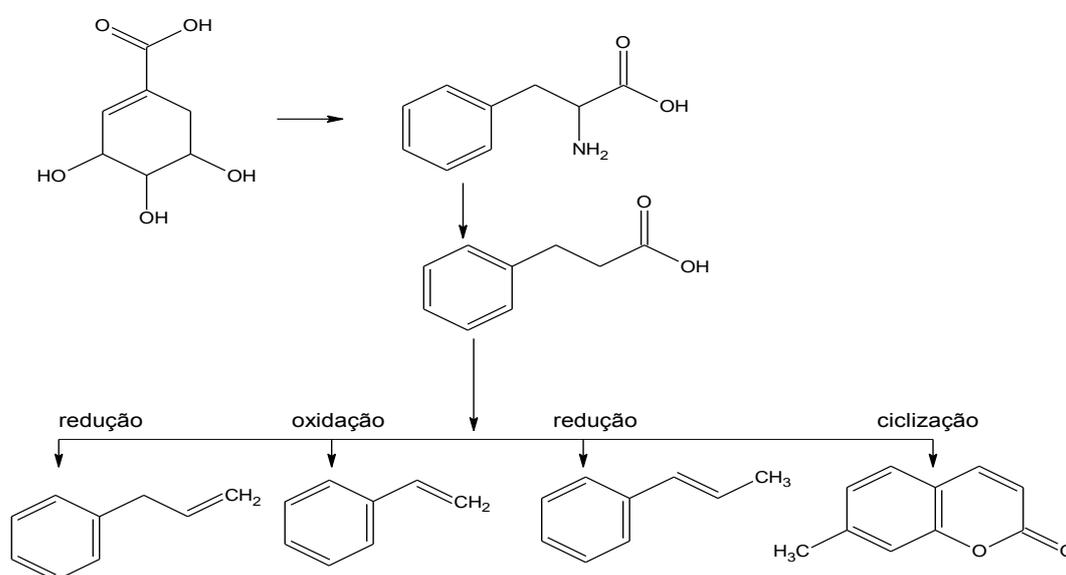


Figura 18 - Formação de fenilpropanóides e cumarinas (SIMÕES *et al.*, 2010).

A origem dos derivados de carotenoides está ligada a degradação destes carotenoides por vias enzimática ou não enzimática. A clivagem não enzimática inclui fotoxigenação, (auto) oxidação e degradação térmica (Figura 19 – página 39). Como anteriormente, estes compostos podem ser formados a partir da degradação dos compostos voláteis quando submetidos a altas temperaturas (UENOJO *et al.*, 2007).

Derivados de carotenoides, como o dihidroedulano, hexahidrofarnesilacetona e (E,E)-farnesilacetona foram identificados por PIMENTA *et al.* (2006) e SILVA *et al.* (2013).

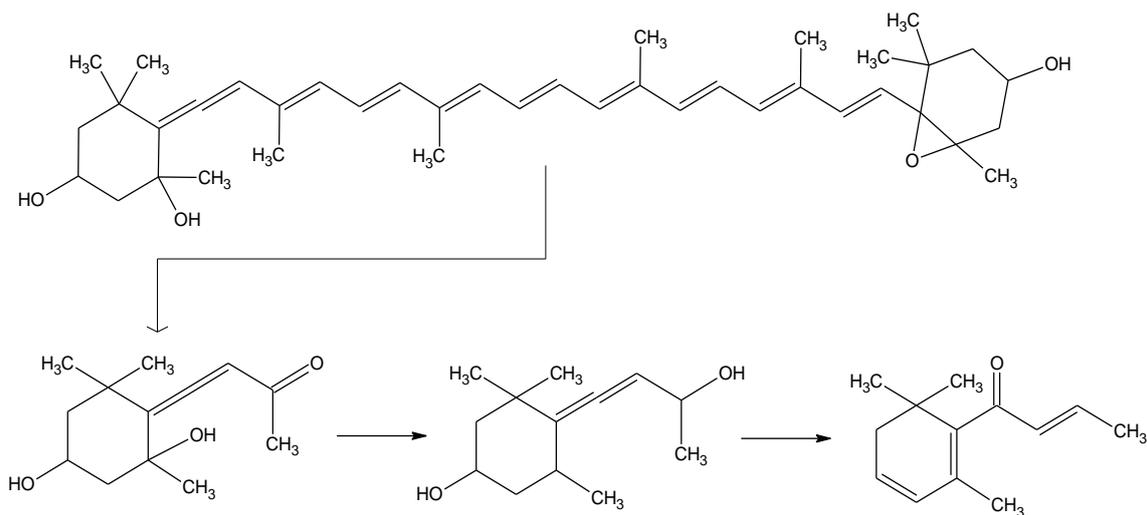


Figura 19 - Formação de compostos por clivagem de carotenoides (UENOJO *et al.*, 2007).

A busca na literatura não permitiu a descrição da rota biossintética das outras classes identificadas para o Chapéu-de-couro. Entretanto, compostos da mesma classe já foram descritos para outras espécies vegetais, tais como o decanal em *Peperomia emarginella* por PEREIRA *et al.* (2007), dodecanol em *Ocotea odorífera* por SILVA *et al.* (2012) e ésteres carboxílicos como éster metílico do ácido hexadecanóico, éster etílico do ácido hexadecanóico, éster metílico do ácido octadecanóico entre outros.

4.3 Amostras de referência frescas

Para as amostras frescas de referência foram identificadas um número equivalente de compostos (15 compostos para *E. grandiflorus* e 13 compostos para *E. macrophyllus*). Entretanto, apenas 3 destes são comuns às duas espécies: cariofileno, 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil benzeno e α -Farneceno.

A maior parte dos compostos identificados para a *E. macrophyllus* são terpenóides, enquanto que para a *E. grandiflorus* ocorreu uma variabilidade das funções orgânicas o que contradiz os resultados de LEITE *et al.*, (1998) e PIMENTA *et al.* (2006) que observaram predominância de compostos terpênicos.

Os compostos majoritários para a amostra fresca de *E. macrophyllus*, foram: cariofileno (31%); (S)- 1-metil-4-(5-metil-1-metileno-4-hexenil)-ciclohexeno(22%) e 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-benzeno (10%). Os compostos majoritários para a amostra fresca de *E. grandiflorus*, foram o α -farneseno (20%), 1-dodecanol (20%) e cariofileno (7%).

Na composição química das amostras frescas, apenas o cariofileno e o α -farneseno foram descritos na literatura (PIMENTA *et al.*, 2006). Essa variabilidade na composição dos componentes voláteis de ambas as espécies era esperada, visto que o tipo e a concentração de metabólitos secundários são fortemente influenciados pela origem geográfica, condições de cultivo, estágio de desenvolvimento e condições de colheita (SIMÕES *et al.*, 2010).

Nos estudos realizados por PIMENTA *et al.* (2000) e PIMENTA *et al.* (2006) com *Echinodorus grandiflorus* observou-se que as condições de cultivo, época do ano, exposição à luz solar, disponibilidade de água, tipo de solo e presença de inflorescências afetou drasticamente a composição dos metabólitos secundários da espécie.

4.4 Amostras de referência secas

Nos perfis obtidos para as amostras de referência *E. macrophyllus* pós-secagem pode-se observar uma grande variabilidade em relação a amostra fresca. Do conjunto total de 17 compostos relacionados ao perfil das duas amostras, 10 destes são encontrados em ambas as espécies, 3 desapareceram devido a secagem (1 aldeído e 2 terpenos) e 4 surgiram após a secagem (4 terpenos).

Os compostos majoritários para a amostra pós-secagem de *E. macrophyllus* foram: cariofileno (38%); 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil benzeno (25%) e (S)-1-metil-4-(5-metil-1-metileno-4-hexenil)- ciclohexeno (12%). O único composto descrito na literatura para a amostra seca de *E. macrophyllus* foi o cariofileno (PIMENTA *et al.*, 2006).

Para a amostra de referência de *E. grandiflorus* pós secagem também ocorreu grande variabilidade a partir do perfil fresco. Do conjunto total de 25 compostos relacionados ao perfil das duas amostras: 14 destes foram

identificados em ambas as espécies, 1 desapareceu devido a secagem (1 terpeno) e 10 surgiram após a secagem (9 terpenos e 1 derivado de carotenoide).

Os compostos majoritários para a amostra pós-secagem de *E. grandiflorus* foram: 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona (21%); (E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona (19%); 5,6,6-trimetil-5-(3-oxobut-1-enil)-1-oxaspiro[2.5]octan-4-ona (8%). O único composto descrito na literatura para a amostra seca de *E. macrophyllus* foi o α -Farneseno (PIMENTA *et al.*, 2006).

Também se pode observar que cinco compostos apareceram nas duas espécies após a secagem: 2,6,6-trimetil-1-ciclohexeno-1-carboxaldeído; β -cubebeno; (Z)-7,11-dimetil-3-metileno-1,6,10-dodecatrieno; 1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-benzeno e (E,E)-6,10-dimetil-3,5,9-undecatrien-2-ona.

Ambas as espécies sofreram efeitos de alteração no perfil químico volátil após a secagem. SILVA e CASALI (2000) afirmaram que o processo de secagem tem a função de diminuir a velocidade de deterioração do material vegetal, por meio da redução no teor de água que atua regressivamente na ação das enzimas, possibilitando a conservação das plantas por maior tempo. Com a redução da quantidade de água, aumenta-se, também, a quantidade de princípios ativos em relação à massa seca, o que explica a maior quantidade de compostos isolados.

Uma das causas da divergência entre os resultados obtidos por este trabalho e os da literatura foi à técnica empregada na extração dos analitos. A maior parte dos trabalhos empregam extratos procedentes de extração de amostras de Chapéu-de-couro para as análises cromatográficas, o que permite identificar compostos de baixa volatilidade, tais como os cembranos e cleoredanos. Já neste trabalho, o método de extração utilizado (SPME) possibilitou a extração de compostos com elevada volatilidade, uma vez que somente estes são capazes de ser adsorvidos no recobrimento polimérico da fibra, o que impossibilita a detecção de compostos não voláteis.

A análise dos compostos presentes nas amostras frescas e pós-secagem revelou dois perfis químicos distintos para as espécies *E.*

grandiflorus e *E. macrophyllus*, o que pode ser utilizado para a avaliação de amostras comerciais.

4.5 Amostras comerciais

As amostras comerciais apresentaram grande variabilidade de compostos, entretanto, alguns destes foram identificados com maior frequência. Os compostos (E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona, 1-dodecanol, 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona, 1,2,3-trimetóxi-5-(2-propenil)-benzeno e 1,5,5,8-tetrametil-1R-1R*,3E12 oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-dieno foram os compostos com maior área média percentual entre as amostras comerciais.

Considerando-se o total de 57 compostos caracterizados, verificou-se que 21 destes só ocorreram em amostras comerciais. Isto provavelmente está relacionado à formação de compostos voláteis devido a reações decorrentes do processo de secagem, como a que ocorre na formação de derivados de carotenoides, os quais foram detectados devido a elevada sensibilidade da técnica de extração proposta neste trabalho (UENOJO *et al.*, 2007).

A elevada sensibilidade da SPME permitiu extrair e identificar uma gama maior de compostos terpênicos e de derivados de carotenoides, principais responsáveis pela formação de aromas em vegetais. Esta propriedade da SPME é o que a torna uma ferramenta eficaz na extração rápida de compostos voláteis de amostras vegetais. A maior parte da literatura sobre Chapéu-de-couro descreve estudos acerca do cultivo, efeitos toxicológicos e busca por estruturas inéditas como novos cembranos e cleoredanos. Este foi o primeiro estudo de Chapéu-de-couro que utilizou a SPME para extração dos compostos voláteis. Neste aspecto, existe uma escassez na literatura a respeito dos metabólitos secundários desta planta. Por isto, verificou-se que apenas 7 dos 57 compostos identificados neste trabalho já foram reportados na literatura e que os outros 50 compostos são descritos pela primeira vez para estas espécies.

4.6 Análise estatística (PCA)

Para a realização da análise, selecionaram-se os dados não padronizados dos compostos mais relevantes para a diferenciação, tais como a presença do composto em ao menos uma das amostras de referência de Chapéu-de-couro seca.

As amostras comerciais foram identificadas como: #1 AL; #2 A.F; #3 AM; #4 A.N; #5 S.C; #6 HO; #7 BH; #8 C.C; #9 C.E e #10 P.E e, em seguida, realizou-se a análise de correlação entre as variáveis pelo cálculo da matriz de covariância de Eigen. O objetivo deste cálculo é definir o número de PCs necessárias para visualizar os dados no menor número de PCs possíveis, mas mantendo o máximo de informação do conjunto de dados (Variabilidade). O resultado da matriz de covariância está expresso no Quadro 3 .

Quadro 3 - Resultado da matriz de covariância de Eigen

Parâmetros	1° PC	2° PC	3° PC
Autovalores	227,38	54,67	3,60E+14
Proporção	0,394	0,327	0,095
Proporção acumulada	0,394	0,720	0,815

Os resultados da matriz acima indicam uma variabilidade relativamente baixa considerando-se o número de variáveis submetidas a análise que se reflete na representação de 81,5% das informações contidas no conjunto de dados. Deste modo, tornou-se possível a geração de um gráfico em três dimensões ao qual cada eixo representa cada uma das PCs definidas. O gráfico obtido está ilustrado na Figura 20 (página 44).

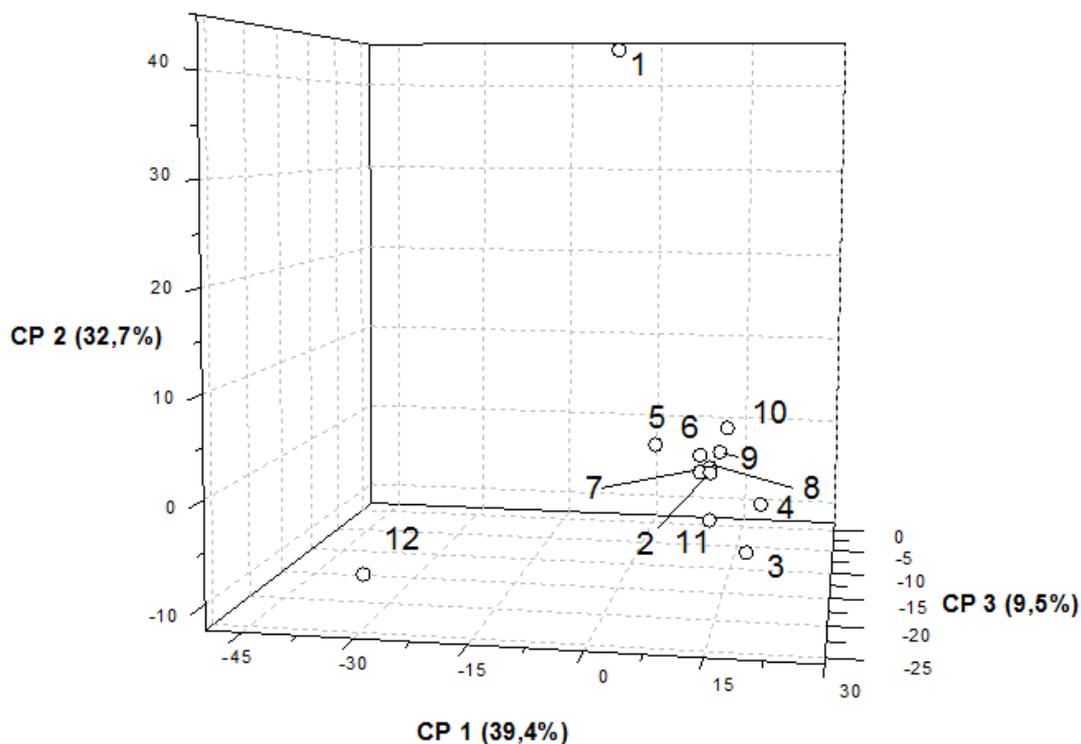


Figura 20 - Resultado da análise de componentes principais dos compostos identificados nas amostras comerciais e de referência de Chapéu-de-couro.

A partir da análise do gráfico, pode-se verificar que as amostras de referência (11 e 12) se localizaram em posições distintas, confirmando a diferença nos perfis de composição química entre as amostras. Observa-se que amostras se distribuem em 3 regiões do gráfico: A primeira apresenta uma grande concentração de 9 amostras comerciais (1, 8, 10, 7, 3, 9, 2, 6) em torno da amostra de referência da *E. grandiflorus* (11) e as outras duas regiões contendo o padrão de *E. macrophyllus* (12) e uma das amostras comerciais (1).

Na primeira região, pode-se observar dispersão dos dados, mas analisando-se o perfil químico das amostras nos quadros 1 e 2 e a distância destes dados em relação aos outros três grupos, pode-se afirmar que estas pertencem a espécie *E. grandiflorus*. Este comportamento pode ser explicado pela variação na composição química das amostras devido a fatores ambientais extrínsecos ou condições de processamento. Também pode-se observar a presença das amostras comerciais 6 e 8 neste grupo, o que confirma o resultado obtido no estudo histológico.

Já a amostra comercial (1) não se enquadrou no perfil de nenhum dos padrões poderia ser tida como adulteração. Entretanto, não se pode inferir através da SPME GC-MS e da PCA se esta realmente pertence à uma espécie de Chapéu-de-couro, sendo necessária a realização de análises complementares para confirmação da espécie desta amostra. Nenhuma das amostras comerciais foi identificada como *E. macrophyllus*.

5. CONCLUSÃO

A extração por SPME e a análise por GC-MS mostrou-se capaz de identificar perfis cromatográficos de componentes voláteis para as amostras comerciais de Chapéu-de-couro do Mercado Central de Belo Horizonte, o que evidenciou o grande impacto do processo de secagem sobre a composição química das frações voláteis destas espécies.

A autenticidade dos materiais vegetais de referência foi verificada por análises anatômicas e histológicas. Esta etapa permitiu identificar as espécies *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus* nas amostras frescas, pós-secagem e comerciais. Estas tiveram suas autenticidades confirmadas pela observação da posição dos estômatos nas faces das folhas de ambas as espécies. O processo de secagem causou danos a estruturas como tricomas e ductos translúcidos (*E. grandiflorus*).

A SPME e GC-MS foram eficazes em extrair e identificar os componentes da fração volátil de todas as amostras, dentre eles vários metabólitos não descritos (50), anteriormente, nas espécies de Chapéu-de-couro. Isto reflete a eficácia da técnica proposta para análise de compostos voláteis e traços de ervas medicinais processadas devido a sua elevada sensibilidade.

A análise multivariada PCA foi capaz de discriminar padrões entre os perfis cromatográficos encontrados para as amostras de referência frescas, pós-secagem e comerciais. Observou-se que as amostras de referência pós-secagem de *E. macrophyllus* e *E. grandiflorus* apresentaram perfis químicos bem distintos, o que possibilitou classificar nove das dez amostras comerciais diretamente como *E. grandiflorus*. Uma amostra comercial não foi confirmada como Chapéu-de-couro por esta técnica e sua identidade deve ser confirmada pela realização de análises complementares.

Por fim, conclui-se que a SPME e GC-MS em conjunto com a PCA se mostrou uma ferramenta eficaz para a discriminação de espécies distintas de ervas medicinais frescas e processadas e apresenta grande potencial para avaliar os efeitos do processamento e a presença de adulterações do material vegetal.

6. REFERÊNCIAS

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, v. 4, 2004.

BUGNO, A. **Drogas Vegetais: Avaliação da contaminação microbiana e pesquisa de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina**. 2006. 219 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. 453 p.

CORRÊA, A. P. R; RODRIGUES, A. G; BARBANO, D. B. A. **POLITICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2006.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C.. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, São Paulo , v. 30, n. 2, 2007.

COSTA, M. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, Campinas, v. 50, n. 1, p.117-122, 1999.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

DAMASCENO, F. C. Microextração em fase sólida em modo headspace aplicada ao estudo de substâncias voláteis de plantas infestadas por galhas foliares entomógenas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GOMES, F. Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluído supercrítico. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

HAYNES, R. R; NIELSEN, L. B. H. **Flora Neotropica. The Alismatacea E. Monograph**. Nova York; New York Botanical Garden, 1994, 105p. 1994.

HAYNES, R.R., LES, D.H., HOLM-NIELSEN, L.B., 1998. Alismataceae. In: K. Kubitzki (Ed.). The Families and Genera of Vascular Plants. 4, 11–18.

HEYWOOD, V.H. ; BRUMMITT, R.K.; CULHAM, A.; SEBERG, O. **Flowering plant families of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew (2007).

INCZEDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A. M.; **Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules 1997, "The Orange Book"**, 3rd ed., Blackwell Science: Oxford, 1998.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H., OHSAKI, A. Chapecoderins A-C, New Labdane-Derived Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Journal Of Natural Products**, Tokyo, p. 375-377. 2000a.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIGEMORI, H., OHSAKI, A. Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Tetrahedron Letters**, Tokyo, p. 2939–2943. 2000b.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHINAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A. Echinophyllins C-F, New Nitrogen-Containing Clerodane Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Journal Of Natural Products**, Tokyo, p. 1576-1579. 2000c.

LEITE, J. P. V.; PIMENTA, D. S.; GOMES, R. S. D. L.; DANTAS-BARROS, A. M. Contribuição ao estudo farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro) - Alismatacea E. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p.242-248, 2007.

LEITE, S. N.; FLORIANI, A. E.; BIAVATTI, M. W.; CHECHINED, F. V. **Parâmetros fitoquímicos , físico-químicos e anatômicos para o controle de qualidade de Chapéu-de-couro (*E. grandiflorus* x *macrophyllus*, Alismatacea)**. Resumos do X Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais do Brasil, 1998. Águas de Lindóia,SP.

LES, D.H.; HAYNES, R. R. **Systematics of subclass Alismatidae: a synthesis of approaches**. Monocotyledons: Systematics and Evolution, Royal Botanical Gardens, Kew (1995), pp. 353-377.

LOPES, G.C.; SANTOS, P.V.P.; DICIAULA, M.C.; BLAINSKI, A.; GUTIERRE, M.A.M.; MELLO, J.C.P. Validação de metodologia analítica para a determinação de derivados do ácido o-hidroxicinâmico de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu , v. 14, n. 3, 2012 .

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000. 672p.

MANNS D.; HARTMANN R. 1993. Echinodol: a new cembrene derivative from *Echinodorus grandiflorus*. **Planta Medica** 59: 465– 466.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: Ed. Universitária – UFV, 1994.

MATIAS, L. Q. O GÊNERO *ECHINODORUS* (ALISMATACEAE) NO DOMÍNIO DA CAATINGA BRASILEIRA. **Rodriguésia**, Fortaleza, v. 4, n. 58, p.743-774, 2007.

PEREIRA, J. L. G.; REBELO, R. A.; AGUIAR, E. M.; JÚNIOR, A. W.; ABREU, A. M.; BRIGHENTE, C. I. M.; SOCCAS, M. S.; CUBAS, C. **Caracterização Química e Propriedade Sensorial do Óleo Essencial de Peperomia emarginella (SW.) C.DC.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30, 2007, Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: SP, 2007. p. 1-2.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Chemical studies on cultivation of *Echinodorus grandiflorus* (cham. & schl.) mich. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 2, 2000.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. E Schltld.) Micheli (Chapéu de couro). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p.623-628, 2006.

REIS, F. A. G. **ANÁLISE DA QUALIDADE DE ERVAS MEDICINAIS DO MERCADO POPULAR DE BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS.** 2009. 35 f. TCC (Curso técnico) – Monografia da Iniciação Científica Júnior, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

ROGERS, G. K. **The genera of Alismataceae in the southeastern United States.** J. Arnold Arbor., 64 (1983), pp. 383–420.

SHIGEMORI, H. *et al.* Echinodolides A and B, New Cembrane Diterpenoids with an Eight-Membered Lactone Ring from the Leaves of *Echinodorus macrophyllus*. **Journal Of Natural Products**, Tokyo, p. 82-84. 2002.

SILVA, A.G.; MERCÊS, P. F. F.; BASTO, S. R. L.; ALVES, R. C. C; MACEDO, A. J.; CORREIRA, M. T. S.; SILVA, M. V. **Constituintes voláteis das folhas de Ocotea odorifera (Vell.) Rohwer (Lauraceae)** In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 22, 2012, Beto Gonçalves. Bento Gonçalves: RS, 2012.

SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais.** Viçosa: Arte e Livros, 2000. 135p.

SILVA, T. M.; MIRANDA, R. R. S.; FERRAZ, V. P.; PEREIRA, M. T.; SIQUEIRA, E. P.; ALCÂNTARA, A. F. C. Changes in the essential oil composition of leaves of *Echinodorus macrophyllus* exposed to radiation γ . **Revista brasileira de farmacognosia.**, Curitiba , v. 23, n. 4, 2013.

SILVERSTEIN, R. M, Webster, F. X, Kiemle, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** Rio de Janeiro, LTC, 7 ed., **2007**, 490 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis, 6. ed., Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª ed. Norte-Americana, Thomson Learning Ltda, 2006.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S; ENDRESS, P.K; CHASE, M.W. **Phylogeny and evolution of angiosperms.** Sinauer Associates, Sunderland, USA. 2005.

SOUZA, M.R.M.; PEREIRA, R.G.F.; FONSECA, M.C.M. Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, 242-245. 2012.

SOUZA, R. C. Z. **Avaliação das frações voláteis de espécies de *Aniba* por microextração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME-GC) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente** – Campinas, SP:[s.n], 2011.

SUPELCO Inc.; **Chromatographic Products** (catálogo); Supelco, Bellefonte, PA, 1996; p. 373.

TANAKA, C. M. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MARSAIOLI, A. J. A cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, Campinas, v. 44, n. 8, p.1547-1549, 1997.

TANAKA, C. M. A. **Constituintes químicos de cinco espécies de *Echinodorus* e avaliação do beta-pineno como substrato para obtenção de quirons mais elaborados**. 2000. 298 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutor em Ciências, Departamento de Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

TOMLINSON PB 1982. *Anatomy of the monocotyledons*. Oxford: Metcolfe.

UENOJO, M.; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química. Nova**, São Paulo , v. 30, n. 3, 2007.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, Campinas- Sp, v. 23, n. 4, p.523-530, 1 ago. 2000.

WAKTE, K. V.; THENGANE, R. J; JAWALI, N.; NADAL, A. B. Optimization of HS-SPME conditions for quantification of 2-acetyl-1-pyrroline and study of other volatiles in *Pandanus amaryllifolius* Roxb. **Food Chemistry**, Mumbai, n. 121, p.595-600, 2009.

7. ANEXOS

Tabela A1 – Parâmetros utilizados para identificação dos compostos.

RT (min)	Erro %	Match	R Match	Prob. %
10,7	1,77	737	884	8,92
14,4	0,42	752	780	2,76
14,6	0,67	883	935	60
15,4	1,42	902	905	72,8
17,8	0,42	887	909	43
18,2	0,45	777	898	61,1
18,6	1,64	659	701	0,45
20,8	0,88	676	785	0,69
21,2	1,99	550	701	1,51
21,5	3,28	621	738	0,98
22,0	3,01	543	749	0,5
22,1	0,06	789	873	38
22,2	0,40	786	905	66,4
22,4	3,22	669	687	5,37
22,6	0,41	686	786	7,85
22,7	1,03	786	948	16
22,9	0,11	754	772	3,51
23,0	1,12	732	777	12,6
23,2	0,76	887	910	24,6
23,7	1,06	772	782	15
23,8	1,01	928	937	88,6
24,0	0,03	884	906	28,9
24,5	0,53	904	910	30,7
24,6	0,60	930	955	70,6
24,7	0,02	770	873	23,1
25,3	0,63	890	935	9,48
25,6	1,83	790	790	10,5
25,7	1,09	835	872	57,1
25,8	0,47	864	874	45,4
25,9	0,61	862	914	83,5
26,2	0,61	751	866	3
26,3	1,04	683	708	5,29
26,7	0,10	916	943	63,9
26,7	0,81	686	908	7,84
26,9	0,42	921	926	40,2
27,0	0,23	718	786	3,55
27,3	0,13	736	832	19,5

Tabela A1 – Parâmetros utilizados para identificação dos compostos (cont.).

RT (min)	Erro %	Match	R Match	Prob. %
27,6	0,64	675	775	7,1
27,9	2,37	727	823	6,47
28,0	1,22	669	713	19,9
28,2	0,38	847	870	22,5
28,5	1,13	899	900	62,7
28,6	0,61	775	787	23
28,8	0,60	799	844	9,75
29,0	0,17	767	794	11,7
29,3	0,05	843	916	26,1
29,4	1,14	824	850	18
29,5	0,76	763	874	6,73
29,7	0,18	748	782	20,7
30,5	0,14	772	863	9,64
30,7	0,75	837	919	10
35,1	1,70	655	657	2,48
35,3	1,20	917	933	11,1
40,5	0,03	616	627	16
40,7	1,17	829	838	60
43,3	1,65	864	871	36,5
44,8	3,37	838	852	2,21