UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARLA LARISSA COSTA MEIRA

Aplicação de Análise de componentes principais para avaliação dos constituintes químicos do extrato metanólico de *Mimosa tenuiflora* por DLLME/CG-EM.

JEQUIÉ – BA

MAIO/2018

CARLA LARISSA COSTA MEIRA

Aplicação de Análise de componentes principais para avaliação dos constituintes químicos do extrato metanólico de *Mimosa tenuiflora* por DLLME/CG-EM.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Rosane Moura Aguiar

Co-orientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

JEQUIÉ – BA

MAIO/2018

M514a Meira, Carla Larissa Costa.

Aplicação de análise de componentes principais para avaliação dos constituintes químicos do extrato metanólico de Mimosa tenuiflora por DLLME/CG-EM / Carla Larissa Costa Meira.- Jequié, 2018.

39f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Profª. Drª. Rosane Moura Aguiar e coorientação do Prof. Dr. Cléber Galvão Novaes)

1.Mimosa tenuiflora 2.CG-EM 3.PCA I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

Esta dissertação é dedicada à minha avó, Áurea Costa (In memoriam), que me amou e sempre me apoiou em todos os meus projetos.

AGRADECIMENTOS

Depois de muitas experiências vividas e momentos de tensão e desespero, o sentimento de gratidão (e alívio hehehe), prevalece dentro de mim. Olhando todo o percurso, foram muitas pessoas importantes que passaram pela minha vida, que, de alguma forma, contribuíram com a minha história.

Agradeço, infinitamente, aos meus pais, Luiz Carlos Brito Meira e Raimunda Costa Meira, por me mostrar que de todos os amores que podemos receber durante a vida, o amor que eles têm por mim é o mais especial. Não existe outro que consiga ser incondicional, e demonstrar ao mesmo tempo um interesse tão grande e genuíno na nossa felicidade. Não consigo, de fato, expressar o meu agradecimento por tudo que vocês têm me dado, pois nunca conseguirei compensar devidamente a dedicação, amor, incentivo, carinho e apoio que sempre manifestaram.

À minha tia, Claudia Milena B. Costa, pelo sentimento maternal, amizade, cumplicidade e proteção. Agradeço à minha avozinha, Áurea Costa *"in memoriam"*, que acompanhou minha vida, me apoiou, me amou e, com toda certeza, estaria do meu lado comemorando mais essa etapa cumprida.

Agradeço da mesma forma a todos os familiares e amigos que de alguma maneira contribuíram para minha evolução.

Agradeço, de uma forma especial, à minha orientadora, professora Dr.ª Rosane Moura Aguiar, pela amizade, paciência e apoio, por ser uma excelente pessoa e profissional, a qual me espelho. Serei sempre grata pela oportunidade que me foi dada em trabalhar em seu grupo de pesquisa (por sete anos! Hehehe), que serviu para agregar experiência e conhecimento.

Ao Prof. Dr. Djalma de Oliveira pelo seu conhecimento, apoio, companheirismo, amizade e pelos momentos de alegria, diversão e boas risadas que compartilhamos durante esses anos. Ao Prof. Dr. Cléber Galvão pela excelente colaboração ímpar para esse trabalho, pela sua competência, disponibilidade em agregar conhecimento e parceria.

Agradeço aos companheiros do Laboratório de Óleos Essenciais, pela amizade, auxílio, e por ter compartilhado conhecimento, dúvidas e alegrias...

Em especial, ao meu colega de trabalho, Vilisaimon Silva, pela competência, parceria e lealdade. Além de Naiara e Claudenice, que contribuíram de forma singular nesse projeto.

Não poderia deixar de citar meus colegas de turma, em especial, Adílio Macêdo, Maria da Luz e Rosângela Pereira, do nosso grupo de pesquisa, no qual passamos pelos mesmos momentos de angústias, alegrias, apreensões... está acabando esse ciclo! Preparados para o próximo? Rsrsrs

Agradeço aos meus amigos, Natália, Edu, Tascy e Juscelia, pelo companheirismo, cumplicidade e por me suportar nos momentos de chatice. Agradeço, carinhosamente, a Lisi, que hoje é mais que uma amiga, uma irmã que a vida me deu, pelo grande apoio e lealdade.

Agradeço aos meus colegas de trabalho e aos meus queridos alunos do Colégio ACM, de Dário Meira, pelo reconhecimento, carinho, companheirismo e pelo ambiente agradável que conseguimos construir, além de me dar a grande oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, como Jen Assis e Wilton Miranda Jr. Jen Assis, mais conhecida como Jen da Mary Kay (ela vai me matar quando ler isso), obrigada pelos agradáveis momentos que passamos juntas, pelo incentivo e amizade.

De forma muito especial, ao meu grande amigo, Wilton Miranda Jr. (Ju...só para os íntimos, hehehehe), pela sua amizade, cumplicidade, lealdade, conselhos... você esteve do meu lado em um dos momentos mais difíceis da minha vida. Não sei como descrever o quanto te admiro e te respeito, pela pessoa maravilhosa que você é. Por você tenho um sentimento tão bom, que torna minha vida mais feliz. Mesmo que um dia eu esteja longe, lembre-se que sempre serei leal a nossa amizade e “meu desejo é que nunca sinta tristeza, só alegria todos os dias de sua vida”.

Agradeço à vida, por ter colocado no meu caminho pessoas tão especiais, como Karla Guedes, que há pouco tempo passou a fazer parte da minha vida, mas compartilharmos uma grande sintonia, equilíbrio e amizade.

Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em Química que desempenharam com dedicação e sabedoria as aulas ministradas e, por fim, à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, por proporcionar a execução dessa pesquisa.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Combinações entre solventes extrator e dispersor e tempo de centrifugação na aplicação da DLLME no extrato orgânico de M. tenuiflora.. 17
Tabela 2. Constituintes majoritários presentes no extrato metanólico de M. tenuiflora, identificados por CG-EM. 18
Tabela 3. Valores para as correlações entre componentes principais e respostas para o sistema de extração. 21

Figura 1. Aspectos morfológicos da *Mimosa tenuiflora* 15
Figura 2. Gráficos dos *escores* (a) e *loadings* (b) para PC1 versus PC2. 23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DLLME – Micro extração Líquido-líquido Dispersiva do inglês *Dispersive liquid–liquid microextraction*

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

EMM – Extrato metanólico de *Mimosa tenuiflora*

PCA – Análise de componentes principais do inglês *Principal Componts Analysis*

PC - Componentes principais

BSTFA - N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

Am1 - etil acetamida

Am2 - *N,N*-dietilformamida

Am3 - *N,N*-dietilacetamida

Phy - Hexestrol

Ke - Ácido alfa-cetobutírico

Ac1 - Ácido tetradecanoico

Phe - Miristicina

Ac2 - Ácido hexadecanoico

Es – Maleato de di-2-etilexil

Al - Octadecanol

Ac3 - Ácido octadecanoico

Te - Ácido pimárico

Ac4 - Adipato de dioctila

Ac5 - Palmitato de (2S)-2,3-dihidroxipropila

Aplicação de Análise de componentes principais para avaliação dos constituintes químicos do extrato metanólico de *Mimosa tenuiflora* por DLLME/CG-EM.

Autora: Carla Larissa Costa Meira
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Rosane Moura Aguiar

RESUMO: A aplicação de técnicas analíticas para o estudo de plantas medicinais representa um grande avanço no estudo de produtos naturais. No entanto, a grande complexidade na dos constituintes químicos presentes em matrizes orgânicas, faz com que seja necessárias etapas de pré-tratamento da amostra para o estudo da composição dessas matrizes. *Mimosa tenuiflora* é um arbusto de ocorrência nos biomas Caatinga e Cerrado, mais especificamente nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. Muito empregada na medicina popular devido as suas propriedades farmacológicas e em rituais religiosos devido à presença de substâncias psicoativas. O presente trabalho visou o estudo dos constituintes químicos fixos de *M. tenuiflora* por meio aplicação das técnicas de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME), derivatização, Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e avaliação estatística dos dados por meio da análise dos componentes principais (PCA). Partes aéreas de *M. tenuiflora* foram coletadas no município de Jequié, localizado na região Sudoeste da Bahia. Foram testados 19 sistemas ternários de solventes no processo de microextração dos constituintes a serem estudados. A derivatização dos compostos extraídos compreendeu uma etapa crítica no processo, visto que promove a volatilização mais eficiente desses compostos a serem identificados, posteriormente, por CG-EM. A análise dos cromatogramas de íons totais permitiu a identificação de 283 constituintes, pertencentes as diversas classes metabólicas e grupos funcionais. Os resultados foram tratados aplicando PCA, a fim de determinar a eficiência dos sistemas de solventes para determinados grupamentos de substâncias. Os resultados de análise por PCA permitiram estabelecer os principais constituintes presentes no extrato metanólico de *M. tenuiflora.* Logo, determinou-se a ocorrência de 14 constituintes majoritários e a formação de seis grupos, que correspondem às similaridades presentes no processo de extração. Esses resultados são importantes para o estudo da composição química de *M. tenuiflora* e futuros trabalhos envolvendo isolamento e identificação de substâncias bioativas.

Aplicação de Análise de componentes principais para avaliação dos constituintes químicos do extrato metanólico de *Mimosa tenuiflora* por DLLME/CG-EM.

Autora: Carla Larissa Costa Meira
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Rosane Moura Aguiar

ABSTRACT: The application of analytical techniques for the study of medicinal plants represents a great advance in the study of natural products. However, the great complexity of the chemical constituents present in organic matrices, makes it necessary to pre-treat the samples to study the composition of these matrices. *Mimosa tenuiflora* is a shrub occurring in the Caatinga and Cerrado biomes, more specifically in the Northeast and Southeast regions of Brazil. Very used in popular medicine due to its pharmacological properties and in religious rituals due to the presence of psychoactive substances. The present work aimed at the study of the fixed chemical constituents of M. tenuiflora by means of the application of Liquid Dispersion-Liquid Microextraction (DLLME), derivatization, Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and statistical evaluation of the data by means of principal component analysis (PCA). Aerial parts of M. tenuiflora were collected in the municipality of Jequié, located in the Southwest region of Bahia. Nineteen ternary solvent systems were tested in the microextraction process of the constituents to be studied. The derivatization of the extracted compounds comprised a critical step in the process, since it promotes the more efficient volatilization of these compounds to be later identified by GC-MS. The analysis of the total ion chromatograms allowed the identification of 283 constituents, belonging to the various metabolic classes and functional groups. The results were treated using PCA in order to determine the efficiency of the solvent systems for certain groups of substances. The results of analysis by PCA allowed to establish the main constituents present in the methanolic extract of *M. tenuiflora*. Therefore, it was determined the occurrence of 14 major constituents and the formation of six groups, which correspond to the similarities present in the extraction process. These results are important for the study of the chemical composition of *M. tenuiflora* and future works involving the isolation and identification of bioactive substances.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. PARTE EXPERIMENTAL 14
2.1 Preparação do material vegetal e obtenção do extrato de *M. tenuiflora* . 14
2.2 Otimização dos sistemas e extração dos constituintes via DLLME..... 15
2.3 Derivatização – Sililação 15
2.4 Análises cromatográficas 16
2.5 Análise estatística 16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 17
4. CONCLUSÃO 25
5. PERSPECTIVAS 26
6. REFERÊNCIAS 27
7. APÊNDICE 30
Apêndice A..... 30
Apêndice B..... 39

1. INTRODUÇÃO

O estudo da composição química de plantas medicinais implica na investigação de uma amostra com grande complexidade. Os diferentes compostos químicos dos diversos grupos dos metabólitos secundários presentes as plantas, dificulta uma análise mais ampla da sua presença em uma amostra. Nesse sentido, aplicação de técnicas analíticas para o estudo de amostras dessa natureza é de grande importância na área de produtos naturais e fitoterápicos [1].

O gênero *Mimosa* é um grupo botânico de grande variabilidade de espécies e, apesar da maioria das espécies pertencentes a esse gênero não serem endêmicas do território brasileiro, apresenta uma grande ocorrência em todo o perímetro do país, sendo reconhecido em todos os estados [2,3].

A *M. tenuiflora* é conhecida popularmente, é uma árvore arbustiva, de ocorrência comum em áreas secas devido a sua grande resistência hídrica. Apresenta folhas pequenas alternadas, que seguem a morfologia do gênero, e caule espinhoso. Os efeitos psicoativos dessa planta são bastante explorados em rituais indígenas e religiosos, além das várias indicações terapêuticas para lesões, odontalgia, inflamações em geral, febre, cólica menstrual, dor de cabeça, hipertensão, bronquite e tosse [4,5].

Estudos envolvendo diversas espécies do gênero *Mimosa* apresentam resultados referentes ao isolamento e identificação de diversos compostos. Moura e colaboradores (2012), isolaram compostos isolados do caule de *Mimosa invisa*, e outros derivados: Pinoresiol, Salicifoliol, Quercetina, Quercetinas C-glicosiladas e 4, 6,7-trimethoxyflavonol [2].

Nos últimos anos, as técnicas clássicas de preparo de amostra para a determinação de compostos orgânicos em matrizes ambientais e alimentos estão sendo substituídas por procedimentos miniaturizadas que são diferenciados pelo baixo custo, alta eficiência, reduzida quantidade de solvente, além da possibilidade de automação. Dentre essas técnicas, a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction - DLLME), desenvolvida por Rezaee (2006), apresenta-se como uma interessante alternativa para o preparo de amostras orgânicas e

está baseada na partição dos analitos de interesse empregando-se pequenos volumes de uma mistura de solventes (dispersor e extrator) [6,7].

Encarada como um avanço nas técnicas de extração já conhecidas, a DLLME baseia-se em um sistema ternário de solventes, compreendendo uma miniaturização da extração líquido-líquido e usando microlitros de solvente extrator. Ao empregar a técnica de DLLME em extratos orgânicos dá-se origem a um elevado número de amostras acrescido de uma grande quantidade de parâmetros e variáveis a serem analisados, o que desperta a busca por ferramentas estatísticas multivariadas para tratamento das informações, de forma a gerar modelos matemáticos por meio do agrupamento dos dados que apresentam alguma similaridade e, consequentemente estabelecer o efeito de cada variável e suas interações sobre todo o conjunto de dados. O método de análise exploratória empregado para esta finalidade foi o de análise de componentes principais (PCA) [8,9].

A técnica de análise de componentes principais consiste numa ferramenta estatística não supervisionada que gera um sistema de coordenadas capaz de fornecer observações importantes sobre as relações entre os dados, principalmente diante de grandes conjuntos de informações, onde existe a necessidade de redimensionar os dados, permitindo melhor interpretação e conservando as informações essenciais para a sua compreensão [10,11].

Quando se trata da identificação e quantificação de compostos orgânicos, a técnica cromatográfica gasosa hifenada com a espectrometria de massas possuem uma grande representatividade, mas, no caso da análise de extratos orgânicos, apresentam muitas limitações. A grande complexidade da amostra e variabilidade das classes de substâncias presentes em um extrato orgânico, impossibilita a sua análise direta por CG-EM. A grande complexidade da amostra e variabilidade das classes de substâncias presentes em um extrato orgânico, impossibilita a sua análise direta por CG-EM. O processo de derivatização por sililacão torna as amostras passíveis de análise por CG-EM, assegurando uma melhor separação entre o tempo de retenção desses constituintes [12].

A derivatização dos produtos obtidos na DLLME, oriundos do extrato orgânico, permite a modificação dos grupos funcionais e aumento da volatilidade das substâncias presentes na matriz. O aumento da volatilidade acarreta numa resposta direta na resposta do detector, visto que se observa maior eficiência na separação dos constituintes [13]. O processo de sililacão assegura melhor separação entre o tempo de retenção desses constituintes, inclusive a separação de substancias não derivatizaveis. Nesse sentido, as derivatizações de extratos orgânicos permitem maior segurança na identificação clara dos compostos por CG-EM.

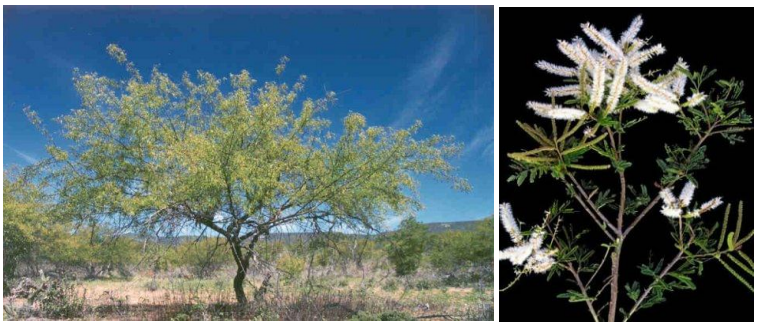
Dessa forma, esse trabalho apresenta a aplicação de PCA para avaliar constituintes químicos fixos de *Mimosa tenuiflora* de ocorrência no município de Jequié, Bahia, obtidos através da aplicação de técnicas de DLLME/CG-EM e derivatização por BSTFA.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Preparação do material vegetal e obtenção do extrato de *M. tenuiflora*

Partes aéreas de espécimes de *M. tenuiflora*, como mostrado na Figura 1 (a) e (b), foram coletadas no município de Jequié - Bahia, localizado na região semiárida do Nordeste brasileiro, em latitude 130 51’ 51” S, longitude 400 04’ 54” W, altitude 215 m; com vegetação de caatinga, mata de cipó e mata tropical. Exsicatas foram produzidas para confirmação da espécie e registro do ponto de coleta, junto ao Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, sob o código HUESB 11141. O material vegetal foi seco até massa constante e pulverizado para posterior obtenção dos extratos orgânicos.

Figura 1. Aspectos morfológicos da *Mimosa tenuiflora*



(a) (b)

Fonte: http://www.cnip.org.br/banco_img/Jurema%20Preta/mimosatenuiflorawilldpoir8.html.

O material de planta em pó (160 g) foi macerado em 300 mL de metanol, realizando três extrações consecutivas, com intervalos de 48 h. O extrato foi separado por filtração simples. Os filtrados foram combinados e concentrados em evaporador rotativo para a obtenção 35,675 g do EMM.

2.2 Otimização dos sistemas e extração dos constituintes via DLLME

Os solventes de extração testados para DLLME convencional foram clorofórmio e diclorometano, e os solventes com menor densidade do que a água foram hexano e acetato de etila. Os solventes dispersores testados foram acetona, acetonitrila, etanol e metanol.

Alíquotas contendo 1 mg do EMM foram transferidas para tubos de polipropileno com capacidade de 3,0 mL, solubilizadas em água destilada sob agitação. A estes foram adicionados 2 mL de uma solução contendo variadas combinações de solventes extratores e dispersores, na proporção 1:1. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm, durante 10 e 20 minutos. Subsequentemente, a fase sedimentada foi recolhida com micro seringa. O volume coletado foi filtrado em sulfato de sódio anidro para remoção dos resíduos de água remanescentes no processo de extração.

2.3 Derivatização – Sililação

As fases sedimentadas obtidas da DLLME foram derivatizadas utilizando-se o agente de sililação *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

(BSTFA) 99%. Todas as reações foram realizadas em microvials esterilizados, com capacidade para 500 µL. Sendo assim, utilizou-se 70 µL de piridina e 100 µL do derivatizante BSTFA, e deixou-se reagir, em banho-maria, à temperatura de 70 °C, durante 30 minutos. As amostras derivatizadas foram analisadas por CG-EM, em condições de operação ajustadas para melhor separação e análise dos constituintes.

2.4 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás com detecção por espectrometria de massa (CG-EM) QP2010 (Shimadzu-Japan). A coluna analítica utilizada foi OV-5 (30 m x 0,25 mm diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme) e carreador de gás hélio, atuando com fluxo de 1,19 mL/min, com a temperatura do injetor e do detector a 220 ºC. A temperatura inicial da coluna foi programada de 40 ºC chegando a 240 a 6 ºC/min.

A identificação dos compostos foi realizada calculando-se o índice de retenção correspondente a cada constituinte, correlacionando com o índice de retenção de um padrão de hidrocarbonetos, analisado sob as mesmas condições. Foram avaliadas as similaridades entre os espectros de massas, de cada componente químico, como aos espectros de massas da biblioteca NIST 14 do equipamento.

2.5 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos na extração dos constituintes via DLLME e CG-EM usando diferentes combinações dos solventes foi realizado através da aplicação da técnica multivariada PCA. Foram utilizados os softwares Excel® (para refinamento estatístico básico) e Statistica® 7.0 (para avaliação por PCA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi empregado um conjunto de sistemas ternários de solventes a fim de verificar qual a combinação mais adequada para a extração e, posteriormente, a identificação dos constituintes majoritários presentes no extrato orgânico metanólico de *M. tenuiflora*. Para a escolha do solvente de extração para DLLME foi levado em consideração a alta afinidade pelos analitos e bom comportamento cromatográfico.

Para a análise das respostas obtidas nos cromatogramas, alguns fatores experimentais foram observados quanto a variabilidade, tais como: solvente extrator, solvente dispersor e tempo de centrifugação, como mostrados na TABELA 1, sendo que as frequências de rotação constante a 4000 rpm para todos os sistemas testados.

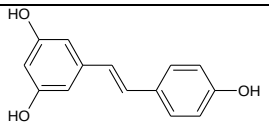
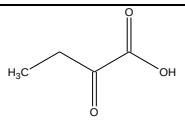
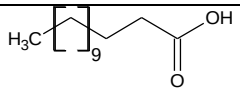
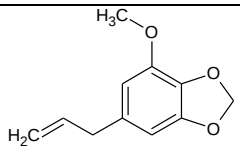
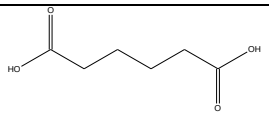
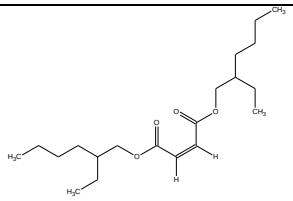
Tabela 1. Combinações entre solventes extrator e dispersor e tempo de centrifugação na aplicação da DLLME no extrato orgânico de *M. tenuiflora*

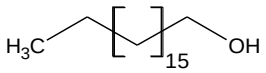
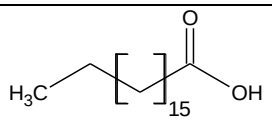
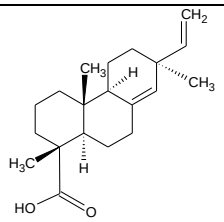
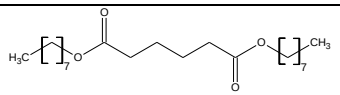
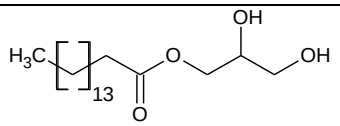
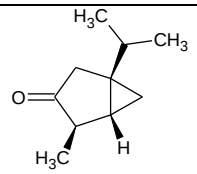
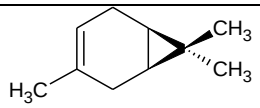
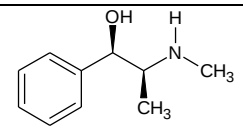
Sistemas de solvente	Solvente extrator	Solvente dispersor	Tempo de centrifugação (min)
1	Hexano	Metanol	10
2	Hexano	Acetonitrila	10
3	Hexano	Acetonitrila	20
4	Acetato de etila	Acetonitrila	10
5	Acetato de etila	Acetona	20
6	Acetato de etila	Metanol	10
7	Diclorometano	Etanol	10
8	Diclorometano	Etanol	20
9	Diclorometano	Metanol	10
10	Diclorometano	Metanol	20
11	Diclorometano	Acetona	10
12	Diclorometano	Acetona	20
13	Diclorometano	Acetonitrila	10
14	Clorofórmio	Acetona	10
15	Clorofórmio	Acetona	20
16	Clorofórmio	Acetonitrila	20
17	Clorofórmio	Etanol	10
18	Clorofórmio	Etanol	20
19	Clorofórmio	Metanol	10

Para a seleção dos sistemas mais adequados levaram-se em consideração a interação dos solventes dentro da mistura ternária desenvolvida e a formação adequada da fase de extração. Algumas combinações dos solventes escolhidos não apresentaram resultados satisfatórios quanto a esses parâmetros, logo não foi possível realizar as análises cromatográficas referentes a essas extrações.

A análise dos cromatogramas de íons totais permitiu a identificação de 283 compostos, nos diversos sistemas de solventes testados. Dentre estes, foram selecionados os 14 constituintes de maior ocorrência, para a avaliação individual e por análise dos componentes principais, a fim de avaliar a eficiência de cada conjunto de solventes na extração de cada classe de compostos. A TABELA 2 apresenta os 14 constituintes majoritários identificados nos sistemas estudados, bem como suas respectivas estruturas químicas e tempos de retenção.

Tabela 2. Constituintes majoritários presentes no extrato metanólico de M. tenuiflora, identificados por CG-EM

Constituintes	Código	TR	Estrutura química
1. Resveratrol	Phy	16,641	
2. Ácido alfa-cetobutírico	Ke	21,556	
3. Ácido tetradecanoico	Ac1	33,023	
4. Miristicina	Phe	45,536	
5. Ácido hexanodioico	Ac2	38,036	
6. Di-2-etilexil maleato	Es	40,469	

7. Octadecanol	A	50,616	
8. Ácido octadecanoico	Ac3	52,593	
9. Ácido pimárico	Te	55,247	
10. Adipato de dioctila	Ac4	45,905	
11. Palmitato de (2*S*)-2,3-dihidroxipropila	Ac5	50,063	
12. Tujona	Mt	36,907	
13. 3-Careno	Car	14,476	
14. Efedrina	Efe	29,319	

Os constituintes majoritários presentes no EMM apresentam grande variabilidade de grupos funcionais e pertencem a diversas classes de metabólitos secundários. Foram observados compostos nitrogenados, ácidos graxos, fenólicos, ácidos carboxílicos, álcoois e terpenos. A ocorrência de compostos nitrogenados é muito comum em espécies de leguminosas. Através da fixação biológica do nitrogênio ocorre a formação de substâncias com baixo peso molecular, como amidas e aminoácidos [14].

Além dos compostos nitrogenados, também merecem destaque os ácidos graxos, terpenos e fitoalexinas identificados entre os constituintes majoritários presentes no EMM. O resveratrol, composto de grande

representatividade nas amostras estudadas, é um composto pertencente a classe das fitoalexinas, de ocorrência comum em planta submetidas a estresse biológico ou acometida por fungos e bactérias. Devido ao eficiente poder de defesa, a essas substâncias são atribuídas atividades inibidoras sobre bactérias, fungos, nematóides e efeito tóxico para animais e para as próprias plantas [15]. O resveratrol participa diretamente da rota metabólica que dá origem aos compostos pertencentes à classe dos flavonoides, já isolados em plantas dessa espécie. Estes possuem atividades biológicas e farmacológicas reconhecidas na literatura tais como neuro-estimulatório, analgésico, antitumoral, antibacteriano, antiviral, antialérgico, antiulcerogênico, entre outros [16].

Outro composto que merece destaque é a miristicina, princípio ativo da noz-moscada, responsável por atividades psicoativas atribuídas a essa espécie, *Myristica fragrans,* bem como espécies pertencentes ao gênero *Piper*, que compreendem importantes fontes de óleos essenciais e substâncias bioativas. Não há relatos na literatura sobre a identificação de miristicina em espécies do gênero *Mimosa.* Em termos químicos, a miristicina é considerada um derivado da mescalina, de forma que apresenta grande similaridade estrutural com esse composto, que, por sua vez, possui a capacidade de aumentar ou distorcer a percepção sensorial, de forma que as ações psicodélicas de seus derivados são previsíveis. O efeito cinérgico da miristicina juntamente com o composto dimetiltriptamina, também identificado nesse estudo, pode estar relacionada às atividades psicoativas da planta em estudo que, por sinal, é amplamente utilizada em rituais religiosos devido a sua capacidade de indução a alucinações, euforia, mudanças na percepção visual, excitação comportamental e alucinações hiperatividade sensorial, severa e hiperexcitabilidade [17,18].

A avaliação dos resultados obtidos para os constituintes apresentados na TABELA 2 a partir da aplicação das 19 combinações da Tabela 1 foi realizada empregando análise por componentes principais. Devido ao grande número de variáveis estudadas (19), que equivale ao número de combinações testadas, e da grande quantidade de respostas obtidas (14), que equivale aos constituintes majoritários presentes no extrato metanólico de *M. tenuiflora*, torna-se interessante a realização desse tratamento

matemático para melhor compreensão e tratamento dos dados. No primeiro momento faz-se necessário estabelecer a correlação entre as respostas obtidas e as variáveis empregadas.

O número de Componentes Principais (PCs) que podem ser obtidas é exatamente igual ao número de variáveis estudadas. Nesse trabalho foram avaliadas dezenove variáveis, que correspondem aos diferentes sistemas de solventes empregados. Apesar do grande número de novos componentes gerados, a maior parte das informações está contida nas primeiras PCs, de forma que as demais não contribuem de forma significativa para a compreensão dos dados. A seleção de um número específico de PCs contribui para a redução da dimensionalidade dos dados, caracterizando uma das vantagens da aplicação de PCA. Essa seleção deve levar em conta critérios como a percentagem de variância explicada, a magnitude do autovalor e a inflexão do gráfico screen-plot [19].

Na TABELA 3 estão disponíveis os valores associados às correlações entre as respostas obtidas (constituintes majoritários) e as cinco primeiras componentes principais. Considerou-se como de contribuição significativa a variável com valor de correlação acima de 0,4. Geralmente valores maiores de correlação são obtidos para sistemas que apresentam outras formas de resposta, como a concentração de constituintes inorgânicos, por exemplo. Entretanto, o sistema em estudo apresenta um pouco mais de complexidade e faz-se necessário o uso de menores valores de correlação.

Tabela 3. Valores para as correlações entre componentes principais e respostas para o sistema de extração.

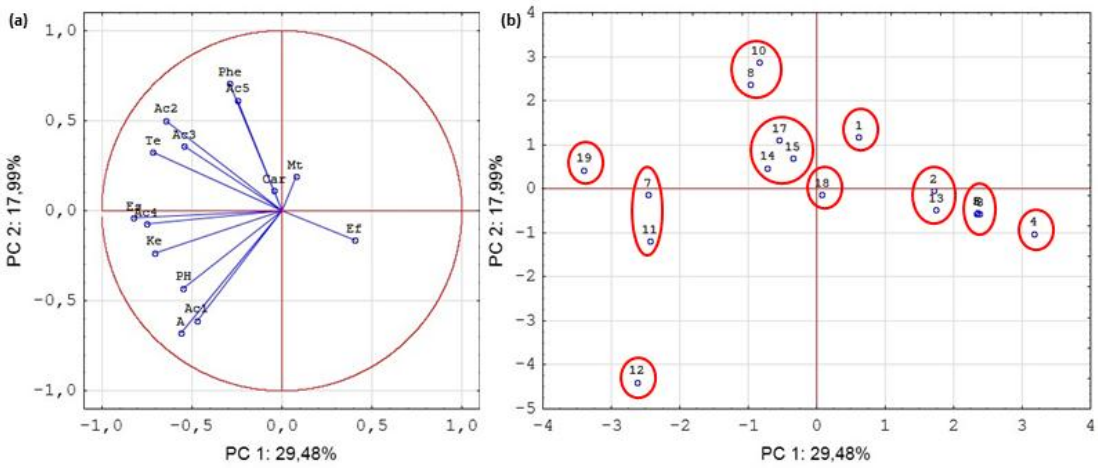
	PC1	**PC2**	**PC3**	**PC4**	**PC5**
PH	**-0,5478**	**-0,4306**	-0,0020	-0,2448	-0,2432
Ke	**-0,7096**	-0,2335	0,0289	-0,2621	0,3314
Ac1	**-0,4717**	**-0,6092**	**0,5015**	0,1525	-0,2365
Phe	-0,2905	**0,7065**	0,2874	-0,0314	**-0,4218**
Ac2	**-0,6453**	**0,5012**	-0,1824	-0,3039	0,2252
Es	**-0,8245**	-0,0408	-0,2966	0,1639	0,2739

A	**-0,5636**	**-0,6804**	0,3731	0,1361	-0,0651
Ac3	**-0,5431**	0,3570	-0,0449	**-0,4073**	-0,1903
Te	**-0,7163**	0,3257	0,2501	**0,4641**	0,0037
Ac4	**-0,7526**	-0,0749	**-0,5805**	-0,0129	-0,1183
Ac5	-0,2441	**0,6146**	**0,5245**	0,3597	0,3359
Mt	0,0777	0,1907	0,3154	**-0,4753**	-0,3695
Car	-0,0441	0,1119	**-0,4932**	**0,6036**	**-0,4999**
Ef	**0,4019**	-0,1652	-0,0320	0,0283	0,2517

Com a análise dos dados da TABELA 3 é possível determinar que dez dos constituintes majoritários identificados apresentam valores significativos na PC1. Vale ressaltar que a primeira componente principal (PC1) representa 29,48% da variância dos dados, frente à segunda componente (PC2), que representa 17,99%, na qual o composto Phe apresenta maior valor na PC. A terceira componente (PC3) é responsável por 11,54% da variância dos dados, de forma que o composto Ac4, estrutura fenólica identificada na amostra, apresenta maior valor significativo na PC. A quarta componente (PC4) apresenta valores significativos em relação ao composto Car, que também é explicado de forma satisfatória pela quinta componente (PC5). Esta, por sua vez, não apresenta percentuais significativos de contribuição de correlação para os demais componentes.

A aplicação de PCA e sua representação gráfica contribuem para a interpretação das respostas obtidas de forma que busca destacar as paridades e diferenças dentro de um conjunto de dados. A FIGURA 2 apresenta gráficos dos *escores* e *loadings* com as PCs mais significativas (PC1 e PC2), que permite a avaliação da contribuição de cada variável na separação dos grupos. A correlação entre as variáveis é descrita pelo cosseno do ângulo entre os vetores loadings, sendo considerável destacar que quanto menor for o ângulo entre estes vetores, maior será a correlação entre as variáveis. Variáveis não correlacionadas apresentam ângulo entre os seus vetores próximos de 180º [20,21].

Figura 2. Gráficos dos *escores* (a) e *loadings* (b) para PC1 versus PC2.



De acordo com a FIGURA 2(b) é possível notar que a análise de componentes principais foi eficiente para agrupar os sistemas de solventes testados por similaridade e eficiência de extração dos compostos identificados. A projeção dos *loadings* sobre as PCs gera o gráfico dos *loadings* que é apresentado na FIGURA 2(a). Uma correlação entre as informações da FIGURA 2(a) e 2(b) permite determinar qual sistema de solvente é mais adequado para a separação e obtenção de determinado grupo de substâncias.

Os agrupamentos gerados na FIGURA 2(b) permitem destacar alguns sistemas de solventes bastante seletivos para um determinado grupo de compostos. Sendo assim, os sistemas de solventes 3, 6 e 9, pontos sobrepostos no gráfico, mostram-se o mais eficiente para a extração da efedrina identificada nas amostras. Vale ressaltar que os três sistemas citados apresentam o metanol como solvente dispersor. Os sistemas 8 e 10, por sua vez, destacam-se pela extração dos compostos Palmitato de (2*S*)-2,3-dihidroxipropila e miristicina. O sistema 19, constituído por clorofórmio e metanol, apresentou uma correlação para extração de alguns ácidos graxos presentes na amostra e para o composto terpeno, ácido pimárico. O sistema de solventes 1 destaca de forma significativa na extração do monoterpeno oxigenado, tujona.

Para a extração do resveratrol, estilbeno identificado no EMM, o sistema de solventes 12, constituído por diclorometano e acetato de etila, apresentou correlação significativa, bem como para a extração de outros dois compostos, o ácido tetradecanoico e o octadecanol.

Os compostos ácido alfa-cetobutírico, di-2-etilexil maleato e ácido hexanodioico apresentaram maior rendimento e seletividade via extração pelos sistemas 7 e 11, que possuem o diclorometano como solvente extrator em comum.

Os agrupamentos 2 e 13; 18; e 4 não apresentaram contribuição significativa para a extração de nenhum composto ou uma classe específica de substâncias. A partir de uma análise univariada das respostas obtidas, expressas no apêndice A, com a utilização desses solventes, é possível identificar os baixos percentuais em área referente a cada um dos compostos extraídos por eles. Nesse sentido, é possível inferir que esses sistemas de solventes não possuem representatividade significativa quando correlaciona-se as componentes PC1 e PC2 para interpretação das respostas.

Os demais sistemas de solvente testados e seus respectivos agrupamentos gerados por meio da análise dos seus componentes principais, mostraram-se eficientes no processo de extração, de forma específica para cada classe de substâncias presentes no EMM. Dessa forma, torna-se viável o emprego da técnica de DLLME, associado às técnicas cromatográficas clássicas de isolamento de constituintes, para direcionar a separação aos compostos de interesse.

É importante ressaltar que o tamanho do vetor *loading* também representa um parâmetro importante em relação à PC considerada. Esse tamanho está diretamente ligado à importância de uma determinada variável na modelagem da PC. Nesse sentido *loadings* muito próximos da origem do sistema cartesiano, como o sistema 18 em destacado no gráfico da FIGURA 2(a), pode não assumir grande representatividade dentro do conjunto de dados [22].

4. CONCLUSÃO

A aplicação da técnica de DLLME permitiu a obtenção de extrações eficientes dos constituintes químicos do extrato orgânico de *Mimosa tenuiflora.* O emprego, subsequente, da derivatização desse produto, possibilitou a análise e identificação da composição química das amostras via CG-EM. Toda metodologia aplicada utilizou pequenas quantidades de solvente e, consequentemente, poucos resíduos foram gerados, tornando o método atrativo e ambientalmente correto.

Os volumes do sistema ternário de solventes (fase aquosa, extrator e dispersor), bem como o tempo de centrifugação, foram ajustados de acordo com as respostas obtidas nos cromatogramas de íons totais, levando em consideração, principalmente, a separação eficiente entre os picos.

A análise dos cromatogramas de íons totais, obtidos das corridas das 19 micro extrações realizadas, permitiu a identificação de 283 constituintes presentes no EMM. Dentre estes, 14 constituintes de maior ocorrência foram selecionados para a avaliação da eficiência dos sistemas ternários de extração.

A análise por componentes principais permitiu determinar o sistema de solvente mais adequado para a extração de compostos específicos. Além disso, possibilitou a aplicação de uma ferramenta estatística de grande relevância em uma área onde PCA é pouco explorada e pode ser muito eficiente para caracterizar diferentes sistemas orgânicos envolvendo matrizes de grande complexidade. As informações obtidas no estudo envolvendo diferentes sistemas de solvente e avaliação por PCA ainda não foram relatadas na literatura.

5. PERSPECTIVAS

Por meio das respostas obtidas com a análise dos componentes principais pretende-se realizar o isolamento dos metabólitos secundários, lançando mão dos respectivos sistemas de solventes que apresentaram eficiência frente a cada grupo dos constituintes majoritários do EMM.

A aplicação de um método analítico para traçar o perfil cromatográfico e composição química de um extrato orgânico possibilita maior conhecimento do seu comportamento químico, isso implica em procedimentos clássicos de isolamento que envolvem menos tempo, custo e menor quantidade de resíduos.

Substâncias de grande importância biológica foram identificadas em pequenas quantidades na amostra em estudo. Com isso, pretende-se desenvolver sistemas de extração que sejam eficientes para a extração e isolamento desses compostos.

Outros parâmetros associados à DLLME poderão ser inclusos no processo de otimização, tais como a velocidade da centrifugação, variação de pH e utilização de líquidos iônicos. Ao adotar a variabilidade desses parâmetros, os constituintes majoritários podem assumir uma nova configuração, gerando uma nova relação de compostos a serem estudados.

6. REFERÊNCIAS

[1] BROCHINI, C.B., LAGO, J.H.G. Aplicação de técnicas cromatográficas e espectrométricas como ferramentas de auxílio na identificação de componentes de óleos voláteis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(2), p. 266-270, 2007.

[2] AGUIAR, R. M.; ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; REZENDE, L. C.; LIMA, L. S.; DAVID, J. P. e QUEIRÓZ, L. P. Antioxidant activities of isolated compounds from stems of *Mimosa invisa* Mart. ex Colla. **Química Nova**, v. 35, p. 567-570, 2012.

[3] DOURADO, D. A.; CONCEIÇÃO, A. S.; SILVA, J. S. O gênero *Mimosa* L. (Leguminosae: Mimosoideae) na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Biota Neotrop.** v. 13, n. 4, p. 225 -240.

[4] ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G. e SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.

[5] FLORES-CRUZ, M.; SANTANA-LIRA, H.D.; KOCH, S.D.; GRETHER, R. Taxonomic Significance of Leaflet Anatomy in *Mimosa* Series *Quadrivalves* (Leguminosae, Mimosoideae). **Systematic Botany**, v. 29, n. 4, p. 892-902, 2004.

[6] REZAEE M, ASSADI Y, MILANI HOSSEINI M-R, AGHAEE E, AHMADI F, BERIJANI S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. Journal of Chromatography A. 2006;1116(1–2):1-9.

[7] MARTINS, M. L. *et al.* Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, Santa Maria, RS, Brasil, v.4, n.1, 2012.

[8] MATOS, G. D. *et al.* Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. Revista Analytica, Campinas, SP, Brasil, n. 6, 2003.

[9] Nascimento, J. A.; Dionísio, A. G. G.; do Nascimento, E. C. L.; Freitas, S. K. B.; Araújo, M. C. U. Análise exploratória das concentrações dos metais Na, Ca, Mg, Sr e Fe em extrato aquoso de petróleo, determinados por ICP OES, após otimização empregando planejamento de experimentos. Quim. Nova 2010, 33, 2.

[10] ANSLYN, E. V.; Ivy, M. A.; STEWART, S. The use of principal component analysis and discriminant analysis in differential sensing routines. Chem. Soc. Rev, Texas, USA, n. 4, 2013.

[11] JOLLIFFE IT, CADIMA J. 2016. Principal component analysis: a review and recent developments.Phil. Trans. R. Soc. A 374: 20150202.

[12] BLAU, K.; HALKET, J. M. Handbook of Derivatives for Chromatography. 2. ed. Chichester: John Wiley e Sons, 1993.

[13] HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. *Derivatization in mass spectrometry – 1. Silylation.* European Journal of Mass Spectrometry, v. 9, p. 1-21, 2003.

[14] GOl, S. R.; FARIA, S. M.; NEVES, C. P. Fixação de nitrogênio, tipo de nódulo e ocorrência de ureídos em Leguminosas florestais. Pesq. agropec. bras., Brasilia, 19 s/n: 185-190,jun. 1984.

[15] BRAGA, M. R. Fitoalexinas e a defesa das plantas. Instituto de Botânica, SMA, São Paulo, SP, 2015.

[16] CRUZ, M. P. OLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE Mimosa hostilis BENTH, 2013. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA INSTITUTO DE QUIMICA

[17] MAIA, J. G.; ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; SILVA, M. H. L. Um tipo químico rico em miristicina de *Piper hispidinervum* C. DC., com ocorrência no Mato Grosso, 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

[18] CAPASSO, F. Botanica, chimica e farmacologia dele piante medicinali. Springer-Verlag Italia 2011.

[19] OTTO, M. Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry, Wiley, 2nd edition, 2007.

[20] VICINI, Lorena. Análise multivariada da teoria à prática. 2005. Monografia (especialização em Estatística e Modelagem Quantitativa) - Departamento de Estatística, Universidade Federal de Santa Maria UFSM, 2005.

[21] GODINHO, M. S.; PEREIRA, R. O.; RIBEIRO, K. O.; SCHIMIDT , F.; OLIVEIRA, A. E. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA). Química Nova, Vol. 31, No. 6, 1485-1489, 2008.

[22] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, vol. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

7. APÊNDICE

Apêndice A

Tabela 1. Relação de todos os constituintes identificados por CG-EM no estudo do EMM com a aplicação das técnicas de DLLME e derivatização

Ácido propan -2- metóxiimino - oico
Dihexil éter
Ácido oxálico
Octadecametil trisiloxano
Tris(trimetilsilil)borate
Ácido tartárico
Ácido pentanóico, éster 2-oxo-trimetilsilílico
2,4 (1H, 3H) - di-hidro-5-hidroxi pirimidinodiona,
Ácido 2-cetoisocapróico
Ácido propen-2-trifluoroacetilamino-oico
N-etil-Acetamida
Silano, trimetilfenoxi
Ditioeritritol, O, O ', S, S'-tetraquis (trimetilsilil) -
N,N-dietilformamida
D-Prolina
Acetamida
3-Etil-3-pentilmetilfosfonofluoridato
N, N-dietilamina
3-Careno
α - Pineno
N,N-dietilacetamida
2-Etil-1-butanol heptafluorobutirato
Ácido fórmico, éster 2-etilbutílico
N, O-diacetil-2-Aminoetanol
(R) -3-pirrolidinol
decametil Tetrassiloxano
Ácido malônico, éster etílico
Hexestrol
Benzenetanamina, 3-metoxi-N - [(pentafluorofenil) metileno] -4 - [(trimetilsilil) oxi] -
N, N-Dietilcarbamato
Ácido propanóico
Tiosemicarbazona de nicotinaldeído
N- (2-Hidroxi-1-fenil-etil) -benzenossulfonamida, N, O-di (trimetilsilil) -
Bis-N, N-hidroxietil formamida
Tris (trimetilsilil) borato
Ácido acético, [(trimetilsilil) oxi] -, trimetilsilil éster

3-etil-3-metilpentano
2,3,3,4-tetrametil-Pentano
éster diisohexílico do ácido oxálico,
éster hexadecil isohexílico do ácido oxálico
éster dodecil isohexílico do Ácido oxálico
éster 4-oxo-trimetilsilílico do ácido pentanóico
Glycine, N-acetyl-, trimethylsilyl ester
éster 2- (metoxiimino) do Ácido butanóico
2,2,8,8-tetrametil-3,7-Dioxa-2,8-disilanonan-5-ona
2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona
L-valina
(. + / -) - Ácido 3-metil-2-oxovalérico, éster trimetilsilílico 79
N-Nitroso-N- [2 - [(trimetilsilil) oxi] etil] etenamina
Ácido 2-cetobutírico eo-tms
Ácido benzeno-propanóico, éster de .- [[(trimetilsilil) oxi] imino] - trimetilsilil
Pentasiloxano, dodecametil-
Silano, (3,3-difenil-1,2-propadienilideno) bis [trimetil-
Tris (trimetilsilil) carbamato
(Metoximetil) trimetilsilano
L-Asparagina, éster de N, N2-bis (terc-butildimetilsilil) - terc-butildimetilsilil
Glycine, éster N- (2-metil-1-oxopropil) -, trimetilsilil
5-hidroximetilfurfural
Silanamina, 1,1,1-trimetil-N-2-propenil-N- (trimetilsilil) -
p-dioxano, 2,3-bis (terc-butiloxi) -
Ácido propanoico, éster 1-metilpropílico
Glicerol, éter tris (trimetilsilil)
Ácido propanóico, 2,3-bis [(trimetilsilil) oxi] - trimetilsilil éster
Fenol, 2,6-dimetoxi-
Ácido 2-hexenodioico, bis (trimetilsilil) éster, (E) -
Glycine, éster N- (2-metil-1-oxopropil) -, trimetilsilil
Derivado da efedrina bis-TBDMS

Deoxiribopiranose, éter tris (trimetilsilil) (isômero 2)
Ácido D-eritrónico, gama-lactona, éter bis (trimetilsilílico)
Ácido arabino-hexónico, 2-desoxi-3,5,6-tris-O- (trimetilsilil) -, gama-lactona
Ácido 1,2-ciclopropanodicarboxílico, 3,3-dimetil-, trans - (. + / -.) -
4- (2,6,6-Trimetilciclohexa-1,3-dienil) but-3-en-2-ona
Ciclo-hexanol, 4- (1,1-dimetiletil) -
Ácido 2-ceto-d-glucónico, pentakis (O-trimetilsilil) -
Glicerol, éter tris (trimetilsilil)
1R, 4s, 7s, 8R, 11R-2,2,4,8-Tetrametiltriciclo [5.3.1.0 (4,11)] undecan-7-ol
[1,1'-bifenil-3-ol], 6-cloro-
Ácido manganônico, 2,3,5,6-tetraquis-O- (trimetilsilil) -, lactona
D - (+) - Talofuranose, pentakis (trimetilsilil) éter (isômero 2)
3,8-Dioxa-2,9-disiladecano, 2,2,9,9-tetrametil-5,6-bis [(trimetilsilil) oxi] -, (R *, S *) -
Benzeno, 1,2,3-trimetoxi-5- (2-propenil) -
4-Metil-2,5-dimetoxibenzaldeído
Ácido 2,3,4-tri-hidroxibutírico tetraquis (trimetilsilil) derivado, (, (R *, R *) -)
Ácido 7-oxo-octanóico, éster 2-trimetilsililetílico
2-Hexanona, 3-metil-4-metileno-
Megastigmatrienona
Óxido de cariofileno
2-Butil-4-fenoxi-1-naftalenol
Ácido octanóico, éster 7-oxo-trimetilsilílico
L - (-) - Sorbose, pentakis (trimetilsilil) éter
Fenol, 3,4,5-trimetoxi-
Thujone
Ácido 7-oxo-octanóico, éster 2-trimetilsililetílico
Ácido undecanóico, 10-oxo, éster metílico
Ácido 4-metilvalérico, éster trimetilsilílico
D-arabinose, tetraquis (trimetilsilil) -
Ácido 3,4,5-tri-hidroxipentanóico, tetraquis (trimetilsilil) -
Ácido sulfuroso, éster ciclohexilmetil hexílico

Oxazole, 2- [1,1-dicloro-2 - [(trimetilsilil) oxi] heptil] -4,5-di- hidro-4,4-dimetil-
Tetradecanoato de metilo
2-propanona, 1-hidroxi-3- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -
Sedoheptulose, o-metiloxima, hexakis-O- (trimetilsilil) -
D-Psicose, éter pentakis (trimetilsilil)
4 - ((1E) -3-Hidroxi-1-propenil) -2-metoxifenol
Ribitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O- (trimetilsilil) -
Dulcitol, éter hexakis (trimetilsilil)
Arabinitol, pentakis-O- (trimetilsilil) -
D - (-) - Tagatose, éter pentakis (trimetilsilil)
Etanona, 1- (6-metoxi-1-naftalenil) -
Ácido benzóico, éster 3-metoxi-4 - [(trimetilsilil) oxi] - trimetilsilil
D - (-) - Eritrose, tris (trimetilsilil) éter, trimetilsililoxima (isômero 1)
Dímero de di-hidroxiacetona, tetra (trimetilsilil) -
Ácido azelaico, éster bis (trimetilsilil)
Ácido trans-9-Octadecenoico, éster trimetilsilílico
2-Fluorobenzilamina, diundecil
Ácido ribônico, 2,3,4,5-tetraquis-O- (trimetilsilil) -, trimetilsilil éster
1,5-Anidro-D-sorbitol, éter de tetraquis (trimetilsilil)
D - (-) - Frutofuranose, pentakis (trimetilsilil) éter (isômero 1)
Ácido tetradecanóico, éster trimetilsilílico
D - (-) - Frutopiranose, pentakis (trimetilsilil) éter (isômero 2)
D-Psicofuranose, pentakis (trimetilsilil) éter (isômero 2)
Sorbopiranose, 1,2,3,4,5-pentakis-O- (trimetilsilil) -, L-
Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster bis (2-metilpropil)
L (-) - Fucose, éter tetrakis (trimetilsilil)
D-xilopiranose, 1,2,3,4-tetraquis-O- (trimetilsilil) -
1,5-Anidro-D-sorbitol, éter de tetraquis (trimetilsilil)
Glucofuranosido, 2,3,5,6-tetraquis-O- (trimetilsilil) -, a-D-
B-D-galactofuranose, 1,2,3,5,6-pentakis-O- (trimetilsilil) -
Homossalato

2- (4- (dimetilamino) estiril) -4-quinolinacarboxilato de etilo
2-Acetil-6-metoxinaftaleno
Glucopiranose, pentakis-O-trimetilsilil-
2-Deoxy-galactopiranose, tetraquis (trimetilsilil)
D-xilopiranose, 1,2,3,4-tetraquis-O- (trimetilsilil) -
Ácido 3,5-bis (1,1-dimetiletil) -4-hidroxi-metílico, ácido benzeno-propanóico
Éter 5-alil-1-metoxi-2,3-di-hidroxibenzeno, di (trimetilsilil)
Ditbdms de 1,3-Benzoxazol-2-amina
Ácido acrílico, 2,3-bis [(trimetilsilil) oxi] -, trimetilsilil éster
Ditbdms de 1,3-Benzoxazol-2-amina
Ácido n-hexadecanóico
Silano, (hexadeciloxi) trimetil-
Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster diundecílico
D-manitol, 1,2,3,4,5,6-hexaquis-O- (trimetilsilil) -
4-t-Butil-2- (1-metil-2-nitroetil) ciclo-hexanona
Ácido sulfuroso, éster de ciclohexilmetil heptilo
D-Psicose, éter pentakis (trimetilsilil)
Ciclodecasiloxano, eicosametil
Heptadecano
1-Metil-3,3'-bi (1H-indole)
4-t-Butil-2- (1-metil-2-nitroetil) ciclo-hexanona
Ácido octadecanóico, éster 2-oxo-metílico
B-galactopiranose, 6-desoxi-1,2,3,4-tetraquis-O- (trimetilsilil) -
Palmitato de isopropilo
D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O- (trimetilsilil) -
Glucopiranose, pentakis-O-trimetilsilil-
D-Mannopiranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O- (trimetilsilil) -
Éter de tris (trimetilsilil) etilenoglicol (4-hidroxi-3-metoxifenil) etilenoglicol
Ácido hexadecanóico, éster trimetilsilílico
Ácido galacturônico, 2,3,4,5-tetraquis-O- (trimetilsilil) -, trimetilsilil éster
Ácido 9,12-Octadecadienóico, éster metílico

Ácido 3-hidroxiantranílico, éster de N, O-bis (trimetilsilil) -, trimetilsilil
Ácido 4-hidroxifenilacético di (t-butildimetilsilil)
d-Glucitol, 4-O-decil-
Ácido 6-octadecenóico, éster metílico, (Z) -
a-D - (-) - Tagatopyranose, pentakis (trimethylsilyl) ether
Arabitol, pentakis (trimetilsilil) -
Levoglucosan, tris (trimetilsilil) -
Estearato de metila
16-Metil-heptadecano-1,2-diol, éter trimetilsilílico
Ácido benzenoacético, a, 3,4-tris [(trimetilsilil) oxi] -, trimetilsilil éster
Ciclo-octasiloxano, hexadecametil-
Ácido heptadecanóico, éster trimetilsilílico
Bis (2-etilhexil) maleato
Silano, trimetil (octadeciloxi) -
Ácido decanodioico, éster dibutílico
Ribitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O- (trimetilsilil) -
Octacosane
Amina, N, N, N-tris ((trimetilsililoxi) etil) -
Ácido oleico, éster trimetilsilílico
Ácido fumárico, éster bis (2-etilhexil)
Manose, 6-desoxi-2,3,4,5-tetraquis-O- (trimetilsilil) -, L-
Fluridona
Acenaftileno, 1,2-bis (trimetilsililoxi) -
Ácido octadecanóico, éster trimetilsilílico
{2,2-Dimetil-5- [2- (2-trimetilsililetoxi-metoxi) propil] [1,3] dioxolan-4-il} metanol
Acetilcitrato de tributilo
Ciclononasiloxano, octadecametil
Nonadecane
Hexatriacontano
5-Metiluridina, tris (trimetilsilil) derivado.
Metil 10-oxo-hexadecanoato

Acenaftileno, 1,2-bis (trimetilsililoxi) -
Ácido Kaur-16-en-18-oico, éster metílico, (4.beta) -
3- (2-Etil-hexoxi) propan-1-amina, N-acetato
Glicosídeo, a-metil-trtrakis-O- (trimetilsilil) -
D-Xilose, tetraquis (trimetilsilil) -
Ácido Isopimaco, TMS
Ácido pimárico TMS
Ácido octadecanóico, éster 10-oxo-metílico
Ácido hexanodioico, éster de dioctilo
Ácido oxálico, éster 2-etilhexil isohexilico
Ácido 9-Octadecenóico (Z) -, éster metílico
Ácido decanodioico, éster bis (terc-butildimetilsilil)
trans, trans-farnesol, éter trimetilsilílico
Ácido D-glucurônico, 2,3,4,5-tetraquis-O- (trimetilsilil) -, trimetilsilil éster
Hexadecanamida, N- (2-trimetilsililoxietil) -
Heptasiloxano, hexadecametil-
Ácido eicosanoico, éster trimetilsilílico
N, N-dimetildodecanamida
Hexacosane
Tetratetracontano
TriTMS citrazínicos
Sacarose, octakis (trimetilsilil) éter
Lexose, tetra- (trimetilsilil) -éter
Manose, 6-desoxi-2,3,4,5-tetraquis-O- (trimetilsilil) -, L-
Di-n-octil ftalato US $ 1,2-Benzenedicarboxylic, dioctyl ester
Gulose, 2,3,4,5,6-pentakis-O- (trimetilsilil) -
Ciclononasiloxano, octadecametil
1,2-di-hidro-2,4-difenil-2- (2-tienil) quinazolina
B-Gentiobiose, octakis (trimetilsilil) éter, metiloxima (isômero 1)
-D-Glucopiranósido, 1,3,4,6-tetraquis-O- (trimetilsilil) - beta-D-frutofuranosil-2,3,4,6-tetraquis-O- (trimetilsilil) -

Ácido hexadecanóico, 2,3-bis [(trimetilsilil) oxi] propil éster
1-monopalmitin trimetilsilil éter
Ácido docosanóico, éster trimetilsilílico
7- (3,4-Metilenodioxi) -tetra-hidrobenzofuranona
Trimetil- (1-pentil-hexiloxi) -silano
D-Turanose, heptaquis (trimetilsilil) -
Ácido 2-trimetilsililoxi-heptanóico, éster trimetilsilílico
Octocrileno
Tetratetracontano
Silano, dimetil-2-propenil [(6,6,9-trimetil-3-propil-6H- dibenzo [b, d] piran-1-il) oxi] -
1H-Pirazolo [3,4-b] quinoxalina, 1-fenil-3- (1,2,3- trimetoxipropil) -, [S- (R *, S *)] -
Sacarose, octakis-O- (trimetilsilil) -
Ciclononasiloxano, octadecametil
D - (+) - trealose, octakis (trimetilsilil) éter
Timol-beta-d-glucopiranosídeo, tetraquis (O-trimetilsilil) -
2-a-Mannobiose, octakis (trimetilsilil) éter (isómero 1)
Tetracosan-1-ol trimetilsilil éter
Ácido talônico, 2,3,5,6-tetraquis-O- (trimetilsilil) -, lactona
Ácido oxálico, monoamida, N, N-dibutilo, éster heptilo
Uréia, tetrabutil
Escopolina, tetra (trimetilsilil) -
Éter trimetilsilílico de 2-monoestearina
D - (+) - Turanose, octakis (trimetilsilil) éter
Ácido esteárico, 2,3-bis (trimetilsiloxi) propil éster
1-Dimetil (trimetilsililmetil) sililoxioctadecano
Ácido octadecanóico, éster 2,3-bis [(trimetilsilil) oxi] propílico
Aucubina, hexaquis (trimetilsilil) éter
3-a-Mannobiose, octakis (trimetilsilil) éter (isómero 2)
Ácido tetracosanoico, éster trimetilsilílico
Ciclononasiloxano, octadecametil
Guaicol-beta-d-glucopiranósido, pentakis (O-trimetilsilil) -

D-Frutose, 3-O- [2,3,4,6-tetraquis-O- (trimetilsilil) - alfa-D-glucopiranosil] -1,4,5,6-tetraquis-O- (trimetilsilil) -
Talose, 2,3,4,5,6-pentakis-O- (trimetilsilil) -
Triacontane, 11,20-didecil-
2-metiloctacosane
D - (+) - Turanose, octakis (trimetilsilil) éter
D - (+) - galactopiranose, pentakis (trimetilsilil) éter (isômero 2)
Maltose, octakis (trimetilsilil) éter, metiloxima (isômero 2)
p-trimetilsililoxifenil- (trimetilsililoxi) trimetilsililacrilato
Silano, (1,1-dimetiletil) hexacosiloxidimetil-
Hexadecano, 1-iodo-
Benzenetanamina, 3-metoxi-N - [(pentafluorofenil) metileno] - beta., 4-bis [(trimetilsilil) oxi] -
Ciclodecasiloxano, eicosametil
Silano, trimetil (octacosilóxi) -
Silano, (1,1-dimetiletil) dimetil (octacosiloxi) -
Melibiose, octakis (trimetilsilil) -

Apêndice B

Tabela 2. Percentuais em área dos componentes majoritários extraídos e identificados por DLLME/CG-EM e os respectivos sistemas de solventes testados

	PH	Ke	Ac1	Phe	Ac2	Es	A	Ac3	Te	Ac4	Ac5	Mt	Car	Efe
1	1,89	3,75	0	1,91	9,75	0	0,33	2,77	1,52	0,57	1,85	0,66	0	0
2	0,53	0	0	0	13,45	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0,21	0	0	0,33	0	0	0,16	0	0	0	0	0	0
5	0,06	0,13	0	0	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0	0,04
6	0	0	0	0	0,17	0	0	0,19	0,09	0	0	0	0	0
7	4.01	5.98	0.78	1.40	16.39	1.64	1.19	6.74	1.95	9.26	0	0	0	0
8	1.16	0.20	1.27	3.00	13.50	0	0	18.50	3.92	2.71	2.03	0	0	0
9	0	15.87	1.16	0	17.56	3.19	0	5.19	0	11.01	3.23	0	0	0
10	0	0.51	0.79	2.06	14.01	0.94	0.51	0	7.51	0	11.23	0	0	0
11	7,05	1,77	1,58	0	11,71	2,19	1,44	4,62	4,29	7,39	0	0	0	0
12	4.12	6.67	9.30	0	1.55	0.88	8.98	2.34	3.56	3.88	0	0	0	0
13	0.23	1.46	0	0	1.81	0.17	0.44	1.09	0.92	0	0.49	0	0	0
14	0	2.67	2.26	2.29	3.23	1.72	1.40	3.23	3.04	2.94	2.93	0	0	0
15	0	0	0	1.20	5.99	1.14	0.51	1.33	4.35	7.48	0	0	3,47	0
16	2.94	1.09	0	0	3.96	0.85	0.46	2.12	0	4.81	11.20	0	0	0
17	0	1.45	1.49	2.13	17.13	0.65	0.70	7.07	1.00	4.99	1.20	0	0	0
18	0	2.36	0	0	12.42	0.94	0.81	2.14	0	6.73	1.30	0	0	0
19	0	11.95	0	0	21.16	2.42	2.41	8.85	4.81	6.14	2.82	0	0	0