

ANÁLISE E DISCRIMINAÇÃO DE QUIMIOTIPOS DE *Lippia graveolens* H.B.K. DA GUATEMALA POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA, CG-EM E ANÁLISE MULTIVARIADA

Juan Francisco Pérez Sabino*, Max Mérida Reyes e Christian Daniel Farfán Barrera

Escuela de Química, Universidad de San Carlos de Guatemala, Edificio T-13, Ciudad Universitaria zona 12, Guatemala, 01012, Guatemala

Antonio Jorge Ribeiro da Silva

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bl. H, 21941-902 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Recebido em 14/2/11; aceito em 13/6/11; publicado na web em 16/8/11

ANALYSIS AND DISCRIMINATION OF THE CHEMOTYPES OF *Lippia graveolens* H.B.K. OF GUATEMALA BY SOLID PHASE MICROEXTRACTION, GC-MS AND MULTIVARIATE ANALYSIS. SPME-GC-MS, PCA and HCA multivariate techniques were used in order to evaluate their applicability to discriminate the three chemotypes (thymol, carvacrol and mixed) described for *L. graveolens* of Guatemala. The leaves of *L. graveolens* are used for treatment of colds, bronchitis, and as seasoning for food preparations, yielding essential oil up to 4.34 %. Leaves of 35 individuals from eight populations, and eight composite samples were analyzed using a DVB/Carboxen/PDMS fiber and GC-MS. PCA and HCA were carried out using eight markers (*p*-cymene, *cis*-sabinene hydrate, linalool, terpinen-4-ol, thymol, carvacrol, (*E*)-caryophyllene and caryophyllene oxide). The three chemotypes of *L. graveolens* were satisfactorily discriminated.

Keywords: chemotype; *Lippia graveolens* HBK; SPME.

INTRODUÇÃO

L. graveolens, conhecida como orégano mexicano é reconhecida por possuir múltiplas propriedades medicinais, sendo amplamente usada na medicina tradicional,¹ no tratamento de doenças gastrointestinais, respiratórias, reumatismo, câncer e tumores.² As folhas aromáticas, secas ou frescas, são usadas na América Central como flavorizante de alimentos e são vendidas secas no mercado.³ Na Guatemala encontra-se a planta em bosques secos e espinhosos subtropicais, em forma de arbustos finos de até 3 m, nos departamentos de El Progreso, Chiquimula, El Petén e Zacapa.³ A planta não é cultivada em grande escala, sendo coletada em populações silvestres e vendida no mercado.² As folhas da planta contêm alto teor de óleo essencial (até 4,34 %),⁴ sendo coletadas em época de floração. Três quimiotipos, timol, carvacrol e misto, têm sido identificados em estudos sobre a variabilidade da composição do óleo de *L. graveolens* de cinco populações de regiões áridas e solo rochoso.⁵ Os óleos de *L. graveolens* da Guatemala têm mostrado atividade antimicrobiana importante contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.⁶ No México, o óleo de *L. berlandieri* v. Shauer, sinônimo de *L. graveolens* de acordo com Pascual *et al.*,¹ apresentou conteúdo fenólico total de 151 mg equivalentes a ácido gálico/mL e baixa atividade antioxidante pelo método do DPPH, embora a composição do óleo não tenha sido estudada.⁴

As técnicas de análise multivariada já mostraram sua utilidade para o estudo de problemas taxonômicos e de variabilidade intraespecífica em espécies com potencial econômico, em conjunto com estudos de distribuição geográfica. Assim, três quimiotipos foram encontrados no estudo da composição química dos óleos essenciais de *Lippia alba* da Colômbia após análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e análise de componentes principais (PCA).⁷ Diferenças em populações dentro da mesma subespécie, entre subespécies e entre as

espécies *Satureja montana* e *S. kataibellii*, da Península Balcânica foram encontradas mediante a avaliação da composição dos óleos essenciais por PCA.⁸ O polimorfismo químico dos óleos essenciais de *Thymus caespitosus* das Ilhas Açores,^{9,10} de *T. pulegioides* da Lituânia,¹¹ de *T. carnosus* da Espanha¹² e de *Lychnophora ericoides* do Cerrado brasileiro, foi demonstrado mediante a aplicação das técnicas de análise multivariada (PCA e HCA) à composição dos óleos.¹³ Alguns autores sugerem que o polimorfismo químico pode se dever à variabilidade genética ou à influência de fatores ambientais e edáficos.^{10,13}

A microextração em fase sólida (MEFS ou *Solid Phase Microextraction*, SPME), técnica de extração não exaustiva, foi desenvolvida por Arthur e Pawliszyn no início dos anos 1990.¹⁴⁻¹⁶ A técnica apresentou utilidade para a classificação de quimiotipos de *Matricaria recutita*,¹⁷ assim como na análise de substâncias voláteis de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill),¹⁸ substâncias voláteis de plantas aromáticas,¹⁹ frações voláteis de alimentos,²⁰ aromas de frutas²¹ e café,²² entre outros produtos naturais.

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (*Hierarchical Cluster Analysis*, HCA) são técnicas estatísticas multivariadas apropriadas para explicar as diferenças entre conjuntos de amostras caracterizadas por um número elevado de variáveis.^{23,24}

No presente trabalho foi estudada a variabilidade intraespecífica de *Lippia graveolens* HBK de oito populações da Guatemala, utilizando MEFS e CG-EM, em combinação com PCA e HCA, para avaliar a aplicação deste método para a escolha de indivíduos de *L. graveolens* destinados ao cultivo e produção de óleos essenciais.

PARTE EXPERIMENTAL

Coleta e preparação do material vegetal

Folhas de 35 espécimes de *L. graveolens* H.B.K. foram coleta-

*e-mail: fpsabino@usac.edu.gt

das em julho de 2007 em oito populações de três departamentos da Guatemala. Exsiccadas das amostras (registros: de 35.388 a 35.396) foram depositadas no Herbário USCG (Universidad de San Carlos de Guatemala). As localidades de coleta estão mostradas na Tabela 1. As amostras foram secadas à temperatura ambiente e uma fração foi separada e transportada ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da UFRJ para análise por MEFS e CG-EM. O material vegetal foi moído e homogeneizado no laboratório. Oito amostras compostas foram preparadas a partir de amostras correspondentes a cada população.

MEFS e análise por CG-EM

O material proveniente de folhas secas e moídas de cada espécime de *L. graveolens* foi analisado individualmente. O mesmo procedimento foi utilizado para as amostras compostas. 60 mg de material foram colocados em um recipiente de 4,0 mL, que foi fechado hermeticamente com tampa especial de teflon. A amostra foi equilibrada a 80 °C por 5 min e submetida à extração por *headspace* por 15 min utilizando uma fibra composta por uma combinação de uma camada de 50 µm de divinilbenzeno-polidimetilsiloxano (DVB-PDMS) sobre uma camada de 30 µm de carboxen-polidimetilsiloxano (Ccrboxen-PDMS) abreviada como DVB/carboxen/PDMS e fornecida pela Supelco. Em seguida, a fibra foi dessorvida por 10 min a 260 °C no injetor do CG-EM.

A análise por CG-EM foi realizada em triplicata para cada amostra, em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, Shimadzu GCMS-QP5000 utilizando-se as seguintes condições: coluna com fase estacionária HP5 (5% fenil-metil-silicone) de 30 m x 0,2 mm e 0,25 µm de espessura de fase. Programa de temperatura de 60 a 240 °C a 3 °C/min e isoterma a 240 °C durante 7 min. Injetor a 260 °C e interface a 200 °C. Injeção no modo *splitless*. Condições do EM: ionização eletrônica a 70 eV, varredura de 40 a 700 Daltons. A identificação dos componentes voláteis foi feita utilizando-se seus espectros de massas e por comparação dos índices de retenção das substâncias com índices de retenção da literatura²⁵ e com os obtidos da análise de padrões de referência (Sigma-Aldrich).²⁶

Análise multivariada da fração volátil de *L. graveolens* extraída por MEFS

Os resultados cromatográficos da MEFS de *L. graveolens* foram submetidos à PCA e HCA, utilizando o programa XLSTAT 2008 (Addinsoft). Os dados submetidos à análise multivariada correspondem aos resultados da média calculada a partir das injeções em triplicata das frações voláteis das amostras extraídas por MEFS. Inicialmente a PCA foi realizada com 61 variáveis, correspondendo às 61 substâncias identificadas na fração volátil (resultados não mostrados). Posteriormente foram descartadas sucessivamente

variáveis que apresentavam muitos valores nulos e outras variáveis que contribuíssem pouco na construção dos componentes principais. Finalmente, 8 variáveis foram selecionadas para realizar a PCA, sendo estas: *p*-cimeno, *cis*-hidrato de sabineno, linalol, terpinen-4-ol, timol, carvacrol, (*E*)-cariofileno e óxido de cariofileno. O arranjo matricial consistiu de 43 linhas (número de amostras analisadas por grupo) e 8 colunas (variáveis ou substâncias selecionadas). Para realizar a PCA se utilizou a matriz de correlações de Pearson, obtendo-se gráficos para os dois primeiros componentes principais, para amostras e variáveis.

A HCA foi realizada utilizando as matrizes de 43 amostras e todas as variáveis (substâncias identificadas) e de 43 amostras e as 8 variáveis definidas na análise de PCA. O coeficiente de dissimilaridade utilizado foi a distância euclidiana; para realizar o agrupamento foi utilizado o método pela associação média (*unweighted pair-group average linkage*). Foi escolhida a opção de truncamento automático para definir os conglomerados e obter o dendrograma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A MEFS em modo *headspace* em combinação com CG-EM foi avaliada com o propósito de se estabelecer sua utilidade como ferramenta para a classificação ou discriminação rápida dos quimiotipos de *L. graveolens*. Após testes com material vegetal dos três quimiotipos de *L. graveolens*, a fibra de DVB/carboxen/PDMS foi escolhida por gerar um perfil cromatográfico similar aos obtidos com o óleo essencial dos três quimiotipos de *L. graveolens*.²⁷ As amostras pertencentes ao quimiotipo misto (El Subinal, Magdalena, km 93,5) apresentaram uma fração volátil mais diversa, com um máximo de 74 substâncias detectadas, não tendo sido identificadas 26 substâncias, correspondendo a um máximo de 13,9% de área relativa (Magdalena). Nas amostras pertencentes ao quimiotipo timol (El Oreganal, San José e Casas de Pinto) foram detectadas um máximo de 35 substâncias, das quais não foram identificadas 6 substâncias, equivalentes a um máximo de 8,0% de área relativa (Casas de Pinto). Entre as amostras pertencentes ao quimiotipo carvacrol (El Carrizal e La Tuna) foram detectadas 38 substâncias, não tendo sido identificadas 6 substâncias, correspondendo a um máximo de 5,8% de área relativa (La Tuna).

A existência dos três quimiotipos de *L. graveolens* tinha sido demonstrada pela análise de óleos essenciais de cultivos do Instituto de Ciência e Tecnologia Agrícola (ICTA) da Guatemala. As amostras de óleo essencial foram obtidas da geração F1 de plantas cultivadas sob as mesmas condições, em um campo localizado em San Jerônimo (15°03'40" N; 90°15'00" O) a uma altitude de 1000 m, no departamento de Baja Verapaz, partindo de sementes coletadas em populações previamente identificadas⁵ e novas populações localizadas nos departamentos de El Progreso, Zacapa e Chiquimula,²⁷ mesmas populações que foram amostradas no presente estudo.

Tabela 1. Localização geográfica das populações de coleta das sementes de *L. graveolens*

No.	Local	Município	Departamento	Latitude	Longitude	Altitude (m)
1	Magdalena	San Agustín Ac.	El Progreso	14°55'08"	89°57'38"	265
2	km 93,5 Rodoviária Interamericana	San Agustín Ac.	El Progreso	14°55'34"	89°56'48"	278
3	El Subinal	El Progreso	El Progreso	14°51'15"	90°08'05"	440
4	San José	Teculután	Zacapa	14°59'12"	89°41'49"	222
5	El Oreganal	Teculután	Zacapa	15°00'38"	89°43'32"	300
6	Casas de Pinto	Río Hondo	Zacapa	15°01'25"	89°36'35"	180
7	El Carrizal	San Jacinto	Chiquimula	14°37'18"	89°28'58"	700
8	La Tuna	Ipala	Chiquimula	14°33'43"	89°34'52"	900

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise por MEFS-CG-EM das frações voláteis de *L. graveolens* das 8 localidades e das amostras compostas de cada localidade. As localidades estão em ordem descendente de oeste a leste na Tabela. As 5 amostras individuais e a amostra composta de El Subinal corresponderam ao quimiotipo misto, com conteúdos muito baixos de timol e sem a presença do carvacrol. Quatro amostras de espécimes de Magdalena correspondem ao quimiotipo misto e uma ao quimiotipo timol. A amostra composta foi preparada sem material da amostra M3, por insuficiência de material. Três amostras do local no km 93,5 da

Rodovia Interamericana corresponderam ao quimiotipo misto e duas ao quimiotipo timol (timol: 73,1-74,9%), com predominância do quimiotipo misto na amostra composta. Nas localidades El Oreganal, San José e Casas de Pinto, todas as amostras de espécimes de *L. graveolens* (13) e as 3 amostras compostas, corresponderam ao quimiotipo timol (timol: 67,4-77,5%). Das amostras do local El Carrizal 3 corresponderam ao quimiotipo carvacrol (carvacrol: 50,3-51,8%) e uma ao quimiotipo timol (timol: 69,6%). A amostra composta de El Carrizal foi preparada só com material dos espécimes correspondentes ao tipo carvacrol. As 3 amostras de espécimes do

Tabela 2. Percentagem de área das substâncias detectadas e identificadas por MEFS e CG-EM de *L. graveolens* e utilizadas como marcadores na análise multivariada

Amostra	<i>p</i> -cimeno	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	linalol	Terpinen-4-ol	timol	carvacrol	(<i>E</i>)-cariofileno	Óxido de cariofileno
IR	1024	1070	1098	1178	1290	1299	1418	1580
S1	4,9	3,9	2,4	10,4	---	---	10,3	3,3
S2	4,1	5,3	1,8	9,7	---	---	12,3	3,7
S3	5,9	0,7	1,7	6,8	0,1	---	12,3	4,4
S4	5,6	2,6	0,8	6,9	0,1	---	4,0	2,7
S5	4,7	3,3	1,4	6,3	0,1	---	6,6	2,9
SM	4,2	3,0	1,9	8,7	0,1	---	9,5	3,9
M1	8,1	1,9	1,7	9,3	0,2	0,4	10,4	4,7
M2	10,3	4,1	6,7	7,2	0,1	0,2	6,1	2,7
M3	1,3	0,1	0,3	0,2	74,9	0,3	0,5	1,0
M4	9,7	2,0	1,6	8,7	0,5	0,2	10,0	3,3
M5	6,6	3,9	8,5	6,8	0,4	0,1	5,6	3,1
MM	8,1	1,9	1,7	9,3	0,2	0,4	10,4	4,7
K1	2,3	0,1	0,4	0,3	73,1	0,3	5,5	0,5
K2	6,1	4,5	5,4	7,1	1,6	0,1	8,6	3,6
K3	1,8	---	0,1	0,2	74,9	0,2	4,8	0,8
K4	7,0	3,2	2,3	9,2	1,3	0,1	6,6	2,4
K5	11,5	3,6	2,1	8,9	0,4	0,2	5,6	2,8
KM	1,2	1,7	1,4	3,5	37,3	0,2	5,7	2,7
O1	2,5	0,1	0,1	0,2	77,5	0,2	4,7	0,4
O2	3,1	0,1	0,1	0,1	72,6	0,3	6,0	0,8
O3	4,4	---	---	0,1	73,5	0,2	3,4	0,5
O4	3,4	---	0,1	---	73,4	0,3	5,6	1,0
OM	3,0	0,1	0,1	0,2	72,1	0,3	5,4	0,4
SJ1	2,1	---	---	0,1	75,8	0,3	5,4	0,7
SJ2	4,3	0,1	0,2	0,2	70,4	0,3	4,7	0,9
SJ3	4,2	---	0,2	0,1	72,8	0,3	5,4	0,7
SJ4	4,3	0,1	0,2	0,2	71,4	0,3	9,0	0,6
SJM	2,4	0,1	0,2	0,2	72,5	0,3	6,0	1,0
CP1	3,0	---	---	0,1	72,1	0,3	4,2	0,7
CP2	1,9	---	---	---	73,5	0,2	6,9	0,6
CP3	4,0	0,1	0,1	0,1	70,7	0,3	5,7	1,0
CP4	2,9	---	0,1	0,2	71,4	0,3	5,3	0,6
CP5	5,9	---	---	0,1	67,4	0,4	4,4	0,9
CPM	3,1	0,1	0,1	0,2	71,0	0,4	5,4	0,8
EC1	4,6	---	0,2	0,3	8,8	49,3	8,7	1,3
EC2	3,4	---	0,1	---	69,6	1,8	6,9	0,8
EC3	4,3	---	0,2	0,2	9,9	51,8	7,2	0,5
EC4	6,4	0,1	0,5	0,3	10,5	50,3	8,3	0,8
ECM	4,3	---	0,2	0,2	9,9	51,8	7,2	0,5
T1	6,8	---	0,2	0,3	8,9	48,7	6,7	---
T2	5,7	---	0,2	0,2	9,9	49,4	5,7	---
T3	5,6	0,1	0,3	0,3	10,3	50,9	6,4	---
TM	8,0	0,1	0,3	0,4	8,9	49,0	1,2	---

IR: Índice de retenção; S: El Subinal; M: Magdalena; K: km 93,5; O: El Oreganal; SJ: San José; CP: Casas de Pinto; EC: El Carrizal; T: La Tuna.

local La Tuna corresponderam ao quimiotipo carvacrol (carvacrol: 48,7-50,9%; timol: 8,9-10,3%), assim como a amostra composta (carvacrol: 49,0%; timol: 8,9%).

Tendência geográfica

As localidades de coleta encontram-se no bosque espinhoso subtropical (me-S), correspondendo às populações de El Subinal, Magdalena, km 93,5, El Oreganal, San José e Casas de Pinto, localizadas em ambos os lados do Rio Motagua que percorre esse bioma. As populações de El Carrizal e La Tuna encontram-se em transições do bosque seco subtropical (bs-S) e bosque úmido subtropical temperado (bh-S (t)). Alguns autores consideram a região compreendida pelo bosque espinhoso subtropical e bosque seco subtropical como pertencentes a um mesmo bioma chamado “chaparral espinhoso”, caracterizado pela aridez e pelo tipo de vegetação. Este “chaparral espinhoso” está dividido em biotopos, um tipo “cactal” correspondente ao bosque espinhoso subtropical, apresentando cactos (gêneros *Nopalía* e *Opuntia*) e outras espécies xerofíticas. O biotopo “zarzal”, correspondente ao bosque seco subtropical, apresenta leguminosas com espinhos dos gêneros *Acacia* e *Mimosa*.²⁸ Os solos do biotopo “cactal”, onde estão localizadas as populações tipos misto e timol, pertencem à classe dos solos de serpentinas e rochas associadas da depressão do Río Motagua. Os solos do biotopo “zarzal”, onde estão localizadas as populações tipo carvacrol, pertencem à classe de solos de cinzas vulcânicas de elevações médias.²⁸

As diferenças de bioma são responsáveis em parte pela diferenciação de quimiotipos das plantas. No caso de *L. graveolens* se observou que o quimiotipo misto predomina na parte ocidental da região de coleta. A parte central da região de coleta parece ser uma área de transição entre os quimiotipos misto e timol (Magdalena, km 93,5). El Oreganal, do lado norte do Rio Motagua, também tem mostrado esses dois quimiotipos,²⁷ com predominância do quimiotipo timol, embora neste trabalho tenham sido encontrados só indivíduos do quimiotipo timol nesse local. Já as populações de San José e Casas de Pinto, localizadas próximo a El Oreganal, do lado sul do Rio Motagua, apresentam o quimiotipo timol. As localidades a leste da região de coleta de *L. graveolens* (El Carrizal e La Tuna) no biotopo “zarzal” apresentaram o quimiotipo carvacrol predominantemente.

Avaliação dos resultados das análises por MEFS-CG-EM de *L. graveolens* utilizando técnicas de análise multivariada

A fibra de DVB/carboxen/PDMS foi escolhida para analisar as amostras de espécimes de *L. graveolens*, por se obter com essa fibra perfis cromatográficos mais similares aos obtidos com os óleos essenciais dos três quimiotipos de *L. graveolens*.²⁷ Os resultados encontrados com a fibra de DVB/carboxen/PDMS foram suficientes para discriminar entre os três quimiotipos.

Para completar a avaliação de MEFS para a discriminação de quimiotipos de *L. graveolens*, os resultados foram submetidos à PCA e HCA. As Figuras 1 e 2 mostram os resultados da análise multivariada dos resultados de MEFS-CG-EM de *L. graveolens* coletada em julho de 2007. A Figura 1 apresenta a plotagem dos escores considerando as amostras e as 8 substâncias marcadoras como únicas variáveis (*p*-cimeno, *cis*-hidrato de sabineno, linalol, terpinen-4-ol, timol, carvacrol, (*E*)-cariofileno e óxido de cariofileno). O primeiro componente explica 58,68% da variância e a segunda componente explica 19,03% dessa variância. As amostras aparecem diferenciadas em três grupos, com exceção da amostra KM que corresponde à amostra composta do local km 93,5.

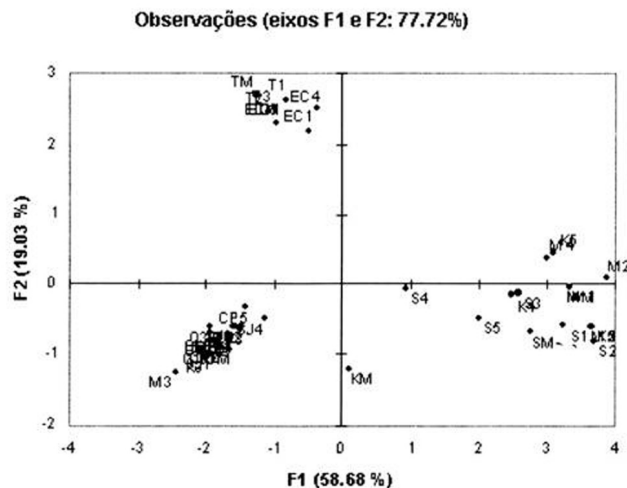


Figura 1. Gráfico dos escores das oito variáveis marcadoras e todas as amostras da ACP de MEFS-CG-EM de *L. graveolens*, coletada em julho de 2007

O isolamento da amostra KM significa que a presença de espécimes de mais de um quimiotipo em uma população pode levar a que uma amostra composta apresente componentes em percentagens que não permitam classificar a amostra como pertencente a um quimiotipo determinado. A PCA foi capaz de diferenciar os quimiotipos diferentes de uma mesma população, com exceção da amostra KM. A Figura 2 apresenta o dendrograma da HCA dos resultados de MEFS-CG-EM. Os três quimiotipos estão claramente diferenciados, o que confirma a utilidade de MEFS para discriminar os quimiotipos de *L. graveolens*. A amostra KM também aparece com diferença marcada do resto de amostras, sendo classificada como tipo timol.

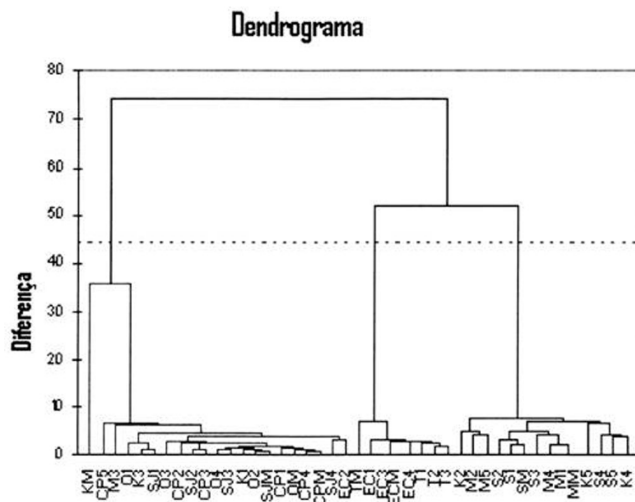


Figura 2. Dendrograma da AHC dos resultados de MEFS-CG-EM de espécimes de *L. graveolens*, coletados em julho de 2007

CONCLUSÕES

No presente estudo foi encontrada uma tendência na distribuição geográfica dos quimiotipos de *L. graveolens*, com predominância do quimiotipo misto no local mais ocidental da região de estudo (El Subinal), uma área de transição entre o quimiotipo misto e timol (localidades do centro da região de estudo), e as populações de San José e Casas de Pinto apresentando espécimes de tipo timol. O quimiotipo carvacrol apresentou predominância nas populações de El Carrizal e La Tuna, no leste da região de estudo. Considera-se necessário rea-

lizar a coleta de um maior número de amostras e de populações para confirmar esta tendência. Na área de transição e em uma população com predominância de quimiotipo carvacrol (La Tuna), foram encontrados espécimes de *L. graveolens* correspondentes a mais de um quimiotipo. Isto nos permite deduzir que *L. graveolens* é uma planta que pode apresentar mais de um quimiotipo por população, o que é contrário às conclusões de estudos anteriores em que era presumido o quimiotipo partindo da concentração média de amostras compostas de vários espécimes.

A técnica MEFS apresentou como vantagem para seu uso na discriminação dos óleos essenciais de *L. graveolens*, menor tempo de extração em relação à hidrodestilação do óleo essencial, além de demandar menor quantidade de amostra (60 mg por MEFS contra 20 g de uma amostra típica para extração do óleo essencial). A MEFS pode, pelas razões acima, ser utilizada como ferramenta na seleção de espécimes de *L. graveolens* correspondentes a quimiotipos de interesse em uma população silvestre, para coleta de sementes e posterior cultivo da planta.

As técnicas de PCA e HCA mostraram ser úteis para diferenciação e agrupamento dos espécimes de *L. graveolens* nos três quimiotipos, em combinação com a MEFS, permitindo, assim, a rápida classificação de material de *L. graveolens* por quimiotipos.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Um mapa de biomas com a localização dos sítios de coleta de *L. graveolens* encontra-se disponível em forma de arquivo PDF, com acesso livre, em

AGRADECIMENTOS

Ao NPPN-UFRJ pelo apoio nas análises por MEFS-CG-EM, ao CNPq pela bolsa de J. F. Pérez Sabino no programa PEC/PG, e à USAC da Guatemala, pelo apoio na coleta e preparação preliminar nas amostras.

REFERÊNCIAS

- Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez Mata, D.; Villar, A.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 201.
- Hernández, T.; Canales, M.; Avila, J. G.; Duran, A.; Caballero, J.; Romo de Vivar, A.; Lira, R.; *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *88*, 181; Cáceres, A.; *Plantas de uso medicinal en Guatemala*, Editorial Universitaria: Guatemala, 1998.
- Standley, P. C.; Williams, L. O.; Gibson, D. N.; *Flora of Guatemala, part IX*, Fieldiana: Chicago, 1970.
- Rocha-Guzmán, N. E.; Gallegos-Infante, J. A.; González-Laredo, R. F.; Ramos-Gómez, M.; Rodríguez-Muñoz, M. E.; Reynoso-Camacho, R.; Rocha-Uribe, A.; Roque-Rosales, M. R.; *Food Chem.* **2007**, *102*, 330.
- Fischer, U.; Franz, Ch.; López, R.; Pöll, E. Em *Proceedings of 27th International Symposium on Essential Oils*; Franz, Ch.; Mathé, A.; Buchbauer, G., eds.; Allured Publ. Corp.: Illinois, 1997.
- Salgueiro, L. R.; Cavaleiro, C.; Gonçalves, M. J.; Proença da Cunha, A.; *Planta Med.* **2003**, *69*, 80.
- Durán, D. C.; Monsalve, L. A.; Martínez, J. R.; Stashenko, E. E.; *Scientia et Technica* **2007**, *33*, 435.
- Slavkoska, V.; Jancic, R.; Bojovic, S.; Milosavljevic, S.; Djokovic, D.; *Phytochemistry* **2001**, *57*, 71.
- Pereira, S. I.; Santos, P. A. G.; Barroso, J. G.; Figueiredo, A. C.; Pedro, L. G.; Salgueiro, L. R.; Deans, S. G.; Scheffer, J. J. C.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 241.
- Santos, P. A. G.; Barroso, J. G.; Figueiredo, A. C.; Pedro, L. G.; Salgueiro, L. R.; Fontinha, S. S.; Deans, S. G.; Scheffer, J. J. C.; *Plant Sci.* **2005**, *169*, 1112.
- Loziene, K.; Vaiciuniene, J.; Venskutonis, P. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 249.
- Salgueiro, L.; Vila, R.; Tommas, X.; Tomi, F.; Cañigual, S.; Casanova, J.; Proença, A.; Adzet, T.; *Phytochemistry* **1995**, *38*, 391.
- Curado, M. A.; Oliveira, C. B. A.; Jesus, J. G.; Santos, S. C.; Seraphin, J. C.; Ferri, P. H.; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2363.
- Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145.
- Slack, G. C.; Snow, N. H.; Kou, D. Em *Sample preparation Techniques in Analytical Chemistry*; Mitra, S., ed.; Wiley Interscience: New Jersey, 2003, cap. 4.
- Ulrich, S.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *902*, 167; Zuba, D.; Parczewski, A.; Reichenbacher, M.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *773*, 75.
- Rubiolo, P.; Belliardo, F.; Cordero, Ch.; Liberto, E.; Sgorbini, B.; Bicchi, C.; *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 217.
- Araújo Filho, H.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2005.
- Bicchi, C.; Cordero, Ch.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Sandra, P.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1071*, 111; Bicchi, C.; Cordero, Ch.; Liberto, E.; Sgorbini, B.; Rubiolo, P.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1152*, 138; Richter, J.; Schellenberg, I.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2207; Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Ngassoum, M. B.; Geissler, M.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *976*, 265.
- Bicchi, C.; Cordero, Ch.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1024*, 217.
- Augusto, F.; Valente, A. L. P.; Tada, E. S.; Rivellino, S. R.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *873*, 117.
- Bicchi, C. P.; Panero, O. M.; Pellegrino, G. M.; Vanni, A. C.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4680.
- Brereton, R. G.; *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, John Wiley & Sons, Ltd.: West Sussex, 2003.
- de Sousa, R. A.; Borges Neto, W.; Poppi, R. J.; Baccan, N.; Cadore, S.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 654.
- Adams, R. P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*, Allured Publ. Corp.: Illinois, 2001.
- Aquino Neto, F. R.; Nunes, D. S. S.; *Cromatografia. Princípios Básicos e Técnicas Afins*, Interciência: Rio de Janeiro, 2003.
- Pérez Sabino, J. F.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2008.
- Villar, L.; *La Flora Silvestre de Guatemala*, Editorial Universitaria: Guatemala, 2008.