



II COLÓQUIO NACIONAL DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS

Vila das Caldas do Gerês
Terras de Bouro
28 e 29 de Setembro de 2007

Actas

Biotransformação por culturas de raízes transgênicas de *Levisticum officinale*: efeito no crescimento e produção de voláteis

Inês S. Nunes*, A. Cristina Figueiredo, Luis G. Pedro, Helena Trindade e José G. Barroso

Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal, *inez.sn@gmail.com

Resumo

Levisticum officinale W. D. J. Koch, vulgarmente conhecido por levístico, é uma planta herbácea, perene, pertencente à família Apiaceae e nativa do Sudoeste da Ásia. O levístico é conhecido pelas suas propriedades medicinais e aromáticas que se devem sobretudo ao seu óleo essencial. As culturas de raízes transgênicas permitem a obtenção de uma produção homogênea e continuada de compostos de origem vegetal e a transformação de substratos exógenos. No presente trabalho estudou-se o efeito da adição de mentol como substrato exógeno, no crescimento e na produção de voláteis pelas culturas de raízes transgênicas de *L. officinale*, analisando-se em particular a sua capacidade de biotransformação. O crescimento foi avaliado por medição do peso fresco e seco e pelo método de desassimilação. Os óleos essenciais foram isolados por destilação-extracção, pelo método Likens-Nickerson, e analisados através de CG e CG-EM. Comparativamente com as culturas controlo, as culturas às quais se adicionou mentol (25mg/l), mostraram um pequeno decréscimo de crescimento quando avaliado pelo método de desassimilação. A adição de mentol não induziu a produção de novos voláteis, sendo o óleo isolado destas raízes transgênicas dominado por z-falcarinol, *n*-octanal e z-ligustilido, tal como o das culturas controlo. Uma semana após a adição de mentol, este composto encontra-se numa concentração relativa de cerca de metade da concentração inicial, mas não foram detectados produtos de biotransformação. A análise dos voláteis extraídos após a adição de β -glicosidase à água de destilação, mostrou que pelo menos parte do mentol é armazenado sobre a forma glicosilada nos vacúolos das células das raízes transgênicas.

Palavras-chave: voláteis, mentol, CG, CG-EM, biotransformação, glicósidos

Abstract

Title: Biotransformation by *Levisticum officinale* hairy roots: effect on growth and on volatiles production

Levisticum officinale W. D. J. Koch, commonly known as lovage, is a herbaceous, perennial, Apiaceae plant native to south western of Asia. Lovage is known for its medicinal and aromatic properties mainly due to its essential oil. The hairy roots cultures allow the attainment of a homogeneous and continuous production of plant metabolites as well as the transformation of exogenous substrates. In the present work the effect of the addition of menthol, as exogenous substrate, in the growth and volatiles production by *L. officinale* hairy roots cultures, was studied. Growth was evaluated by measurement of the fresh and dry weight and by the dissimilation method. The essential

oils were isolated by distillation-extraction using a Likens-Nickerson apparatus, and analyzed by GC and GC-MS. When compared with the control cultures, the menthol added cultures (25mg/l), showed a small growth decrease when evaluated by the dissimilation method. The addition of menthol did not induce the production of new volatiles, the volatiles of these hairy roots being dominated by *z*-falcarinol, *n*-octanal and *z*-ligustilide, like the control cultures. One week after the addition of menthol, this compound was present in a relative amount about half the initial one, but no biotransformation products were detected. The analysis of the extracted volatiles, after the addition of β -glycosidase to the distillation water, showed that, at least, part of the menthol added was stored, in the glycosidic form, in the vacuoles of the hairy roots.

Keywords: volatiles, menthol, GC, GC-MS, biotransformation, glycosides

Introdução

Levisticum officinale W. D. J. Koch (Apiaceae), vulgarmente designado levístico, é uma planta glabra, perene e herbácea, cultivada em vários países europeus (Bylaité et al., 1998). Esta planta possui propriedades aromáticas, sendo utilizada na perfumaria, indústria do tabaco e alimentar (Cu et al., 1990), onde é utilizada na produção de condimentos como, por exemplo, os cubos Maggi (Blank & Schieberle, 1993). Possui também propriedades medicinais, atribuindo-se-lhe actividades estomacais, emenagogas, expectorantes (Lawless, 1995) e, especialmente às suas raízes, acções diuréticas e carminativas (Segebrecht & Schilcher, 1989). Existem várias publicações relativamente ao estudo dos óleos essenciais de *L. officinale*, sendo que alguns atribuem um particular interesse às suas raízes (Gijbels et al., 1982; Toulemonde & Noleau, 1988; Cu et al., 1990; Szebeni-Galambosi et al., 1992; Blank & Schieberle, 1993; Bylaité et al., 2000; Santos et al., 2005).

O desenvolvimento de novas técnicas em biotecnologia de plantas promoveu a utilização de culturas de células e de tecidos diferenciados, como as raízes transgénicas, também designadas *hairy roots*. As raízes transgénicas constituem um sistema experimental único, devido ao seu elevado crescimento e à sua capacidade biossintética (Figueiredo et al., 2006). Sendo geneticamente e bioquimicamente mais estáveis que as culturas de células em suspensão, as *hairy roots* são bastante úteis no estudo da produção *in vitro* de metabolitos secundários (Wysokinska & Chmiel, 1997) e em ensaios de biotransformação. A produção de metabolitos secundários atinge níveis mais elevados que em culturas de células indiferenciadas e por vezes é igual ou superior à produção de óleos essenciais da sua planta de origem. A aplicabilidade industrial destas culturas é estudada relativamente à modificação das suas vias biossintéticas e à possibilidade de biotransformação de substratos orgânicos com o objectivo de produzir elevadas quantidades de compostos de interesse, independentemente das condições ambientais. A glicosilação é uma reacção comum em processos de biotransformação e tem também uma aplicabilidade na indústria farmacêutica e alimentar (Berger & Drawert, 1988). *In vivo* o processo de glicosilação ocorre como um mecanismo de desintoxicação da planta, que armazena os compostos, que lhe são tóxicos, na forma de substâncias glicosiladas a nível do vacúolo.

Este trabalho tem como objectivo avaliar o efeito da adição de mentol como substrato exógeno, no crescimento e na produção de voláteis das culturas de raízes transgénicas de *L. officinale*, analisando em particular a sua capacidade de biotransformação.

Material e métodos

Material

Nos ensaios de biotransformação foram utilizadas raízes transgênicas de *Levisticum officinale*, estabelecidas como descrito em Santos et al. 2005. As culturas de raízes transgênicas foram mantidas em meio SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), em escuridão permanente, a uma temperatura de 24°C e sob agitação numa agitadora orbital Pilot-Shake RC-6-U (Adolf Kühner AG, Suíça) a 80r.p.m.

Caracterização do crescimento das raízes transgênicas

Na caracterização do crescimento de raízes transgênicas, controlo e sujeitas à adição de mentol, foram utilizados Erlenmeyers de 250ml, contendo 100ml de meio SH, e rolhas de silicone de poro reduzido e controlado (T-32 Shin-Etsu Polymer-Silicosen, Freudenberg Simrit, Holanda). Em cada Erlenmeyer colocou-se, assepticamente, 1g de peso fresco de raízes transgênicas (1g p.f.). As raízes foram mantidas sob escuridão permanente, a 24°C e sob agitação numa agitadora orbital Pilot-Shake RC-6-U (Adolf Kühner AG, Suíça) a 80r.p.m. O crescimento foi determinado num período de 6 semanas pelo método de desassimilação (Schripsema et al., 1990) e pela determinação semanal do peso fresco e seco das raízes. Para o método de desassimilação os Erlenmeyers foram pesados diariamente numa balança de elevada precisão (Sartorius L 420S-*RC, gama 0-420g, precisão 1mg). Para a determinação do peso fresco as pesagens foram realizadas semanalmente, após remoção do excesso de água das raízes a pesar, numa balança de elevada precisão Sartorius BP 210S, gama 0-210g, precisão de 0,1mg. As amostras para a determinação do peso seco foram congeladas a -20°C e posteriormente liofilizadas num liofilizador Chris Alpha I-5, a uma pressão de 10⁻¹mbar, a -42°C, durante 3 dias, e pesadas na mesma balança utilizada para a determinação do peso fresco.

Biotransformação

Quinze dias após a inoculação das raízes transgênicas, foi adicionada, a alguns dos Erlenmeyers, uma mistura de mentol-metanol (2% v/v) de modo a obter uma concentração de 25mg/l de mentol no meio de cultura. Para além das amostras retiradas com periodicidade semanal, e de modo a avaliar a influência da adição do mentol no crescimento e composição dos voláteis das raízes transgênicas, foram retiradas, adicionalmente, amostras ao fim de 1h, 4h, 8h, 24h, 32h e 48h, após a adição de substrato. Todas as amostras controlo e biotransformadas foram armazenadas a -20°C até extracção.

Extracção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram isolados das diferentes amostras, por destilação-extracção, durante 3h pelo método Likens-Nickerson (Likens e Nickerson, 1964), utilizando *n*-pentano como solvente.

Determinação dos voláteis glicosilados

A enzima β-glicosidase (26U/mg, 1mg/L) foi aplicada à solução aquosa resultante do processo de destilação-extracção de acordo com o método de Baerheim Svendsen and Merckx (em Figueiredo et al., 1996). Neste ensaio foram avaliadas as soluções aquosas resultantes das destilações realizadas às raízes controlo e com adição de mentol, após 4 semanas de crescimento. A hidrólise foi realizada durante 24h a

37°C. A extracção dos óleos essenciais realizou-se por destilação-extracção como referido acima.

Análise dos óleos essenciais

Cromatografia Gasosa: As análises de Cromatografia Gás-Líquido (CGL) foram efectuadas num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois Detectores de Ionização de Chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injector, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, (30mx0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.) e DB-17HT de sílica fundida (30mx0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10min. Temperatura do injector e dos detectores, 290°C e 280°C, respectivamente. Gás de arrastamento, hidrogénio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s. Relação de repartição de fluxo, 1:50. A composição percentual dos óleos foi determinada, usando o método da normalização, pela integração das áreas dos picos sem utilização de factores de correcção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções por óleo extraído.

Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa: Nas análises de Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massa (CGL/EM) utilizou-se um Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30mx0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão de programa 4.1). A temperatura do forno foi programada de 45 a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10min; temperatura da linha de transferência, 280°C; temperatura da câmara de ionização, 220°C; gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s; relação de repartição de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70eV; corrente de ionização, 60µA; gama de massas, 40-300u; tempo de varrimento, 1s.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massa, com os de padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório.

Resultados

Crescimento das raízes transgénicas

A análise das curvas de crescimento, Figura 1, das raízes transgénicas de *L. officinale* controlo (sem adição de substrato) e aquelas às quais o mentol foi adicionado, quinze dias após inoculação, mostrou uma grande semelhança entre as duas curvas, principalmente nos primeiros vinte dias do ensaio. A partir do trigésimo dia, aproximadamente, as curvas divergiram, havendo uma maior desassimilação por parte das raízes controlo, Figura 1. No entanto, não se observaram alterações morfológicas significativas que permitissem fazer a distinção entre raízes controlo e raízes às quais foi adicionado substrato, Figura 2.

A avaliação do peso fresco e peso seco ao longo do crescimento, Figura 3A e B, não mostrou grandes diferenças no padrão de crescimento das raízes transgénicas às

quais foi adicionado mentol, comparativamente com as controlo, sendo apenas de notar um pequeno acréscimo do peso seco das raízes transgênicas às quais foi adicionado o substrato.

Análise da composição constitutiva dos voláteis

Os voláteis constitutivos, isto é, produzidos em condições controlo, isolados das raízes transgênicas de *L. officinale* são constituídos maioritariamente (numa percentagem relativa $\geq 5\%$) por *n*-octanal, *Z*-ligustilido e *Z*-falcarinol. No total dos óleos isolados num período de 6 semanas identificaram-se 35 componentes e totalizaram-se percentagens de identificação entre os 82 e 92%. Os grupos de compostos dominantes deste óleo são os poliacetilenos, os ftálicos e um grupo designado por “outros”, dado que os seus componentes não podem ser classificados em terpenos, poliacetilenos, ftálicos ou ácidos gordos. A grande percentagem de poliacetilenos deve-se essencialmente à elevada percentagem relativa de *Z*-falcarinol ao longo do ensaio relativamente aos outros compostos.

Análise do efeito da adição do substrato mentol na composição de voláteis

Após a adição de mentol não se observou a formação de nenhum produto de biotransformação volátil. Nas primeiras 48h após a aplicação do substrato, a percentagem relativa de mentol no óleo essencial isolado variou entre os 60 e os 80%, havendo um ligeiro decréscimo do primeiro para o segundo dia. Uma semana depois da adição de substrato, ocorreu uma diminuição mais acentuada, passando para cerca de metade a quantidade percentual do mentol na composição do óleo essencial das raízes, embora o decréscimo mais drástico fosse registado entre a primeira e a segunda semana após a aplicação do substrato.

Determinação dos voláteis glicosilados

A análise dos voláteis isolados, após hidrólise das soluções aquosas resultantes das destilações realizadas às raízes transgênicas com adição de mentol, mostrou uma percentagem relativa elevada de mentol na sua constituição.

Discussão

O fornecimento de 25mg/ml de mentol às raízes transgênicas de *L. officinale*, quinze dias após inoculação, não pareceu afectar significativamente o crescimento destas raízes. De igual modo, não se observaram alterações morfológicas evidentes nas raízes, quer em termos de ramificação e/ou fenolização.

Estas raízes não revelaram capacidade de biotransformarem o mentol, já que a adição deste substrato não resultou na produção de novos compostos voláteis, diferentes dos isolados das raízes controlo. Verificou-se, contudo, que pelo menos parte do substrato administrado foi convertido num derivado glicosidado e armazenado a nível do vacúolo.

Referências

- Berger, R.G., Drawert, F. 1988. Glycosylation of terpenols and aromatic alcohols by cell suspension cultures of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Z. Naturforsch.* 43c, 485-490.
- Blank, I. & Schieberle, P. 1993. Analysis of the seasoning-like flavour substances of a

- commercial lovage extract (*Levisticum officinale* Koch.). Flavour and Fragrance Journal 8, 191-195.
- Bylaité, E., Roozen, J.P., Legger, A., Venskutonis, P.R. & Posthumus, M.A. 2000. Dynamic headspace – gas chromatography – olfactometry analysis of different anatomical parts of lovage (*Levisticum officinale* Koch) at eight growing stages. J. Agric. Food Chem. 48, 6183-6190.
- Bylaité, E., Venskutonis, R.P. & Roozen, J.P. 1998. Influence of harvesting time on the composition of volatile components in different anatomical parts of lovage (*Levisticum officinale* Koch.). J. Agric. Food Chem. 46, 3735-3740.
- Cu, J.Q., Pu, F., Shi, Y., Perineau, F., Delmas, M. & Gaset, A. 1990. The chemical composition of lovage headspace and essential oils produced by solvent extraction with various solvents. J. Essent. Oil Res. 2, 53-59.
- Figueiredo, A.C., Almendra, M.J., Barroso, J.G. & Scheffer, J.J.C. 1996. Biotransformation of monoterpenes and sesquiterpenes by cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. Biotechnology letters 18, 863-868.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.B., Pedro, L.G. & Scheffer, J.J.C. 2006. Potentialities of hairy root cultures for *in vitro* essential oil production. In: Teixeira da Silva (ed.), Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Volume II, Global Science Book. pp.479-486.
- Gibjels, M.J.M., Scheffer, J.J.C., Baerheim Svendsen, A. 1982. Phthalides in the essential oil from roots of *Levisticum officinale*. Planta Med. 44, 207-211.
- Lawless, J. 1995. The illustrated encyclopaedia of essential oils. In: Element, Shaftesbury, Dorset, p. 165.
- Lickens, S.T. & Nickerson, G.B. 1964. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. Am. Soc. Brew. Chem. Proc. pp 1-13.
- Santos, P.A.G., Figueiredo, A.C., Oliveira, M.M., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Deans, S.G. & Scheffer, J.J.C. 2005. Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch (lovage). Plant Science 168, 1089-1096.
- Schenk, U.R. & Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J. Bot. 50, 199-204.
- Schripsema, J., Meijer, A.H., van Iren, F., ten Hoopen, H.P.C. & Verpoorte, R. 1990. Dissimilation curves as a simple method for the characterization of growth of plant cell suspension cultures. Plant Cell Tissue Org. Cult. 22, 55-64.
- Segebrecht, S. & Schilcher, H. 1989. Ligustilide: Guiding component for preparations of *Levisticum officinale* roots. Plant Med. 55, 572-573.
- Szebeni-Galambosi, Z., Galambosi, B. & Holm, Y. 1992. Growth, yield and essential oil of lovage grown in Finland. J. Essent. Oil Res. 4, 375-380.
- Toulemonde, B. & Noleau 1988. Volatile constituents of lovage (*Levisticum officinale* Koch.). Lawrence BM, Mookherjee BD and Willis BJ (eds.), Flavor and fragrances: A world perspective. Proceedings of the 10th International congress of essential oils, fragrances and flavors. Elsevier, Amsterdam, pp. 641-657.
- Wysokinska, H., Chmiel, A., 1997. Transformed root cultures for biotechnology. Acta Biotechnol. 17,131-159.

Quadros e figuras

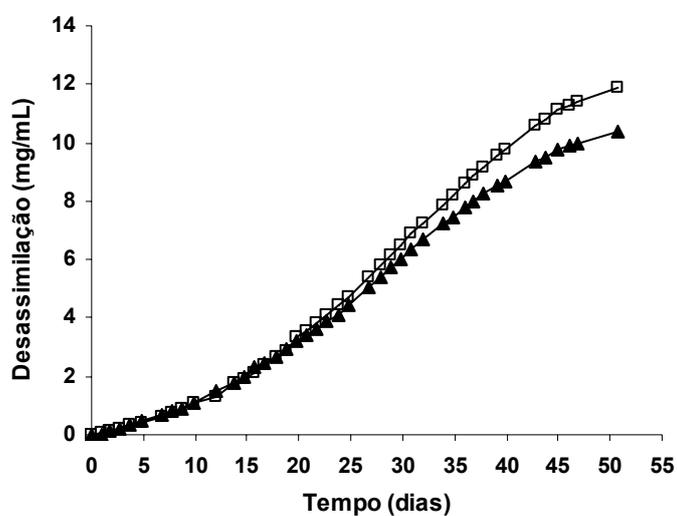


Figura 1. Determinação do crescimento, pelo método de desassimilação, das raízes transgênicas de *L. officinale* controle (□) e das raízes transgênicas sujeitas a tratamento com o substrato mentol (▲)

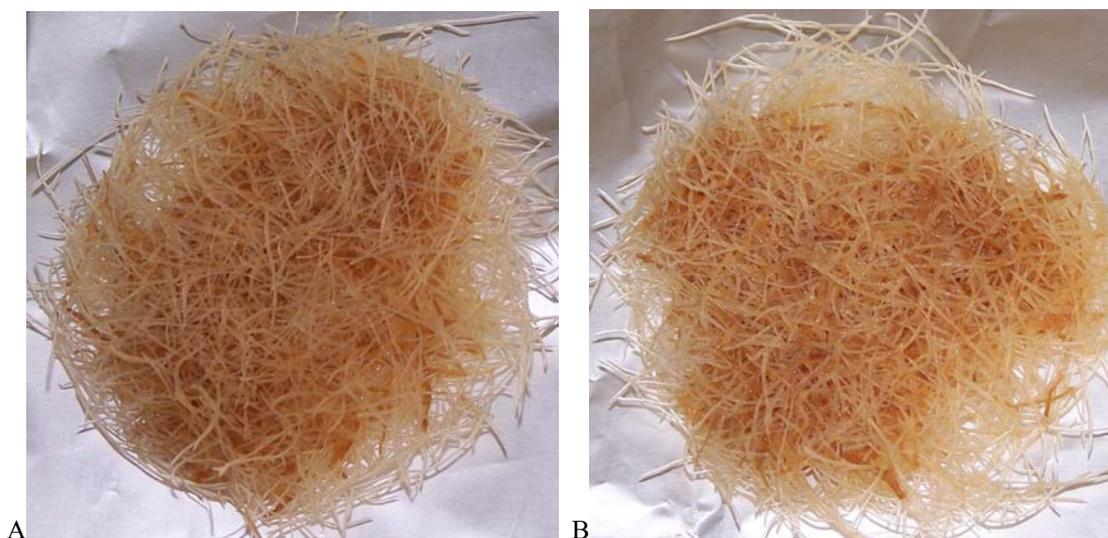
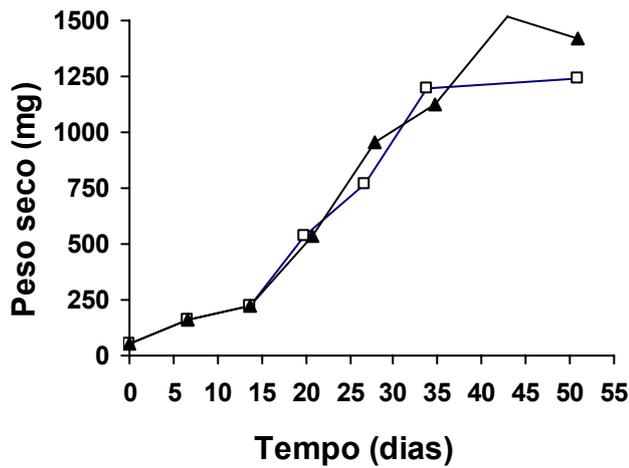
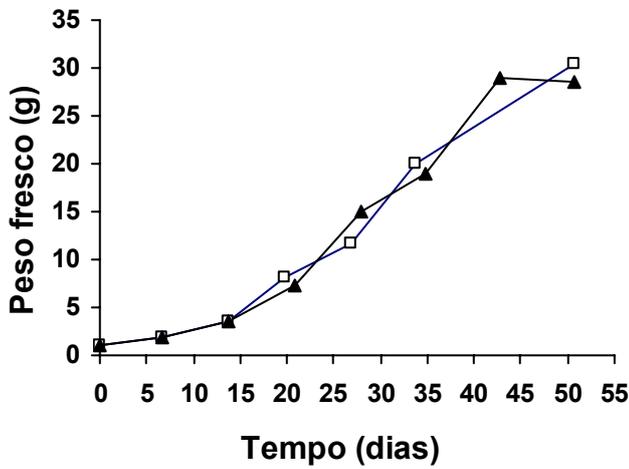


Figura 2. Aspecto macroscópico das raízes transgênicas de *L. officinale* com quatro semanas de crescimento. A - raízes transgênicas controle. B - raízes transgênicas após a adição de mentol



A



B

Figura 3. Avaliação do crescimento das raízes transgênicas de *L. officinale* controle (□) e das raízes transgênicas sujeitas a tratamento com o substrato mentol (▲), por determinação do peso seco (A) e do peso fresco (B)

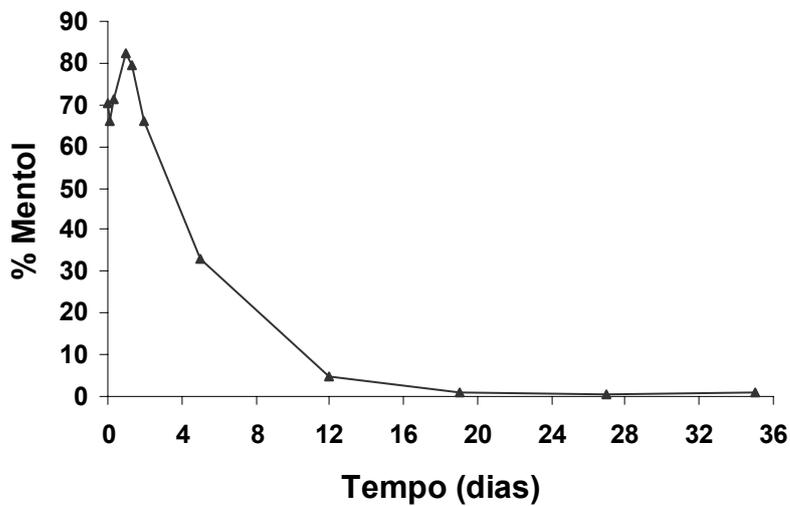


Figura 4. Variação da concentração relativa de mentol, ao longo do tempo, nas raízes transgênicas de *L. officinale* sujeitas à adição substrato, duas semanas após inoculação

Quadro 1. Composição percentual do óleo essencial constitutivo de raízes transgênicas de *L. officinale*

Compostos	IR	Tempo (semanas)					
		1	2	3	4	5	6
Benzaldeído	927	0,1	0,6	0,3	0,3	0,3	0,1
α -Pinoeno	930	0,1	0,4	0,3	0,3	0,3	0,1
<i>n</i> -Heptanol	952	0,1	0,2	0,1	0,3	0,5	0,3
β -Pinoeno	963	0,1	0,5	0,4	0,6	0,5	0,2
2-Octanona	967	0,2	0,7	0,4	0,5	0,1	0,2
2-Pentilfurano	973	v	v	v	v	v	v
<i>n</i> -Octanal	973	5,1	11,8	8,5	10,2	5,8	5,1
Benzeno acetaldeído	1002	0,2	0,2	0,2	0,3	0,8	0,5
<i>p</i> -Cimeno	1003	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1
β -Felandreno	1005	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1
Limoneno	1009	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1
<i>n</i> -Octanol	1045	0,1	0,7	0,3	1,1	0,3	0,3
2-Nonanona	1058	0,4	1,0	0,4	0,1	0,3	0,3
<i>n</i> -Nonanal	1073	0,8	1,0	0,8	1,4	0,6	0,7
<i>trans</i> -Vertocitral c*	1077	0,5	1,3	0,8	0,9	0,7	0,5
2- <i>trans</i> -Nonen-1-al	1114	2,2	2,2	1,4	1,4	0,8	0,3
Pentil Benzeno	1119	3,9	3,0	2,8	3,0	1,9	2,8
Pentil ciclo hexadieno	1125	1,2	2,5	2,8	4,8	3,1	1,9
2- <i>trans</i> ,4- <i>trans</i> Nonadienal	1184	0,1	2,5	1,1	2,0	v	0,7
<i>n</i> -Dodecano	1200	0,5	1,0	0,1	v	v	0,1
2- <i>trans</i> -Decenal	1224	3,2	2,5	1,8	0,5	0,9	0,7
Carvacrol	1286	1,0	3,2	0,5	v	v	0,3
<i>trans</i> -4-Undecenal	1402	2,8	2,2	2,3	0,5	0,9	0,9
γ -Decalactona	1430	1,4	0,4	0,4	0,5	1,0	1,1
γ -Elemeno*	1430	0,1	0,9	0,5	v	v	0,3
<i>cis</i> - β -Farneseno*	1476	v	v	0,2	0,5	2,9	1,4
Germacreno B *	1533	6,9	2,9	3,2	2,0	4,5	4,5
3- <i>n</i> -Butilftálico*	1591	v	0,1	v	v	v	v
3- <i>cis</i> -Butilideno ftálico	1615	7,3	2,1	2,7	2,9	1,1	1,4
3- <i>trans</i> -Butilideno ftálico	1655	1,5	1,9	2,4	3,7	1,7	1,3
Z-Ligustilido	1660	14,6	4,0	9,7	15,1	10,4	2,6
E-Ligustilido	1669	3,4	3,6	1,4	2,1	v	0,8
NI	1835	2,4	1,3	2,4	1,5	2,6	3,2
Ácido hexadecanóico (palmítico)	1908	9,2	6,6	9,4	4,9	5,3	3,7
Z-Falcarinol	2002	16,0	20,1	22,7	20,3	43,8	49,0
Ácido linoléico	2125	4,8	3,1	3,7	6,7	3,3	1,1
% de Identificação		88,4	83,6	82,0	87,8	92,4	83,5
Compostos agrupados							
Hidrocarbonetos monoterpênicos		0,8	1,3	1,1	1,8	1,4	0,6
Monoterpenos oxigenados		2,4	3,6	0,9	0,5	1,0	1,4
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		7,0	3,8	3,9	2,5	7,4	6,2
Poliacetilenos		16,0	20,1	22,7	20,3	43,8	49
Ftálicos		26,8	11,7	16,2	23,8	13,2	6,1
Ácidos gordos		14,0	9,7	13,1	11,6	8,6	4,8
Outros		21,4	33,4	24,1	27,3	17,0	15,4

IR: Índices de retenção relativos a uma série de *n*-alcanos C₉-C₂₂ num coluna DB-1. v: vestigial (<0,1%).
 NI - não identificado *Compostos identificados apenas com base no espectro de massa.