



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA REIS DA SILVA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE NA
ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS
DE *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill POR MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS**

Londrina
2009

RENATA REIS DA SILVA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE NA
ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS
DE *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill POR MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586a Silva, Renata Reis da.

Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Rol/inia mucosa* (Jacq.)
8aill por métodos quimiométricos / Renata Reis da Silva. -
Londrina, 2009. 93 f.: il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.
Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) -
Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas,
Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais,
2009.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica Teses. 2 Fruta de-conde Teses. 3
Quimiometria -Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de
Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais. III. Título.

CDU 543.4

Renata Reis da Silva

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE NA ANÁLISE
DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS DE *Rollinia
mucosa* (Jacq.) Baill POR MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ieda Spacino Scarminio
(Orientadora)

Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (UNICAMP)

Prof^a. Dr^a Juliana Feijó de Souza Daniel (UEL)

Londrina, 16 de fevereiro de 2009

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

A Deus sempre, que acima de tudo orienta minha vida.

A professora Ieda S. Scarminio pela orientação, apoio e confiança na execução deste trabalho.

A minha família principalmente meus pais João e Márcia, Tios João e Lurdes e minha querida e eterna vó Ana (in memória) pela confiança e eterna motivação.

Ao meu grande amor Sandro pela paciência, motivação, e pelo companheirismo que sempre esteve presente durante toda esta jornada.

As minhas grandes e inesquecíveis amigas Eloana, Luciana Cividatti, Claudinha, Elisângela, Fróes, Renata, Sabrina e Raquel por todos os momentos, principalmente pelos mais difíceis porque nunca me faltaram o apoio e o carinho de vocês.

Aos técnicos do Departamento de Química Dalva, Ivanira, Dorizete e Lorival, e o Mauro do almoxarifado, pela ajuda e colaboração na execução deste trabalho.

Ao Didi pelas dúvidas sanadas.

Aos professores do Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais que contribuíram para o meu crescimento profissional.

A Capes pela bolsa concedida.

A todos agradeço imensamente pela contribuição profissional e pessoal.

SILVA, Renata Reis da. **Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólito secundário das folhas de *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill por métodos quimiométricos.** 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Dos Recursos Naturais, Departamento de Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Planejamento estatístico de misturas de cinco componentes e métodos quimiométricos de análise multivariada foram usados para avaliar o efeito dos solventes na extração dos metabólitos secundários das folhas da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill, popularmente conhecida como pinha ou fruta do conde. O poder de extração de cada solvente ou misturas de solventes foi avaliado pela diversidade de compostos extraídos, representado pelo número de picos cromatográficos. Os rendimentos dos extratos brutos e fracionados também foram avaliados. Três fases móveis com diferentes forças cromatográficas foram avaliadas. Os maiores rendimentos em massa para o extrato bruto foi obtido com a mistura ternária etanol-diclorometano-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v). O maior rendimento para a fração neutra também foi obtido com uma mistura ternária de etanol-diclorometano-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v). Para a fase orgânica o maior rendimento foi obtido com a mistura quaternária etanol-acetato de etila-acetona-clorofórmio (1/4; 1/4; 1/4; 1/4; 1/4) (v/v/v/v). A fração básica apresentou maior rendimento com a mistura quinária etanol-acetato de etila-diclorometano-acetona-clorofórmio (1/5; 1/5; 1/5; 1/5; 1/5) (v/v/v/v/v), enquanto que para a fibras o melhor extrator foi o diclorometano puro. Para a análise cromatográfica a fase móvel que apresentou maior número de picos com área superior a 0,5% é composta de acetonitrila-metanol-água (17,5; 17,5; 65) (v/v/v). A fase orgânica que apresentou maior número de picos foi a mistura ternária de diclorometano-acetona-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v) com 39 picos cromatográficos. A fração básica que apresentou maior número de picos (45 picos) foi a mistura etanol-acetona (1/2; 1/2) (v/v). A análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica (AH) aplicadas aos dados de absorção no infravermelho (FTIR) e dados cromatográficos, discriminaram os grupos dos solventes puros e misturas de acordo com os parâmetros de seletividade e a composição extratora.

Palavras – Chave: Química analítica. Fruta-de-conde. Quimiometria.

SILVA, Renata Reis da. **Exploratory analysis of the solvent effect on the analysis of secondary metabolite from the leaves of *Rollin mucosa* (Jacq.) Baill by chemometrics methods**. 2009. 93 f. Thesis (MA) - Course of Chemistry Natural Resources, Department of Centre for Mathematical Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2009

ABSTRACT

Effect of different solvents on the extraction and yield of secondary metabolites of the crude and fractionated extracts of the *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill was investigated by simplex centroid design mixtures of ethanol, ethyl acetate, dichloromethane, acetone and chloroform. The effect of the composition of mobile phase on the chromatographic separation of the extracts of the organic and basic fractions also was investigated. The number of peaks was used to evaluate the extraction efficiency. A mixture of acetonitrile:methanol:water (17,5:17,5:65% v/v/v) was chosen as the mobile phase. The largest crude extract yield was obtained using a ternary mixture of ethanol:dichloromethane:chloroform (1/3:1/3:1/3 v/v/v). The largest neutral fraction yield was obtained using a ternary mixture ethanol:dichloromethane:chloroform (1/3:1/3:1/3 v/v/v). The largest yield of the organic fraction was obtained for the quaternary mixture of ethanol:ethyl acetate:acetone:chloroform (1/4:1/4:1/4:1/4 v/v/v/v), and the five component mixture was more efficient at extracting the basic fractions. The largest yield of the fiber fraction occurs for the pure dichloromethane solvent. Principal component analysis and hierarchical cluster analysis models were applied to chromatograms and middle infrared (FTIR) spectral data of different extracts to discriminate the chemical compositions as mixture composition change.

Key - words: Analytical chemistry. Fruit- of- earl. Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral das funções dos metabólitos primários e secundários.	14
Figura 2 - Fórmula estrutural básica das acetogeninas da Annonaceae.	21
Figura 3 - Espaço experimental para processos com três fatores independentes incluindo todos os pontos dentro do cubo. O espaço experimental para misturas de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo.	24
Figura 4 - Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).	28
Figura 5 - Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes.	29
Figura 6 - Procedimento experimental para a obtenção dos extratos brutos, do fracionamento dos extratos, dos dados espectroscópicos e cromatográficos das folhas da <i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.) Baill.	33
Figura 7 - Foto da exsicata da <i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.) Baill. depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina.	34
Figura 8 - Triângulo de seletividade baseado nos dados solvatocrômicos da Tabela 1.	37
Figura 9 - Procedimento geral para o preparo dos extratos brutos.	39
Figura 10 - Procedimento geral para o fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos.	41
Figura 11 - Procedimento para o preparo das amostras para análise em HPLC.	42
Figura 12 - Gráfico dos rendimentos dos extratos brutos da <i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.) Baill (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio).	47
Figura 13 - Gráfico dos rendimentos da fração neutra da <i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.) Baill (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio).	49

- Figura 14** - Gráfico dos rendimentos obtidos experimentalmente para a fase orgânica da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio). 51
- Figura 15** - Gráfico dos rendimentos obtidos experimentalmente para a fração básica da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio). 53
- Figura 16** - Gráfico dos rendimentos obtidos experimentalmente para as fibras da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio). 55
- Figura 17** - Cromatograma obtido na fase orgânica pela mistura quaternária composta por etanol-acetato de etila-acetona-clorofórmio (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/ min; comprimento de onda: 254 nm. 58
- Figura 18** - Cromatograma obtido na fase orgânica pela mistura binária composta por 54 acetato de etila-diclorometano (1/2: 1/2) (v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrila -metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/ min; comprimento de onda: 254 nm..... 59
- Figura 19** - Gráfico do número de picos cromatográficos para a fase orgânica obtidos pela fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v) (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio). 59
- Figura 20** - Cromatogramas obtidos na fase orgânica para os solventes puros etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrilametanol- água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/ min; comprimento de onda: 254 nm. 60

- Figura 21** - Cromatograma obtido na fase orgânica para a mistura quaternária etanol-acetato de etila-diclorometano-acetona (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/ min; comprimento de onda: 254 nm. 61
- Figura 22** - Gráfico do número de picos cromatográficos para a fração básica obtidos pela fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v) (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio). 62
- Figura 23** - Cromatograma obtido na fração básica para a mistura quinária etanol-acetato de etila-diclorometano-acetona-clorofórmio (1/5: 1/5: 1/5: 1/5: 1/5) (v/v/v/v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrila metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/ min; comprimento de onda: 254 nm. 64
- Figura 24** - Cromatograma obtido na fração básica para o solvente puro clorofórmio; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/ min; comprimento de onda: 254 nm. 64
- Figura 25** - Cromatograma obtido na fração básica na mistura quaternária acetato de etila-diclorometano-acetona-clorofórmio (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/ min; comprimento de onda: 254 nm. 65
- Figura 26** - Cromatogramas obtidos na fração básica para os solventes puros etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrilametanol- água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/ min; comprimento de onda: 254 nm. 65

Figura 27 - Cromatograma obtido na fração básica na mistura binária etanol acetona (1/2: 1/2) (v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1mL/ min; comprimento de onda: 254 nm.	66
Figura 28 - Gráfico dos escores para as componentes CP1 e CP3 dos dados cromatográficos para os 33 extratos da fase orgânica.	67
Figura 29 - Gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 3 para as 33 amostras da fase orgânica.....	68
Figura 30 - Cromatogramas das amostras do grupo I e III discriminados na CP1.....	68
Figura 31 - Cromatogramas das amostras dos grupos I e II separados pela CP3.....	69
Figura 32 - Dendrograma obtido com os dados dos cromatogramas para as amostras da fase orgânica.	69
Figura 33 - Gráfico dos escores para as componentes principais 1x3x4, que juntas explicam 84,11 % da variância total dos dados.	70
Figura 34 - Gráfico dos loadings das componentes 1x3x4 para os extratos da fase orgânica.	72
Figura 35 - Espectros de absorção no infravermelho para as amostras 04 e 11 obtidas na fase orgânica discriminadas pelas componentes 1x3x4.	73
Figura 36 - Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR para as amostras da fase orgânica.....	73
Figura 37 - Gráfico dos escores para as componentes 1x2x3 dos dados cromatográficos para os 31 extratos da fração básica.	74
Figura 38 - Gráfico dos loadings das componentes 1x2x3 para os dados cromatográficos obtidos na fração básica.	76
Figura 39 - Cromatogramas das amostras 13 e 24 discriminados pelos fatores 1x2x3.	76
Figura 40 - Diagrama com base nos dados cromatográficos para a fração básica na fase móvel acetonitrila-metanol-água (17,5: 17,5: 65).....	77
Figura 41 - Gráfico dos escores para as componentes principais 1x2x3, que juntas explicam 89,9 % da variância total dos dados.	77

Figura 42 - Gráfico dos loadings das componentes 1x2x3 para os extratos da fração básica.	78
Figura 43 - Espectros de absorção no infravermelho da fração básica para as amostras 02 e 09 obtidas das folhas da <i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.) Baill.	79
Figura 44 - Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR para as amostras da fração básica.....	80
Figura 45 - Projeção das variáveis no plano dos fatores 1x2. 82.....	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	23
2.1 MODELAGEM DE MISTURA	23
2.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS	27
2.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	29
2.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA	30
3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL	33
3.1 PLANTA	33
3.2 CARACTERÍSTICA DA PLANTA	34
3.3 COLETA	34
3.4 PROCEDIMENTO PARA ESCOLHA DOS SOLVENTES EXTRATORES	35
3.5 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS PARA O FRACIONAMENTO	38
3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	41
3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	42
3.8 REAGENTES 34	43
3.9 EQUIPAMENTOS 35	43
3.10 PROGRAMA COMPUTACIONAL 35	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÃO	84
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89



Capítulo I
Introdução
e
Objetivos

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grupos: os metabólitos primários ou macromoléculas, e os metabólitos secundários ou micromoléculas, Figura 1. Nos metabólito primário estão incluídos os lipídeos, protídeos e glicídeos, produtos que se originam a custa de energia. Os metabólitos secundários por sua vez, podem ter suas origens resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Os metabólitos secundários também podem ser encontrados na forma livre, como agliconas ou quando ligados a unidades de açúcares denominados de heterosídeos¹

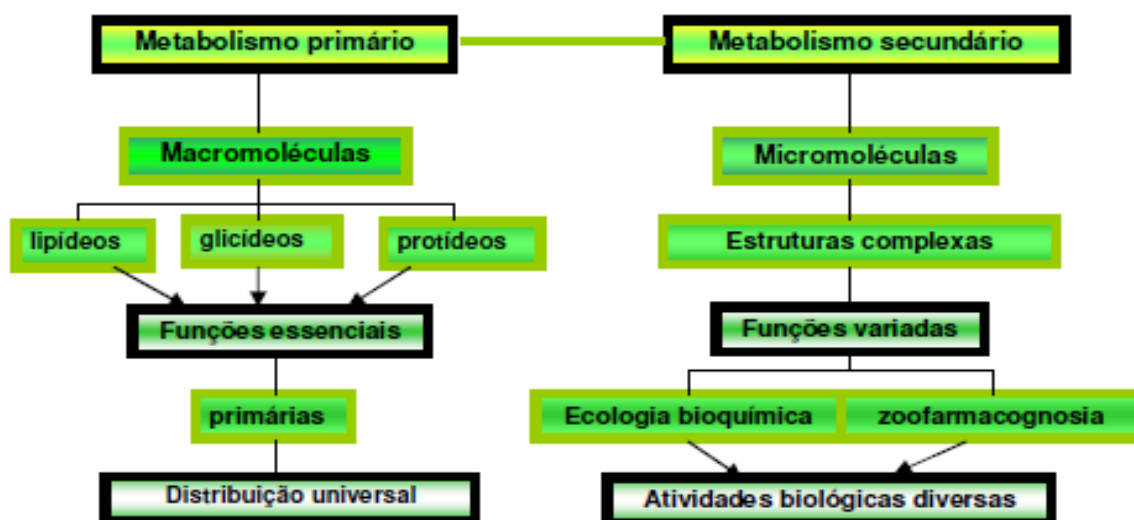


Figura 1 – Esquema geral das funções dos metabólitos primários e secundários.

Os metabólitos secundários são estruturas complexas, com atividades biológicas marcantes, concentrações relativamente baixas e são encontrados em algumas espécies de plantas. Durante muitos anos foram considerados produtos de excreção vegetal, no entanto atualmente sabe-se que são compostos importantes para a defesa das plantas¹, além de produzirem compostos

com ação bioativa de grande importância na farmacologia², também são marcadores moleculares importantes para diferenciar e monitorar a diversidade genética, e também para identificar espécies e associá-las com os produtos farmacológicos. Eles agem na defesa dos vegetais contra herbívoros e microorganismos, proteção contra os raios ultravioleta, como dissuasórios alimentares e como toxinas¹.

Os produtos que são originados a partir do ciclo biossintético dos metabólitos secundários podem ser representados pelos: alcalóides, compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, quinonas, cumarinas) saponinas¹, entre outros.

Os alcalóides fazem parte de um grupo de metabólitos secundários que representa um número elevado de substâncias com estruturas muito diversas e complicadas de serem definidas quimicamente. São compostos capazes de produzir poderosos efeitos fisiológicos. Alguns atuam no sistema nervoso central, com efeito, de calmante, estimulante, e anestésico, enquanto que outros podem ser cancerígenos ou antitumorais³. Na maioria das vezes esses compostos apresentam uma importante ação fisiológica, por exemplo, eles já foram usados como venenos (conina, batracotoxina), estimulantes (morfina e cocaína), ou remédios (efedrina)⁴.

O interesse pelos alcalóides são muitos, podemos destacar o uso no tratamento da leishmaniose, doença endêmica que causa problema em torno de 88 países em 4 continentes. Brasil, Bangladesh, Índia, Peru, Iran, Arábia Saudita, e alguns países da África são os mais atingidos⁵. Devido à alta atividade farmacológica dos alcalóides, atualmente eles tem despertado a atenção nas pesquisas de medicamentos naturais⁶. As fontes mais conhecidas de alcalóides são os vegetais superiores, microorganismos e animais marinhos e em algumas espécies da Solanaceae como a, Atropa, Datura, Duboisia, Mandrágora e Scopo. Os compostos do grupo dos alcalóides podem ser representados pelas fenilalaninas, os alcalóides indólicos, isoquinoleicos, quinoleicos, esteróides, entre outros³.

Os polifenóis são os metabólitos secundários mais comuns produzidos por praticamente todas as células vegetais⁷. Tendo como classes principais os fenóis simples, as benzoquinonas, os ácidos fenólicos, as cumarinas,

os fenilpropenos, os flavonóides, as xantonas, as antraquinonas, as antocianinas, entre outros⁵.

Os ácidos fenólicos, por exemplo, podem ser encontrados nas folhas da *Cynara scolymus* L. Eles estão presentes em vegetais e também em vinhos, chás, cervejas, sidra e no cacau, entre outros. Além de vitaminas e minerais, as frutas e os vegetais contêm uma grande quantidade de compostos antioxidantes, compostos fenólicos e carotenóides⁸. Os compostos fenólicos, carotenóides e/ou outros metabólitos secundários apresentam importantes atividades antioxidantes^{9, 10}. Os ácidos fenólicos fazem parte de uma classe de compostos responsáveis pelos pigmentos vegetais e são de ampla distribuição na natureza sendo um importante grupo dos polifenóis¹¹, e um dos maiores grupos dos metabólitos secundários.

Os flavonóides são encontrados em altas concentrações nas frutas, vegetais e chás¹². Eles possuem diversas funções como, proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com finalidade de polinização, além de apresentar grande importância farmacológica com atividade antitumoral, antiinflamatória e antioxidante^{13, 14}, antiviral, entre outras. São também utilizados como marcadores taxonômicos¹⁵ devido a sua abundância relativa em quase todo o reino vegetal. A atividade antioxidante dos flavonóides é determinada predominantemente pela sua estrutura, em particular pela deslocalização de elétrons ao longo do núcleo aromático. Ao reagir com um radical livre ocorre a estabilização do núcleo aromático pelo efeito de ressonância que impede a continuação do radical livre na reação em cadeia¹⁶. Para determinar a mecanismo antioxidante de um composto ou um grupo de componentes de um determinado extrato vegetal é um trabalho difícil, pois a atividade depende de múltiplos fatores, como o tipo de matriz, concentração, formas isoméricas ou a interação sinérgica com outros componentes¹⁷.

Já os taninos fazem parte de um grupo de compostos fenólicos encontrados principalmente em frutos verdes e em plantas da família Leguminosae¹⁸. A importância milenar dos taninos está intimamente ligada às suas propriedades de transformar a pele animal em couro. Eles são substâncias fenólicas

hidrossolúveis, e por isso formam complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Eles são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos. Por causa da sua estrutura química são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são constituídos por diversas moléculas de ácidos fenólicos, como o gálico e o elágico, que estão unidos a um resíduo de glucose central. Eles possuem este nome porque suas ligações ésteres são passíveis de sofrerem hidrólise por ácidos ou enzimas. Em solução desenvolvem coloração azul com cloreto férrico, assim como o ácido gálico. Os taninos condensados incluem todos os outros taninos. Sob tratamento com ácidos ou enzimas esses compostos tendem a se polimerizar em substâncias vermelhas insolúveis, chamadas de flobafenos. Essas substâncias são responsáveis pela coloração vermelha de diversas cascas de plantas (quina vermelha). Em solução, desenvolvem coloração verde com cloreto férrico, assim como o catecol¹.

As plantas que contem os taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de doenças como, diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais e renais, no sistema urinário e em processos inflamatórios de modo geral, além de, atuarem como antídoto em caso de intoxicação por alcalóides vegetais⁴. Acredita-se que provavelmente a ação dos taninos esteja relacionada à pelo menos três características gerais em maior ou menor grau, complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres, habilidade em complexar macromoléculas como proteínas e polissacarídeos. Podem ser encontrados nas folhas, raízes e flores, como exemplos¹, cascas e folhas da *Hamamelis virginiana* L., rizomas e tubérculos da *Potentilla erecta* (L.) Raeusch, nas cascas e raízes da *Krameria triandra*, folhas e flores da *Crataegus monogyna* Jaquin emend. Lindman e *Crataegus laevigata* (Poiret) DC, nas cascas da *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, e em folhas da *Eugenia uniflora* L., entre outras.

As quinonas são substâncias orgânicas que podem ser resultantes dos produtos da oxidação de fenóis. E da redução de quinonas para originar os correspondentes fenóis. O interesse por plantas que contêm quinonas é milenar. No Egito antigo, Pérsia e Índia já era utilizada a raiz da *Rubia tinctorum* L. (Rubiaceae), para obter a antraquinona, e a lizarina, como fonte de corantes ou devido às atividades biológicas que elas apresentam. As quinonas apresentam normalmente

substâncias cristalinas de cores amarela a vermelha, algumas com colorações azul, verde ou até preta. Já as antraquinonas são geralmente de cor laranja ou vermelha. As antraquinonas¹ podem ser encontradas em folíolos e frutos da *Cássia angustifolia* Vahl, *Cássia senna* L. e *Cássia acutifolia* Delile, em rizomas do *Rheum palmatum* L. e *Rheum officinale* Baill. e híbridos destas espécies, no látex dessecado das folhas da *Aloe ferox* Mill. e seus híbridos com *Aloe africana* Mill e *Aloe spicata* L. f. e *Aloe vera* (L.) Burm f. As antraquinonas também são usadas como laxante.

As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina, e as estruturas mais simples são encontradas com frequência nas angiospermas. O cultivo de plantas com alta produção de cumarinas possui um valor comercial significativo, devido às propriedades terapêuticas como anti-edema e tonificante da circulação venosa¹⁹. As cumarinas podem ser encontradas em praticamente todos os membros de uma planta e em várias espécies, como nos frutos da *Ammi visnaga* (L.) Lam. Nas raízes e rizomas secos da *Angélica archangelica* L, são encontrados além de cumarinas, lactonas macrocíclicas, ácidos fenólicos, flavonóides e esteróides, em folhas da *Melilotus officinalis* Lam Pallas¹⁹, frutos imaturos do *Citrus aurantium* L. e *Citrus medica* L.¹

As saponinas são substâncias que se encontram em misturas complexas devido ao número variado de açúcares. Por isso só foram descobertas a química e as propriedades biológicas nos últimos anos com a evolução das técnicas cromatográficas. Esse grupo é de grande interesse farmacêutico, seja como adjuvantes em formulações, componentes ativos em material vegetal, além de serem substâncias com destaque para o uso tradicional como expectorantes e diuréticas ou como matéria prima para a síntese de esteróides¹. As saponinas são terpenóides da classe dos triterpenóides²⁰ e podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona, ou pelo seu caráter ácido, básico ou neutro. Por fazer parte da família dos terpenóides, estão presentes em sementes, folhas, flores, raízes e troncos de plantas superiores, em bolores, fungos, e líquens¹. Possuem elevada solubilidade em água, ação sobre membranas, com capacidade de causar desorganização em membranas das células sanguíneas ou das células das brânquias em peixes, uma vez que reduzem intensamente a tensão superficial da água³. Algumas saponinas fazem complexação com esteróides, e podem apresentar

ação antifúngica, antiinflamatória²⁰ e hipocolesterolemizante. Apresentam intensa ação espumante e também são bons compostos de emulsificação. Elas causam desequilíbrio no intestino, aumentam as secreções dos brônquios, além de irritação às mucosas. Em algumas espécies podem ser encontradas saponinas com ação diurética e desinfetante das vias urinárias, como exemplo aquelas encontradas no caule da herniária, em folhas da bétula, e em raízes de resta-boi. As saponinas são encontradas nas raízes da *Panax ginseng*³, nas raízes e rizomas do *Glycyrrhiza glabra* L., nas flores da *Calendula officinalis* L., nas raízes da *Centella asiática* (L.) Urb e nas cascas da *Quillaja saponaria* Molina¹.

As plantas e os extratos vegetais são usados há muitos séculos por todo o mundo²¹, mas nos últimos anos tem aumentado consideravelmente o uso de extratos de plantas medicinais em produtos cosméticos²² e na cura de enfermidades, com isso muitos estudos tem sido feitos com objetivo de encontrar substâncias com características eficazes e confiáveis.

Atualmente tem surgido um grande interesse pelos metabólitos secundários por causa do elevado potencial preventivo em doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e cancerígenas. A identificação e a quantificação de compostos fitoquímicos em alimentos e a avaliação dos seus potenciais benéficos à saúde tem estado em foco. Entretanto estudos *in vitro* e em animais mostraram que a ação de muitas substâncias químicas é alcançada em quantidades muito além daquelas obtidas a partir da ingestão da planta²³. No entanto, cada metabólito possui uma propriedade única em termos da extração, por isto tem-se que levar em consideração alguns fatores no processo de extração como o solvente, pH do meio, temperatura, número do grau de extração, entre outros²⁴.

Os compostos antioxidantes, por exemplo, os ácidos fenólicos e os glicosídeos de muitos flavonóides são geralmente extraídos com água, álcool ou misturas. Por exemplo, os flavonóides das folhas de alecrim silvestre (*Rosmarinus officinalis*), das raízes secas da mashua (*T. tuberosum*), do própolis e das folhas do ginkgo foram extraídos em metanol^{17, 24-26}. No farelo de trigo foram extraídos em metanol, etanol e acetona 70%²⁷, enquanto que, em brotos e folhas da groselha preta foram extraídos em metanol 80%, acetona 50% e 70% e água⁹. A extração de

flavonóides das folhas do *Inga edulis* foram extraídas em etanol e água (50:50, v: v)²⁸. Em outro trabalho mostrou que grãos e farelos de trigo foram extraídos em etanol, metanol e acetona²¹. Do bagaço da pêra foram extraídos compostos fenólicos com acetona 70% (v: v)¹⁰, da espécie *Artemisia* (*Asteraceae-Anthemideae*) com acetona²⁹, do suco da maçã e das sementes da uva *Vitis vinifera* sp foram extraídos em acetato de etila^{10, 30}. Em outras aplicações foram usados, etanol 96%³¹, etanol 80%³², n-hexano e etanol-água (70:30)³³, diclorometano^{34,35} e clorofórmio³⁶.

Os alcalóides dos ramos da *Tabernaemontana catharinensis*, foram extraídos utilizando etanol 5% (v/v) como solvente extrator⁴. Da casca da *Cinchona* determinou alcalóides, utilizando como solvente extrator metanol²². Da *Camptotheca acuminata* foram extraídos os alcalóides extratos das sementes e folhas com metanol, diclorometano e acetona³⁷.

Para determinar a quantidade de saponinas nas folhas da *Maesa lanceolata* e para extrair saponinas triterpenóides em *Bacopa monnieri* foi utilizado metanol 50% (v: v) como solvente extrator^{38, 39}. Para preparar os extratos das raízes da *Panax notoginseng* (Burk.) usou-se como solvente o metanol⁴⁰. Para os diferentes tipos de extração das flores da *Melilotus officinalis* (L.) utilizou-se o etanol¹⁹ como solvente extrator.

A cumarina, a 5,6- metilenodioxo -7,8- dimetoxicumarina, além de outras cumarinas e alcalóides foram isoladas do caule da *Metrodorea flavida*, utilizando como solvente extrator hexano e diclorometano⁴¹.

Os taninos podem ser extraídos dos vegetais por diferentes solventes tais como água, acetona, etanol ou por soluções aquosas com alguns sais como sulfato de sódio, carbonato de sódio⁴².

Na literatura são encontrados diversos trabalhos relacionados à família Annonaceae. Elas possuem as acetogenina, Figura 2⁴³, que são substâncias com propriedades bioativas, que apresentam excelente potencial para o tratamento de alguns tipos de câncer. Porém são poucos estudos direcionado a espécie *Rollinia*

mucosa (Jacq.) Baill. Em alguns estudos foram encontradas as acetogeninas em extratos etanólicos das folhas *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill com propriedades de inibição para alguns tipos de câncer⁴⁴. Também em extratos preparados em acetato de etila⁴⁵, metanol⁴⁶ de frutos imaturos da desta espécie foram isolados metabólitos com propriedades bioativas.

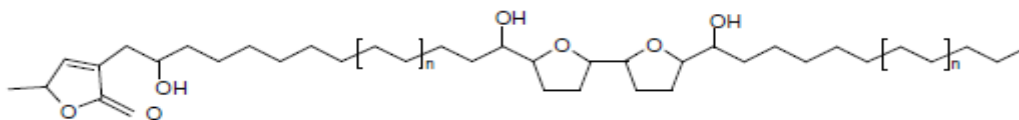


Figura 2 – Fórmula estrutural básica das acetogeninas da Annonaceae.

Desta forma considerando o exposto acima, o trabalho tem como objetivos:

- ✓ Utilizar métodos quimiométricos de análise multivariada associados a dados espectroscópicos, para avaliar o efeito dos solventes na extração de metabólitos secundários das folhas da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill por planejamento estatístico;
- ✓ Aplicar métodos quimiométricos de análise multivariada para extrair informações químicas relevantes dos dados obtidos pela CLAE, FTIR.
- ✓ Investigar o efeito da força cromatográfica em relação ao número de picos nos cromatogramas.



Capítulo II

Métodos

Quimiométricos

2 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

2.1 MODELAGEM DE MISTURAS

Mistura se caracteriza por associar vários ingredientes e formar um produto. O produto resultante de uma mistura tem características que dependem da natureza de seus reagentes e das proporções relativas dos mesmos, e não da quantidade total da mistura. A soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%. Para uma mistura qualquer de q componente, pode-se escrever:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1, \quad (1)$$

no qual x_i representa a proporção do i -ésimo componente. Esta equação retira um grau de liberdade das proporções. Para especificar a composição da mistura, é preciso fixar as proporções de $q - 1$ componentes. A proporção do último componente é o que falta para completar 100%⁴⁷.

Com a restrição da Equação 1 os valores de x_i (proporção do i -ésimo ingrediente), no espaço torna-se uma região simplex. Em que um simplex é uma configuração espacial determinada por um número de pontos um a mais do que o número de dimensões do espaço. Cada um dos q pontos que determinam o simplex representam uma mistura no qual um dos q componentes assume a proporção 1.

Para sistemas com três fatores independentes, podem-se realizar experimentos correspondentes a qualquer ponto dentro do cubo da Figura 3. Caso o sistema seja uma mistura de três componentes, porém, terá de obedecer à restrição $x_1 + x_2 + x_3 = 1$, que define um triângulo equilátero inscrito no cubo, também mostrado na Figura 3.

Todas as composições possíveis da mistura ternária são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo. Os vértices correspondem aos componentes puros e as arestas às misturas binárias, enquanto os pontos situados no interior do triângulo representam as misturas de três componentes.

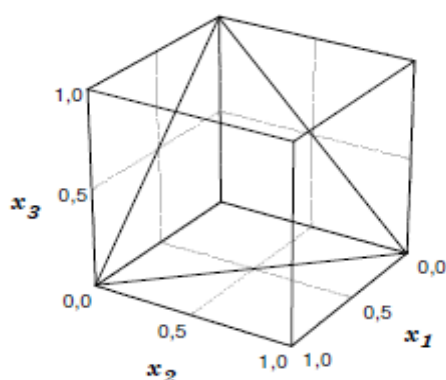


Figura 3 - Espaço experimental para processos com três fatores independentes incluindo todos os pontos dentro do cubo. O espaço experimental para misturas de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo.

Além da restrição natural mostrada na Equação 1, também pode ter restrições dos limites superiores e inferiores dos teores dos componentes na mistura, por motivos tecnológicos ou econômicos, entre outros. Obviamente a soma de todos esses limites tem de ser menor que um, senão será impossível de preparar a mistura. Tais restrições para um caso geral de q componentes são escritas conforme a Equação 2. Estes pontos são chamados os vértices do simplex ⁴⁷.

$$0 \leq \alpha_i \leq c_i \quad \text{e} \quad \sum_{i=1}^q \alpha_i < 1, \quad i = 1, 2, \dots, q. \quad (2)$$

no qual α_i são os limites inferiores não nulos.

O modelo mais simples para uma mistura é o modelo linear ou aditivo, que tenta explicar o comportamento de uma propriedade apenas com os resultados obtidos com a utilização de cada componente individualmente, isto é, prever o comportamento de qualquer mistura sem realizar nenhuma mistura. Para uma mistura de quatro componentes o modelo é:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \varepsilon_i, \quad (3)$$

no qual y_i é um valor experimental da resposta de interesse, $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3$ e β_4 são os parâmetros do modelo e ε_i representa o erro aleatório associado à determinação do valor de y_i . Ajustando o modelo às observações feitas com essa finalidade, obtém-se a expressão:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_4 x_4, \quad (4)$$

que permite estimar a resposta média num ponto qualquer de composição $(x_1 + x_2 + x_3 + x_4)$. O símbolo (^) é para diferenciar um valor populacional de uma estimativa.

Substituindo o termo b_0 por $b_0(x_1 + x_2 + x_3 + x_4)$ e agrupando os termos em x_i , obtém se:

$$\hat{y} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_4^* x_4, \quad (5)$$

Sendo $b_i^* = b_0 + b_i$, para $i = 1, 2, 3$ e 4 .

Caso o modelo linear não se mostre satisfatório, deve-se tentar ajustar um modelo quadrático. Para misturas de quatro componentes, a expressão geral do modelo quadrático contém 15 termos:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_4 x_4 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{33} x_3^2 + b_{44} x_4^2 + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{14} x_1 x_4 + b_{23} x_2 x_3 + b_{24} x_2 x_4 + b_{34} x_3 x_4 \quad (6)$$

Substituindo as relações

$$1 \times b_0 = (x_1 + x_2 + x_3 + x_4) \times b_0 \quad \text{e} \quad b_{11} x_1^2 = b_{11} x_1 (1 - x_2 - x_3 - x_4)$$

além de expressões análogas para $b_{22}x_2^2$, $b_{33}x_3^2$ e $b_{44}x_4^2$ tem-se:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_0(x_1 + x_2 + x_3 + x_4) + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{11}x_1(1 - x_2 - x_3 - x_4) + \\ & b_{22}x_2(1 - x_1 - x_3 - x_4) + b_{33}x_3(1 - x_1 - x_2 - x_4) + b_{44}x_4(1 - x_1 - x_2 - x_3) + \\ & b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 \end{aligned} \quad (7)$$

Agrupando os termos, obtém-se finalmente:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 + b_4^*x_4 + b_{12}^*x_1x_2 + b_{13}^*x_1x_3 + b_{14}^*x_1x_4, \\ & + b_{23}^*x_2x_3 + b_{24}^*x_2x_4 + b_{34}^*x_3x_4 \end{aligned} \quad (8)$$

no qual $b_i^* = b_0 + b_i + b_{ii}$ e $b_{ij}^* = b_{ij} - b_{ii} - b_{jj}$, com $i \neq j$.

Quando o modelo quadrático se mostrar insuficiente, é necessário acrescentar-lhe termos cúbicos. O modelo cúbico completo para uma mistura de quatro componentes é dado pela Equação 9:

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i^*x_i + \sum_{i < j}^q \sum_j^q b_{ij}^*x_ix_j + \sum_{i < j}^q \sum_{j < k}^q \sum_k^q b_{ijk}^*x_ix_jx_k + \dots + b_{12\dots q}^*x_1x_2\dots x_q. \quad (9)$$

Usando a identidade $1 = x_1 + x_2 + x_3 + x_4$ e fazendo as substituições apropriadas, pode-se chegar à expressão:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 + b_4^*x_4 + b_{12}^*x_1x_2 + b_{13}^*x_1x_3 + b_{14}^*x_1x_4 + b_{23}^*x_2x_3 + \\ & b_{24}^*x_2x_4 + b_{34}^*x_3x_4 + d_{12}x_1x_2(x_1 - x_2) + d_{13}x_1x_3(x_1 - x_3) + d_{14}x_1x_4(x_1 - x_4) + \\ & d_{23}x_2x_3(x_2 - x_3) + d_{24}x_2x_4(x_2 - x_4) + d_{34}x_3x_4(x_3 - x_4) + b_{123}^*x_1x_2x_3 + \\ & b_{124}^*x_1x_2x_4 + b_{134}^*x_1x_3x_4 + b_{234}^*x_2x_3x_4 + b_{1234}^*x_1x_2x_3x_4 \end{aligned} \quad (10)$$

Como esta equação tem 21 termos, ter-se-ia de fazer no mínimo 21 ensaios diferentes para determinar os valores de todos os seus coeficientes. Muitas vezes, basta introduzir um único termo cúbico para que o modelo passe a descrever satisfatoriamente toda a região experimental. Eliminando os termos em d_{ij} d na Equação 10, chega-se à expressão do modelo cúbico especial, Equação 11:

$$\hat{y} = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 + b_4^*x_4 + b_{12}^*x_1x_2 + b_{13}^*x_1x_3 + b_{14}^*x_1x_4 + b_{23}^*x_2x_3 + b_{24}^*x_2x_4 + b_{34}^*x_3x_4 + b_{123}^*x_1x_2x_3 + b_{124}^*x_1x_2x_4 + b_{134}^*x_1x_3x_4 + b_{234}^*x_2x_3x_4 + b_{1234}^*x_1x_2x_3x_4 \quad (11)$$

O planejamento experimental normalmente empregado para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico especial é o chamado centróide simplex, que se obtém acrescentando ao simplex em rede um ponto central correspondendo à mistura quaternária em partes

$$(x_1, x_2, x_3, x_4) = \left(\frac{1}{4}, \frac{1}{4}, \frac{1}{4}, \frac{1}{4} \right).$$

iguais,

2.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS

A seqüência básica da análise multivariados aos dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 4. Para iniciar a análise dos dados é feita uma inspeção visual para verificar problemas de variação da linha de base, sobreposição de picos e ruídos. Os dados são convertidos na forma de uma matriz (tabela de dados), no qual será representada por X. As n linhas da matriz representam as amostras (ou objetos), no qual cada valor corresponde a uma propriedade medida para uma amostra específica, enquanto que as p colunas são variáveis que correspondem a uma propriedade medida para cada amostra. Em seguida é realizada uma pré-seleção das variáveis, caso seja necessário para definir a região do espectro ou cromatograma que contém a informação para fazer o cálculo.

O pré-processamento é uma etapa importante da análise, pois os dados de uma forma geral contêm fontes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos ou unidades diferentes. Ele é definido como qualquer manipulação matemática nos dados com o objetivo de remover ou reduzir estas fontes irrelevantes de variação. Pode ser dividido em dois tipos básicos, dependendo se são operados nos valores relacionados às amostras ou às variáveis, e a sua escolha vai depender do conjunto de dados e do objetivo⁴⁸.

Neste trabalho optou-se por usar a normalização por comprimento do vetor, que é um pré-processamento no espaço das amostras.

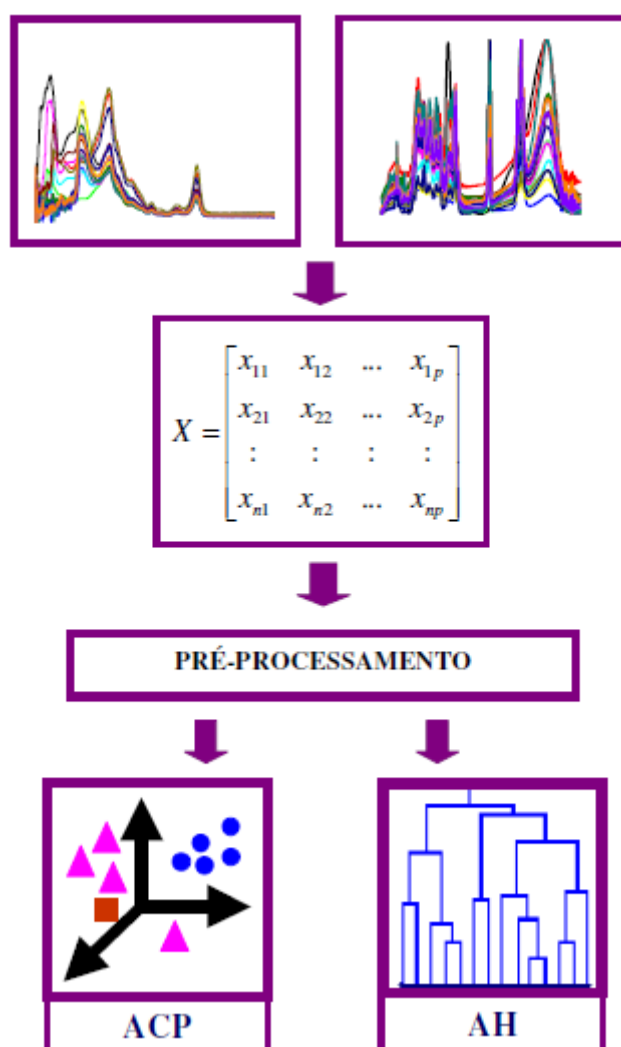


Figura 4 – Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).

Esta normalização é feita dividindo cada valor original pela soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha, Equação 12. A finalidade é remover a variação sistemática, normalmente associada com a quantidade total da amostra⁴⁸.

$$x' = x_{ij} / \sqrt{\sum_{j=1}^p x_{ij}^2} . \quad (12)$$

2.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

A ACP é um método que tem por finalidade básica, a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais⁴⁸. Na ACP, a decomposição é calculada através da diagonalização da matriz X^tX e XX^t . A matriz X ($n \times p$), formada por n objetos e p variáveis é decomposta no produto de duas matrizes menores:

$$X = T \times P^t + \epsilon, \quad (13)$$

no qual T é a matriz dos escores das componentes principais, P é a matriz “loadings” (pesos) das componentes principais, ϵ é a matriz dos resíduos. O sobrescrito t indica a transposta da matriz e q é um escalar que indica o número de componentes principais que descreve a maior parte da variância dos dados. Este procedimento está representado esquematicamente na Figura 5.

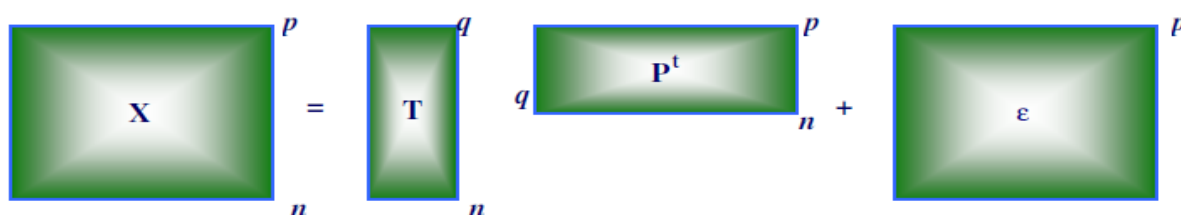


Figura 5 – Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes.

Após os cálculos, os resultados são utilizados para interpretar a distribuição das amostras num gráfico bidimensional das componentes principais e posteriormente identificar e julgar a importância das variáveis originais escolhidas, pois as variáveis originais com maiores valores de loadings na combinação linear das componentes principais são as mais importantes no ponto de vista estatístico.

A matriz T ou P (dependendo se o espaço é das variáveis ou das amostras) pode sofrer uma rotação rígida chamada varimax.⁴⁹ A rotação varimax maximiza a variância dos pesos das componentes principais (agora nominadas de fatores), sujeitos a restrição que eles retenham a ortogonalidade.

2.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA (AH)

A análise de agrupamentos é um nome dado a uma grande variedade de técnicas que permitem a separação dos objetos ou variáveis em grupos diferentes. O método mais utilizado é a análise hierárquica de agrupamentos (AH)⁵⁰.

A AH descreve a estrutura dos dados interligando as amostras por suas associações, revelando os agrupamentos naturais existentes no conjunto de dados, com base na informação das variáveis medidas. Graficamente, a hierarquia pode ser representada na forma de um gráfico bidimensional chamado de dendrograma, no qual as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si.

Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos no espaço p-dimensional. A maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos (amostras) que estão mais próximos, usando a distância Euclidiana definida na Equação 14, e substituí-los por um novo ponto, localizado na metade da distância entre eles.

$$d_{ik} = \left[\sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2}. \quad (14)$$

Nesta equação, d_{ik} é a distância Euclidiana entre os pontos i e k . O procedimento descrito é repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, levando à construção do dendrograma, no qual no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical à distância. Considera-se que quanto menor a distância entre os pontos, maior a similaridade entre as amostras representadas por eles. A similaridade é convenientemente definida pela Equação 15,

$$S_{ik} = \left[1 - \frac{d_{ik}}{(d_{ik})_{\text{máx}}} \right], \quad (15)$$

no qual S_{ik} é a similaridade entre as amostras i e k e $(d_{ik})_{\text{máx}}$ é a distância máxima entre dois pontos de um conjunto de dados no espaço p -dimensional. Para amostras idênticas, $S_{ik} = 1$, enquanto que $S_{ik} = 0$, corresponde a dois pontos separados pela maior distância constatada no conjunto estudado.

Os valores de similaridade são colocados na forma de uma matriz. Os pontos mais similares são agrupados e o resultado é representado na forma de um dendrograma. Os valores correspondentes a estes pontos são substituídos na matriz na forma de grupos, os quais correspondem aos pares de pontos mais similares. Calcula-se uma nova matriz de similaridade, cuja dimensão é menor que a original. Este processo continua até que todos os pontos estejam contidos em um agrupamento, no qual se podem visualizar as similaridades entre as amostras ou variáveis. A análise de agrupamentos complementa a análise de componentes principais, sendo uma outra forma de visualizar as semelhanças e diferenças na composição das amostras.



Capítulo III

Descrição
Experimental

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental para obter os extratos brutos, as frações deste extrato, e a obtenção dos dados espectroscópicos e cromatográficos das folhas da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill, encontram-se resumidos na Figura 6.

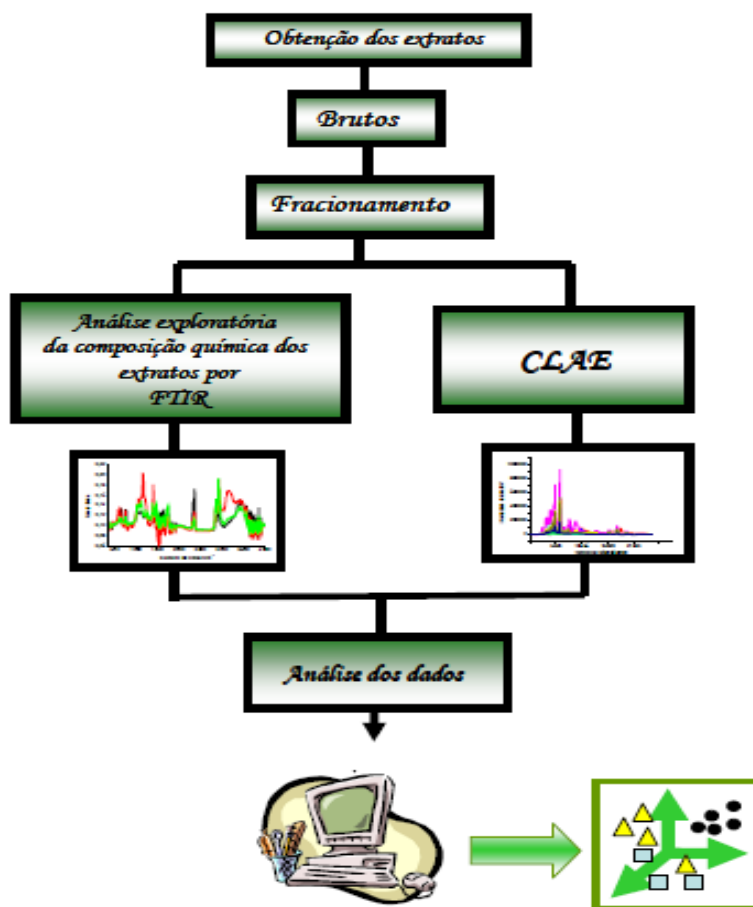


Figura 6– Procedimento experimental para a obtenção dos extratos brutos, do fracionamento dos extratos, dos dados espectroscópicos e cromatográficos das folhas da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

3.1 PLANTA

A planta utilizada para realizar o experimento pertence à família das *Annonaceae*, com nome científico de *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill e vulgarmente conhecida como pinha ou fruta do conde, Figura 7.

3.2 CARACTERÍSTICAS DA PLANTA

Determinada por A. O. S. Vieira & L. R. Bargoena em 28/04/08

Data da coleta: 26/03/08

Nome científico: *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

Família: *Annonaceae*

Nome vulgar: pinha, fruta do conde

Local: Departamento de Química, CCE, Campus Universitário da UEL

Cidade: Londrina

UF: Paraná

Observações: Árvore com flores e frutos

Número da exsicata depositada no herbário da UEL: 42.919



Figura 7 – Foto da exsicata da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina.

3.3 COLETA

As coletas das folhas foram realizadas no jardim experimental do Departamento de Química do centro de ciências exatas da Universidade Estadual de Londrina, entre os meses de agosto de 2007 a janeiro de 2008, sempre no período da manhã (07h30min às 08h30min). As folhas foram picotadas com tesoura e secadas por onze dias em lugar arejado, à temperatura ambiente e protegida da luz, umidade, ataque de fungos, insetos e roedores. Para a moagem foi utilizado um liquidificador. Posteriormente o material foi armazenado em embalagem de papelão.

3.4 PROCEDIMENTO PARA ESCOLHA DOS SOLVENTES EXTRATORES

A escolha dos solventes foi baseada no triângulo de seletividade primeiramente proposto por Snyder para cromatografia. A Tabela 1, apresenta os valores de α (acidicidade), β (basicidade) e π (dipolaridade) normalizados bem como o valor da polaridade dos solventes puros e das misturas do planejamento experimental. A Figura 8 representa o triângulo de seletividade dos solventes para os componentes puros e misturas da Tabela 1. Os parâmetros α (acidicidade), β (basicidade) e π (dipolaridade) são medidas relativas da força de interação molecular do soluto com o solvente. Os valores destes parâmetros para diferentes solventes foram derivados da espectroscopia, por isso o nome de solvatocrômico⁵¹. A vantagem do triângulo de Snyder é o agrupamento de solventes de acordo com o tipo de interação com os compostos de interesse. Solventes quimicamente semelhantes possuem parâmetros de seletividade similares e fazem parte do mesmo grupo, no entanto podem apresentar diferentes valores de polaridades.

Acetato de etila, acetona e a mistura binária destes solventes apresentam um caráter básico e dipolar, sendo fortes receptores de prótons, portanto, estes solventes interagem preferencialmente com compostos que possuem caráter ácido, ou seja, fortes doadores de prótons, como ácidos carboxílicos, álcoois, fenóis, entre outros.

O clorofórmio apresenta um alto valor de acididade e dipolaridade e assim interage melhor com substâncias de caráter básico.

O etanol apresenta altos valores de acididade (α) e basicidade (β), e um valor dipolaridade (π) um pouco menor ($\alpha \cong \beta > \pi$), por este motivo ele se encontra próximo ao centro do triângulo. A maior parte das misturas está localizada próxima do eixo de dipolaridade (π) e basicidade (β), isso ocorre porque o acetato de etila e a acetona apresentam valores de $\alpha \cong 0$ e o diclorometano $\beta = 0$. Em compensação estes três solventes apresentam altos valores de π , fazendo com que as misturas que contém estes solventes apresentem principalmente interação dipolar e no processo de extração estas misturas extraem preferencialmente compostos

com interação dipolo. Os valores dos parâmetros α , π e β , bem como a polaridade (P), Tabela 2 para as misturas foram calculados pelas equações:

$$\alpha = \sum_{i=1}^n \alpha_i \varphi_i \quad (16)$$

$$\pi = \sum_{i=1}^n \pi_i \varphi_i \quad (17)$$

$$\beta = \sum_{i=1}^n \beta_i \varphi_i \quad (18)$$

$$P = \sum_{i=1}^n P_i \varphi_i, \quad (19)$$

onde n é o número de solventes, α_i , π_i e β_i , e P_i são os valores de acidez, dipolaridade, basicidade e polaridade dos solventes puros e φ_i são as proporções das misturas.

Tabela 1 – Classificação dos solventes de acordo com a seletividade normalizada

Extratos	α	π	β	P
Etanol (e)	0,39	0,25	0,36	4,30
Acetato de etila (ae)	0,00	0,55	0,45	4,40
Diclorometano (d)	0,27	0,73	0,00	3,10
Acetona (ac)	0,06	0,56	0,38	5,10
Clorofórmio (cl)	0,43	0,57	0,00	4,10
e/ae	0,19	0,4	0,41	4,35
e/d	0,33	0,49	0,18	3,70
e/ac	0,23	0,40	0,37	4,70
e/cl	0,41	0,41	0,18	4,20
ae/d	0,14	0,64	0,22	3,75
ae/ac	0,03	0,56	0,41	4,75
ae/cl	0,21	0,56	0,23	4,25
d/ac	0,16	0,65	0,19	4,10
ac/cl	0,24	0,57	0,19	4,60
d/cl	0,35	0,65	0,00	3,60
e/ae/d	0,22	0,51	0,27	3,90
e/ac/cl	0,29	0,46	0,25	4,50
e/ae/cl	0,27	0,46	0,27	4,30
e/d/cl	0,36	0,52	0,12	3,80
e/ae/ac	0,15	0,45	0,40	4,60
d/ac/cl	0,25	0,62	0,13	4,10
ae/ac/cl	0,16	0,56	0,28	4,50
ae/d/cl	0,23	0,62	0,15	3,87
ae/d/ac	0,11	0,62	0,27	4,20
e/d/ac	0,24	0,51	0,25	4,17
e/ae/d/ac	0,18	0,52	0,30	4,22
ae/d/ac/cl	0,19	0,60	0,21	4,17
e/d/ac/cl	0,29	0,53	0,18	4,15
e/ae/ac/cl	0,22	0,48	0,30	4,48
e/ae/d/cl	0,27	0,53	0,20	3,98
e/ae/d/ac/cl	0,23	0,53	0,24	4,20

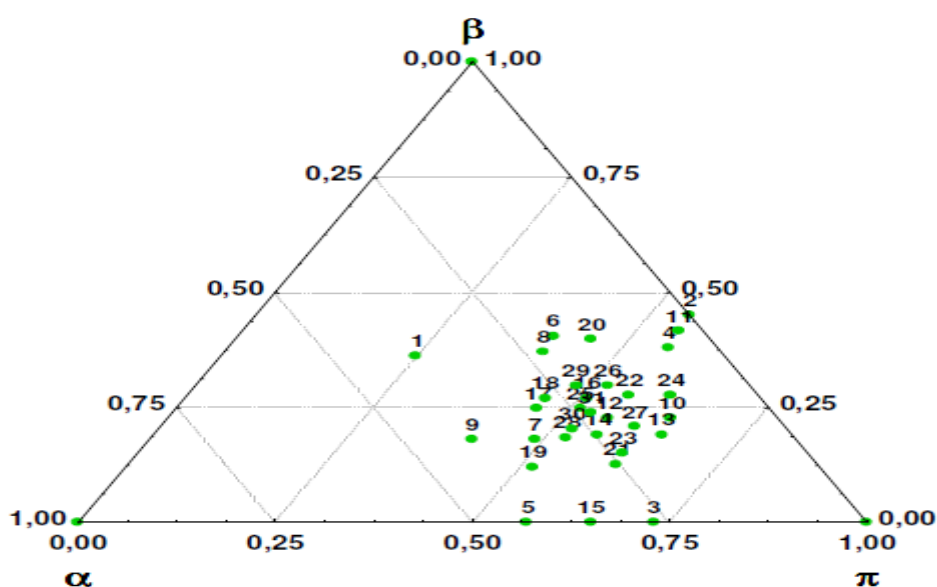


Figura 8 – Triângulo de seletividade baseado nos dados solvatocrômicos da Tabela 1.

O etanol tem valores de α e β muito próximos, e o valor de π mais baixo entre os cinco solventes puros. O acetato de etila apresenta valores próximos para π e β , com α igual a 0. A acetona pertence ao mesmo grupo do acetato de etila. O diclorometano possui o maior valor de π .

Este posicionamento dos diferentes tipos de solventes ou misturas de solventes na Figura 8 já era esperado. Por exemplo, o diclorometano é um forte doador de prótons e um fraco receptor, além de ter um caráter altamente dipolar e por isso está localizado sobre o eixo acidez-dipolaridade. Devido ao alto valor de dipolaridade, o diclorometano extrai preferencialmente composto que contém moléculas com grupo funcional polar, tais como éteres, ésteres, sulfetos, sulfóxidos, tióis, hidroxilas, halogênios, aldeídos, cetonas, compostos com ligação nitro (-NO₂) e nitrila (-CN), entre outros.

3.5 PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS PARA O FRACIONAMENTO

A Figura 9 mostra o procedimento experimental para o preparo dos extratos brutos. Os extratos brutos foram preparados pesando-se 20,00g de folhas secas de uma mistura de seis meses de coleta e colocadas em contato com 70 mL de solventes puros, ou misturas, de acordo com o planejamento experimental com cinco componentes, Tabela 2. Em seguida solubilizados no ultrassom por 30 min, e filtrados em algodão. Este processo foi repetido por três vezes, obtendo-se um volume final de 210 mL de solução, que foi levado a evaporação no evaporador rotatório a temperatura de 70 °C. Depois da evaporação do solvente puro, ou da mistura, os extratos foram colocados em frascos âmbar e armazenados a temperatura ambiente até obterem massas constantes. As amostras totalizaram 31 combinações entre misturas e solventes puros. O ponto central foi feito em triplicata.

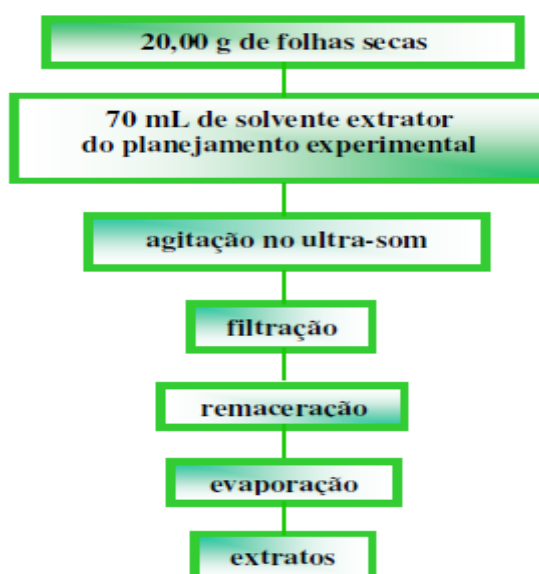


Figura 9 – Procedimento geral para o preparo dos extratos brutos.

Tabela 2 – Planejamento experimental com cinco componentes para obter os extratos brutos da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

Extratos	Solventes extratores				
	etanol	Acetato de etila	Dicloro-metano	acetona	Cloro-fórmio
1	1	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0
3	0	0	1	0	0
4	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	1
6	1/2	1/2	0	0	0
7	1/2	0	1/2	0	0
8	1/2	0	0	1/2	0
9	1/2	0	0	0	1/2
10	0	1/2	1/2	0	0
11	0	1/2	0	1/2	0
12	0	1/2	0	0	1/2
13	0	0	1/2	1/2	0
14	0	0	0	1/2	1/2
15	0	0	1/2	0	1/2
16	1/3	1/3	1/3	0	0
17	1/3	0	0	1/3	1/3
18	1/3	1/3	0	0	1/3
19	1/3	0	1/3	0	1/3
20	1/3	1/3	0	1/3	0
21	0	0	1/3	1/3	1/3
22	0	1/3	0	1/3	1/3
23	0	1/3	1/3	0	1/3
24	0	1/3	1/3	1/3	0
25	1/3	0	1/3	1/3	0
26	1/4	1/4	1/4	1/4	0
27	0	1/4	1/4	1/4	1/4
28	1/4	0	1/4	1/4	1/4
29	1/4	1/4	0	1/4	1/4
30	1/4	1/4	1/4	0	1/4
31a	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
31b	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
31c	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5

Os extratos brutos foram fracionados de acordo com a Figura 10⁵². Ao extrato bruto seco foi adicionado 20 mL do solvente extrator, ou da mistura e solubilizado no ultra-som por 20 min. Em seguida foram adicionados 20 mL de metanol e água (4:1) (v:v) e a solução foi novamente homogeneizada no ultra-som por 10 min. Esta solução foi deixada em repouso por 30 min, para então ser filtrada em papel de filtro comum e funil de büchner, obtendo duas frações.

O resíduo retido no papel de filtro comum constituído por fibras, gorduras e graxas foi lavado com acetato de etila. A fração recolhida com acetato de etila foi evaporada o solvente no evaporador rotatório. As fibras retidas no papel de filtro foram secadas a temperatura ambiente.

O filtrado foi concentrado a um décimo do volume em evaporador rotatório a temperatura de 70°C. Em seguida a solução foi acidificada com ácido sulfúrico concentrado, e colocada em funil de separação e adicionados 10 mL de clorofórmio e agitada. O processo foi repetido por três vezes, separando a fase orgânica da fração básica e polar.

A fração básica e polar foram separadas adicionando hidróxido de amônio concentrado a solução até obter pH 10, em seguida adicionado 20 mL de clorofórmio e metanol (3:1) (v:v) agitado e acrescentado um excesso de clorofórmio 20 mL. Primeiro foi recolhida à fase básica (alcalóides), em seguida a fração polar (alcalóides quaternários, N-óxidos). A fração neutra, orgânica, básica e aquosa foram evaporadas e concentradas em evaporador rotatório à temperatura de 70°C e armazenadas em frascos âmbar, mantidas a temperatura ambiente até atingirem massas constantes.

A fase orgânica (terpenóides e compostos fenólicos) e a fração básica (alcalóides) foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

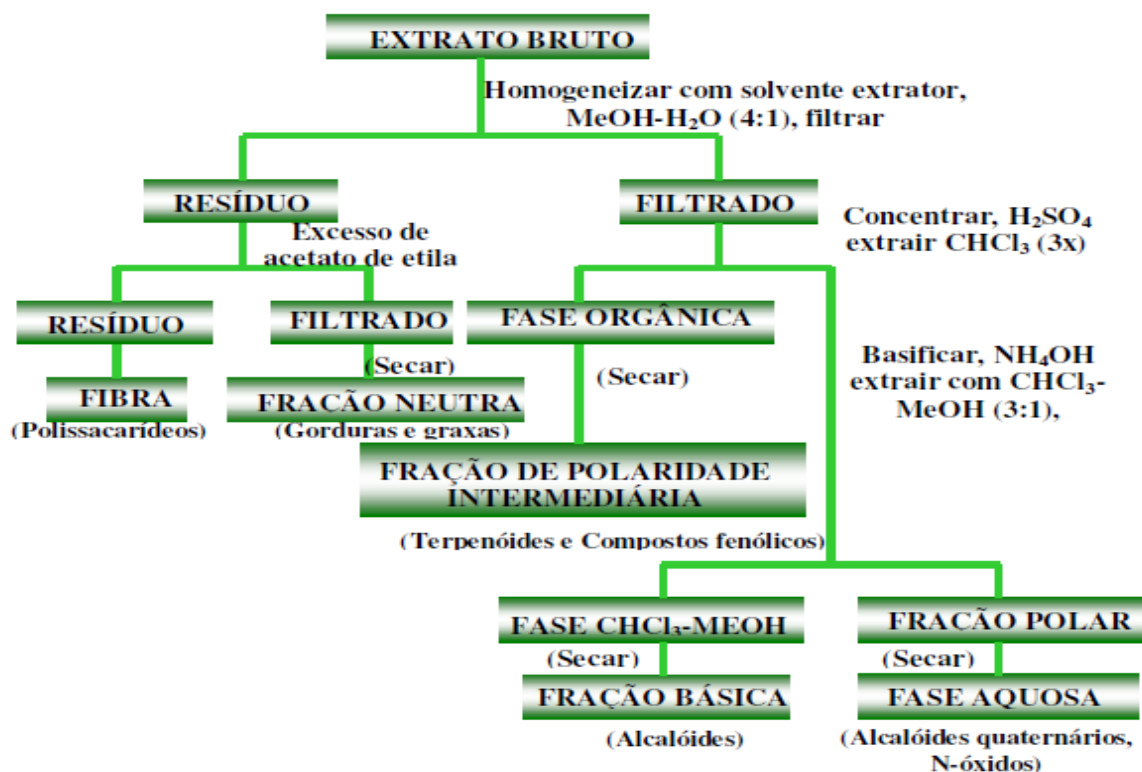


Figura 10 – Procedimento geral para o fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos.

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As amostras obtidas na fase orgânica e fração básica foram adicionados 3 mL de metanol e dissolvidas em ultra-som por 10 min, em seguida deixadas em repouso por 1h. Após esse tempo cada solução foi filtrada em filtro de papel comum e em funil de büchner, colocadas em frascos âmbar e armazenadas em freezer. Para a análise cromatográfica, as amostras foram retiradas do freezer e estabilizadas a temperatura ambiente. Em seguida foram tomadas alíquotas de 200µL e diluídas em 200µL (1:1) da fase móvel. As amostras diluídas foram filtradas em filtro milipore millex com 0,22µm, e injetado 20µL na alça de amostragem. A Figura 11 mostra o procedimento experimental do preparo das amostras para a CLAE.

A análise cromatográfica foi realizada nas seguintes condições: coluna C18 ODS Metasil da Phenomenex com dimensões de 250 mm x 4,6mm, com

tamanho de partícula de 5 μm , temperatura do forno 50°C, volume de injeção de 20 μL , vazão da fase móvel a 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, eluição monitorada nos comprimentos de onda de 210, 220, 254 e 260 nm.

Foram testadas três fases móveis: a fase móvel Q preparada com misturas de acetonitrila-metanol-água, (17,5: 17,5: 65) (v/v/v), fase móvel E (26:27:47) (v/v/v) e fase móvel R (35:35:30) (v/v/v), com forças dos solventes 1,0, 1,5 e 2,0, respectivamente.



Figura 11 – Procedimento para o preparo das amostras para análise em HPLC.

3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para análise das amostras da fase orgânica foram adicionados 5 mL de clorofórmio e levadas ao ultra-som por 1 minuto, em seguida transferiu 0,2 mL dessa solução em um frasco e adicionou 5 mL de clorofórmio. Desta solução fez-se uma tomada de 0,2 mL e adicionou-se 150mg de KBr.

A fração básica foi adicionado 4 mL de clorofórmio na amostra e levadas ao ultra-som por 1 min, em seguida adicionou 0,2 mL desta solução em 2

mL de clorofórmio. Pegou-se uma alíquota de 0,2 mL da solução e misturou-se em 150mg de KBr.

Os espectros foram registrados na região de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 1,93 cm^{-1} e 80 leituras.

3.8 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram álcool etílico hidratado P.A. MONTENEGRO, acetona P.A. VETEC, 99,5 %, acetato de etila P.A. VETEC, 99,5%, clorofórmio P.A. VETEC, 99,5%, diclorometano P.A. VETEC, 99,5 %, metanol VETEC, GRAU HPLC, acetonitrila VETEC, GRAU HPLC, hidróxido de amônio MERCK, 97%, ácido sulfúrico P.A. VETEC, 99%, brometo de potássio P.A. ACS (P.M. 119,00 g/mol) 99%, papel de tornassol azul J. PROLAB, papel indicador universal J. PROLAB, e água ultrapura utilizada em todas as preparações.

3.9 EQUIPAMENTOS

Os aparelhos utilizados foram balança analítica Scientech AS 120, liquidificador SKYMSSEN TA-02, pHmetro HANNA HI9321, evaporador rotativo FISATOM 802, ultrasom ULTRACLEANER 1400 UNIQUE, cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10AT com detector espectroscópico Diodo Array SPD-M10A e espectrômetro de infravermelho Shimadzu FTIR-8300.

3.10 PROGRAMA COMPUTACIONAL

A Análise Hierárquica e os gráficos foram feitos com o software Statistica 6.0⁴⁷. Os demais programas utilizados foram desenvolvidos pela Profa. Dra. Ieda S. Scarminio do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina.



Capítulo IV

Resultados

4 Resultados e Discussão

Todos os extratos brutos e as frações foram evaporados e secados até obter massas constantes. Os frascos foram pesados vazios e com os extratos a diferença é o rendimento obtido para cada amostra. A Tabela 3 apresenta o planejamento experimental com cinco componentes e os valores das massas para o rendimento do extrato bruto da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill e das frações obtidas no fracionamento líquido-líquido.

O mesmo procedimento foi utilizado para obter a massa das frações líquidas neutra, orgânica e básica. A massa da fibra foi obtida pesando o papel de filtro limpo, sem fibra e depois com a fibra seca.

Pode-se observar nos resultados apresentados na Figura 12 que os maiores rendimentos em massa obtidos pelo planejamento estatístico para o extrato bruto foi nas misturas ternárias e quaternárias. Para obter o maior rendimento em massa para o extrato bruto deve-se utilizar a mistura etanol-diclorometano-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v). Outras opções seriam as misturas etanol-acetato de etila-diclorometano-clorofórmio (1/4; 1/4; 1/4; 1/4) (v/v/v/v), etanol-acetato de etila-acetona-clorofórmio (1/4; 1/4; 1/4; 1/4) (v/v/v/v), etanol-diclorometano-acetona (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v), etanol-acetona-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v), e etanol-acetato de etila diclorometano (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v).

Tabela 3 – Tabela de rendimentos dos extratos brutos da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill, da fração neutra, orgânica, básica e das fibras.

amostras	Solventes extratores					Extrato Bruto(g)	Frações (g)			
	e	ae	d	ac	cl		Neutra	Orgânica	Básica	Fibras
1	1	0	0	0	0	0,4830	0,0172	0,0638	0,0063	0,0377
2	0	1	0	0	0	0,3607	0,1246	0,0691	0,01068	0,1161
3	0	0	1	0	0	0,7925	0,2458	0,0086	0,0092	0,2772
4	0	0	0	1	0	0,2530	0,0361	0,1217	0,0099	0,0610
5	0	0	0	0	1	0,7535	0,4106	0,0066	0,0006	0,2304
6	1/2	1/2	0	0	0	0,4901	0,2750	0,1618	0,0101	0,0369
7	1/2	0	1/2	0	0	0,8371	0,1980	0,2148	0,0068	0,1444
8	1/2	0	0	1/2	0	0,6105	0,4590	0,0215	0,0070	0,0345
9	1/2	0	0	0	1/2	0,9220	0,3148	0,1067	0,0014	0,1820
10	0	1/2	1/2	0	0	0,5035	0,2823	0,0041	0,0109	0,1313
11	0	1/2	0	1/2	0	0,9129	0,0646	0,0222	0,0095	0,0341
12	0	1/2	0	0	1/2	0,6641	0,3134	0,0550	0,0026	0,1973
13	0	0	1/2	1/2	0	0,6801	0,2766	0,1130	0,0078	0,2092
14	0	0	0	1/2	1/2	0,5334	0,3275	0,0250	0,0103	0,1656
15	0	0	1/2	0	1/2	0,8028	0,2981	0,0407	0,0092	0,1457
16	1/3	1/3	1/3	0	0	0,9814	0,2614	0,0517	0,0073	0,1377
17	1/3	0	0	1/3	1/3	0,9925	0,2106	0,0415	0,0070	0,1009
18	1/3	1/3	0	0	1/3	0,8919	0,3224	0,0482	0,0097	0,1614
19	1/3	0	1/3	0	1/3	1,5380	0,5765	0,0069	0,0051	0,1742
20	1/3	1/3	0	1/3	0	0,4913	0,0719	0,1402	0,0091	0,0712
21	0	0	1/3	1/3	1/3	0,7065	0,4200	0,0268	0,0098	0,2015
22	0	1/3	0	1/3	1/3	0,6382	0,3118	0,0443	0,0012	0,2182
23	0	1/3	1/3	0	1/3	0,6892	0,1276	0,0592	0,0097	0,2208
24	0	1/3	1/3	1/3	0	0,6552	0,1477	0,1323	0,0018	0,1246
25	1/3	0	1/3	1/3	0	1,0900	0,1772	0,1286	0,0080	0,1041
26	1/4	1/4	1/4	1/4	0	0,9350	0,1976	0,1517	0,0085	0,0899
27	0	1/4	1/4	1/4	1/4	0,5214	0,2422	0,0073	0,0006	0,1401
28	1/4	0	1/4	1/4	1/4	0,7551	0,3633	0,0760	0,0057	0,1483
29	1/4	1/4	0	1/4	1/4	1,1090	0,4650	0,2373	0,0012	0,1049
30	1/4	1/4	1/4	0	1/4	1,2540	0,3467	0,0809	0,0067	0,1736
31a	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	0,7491	0,3446	0,1060	0,0080	0,1458
31b	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	0,7836	0,3374	0,0323	0,0040	0,1491
31c	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	0,8010	0,2859	0,0875	0,0111	0,1693

e=etanol, ae=acetato de etila, d=diclorometano, ac=acetona e cl=clorofórmio.

Para analisar o rendimento dos extratos obtidos pelo planejamento de misturas foram utilizados modelos estatísticos multivariados que permitem explorar os efeitos de inúmeras variáveis simultaneamente na resposta e extrair o máximo de informações do experimento em estudo. Então, para avaliar o efeito dos solventes no rendimento dos extratos brutos foram testados os modelos linear, quadrático e o cúbico especial. Porém todos os modelos apresentaram falta de ajuste

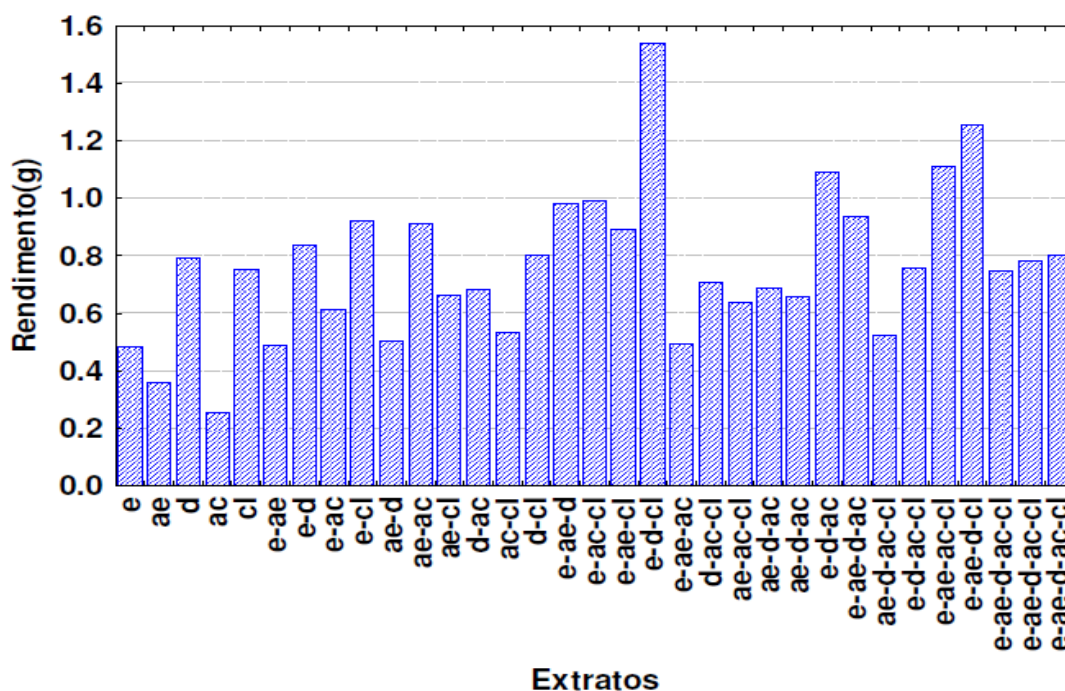


Figura 12 – Gráfico dos rendimentos dos extratos brutos da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio).

Na Tabela 4 estão apresentados os valores dos coeficientes de regressão e seus erros padrão, valores de t (student) para o modelo cúbico especial. Os efeitos significativos estão em negrito. Analisando os coeficientes de regressão dos solventes puros podemos concluir que o diclorometano e o clorofórmio produzem maiores rendimentos dos extratos comparados ao etanol, acetato de etila e acetona e entre as misturas, a binária composta por acetato de etila- acetona (1/2; 1/2) (v/v). Incluindo somente os termos significativos na equação de previsão o modelo apresenta falta de ajuste. Isto pode ser explicado pelas interações ternárias que não são significativas no nível de 95% de confiança. Entretanto nota-se um alto efeito sinérgico pelos valores dos coeficientes para a mistura etanol-diclorometano clorofórmio, o que significa que a presença dos três solventes extratores é importante para aumentar o rendimento do extrato bruto. Estes resultados podem ser confirmados pela Tabela 3, em que os maiores rendimentos foram encontrados no extrato obtido pela mistura ternária etanol-diclorometano-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v). Por outro lado, o modelo de misturas não inclui efeitos quaternários.

Tabela 4 – Coeficientes da regressão para o modelo cúbico especial no estudo dos extratos brutos da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

Fatores	Coefficientes	Erro padrão	t(8)
Etanol (e)	0,47728	0,211	2,263
Acetato de etila (ae)	0,35916	0,211	1,703
Diclorometano (d)	0,78224	0,211	3,708
Acetona (ac)	0,24581	0,211	1,165
Clorofórmio (cl)	0,74594	0,211	3,536
e/ae	0,23714	1,020	0,232
e/d	1,05824	1,020	1,037
e/ac	1,12634	1,020	1,037
e/cl	1,38410	1,020	1,356
ae/d	-0,17371	1,020	-0,170
ae/ac	2,43838	1,020	2,389
ae/cl	0,45495	1,020	0,446
d/ac	0,94028	1,020	0,921
d/cl	0,44285	1,020	0,434
ac/cl	0,33974	1,020	0,3331
e/ae/d	8,66496	6,312	1,372
e/ae/ac	-5,53980	6,312	-0,877
e/ae/cl	5,67858	6,312	0,899
e/d/ac	2,48695	6,312	0,394
e/d/cl	10,52712	6,312	1,667
e/ac/cl	2,97216	6,312	0,470
ae/d/ac	-5,38193	6,312	-0,852
ae/d/cl	-1,79616	6,312	-0,284
ae/ac/cl	-3,63161	6,312	-0,575
d/ac/cl	-7,42607	6,312	-1,175

Pela Tabela 3, o segundo maior rendimento foi obtido com uma mistura quaternária de etanol-acetato de etila-diclorometano-clorofórmio (1/4; 1/4; 1/4; 1/4) (v/v/v/v), 1, 254 g, e não foi significativa de acordo com o modelo. A não inclusão destes termos no modelo e a complexidade das amostras justificam a falta de ajuste dos modelos.

Os resultados apresentados na Figura 13 foram obtidos através do planejamento estatístico para a fração neutra. Para encontrar os maiores rendimentos em massa da fração neutra é preferível utilizar a mistura ternária de etanol-diclorometano-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v). Seguida pelas misturas quaternária etanol-acetato de etila-acetona-clorofórmio (1/4; 1/4; 1/4; 1/4) (v/v/v/v), e a mistura binária etanol-acetona (1/2; 1/2) (v/v). Nota-se que a maior parte dos rendimentos em massa possui valores entre 0,2 e 0,4 g, e dentro desta faixa a maior parte das misturas encontra-se presente o clorofórmio como um dos solventes extratores. Por outro lado o solvente extrator etanol puro foi o que extraiu a menor

quantidade de gorduras e graxas ou metabólitos de polaridade neutra, por exemplo, os alcalóides de caráter neutro⁵³. Se o objetivo for maximizar o rendimento desta fração o etanol seria o pior solvente extrator.

Para avaliar os efeitos obtidos nos valores de rendimentos da fração neutra foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico especial. No entanto, todos eles apresentaram falta de ajuste. Os valores dos coeficientes de regressão e seus erros padrão, valores de t (student) para o modelo cúbico especial são mostrados na Tabela 5.

De acordo com os coeficientes obtidos para os solventes puros pode-se concluir que o diclorometano e clorofórmio rendem maiores quantidades da fração quando comparados ao acetato de etila, acetona e etanol. No nível de 95% de confiança apenas os solventes puros diclorometano e clorofórmio, juntamente com as misturas binária etanol-acetona (1/2; 1/2) (v/v) e ternária etanol-diclorometano-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v) foram significativas.

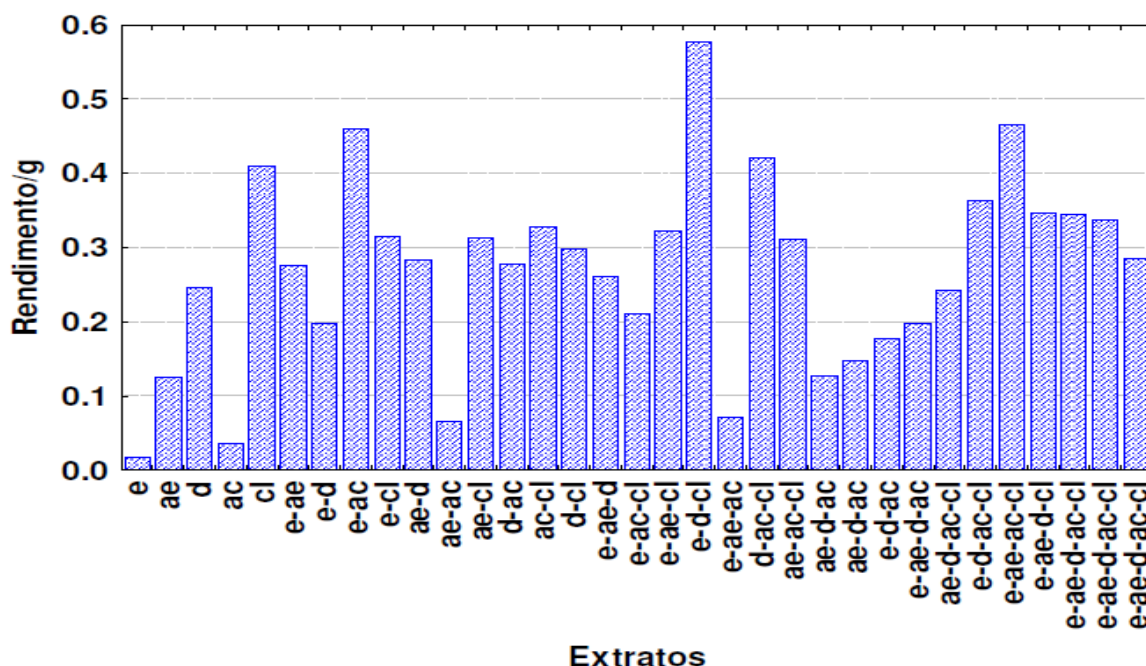


Figura 13 – Gráfico dos rendimentos da fração neutra da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio).

A falta de ajuste dos modelos pode ser explicada pelas outras interações que não foram incluídas no modelo, mas que apresentam um

considerável efeito sinérgico, notado pelos valores dos coeficientes para as misturas acetato de etila-acetona clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v) e diclorometano-acetona-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v). Quando analisados os resultados na Tabela 1 notamos um alto rendimento para a mistura quaternária etanol-acetato de etila-acetona-clorofórmio, 0, 465 g (1/4; 1/4; 1/4; 1/4;) (v/v/v/v). Isso mostra que a mistura dos quatro solventes extratores é importante para aumentar o rendimento da fração neutra. A não inclusão destes termos no modelo aliado a complexidade das amostras justificam a falta de ajuste dos modelos.

A Figura 14 mostra o resultado das misturas para a fase orgânica. Os rendimentos mais expressivos em massa são encontrados na mistura quaternária de etanol-acetato de etila-acetonaclorofórmio (1/4; 1/4; 1/4; 1/4) (v/v/v/v), em torno de 0, 237 g e na mistura binária etanol- diclorometano (1/2; 1/2) (v/v) em torno de 0, 215 g.

Tabela 5 – Coeficientes da regressão para o modelo cúbico especial no estudo da fração neutra da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t(8)
Etanol (e)	0,02045	0,083	0,247
Acetato de etila (ae)	0,12783	0,083	1,545
Diclorometano (d)	0,24620	0,083	2,975
Acetona (ac)	0,03934	0,083	0,475
Clorofórmio (cl)	0,41279	0,083	4,988
e/ae	0,69748	0,400	1,742
e/d	0,24315	0,400	0,607
e/ac	1,61003	0,400	4,021
e/cl	0,32006	0,400	0,799
ae/d	0,36642	0,400	0,915
ae/ac	-0,18151	0,400	-0,453
ae/cl	0,10053	0,400	0,251
d/ac	0,52016	0,400	1,299
d/cl	-0,10701	0,400	-0,267
ac/cl	0,33347	0,400	0,833
e/ae/d	-0,01856	2,478	-0,008
e/ae/ac	-3,66059	2,478	-1,477
e/ae/cl	1,99739	2,478	0,806
e/d/ac	-4,68460	2,478	-1,890
e/d/cl	7,71858	2,478	3,114
e/ac/cl	-3,65145	2,478	-1,473
ae/d/ac	-1,46130	2,478	-0,590
ae/d/cl	-5,09792	2,478	-2,057
ae/ac/cl	4,12915	2,478	1,666
d/ac/cl	2,44303	2,478	0,986

Considerando o custo dos reagentes, a mistura binária é uma excelente alternativa se os metabólitos de interesse são extraídos usando estes dois solventes. Observa-se também que a maior parte dos rendimentos obtidos pelo planejamento encontra-se abaixo de 0,12 g. Os extratos preparados em diclorometano, clorofórmio, acetato de etila-diclorometano (1/2; 1/2) (v/v), etanol-diclorometano-clorofórmio (1/3; 1/3; 1/3) (v/v/v), acetato de etila-diclorometano-acetona - clorofórmio (1/4; 1/4; 1/4; 1/4) (v/v/v/v), foram os que apresentaram os rendimentos mais baixos na fase orgânica. Isso mostra que para aumentar o rendimento da fase orgânica deve-se evitar estes solventes puros ou estas misturas.

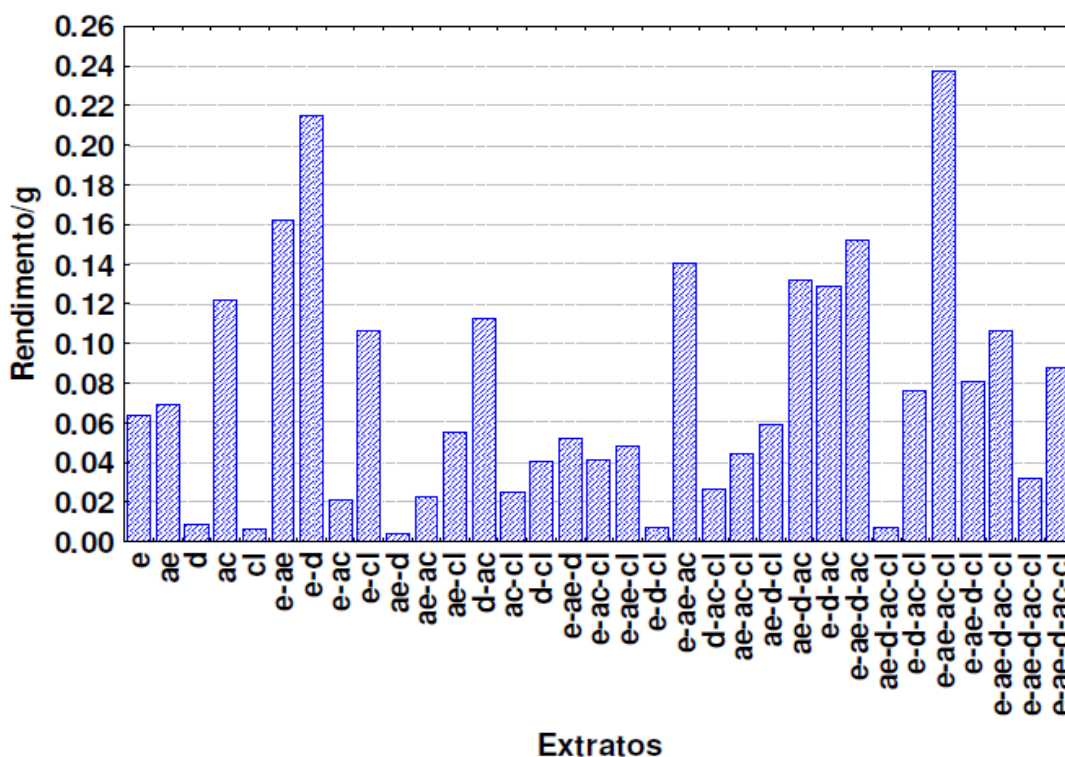


Figura 14 – Gráfico dos rendimentos obtidos experimentalmente para a fase orgânica da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio).

Para ajustar os resultados da fase orgânica também foram testados os modelos estatísticos, mas todos eles apresentaram falta de ajuste.

A Tabela 6 mostra os valores dos coeficientes de regressão, seus erros padrão, valores de t, para o modelo cúbico especial. Neste caso a única interação que apresentou efeito significativo foi à mistura binária de etanol-diclorometano (1/2; 1/2) (v/v). Podemos verificar na Figura 14, que os maiores

valores de rendimento são fornecidos pela mistura quaternária etanol-acetato de etila- acetona- clorofórmio (1/4; 1/4; 1/4; 1/4) (v/v/v/v) e pela mistura binária etanol-diclorometano (1/2; 1/2) (v/v). A falta de ajuste pode ser justificada pelo fato de serem misturas complexas e o modelo restringir as interações em até três componentes.

Os resultados encontrados pelo planejamento de misturas para a fração básica estão apresentados na Figura 15. Os maiores rendimentos em massa para a fração básica foram obtidos na mistura quaternária etanol-acetato de etila-diclorometano-acetona-clorofórmio (1/5; 1/5; 1/5; 1/5; 1/5) (v/v/v/v/v), mistura binária acetato de etila-diclorometano (1/2; 1/2) (v/v), e o puro acetato de etila. Aproximadamente 48% dos valores em massa estão acima de 0,008 g, e a maior parte desses rendimentos contém na composição o acetato de etila puro ou em misturas, e/ou clorofórmio em misturas como solventes extratores. Estes resultados mostram que o acetato de etila se destaca entre os demais solventes por apresentar um maior rendimento na fração básica. E os menores rendimentos foram obtidos na presença do clorofórmio puro e em misturas.

Na Tabela 7 encontram-se os coeficientes e seus erros padrão, valores de t e p, para o modelo cúbico especial. Estes valores mostram que os solventes puros acetato de etila, diclorometano e acetona garantem maiores rendimentos se comparados a etanol e clorofórmio puros. De acordo com o modelo cúbico especial os efeitos significativos são dados apenas aos solventes puros acetato de etila, diclorometano e acetona, juntamente com a mistura ternária acetato de etila-acetona-clorofórmio (1/3; 1/3;1/3) (v/v/v). Vale ressaltar que esta mistura ternária tem efeito antagônico na extração, ou seja, a presença destes três solventes juntos diminui os rendimentos.

Tabela 6 – Coeficientes de regressão para o modelo cúbico especial para os rendimentos da fase orgânica da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t(8)
Etanol (e)	0,06565	0,058988	1,11293
Acetato de etila (ae)	0,06970	0,058988	1,18162
Diclorometano (d)	0,00807	0,058988	0,13681
Acetona (ac)	0,12201	0,058988	2,06841
Clorofórmio (cl)	0,00748	0,058988	0,12684
e/ae	0,32044	0,285402	1,12276
e/d	0,69190	0,285402	2,42430
e/ac	-0,33610	0,285402	-1,17764
e/cl	0,21551	0,285402	0,75511
ae/d	-0,11906	0,285402	-0,41717
ae/ac	-0,30146	0,285402	-1,05627
ae/cl	0,04055	0,285402	0,14207
d/ac	0,22120	0,285402	0,77504
d/cl	0,14281	0,285402	0,50038
ac/cl	-0,17479	0,285402	-0,61244
e/ae/d	-2,19369	1,766528	-1,24181
e/ae/ac	3,41482	1,766528	1,93307
e/ae/cl	-0,30355	1,766528	-0,17183
e/d/ac	0,14925	1,766528	0,08449
e/d/cl	-3,10981	1,766528	-1,76041
e/ac/cl	1,44900	1,766528	0,82025
ae/d/ac	1,63172	1,766528	0,92369
ae/d/cl	0,31366	1,766528	0,17755
ae/ac/cl	0,99917	1,766528	0,56561
d/ac/cl	-1,61810	1,766528	-0,91598

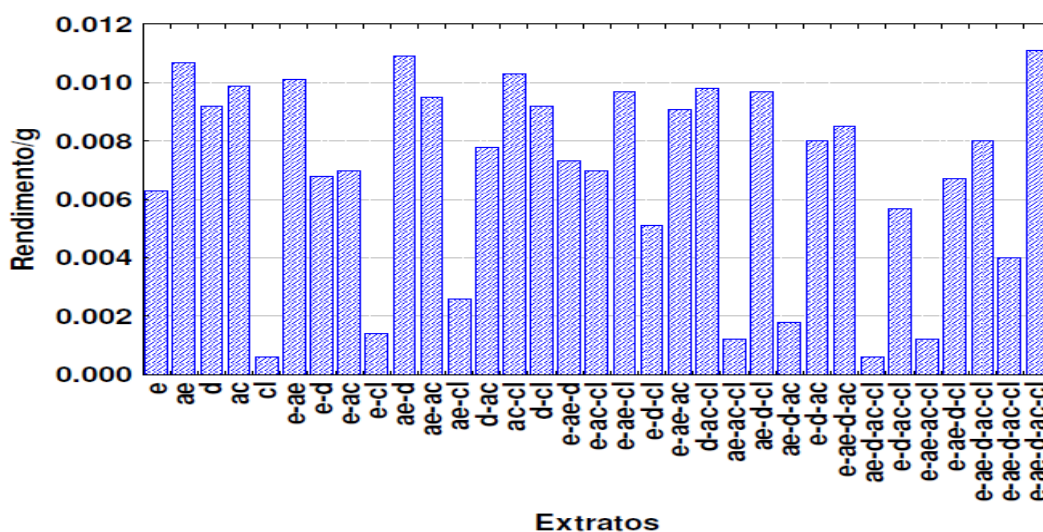


Figura 15 – Gráfico dos rendimentos obtidos experimentalmente para a fração básica da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio).

Ao analisar os rendimentos apresentados na Tabela 3 e Figura 15, nota-se que o rendimento encontrado na mistura quinária etanol-acetato de etila-diclorometano acetona- clorofórmio (1/5; 1/5; 1/5; 1/5; 1/5) (v/v/v/v/v) é elevado, mostrando que os cinco solventes juntos são importantes para obter um rendimento expressivo na fração básica. Considerando que os solventes puros acetato de etila, diclorometano e acetona apresentam-se como bons extratores qualquer um deles poderia ser usado para extrair metabólitos da fração básica.

Tabela 7 – Coeficientes previstos pelo modelo cúbico especial para o rendimento de fração básica da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t(8)
Etanol (e)	0,006345	0,003094	2,05064
Acetato de etila (ae)	0,010714	0,003094	3,46280
Diclorometano (d)	0,009269	0,003094	2,99565
Acetona (ac)	0,009934	0,003094	3,21072
Clorofórmio (cl)	0,000581	0,003094	0,18776
e/ae	0,005413	0,014970	0,36160
e/d	-0,006003	0,014970	-0,40097
e/ac	-0,005427	0,014970	-0,36253
e/cl	-0,007411	0,014970	-0,49505
ae/d	0,001997	0,014970	0,13342
ae/ac	-0,003827	0,014970	-0,25565
ae/cl	-0,011011	0,014970	-0,73553
d/ac	-0,008843	0,014970	-0,59070
d/cl	0,017173	0,014970	1,14713
ac/cl	0,021348	0,014970	1,42605
e/ae/d	-0,012067	0,092661	-0,13023
e/ae/ac	0,021087	0,092661	0,22757
e/ae/cl	0,110034	0,092661	1,18749
e/d/ac	0,078904	0,092661	0,85154
e/d/cl	-0,026249	0,092661	-0,28328
e/ac/cl	-0,020395	0,092661	-0,22010
ae/d/ac	-0,164341	0,092661	-1,77358
ae/d/cl	0,037706	0,092661	0,40693
ae/ac/cl	-0,218040	0,092661	-2,35310
d/ac/cl	-0,017122	0,092661	-0,18479

Na Figura 16 estão apresentados os rendimentos obtidos pelo planejamento de misturas para as fibras. Os maiores rendimentos em massa foram encontrados para os solventes puros diclorometano, clorofórmio, e para as misturas

ternárias acetato de etila-diclorometano-clorofórmio (1/3; 1/3;1/3) (v/v/v), acetato de etila-acetona clorofórmio (1/3;1/3;1/3) (v/v/v). Assim para obter o maior rendimento em fibras o mais indicado é utilizar o solvente puro diclorometano.

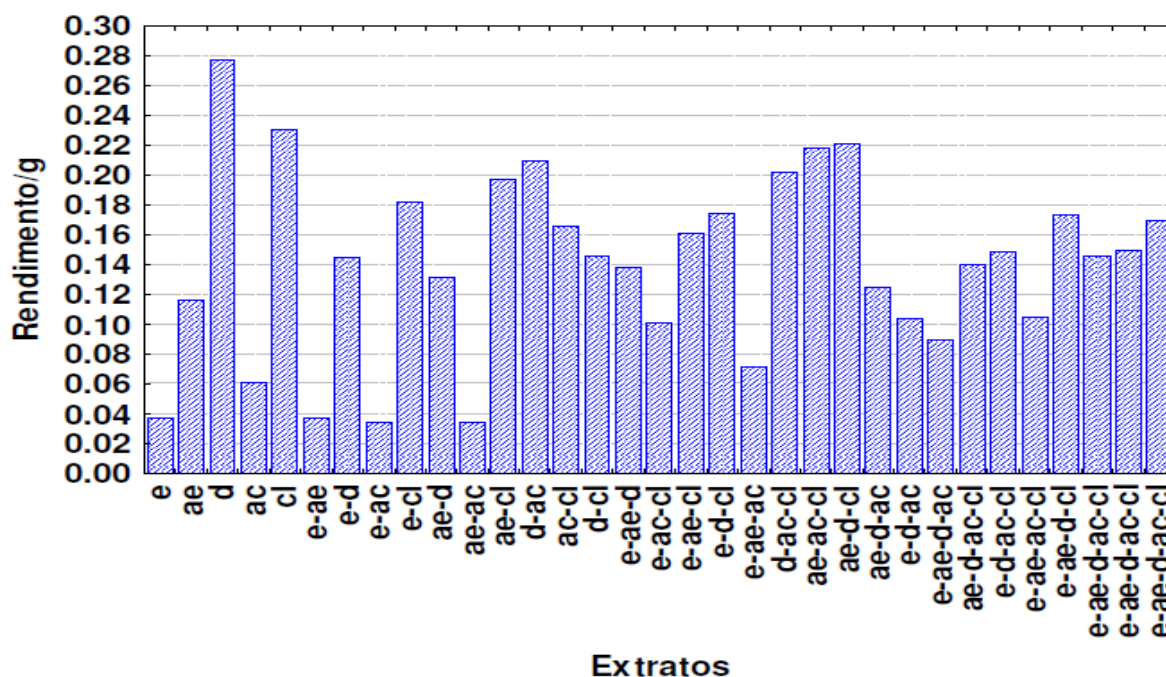


Figura 16 – Gráfico dos rendimentos obtidos experimentalmente para as fibras da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio).

Para avaliar o efeito dos solventes no rendimento das fibras, foram testados diferentes modelos estatísticos. Os valores dos coeficientes de regressão do modelo cúbico especial, o erro padrão dos coeficientes e os valores de t, estão apresentados na Tabela 8. De acordo com estes valores o solvente puro acetato de etila, diclorometano e clorofórmio rendem as maiores quantidades de fibra quando comparados à acetona e etanol. E a mistura binária diclorometano-clorofórmio (1/2; 1/2) (v/v) possui efeito significativo antagônico, de modo a diminuir o rendimento das fibras.

No nível de 95% de confiança apenas os solventes puros acetato de etila, diclorometano e clorofórmio, juntamente com a mistura binária diclorometano-clorofórmio (1/2; 1/2) (v/v) foram significativas. Com apenas estes termos na equação de previsão o modelo não se ajusta aos dados.

Tabela 8 – Coeficientes de regressão para o modelo cúbico especial para o rendimento das fibras da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

Fatores	Coeficiente	Erro padrão	t(8)
Etanol (e)	0,03743	0,026561	1,40931
Acetato de etila (ae)	0,11497	0,026561	4,32864
Diclorometano (d)	0,27664	0,026561	10,41534
Acetona (ac)	0,06016	0,026561	2,26491
Clorofórmio (cl)	0,22960	0,026561	8,64409
e/ae	-0,14072	0,128510	-1,09501
e/d	-0,05225	0,128510	-0,40657
e/ac	-0,04982	0,128510	-0,38769
e/cl	0,20012	0,128510	1,55723
ae/d	-0,23222	0,128510	-1,80700
ae/ac	-0,17899	0,128510	-1,39282
ae/cl	0,13375	0,128510	1,04078
d/ac	0,17988	0,128510	1,39973
d/cl	-0,41418	0,128510	-3,22292
ac/cl	0,10745	0,128510	0,83610
e/ae/d	0,99010	0,795427	1,24474
e/ae/ac	0,76961	0,795427	0,96754
e/ae/cl	0,01898	0,795427	0,02386
e/d/ac	-0,72471	0,795427	-0,91110
e/d/cl	0,70236	0,795427	0,88300
e/ac/cl	-1,10693	0,795427	-1,39162
ae/d/ac	-0,56840	0,795427	-0,71459
ae/d/cl	1,37497	0,795427	1,72859
ae/ac/cl	1,32218	0,795427	1,66223
d/ac/cl	0,39786	0,795427	0,50018

O melhor extrator nem sempre é aquele que fornece o maior rendimento, mas sim o que extrai maior diversidade de metabólitos. Uma forma de avaliar a eficiência do sistema extrator é por meio do número de picos cromatográficos. Neste trabalho foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência para avaliar melhor o sistema extrator. Foram utilizadas três fases móveis compostas por acetonitrila-metanol-água nas proporções de 35:35:30 (v/v/v), 26:27:47 (v/v/v) e 17,5:17,5:65 (v/v/v). Os solventes utilizados na fase móvel foram escolhidos de acordo com o diagrama de Snyder, foi selecionado um solvente de cada grupo. Sendo a força do solvente de uma mistura eluente que determina a variação nos quais todos os solutos de uma amostra são eluídos e dependem

principalmente da fração de água na mistura. As proporções da fase móvel foram escolhidas as quais deram a melhor resposta no trabalho sobre a impressão digital da *Bauhinia variegata*⁵⁴. Destas fases móveis a que apresentou o maior número de picos para todos os cromatogramas foi a fase móvel acetonitrila-metanol-água na proporção de 17,5: 17,5:65 (v/v/v). O aumento da força cromatográfica diminuiu o número de picos. Considerando que a impressão cromatográfica deve conter o maior número de picos no cromatograma, neste trabalho será enfatizado os resultados com a fase cromatográfica acetonitrila-metanol-água na proporção de 17,5: 17,5:65 (v/v/v).

Na Tabela 9 encontram-se os valores dos rendimentos da fase orgânica e o número de picos cromatográficos obtidos para os extratos analisados na fase móvel acetonitrila -metanol- água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v). Por estes resultados pode-se observar que a mistura quaternária composta por etanol-acetato de etila-acetona-clorofórmio (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v) foi a que apresentou o maior rendimento (0, 2373 g) na fase orgânica e 31 picos cromatográficos com área superior a 0,5%, de acordo com a integração dos picos dada pelo programa computacional, Figura 17. Já a mistura binária composta por acetato de etila diclorometano (1/2: 1/2) (v/v) com o menor rendimento (0, 0041 g) apresentou 33 picos cromatográficos, Figura 18. Mesmo com o rendimento muito distinto para os dois extratos, eles apresentam o número de picos bem próximos. Já a mistura ternária composta por diclorometano-acetona-clorofórmio (1/3: 1/3: 1/3) (v/v/v) com o nono maior rendimento (0, 0268 g) na fração apresentou o maior número de picos nos cromatogramas para a fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v) 39 picos. Observa-se na Tabela 9 e Figura 19, que os extratos que apresentaram maior número de picos foram preparados em misturas contendo acetato de etila e/ ou acetona. Diante destes resultados pode-se concluir que o maior rendimento não implica em maior diversidade de metabólitos.

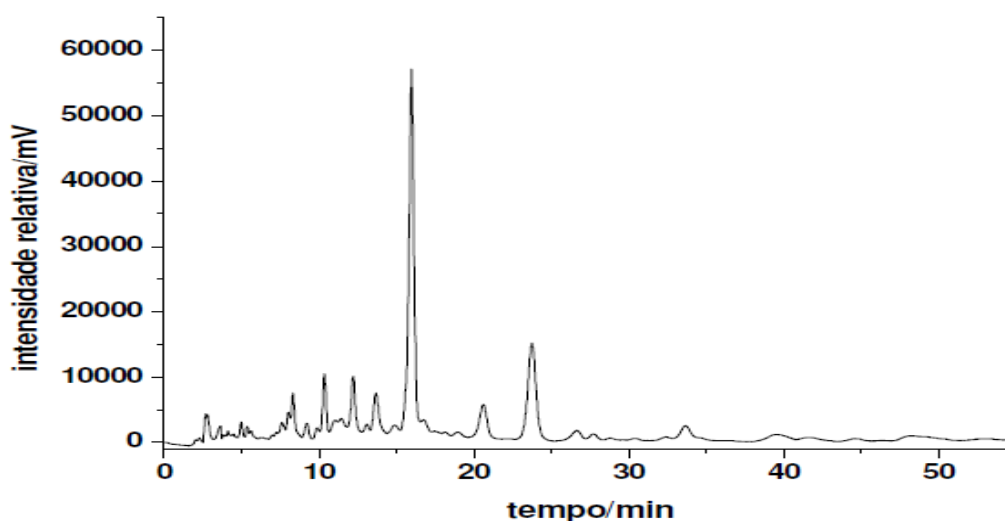


Figura 17 – Cromatograma obtido na fase orgânica pela mistura quaternária composta por etanol-acetato de etila-acetona-clorofórmio (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

Tabela 9 – Rendimento da fase orgânica e o número de picos cromatográficos para os extratos obtidos pelo planejamento de cinco componentes utilizando a fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v).

Extrato	Solvente extrator	Rendimento/g	Nº de picos
1	Etanol (e)	0,0638	31
2	Acetato de etila (ae)	0,0691	30
3	Diclorometano (d)	0,0086	32
4	Acetona (ac)	0,1217	23
5	Clorofórmio (cl)	0,0066	32
6	e/ac	0,1618	26
7	e/d	0,2148	32
8	e/ac	0,0215	23
9	e/cl	0,1067	30
10	ae/d	0,0041	33
11	ae/ac	0,0222	31
12	ae/cl	0,0550	27
13	d/ac	0,1130	23
14	ac/cl	0,0250	33
15	d/cl	0,0407	31
16	e/ae/d	0,0517	31
17	e/ac/cl	0,0415	32
18	e/ae/cl	0,0482	36
19	e/d/cl	0,0069	29
20	e/ae/ac	0,1402	29
21	d/ac/cl	0,0268	39
22	ae/ac/cl	0,0443	32
23	ae/d/cl	0,0592	29
24	ae/d/ac	0,1323	34
25	e/d/ac	0,1286	28
26	e/ae/d/ac	0,1517	30
27	ae/d/ac/cl	0,0073	19
28	e/d/ac/cl	0,0760	31
29	e/ae/ac/cl	0,2373	31
30	e/ac/d/cl	0,0809	32
31a	e/ae/d/ac/cl	0,1060	36
31b	e/ae/d/ac/cl	0,0323	29
31c	e/ae/d/ac/cl	0,0875	27

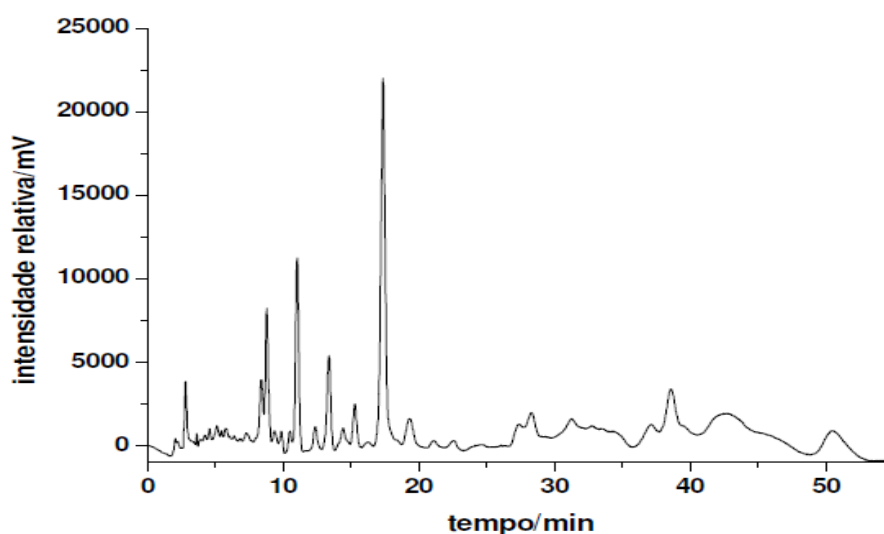


Figura 18 – Cromatograma obtido na fase orgânica pela mistura binária composta por acetato de etila-diclorometano (1/2: 1/2) (v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel acetonitrila metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

Se o objetivo for obter um perfil cromatográfico bem informativo, impressão digital da espécie é preferível utilizar a fase móvel que apresentar a maior diversidade de picos cromatográficos. No caso da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill a fase móvel composta por acetonitrila-metanol-água 17,5:17,5:65 (v/v/v) foi a que apresentou o maior número de picos cromatográficos na fase orgânica, Figura 19, juntamente com a mistura ternária composta por diclorometano-acetona-clorofórmio (1/3:1/3:1/3) (v/v/v).

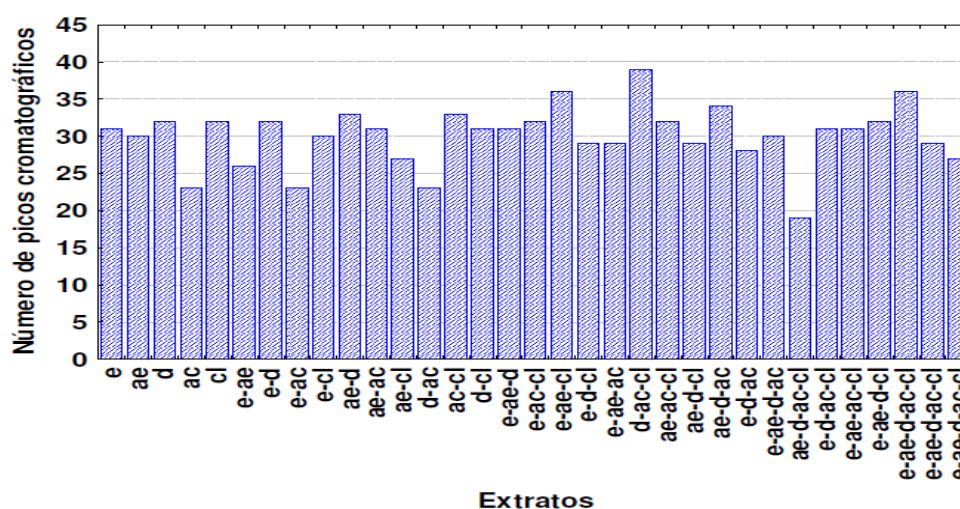


Figura 19 – Gráfico do número de picos cromatográficos para a fase orgânica obtidos pela fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v) (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio)

Para os cromatogramas obtidos com os solventes puros, Figura 20 pode-se destacar o tempo de retenção de 14,6 min, onde há um pico cromatográfico comum para todos os extratos analisados na fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v) para a fase orgânica. Na busca por um biomarcador poderia utilizar qualquer um dos solventes puros. Além disso, os extratos preparados com os solventes puros diclorometano e acetona foram os únicos que apresentaram um pico cromatográfico no tempo de eluição de 37,3 min para a fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5:65 (v/v/v). Sendo que a maior intensidade do pico cromatográfico foi obtido em acetona pura. Este poderia ser um diferencial na espécie *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

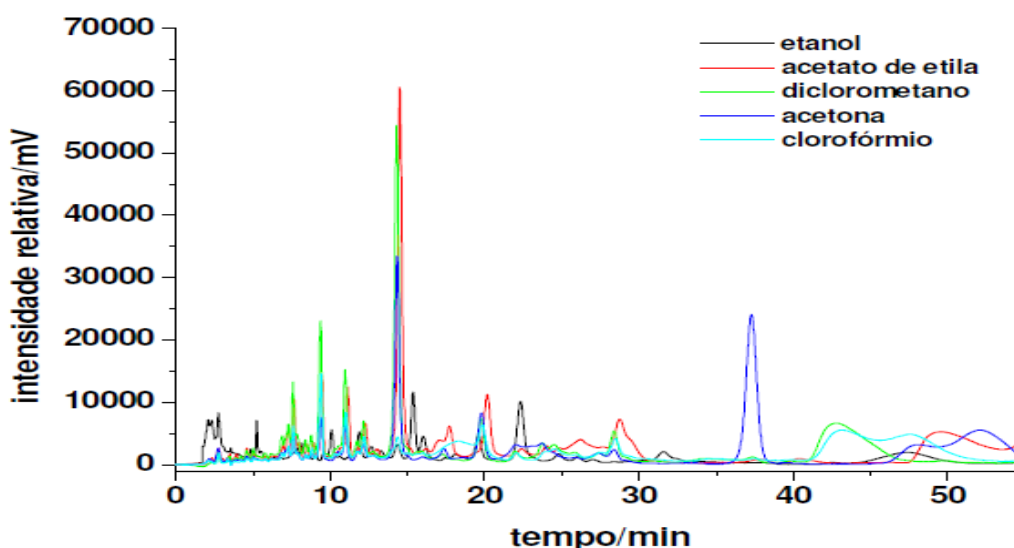


Figura 20 – Cromatogramas obtidos na fase orgânica para os solventes puros etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5:17,5:65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

O extrato preparado na mistura quaternária etanol-acetato de etila-diclorometano acetona (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v: v), foi o que apresentou picos cromatográficos em tempos de eluição diferentes (35,8 min (1) e 44,8 min (2)) das demais amostras na fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v), Figura 21. No caso, se o interesse do estudo fosse à busca de um novo composto poderia optar por esta composição de extrato.

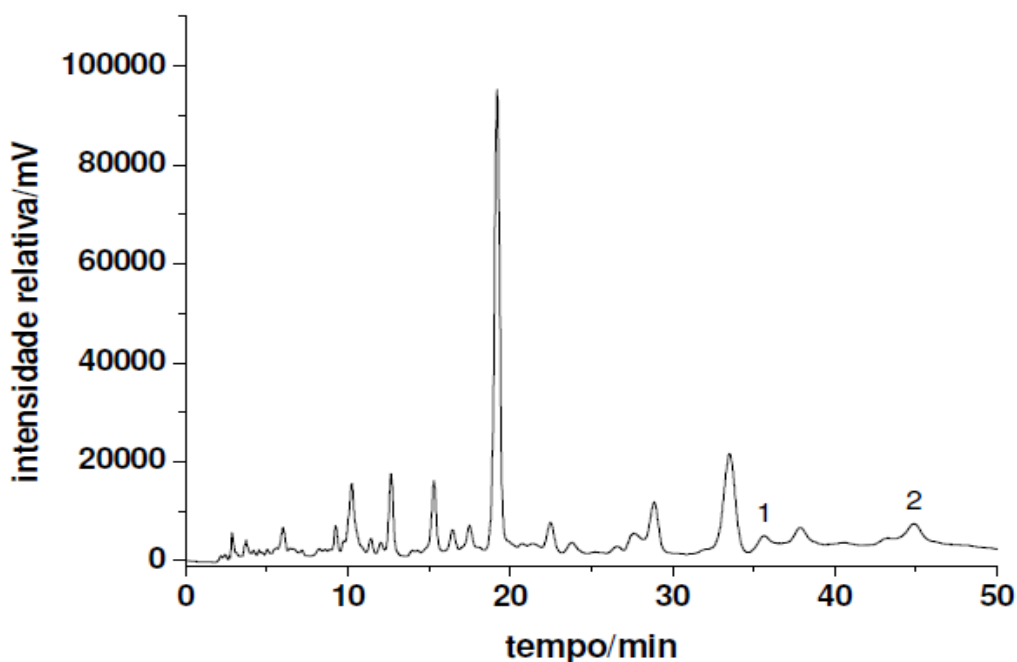


Figura 21 – Cromatograma obtido na fase orgânica para a mistura quaternária etanol-acetato de etila-diclorometano-acetona (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel acetonitrila-metanol água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

Para a fração básica também foram analisados os 31 extratos, com triplicata para o ponto central, obtidos pelo planejamento com cinco componentes para a espécie *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill com as fases móveis compostas por acetonitrila metanol-água nas proporções de 35:35:30 (v/v/v), 26:27:47 (v/v/v) e 17,5:17,5:65 (v/v/v).

Na Figura 22 encontram-se os resultados do número de picos cromatográficos para a fase móvel nas proporções de acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v), a qual apresentou o maior número de picos cromatográficos em relação as outras proporções da fase móvel. O extrato preparado em etanol-acetona (1/2; 1/2) (v/v) apresentou o maior número de picos cromatográficos (45) com área maior que 0,5%, e a segunda mistura foi acetato de etila-diclorometano acetona-clorofórmio com 32 picos cromatográficos, os demais extratos ficaram abaixo de 30 picos cromatográficos.

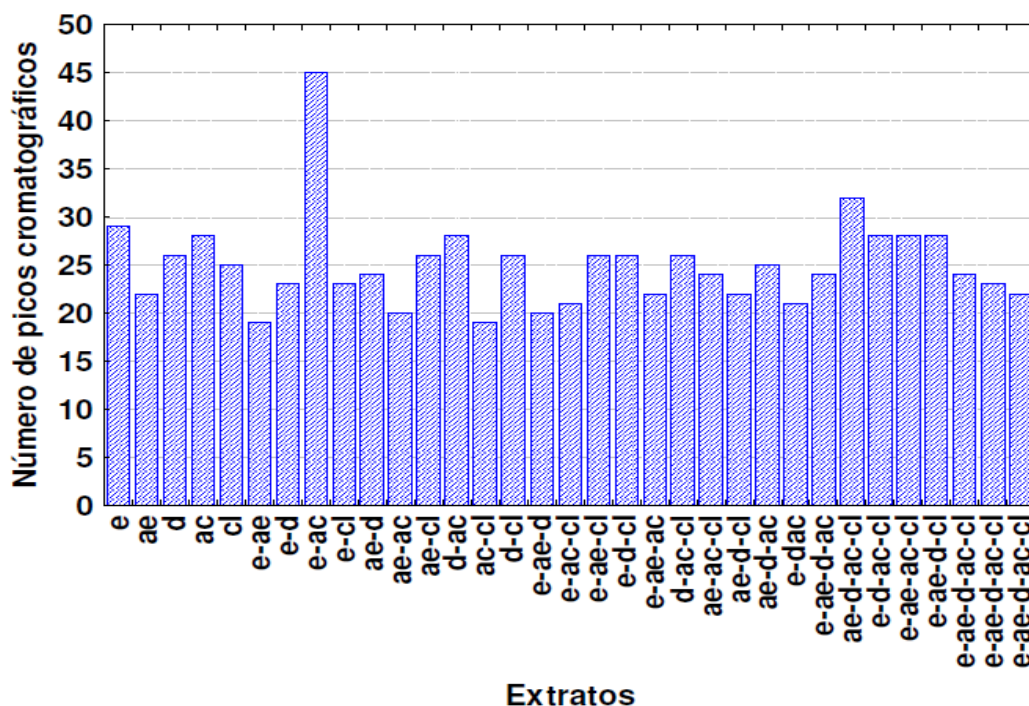


Figura 22 – Gráfico do número de picos cromatográficos para a fração básica obtidos pela fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v) (e = etanol, ae = acetato de etila, d = diclorometano, ac = acetona e cl = clorofórmio).

Na Tabela 10 estão os valores de rendimentos dos extratos em massa e o número de picos cromatográficos, com área superior a 0,5%, obtidos na fase móvel acetonitrila-metanol-água na composição 17,5: 17,5: 65 (v/v/v).

Tabela 10 – Rendimento da fração básica e o número de picos cromatográficos para os extratos obtidos pelo planejamento de cinco componentes através da fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v).

Extrato	Solvente extrator	Rendimento/g	Nº de picos
1	Etanol (e)	0,0063	29
2	Acetato de etila (ae)	0,01068	22
3	Diclorometano (d)	0,0092	26
4	Acetona (ac)	0,0099	28
5	Clorofórmio (cl)	0,0006	25
6	e/ac	0,0101	19
7	e/d	0,0068	23
8	e/ac	0,0070	45
9	e/cl	0,0014	23
10	ae/d	0,0109	24
11	ae/ac	0,0095	20
12	ae/cl	0,0026	26
13	d/ac	0,0078	28
14	ae/cl	0,0103	19
15	d/cl	0,0092	26
16	e/ae/d	0,0073	20
17	e/ac/cl	0,0070	21
18	e/ae/cl	0,0097	26
19	e/d/cl	0,0051	26
20	e/ae/ac	0,0091	22
21	d/ac/cl	0,0098	26
22	ae/ac/cl	0,0012	24
23	ae/d/cl	0,0097	22
24	ae/d/ac	0,0018	25
25	e/d/ac	0,0080	21
26	e/ae/d/ac	0,0085	24
27	ae/d/ac/cl	0,0006	32
28	e/d/ac/cl	0,0057	28
29	e/ae/ac/cl	0,0012	28
30	e/ae/d/cl	0,0067	28
31a	e/ae/d/ac/cl	0,0080	24
31b	e/ae/d/ac/cl	0,0040	23
31c	e/ae/d/ac/cl	0,0111	22

Ao analisar estes resultados pode-se notar que a mistura quinária etanol-acetato de etila- diclorometano- acetona-clorofórmio (1/5: 1/5: 1/5: 1/5: 1/5) (v/v/v/v/v) foi o extrato obtido na fração básica que apresentou o maior rendimento (0, 0111 g) e 22 picos cromatográficos, Figura 23.

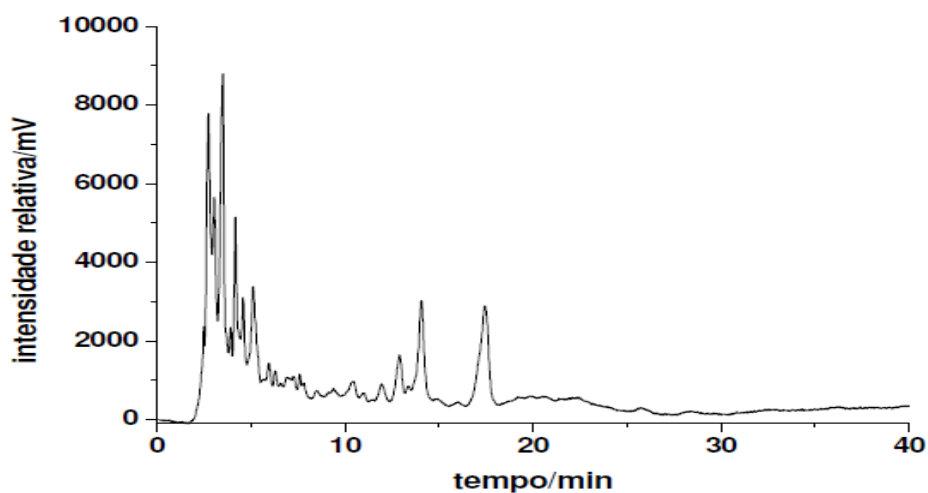


Figura 23 – Cromatograma obtido na fração básica para a mistura quinária etanol-acetato de etila-diclorometano- acetona-clorofórmio (1/5: 1/5: 1/5: 1/5: 1/5) (v/v/v/v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μm ; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

O extrato preparado em clorofórmio puro com o menor rendimento entre da fração básica apresentou 25 picos cromatográficos. A mistura quaternária acetato de etila-diclorometano-acetona- clorofórmio (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v) com o mesmo rendimento do clorofórmio apresentou 32 picos cromatográficos, Figuras 24 e 25, respectivamente.

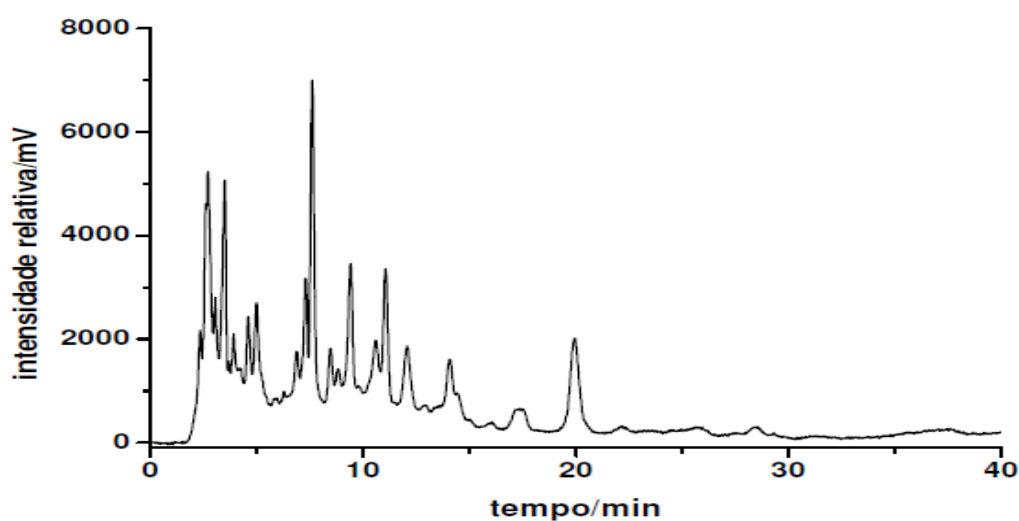


Figura 24 – Cromatograma obtido na fração básica para o solvente puro clorofórmio; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μm ; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

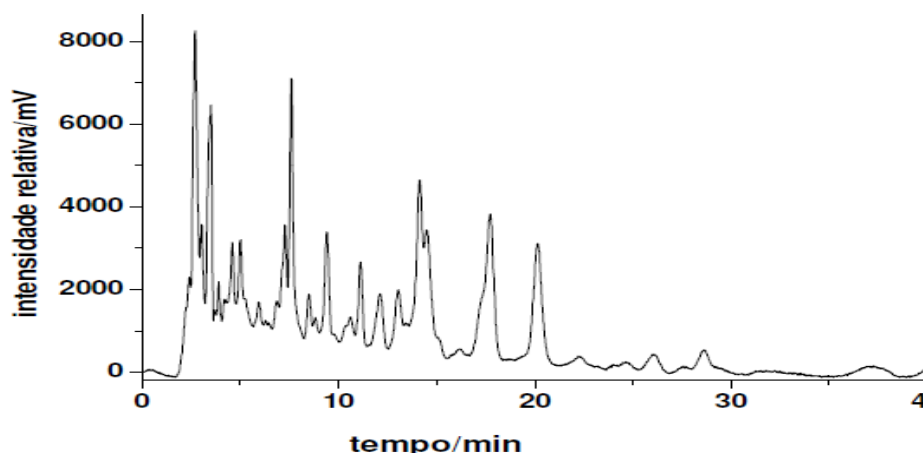


Figura 25 – Cromatograma obtido na fração básica na mistura quaternária acetato de etila-diclorometano- acetona-clorofórmio (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μm ; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

Assim podemos observar que o menor rendimento apresentou a maior variedade de picos cromatográficos quando comparado ao extrato de maior rendimento na fase móvel acetonitrilametanol- água na composição 17,5: 17,5: 65 (v/v/v), principalmente para a mistura quaternária acetato de etila-diclorometano-acetona-clorofórmio (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v).

Na Figura 26 estão os cromatogramas dos extratos obtidos com os solventes puros para a fração básica. O extrato 1 (etanol) foi o que apresentou o maior número de picos cromatográficos (29) e mais intensos também.

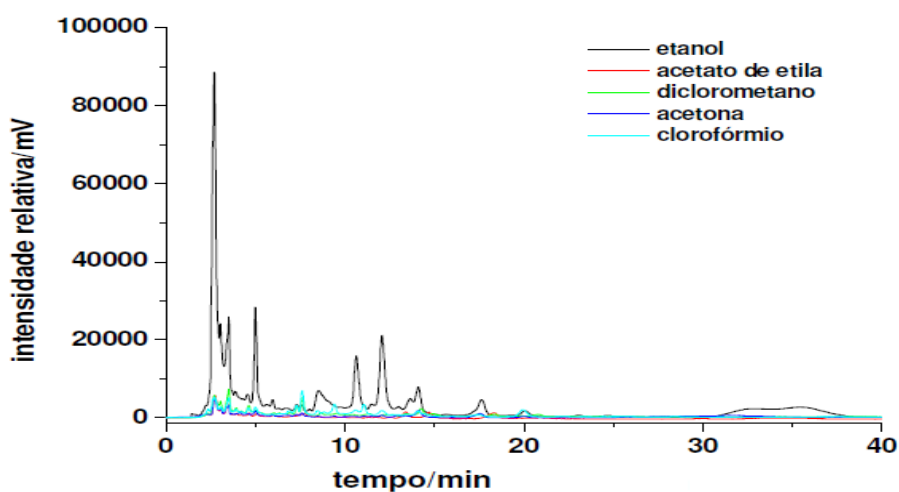


Figura 26 – Cromatogramas obtidos na fração básica para os solventes puros etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μm ; Fase móvel acetonitrila-metanol água 17,5:17,5:65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

O extrato preparado na mistura binária etanol-acetona (1/2: 1/2) (v/v) foi o que apresentou o maior número de picos cromatográficos (45) na fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v), Figura 27. Assim, para a fração básica esta seria a mistura de solventes mais indicada para obter a impressão digital da espécie *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill pela quantidade de picos cromatográficos apresentados nesta fase móvel.

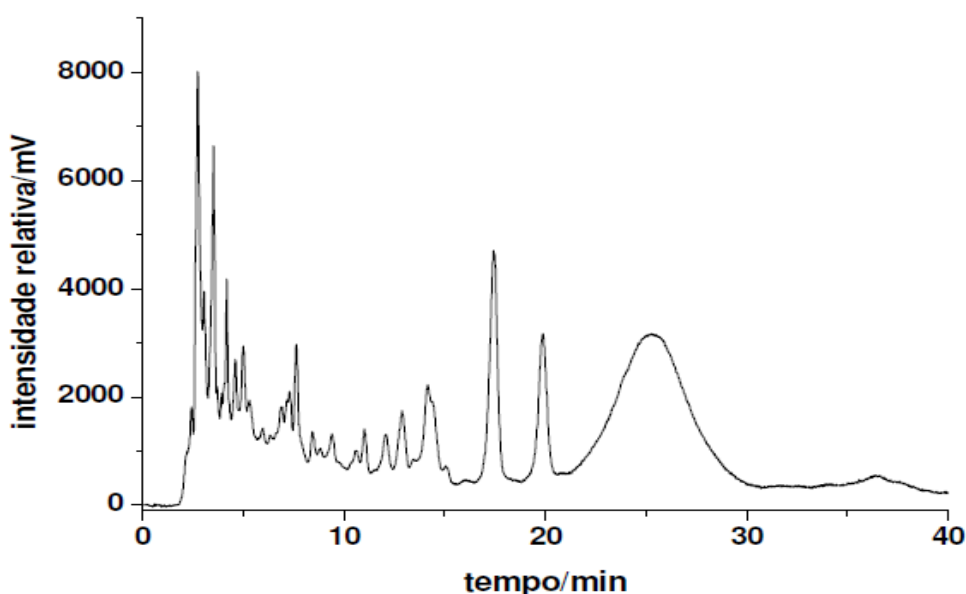


Figura 27 – Cromatograma obtido na fração básica na mistura binária etanol-acetona (1/2: 1/2) (v/v); Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μm ; Fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

A análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica (HCA) foram usadas para avaliar possíveis discriminações na composição química das amostras da fase orgânica.

Nesta etapa do trabalho serão apresentados os resultados cromatográficos para a fase móvel que apresentou o maior número de picos, acetonitrila-metanol-água nas proporções 17,5: 17,5: 65 (v/v/v) e análise exploratória dos espectros na região do infravermelho.

Os cromatogramas obtidos para os 31 pontos do planejamento com triplicata no ponto central, foram colocados na forma de uma matriz de 33x2907, 33 cromatogramas e 2907 variáveis, com valores de altura do pico (mV) nos diferentes tempos de retenção.

Cinco componentes principais explicam 74,46% da variância total contida nos dados. A Figura 28 mostra o gráfico dos escores das componentes principais CP1 e CP3 que juntas explicam 51,5% da variância total.

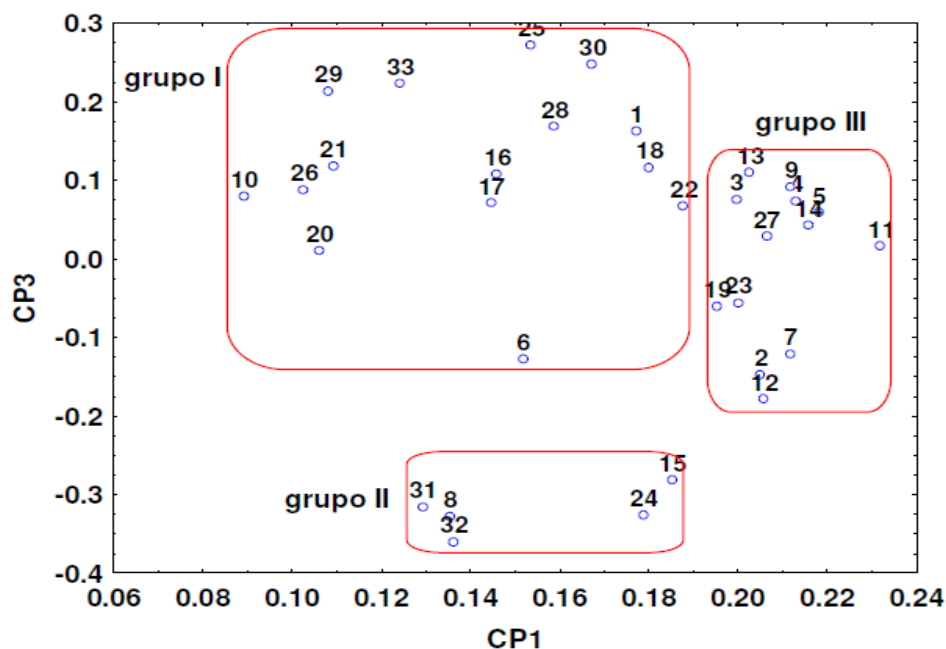


Figura 28 – Gráfico dos escores para as componentes CP1 e CP3 dos dados cromatográficos para os 33 extratos da fase orgânica.

A CP1 separa o grupo III dos grupos I e II, enquanto que a CP3 separa o grupo II dos demais. As amostras presentes no grupo I sofrem influência dos solventes extratores etanol puro ou em misturas principalmente com acetato de etila e/ou acetona. O grupo II contém as duplicatas do ponto central e misturas de etanol acetato de etila, diclorometano-clorofórmio e a mistura ternária de acetato de etila, diclorometano e acetona. O grupo III é separado dos demais por conter extratos preparados em diclorometano e clorofórmio puros ou em misturas.

Com auxílio do gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 3, Figura 29, observa-se que todos os valores para a CP1 são positivos. Esta componente apresenta forte influência na concentração dos diferentes metabólitos. A Figura 30 mostra um cromatograma das amostras discriminadas pela CP1. Observa-se que o extrato 11 de grupo III apresenta maior intensidade dos picos, nos tempos de eluição de 7,5, 9,4, 14,4 e 19,9 min por estar na região mais positiva da CP1, que o extrato 10 na região menos positiva. Os loadings da CP3 mostram uma

forte influência nos tempos de retenção de 14,9 e 15,7 min na discriminação dos grupos I e II.

Comparando um espectro destes dois grupos, Figura 31, verifica que o cromatograma do grupo I apresenta um pico intenso 15,7 min, enquanto que o grupo II apresenta um pico mais intenso em 14,9 min.

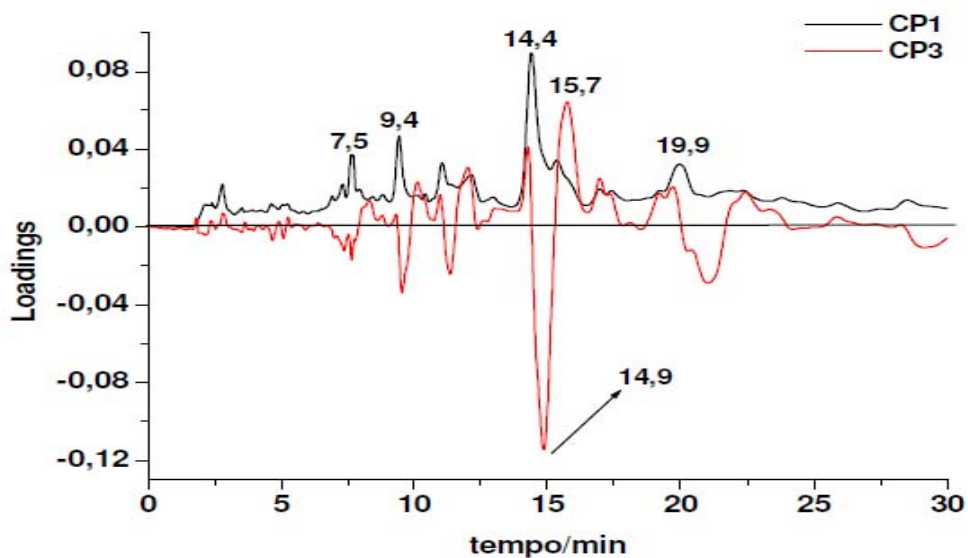


Figura 29 – Gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 3 para as 33 amostras da fase orgânica.

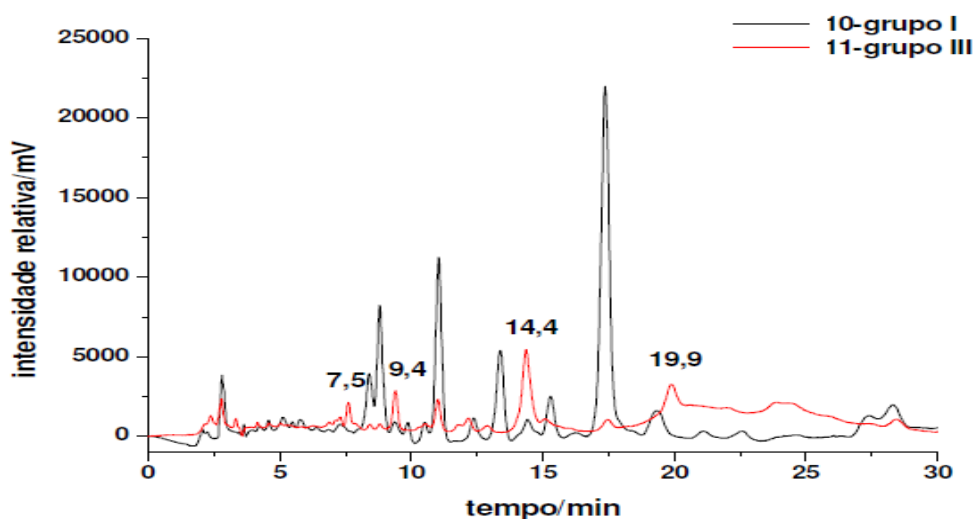


Figura 30 – Cromatogramas das amostras do grupo I e III discriminados na CP1.

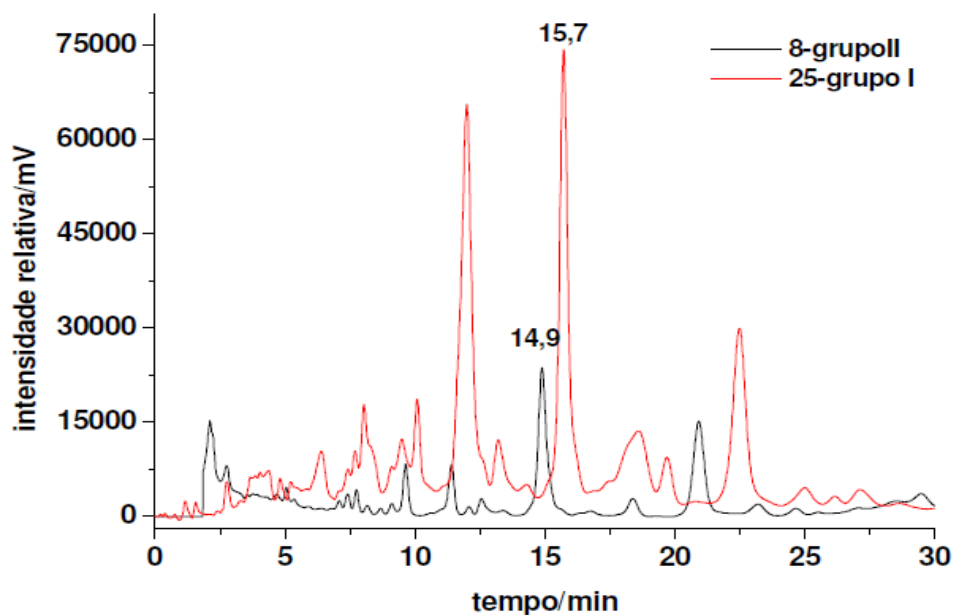


Figura 31 – Cromatogramas das amostras dos grupos I e II separados pela CP3.

Para confirmar os resultados obtidos nas componentes principais foi utilizada a análise hierárquica, Figura 32. Na distância de ligação de 2,25, pode-se observar os mesmos grupos formados, Figura 28.

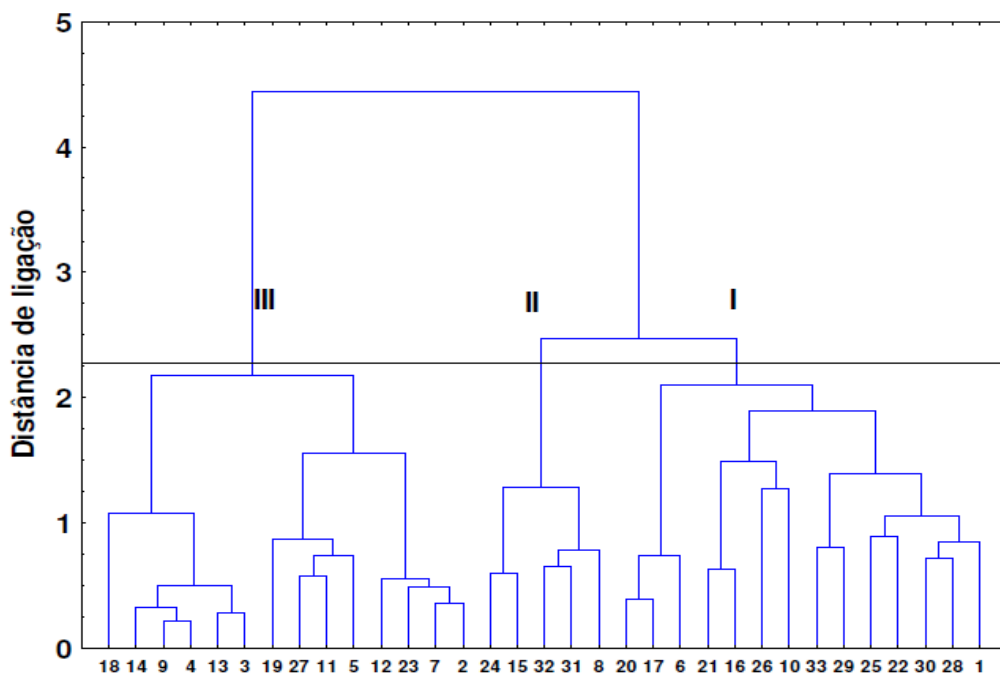


Figura 32 – Dendrograma obtido com os dados dos cromatogramas para as amostras da fase orgânica.

Os espectros obtidos na região do infravermelho para a fase orgânica foram colocados na forma de uma matriz com 31 amostras e 1866 variáveis. A Figura 33 mostra o gráfico dos escores dos fatores varimax 1x3x4. Quatro componentes principais juntas explicam 96,4% da variância contida nos dados. Nesta Figura podemos observar a formação de oito grupos distintos.

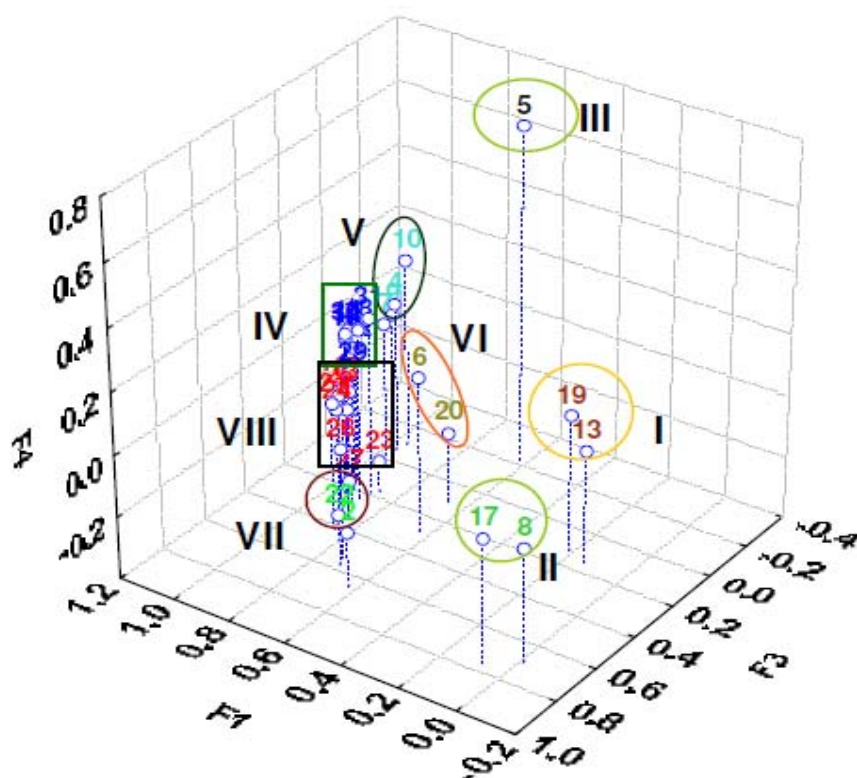


Figura 33 – Gráfico dos escores para as componentes principais 1x3x4, que juntas explicam 84,11 % da variância total dos dados.

Uma maneira de explicar a separação dos grupos é utilizando os dados de seletividade da Tabela 1. Nesta abordagem, os solventes são agrupados de acordo com o tipo de interação que são capazes de realizar com os compostos de interesse. Os parâmetros de seletividade utilizados são a acidez (α), basicidade (β) e dipolaridade (π). Os solventes ou misturas que apresentam parâmetros de seletividade similares são quimicamente semelhantes, embora possam apresentar diferentes valores de polaridade.

No grupo I predomina o diclorometano como solvente extrator, em mistura binária (diclorometano-acetona) e ternária (etanol-diclorometano-clorofórmio)

que apresenta uma alta dipolaridade (π) e baixa basicidade (β), sendo assim, este grupo deve extrair preferencialmente substâncias com capacidade de interação dipolar, como ésteres, éteres, sulfóxidos, hidroxilas, cetonas, aldeídos, e compostos nitrogenados, entre outros.

O grupo II é composto pelos solventes extratores nas misturas binárias etanol acetona e ternária etanol-acetona-clorofórmio, o grupo IV predominam misturas com três ou mais solventes extratores e na maior parte composto por misturas com acetato de etila e clorofórmio. Desse modo o grupo IV apresenta valores de π maiores que o grupo II, e valores de α e β semelhantes, com isso o grupo IV deve extrair mais compostos com interação dipolar que o grupo II.

O grupo III formado pelo clorofórmio apresenta um alto valor de acidez e zero basicidade $\beta=0$. Com estas características ele é um forte doador de prótons e um fraco receptor, assim irá interagir com compostos que apresentam caráter básico e de polaridade intermediária.

O grupo V com predominância de misturas binárias e dos solventes extratores etanol e diclorometano, apresenta um alto valor de π e valores de α e β oscilante, logo este grupo irá extrair mais compostos com interação dipolo que compostos com caráter ácido e básico.

O grupo VI e VII composto pelos solventes extratores etanol-acetato de etila-acetona e etanol-acetato de etila, acetato de etila-acetona e acetato, apresentam baixos valores α , altos valores de π e β , logo estes grupos vão preferir extrair compostos de caráter mais ácido.

Já o grupo VIII com predominância de misturas ternárias formadas principalmente por diclorometano em misturas puro. Este grupo apresenta os maiores valores de π , assim irá extrair compostos que contenham interação dipolar, halogênios, aldeídos, sulfetos, compostos com ligação nitro (-NO₂) e nitrila (-CN), entre outros.

Na Figura 34 encontra-se o gráfico dos loadings dos fatores varimax 1x3x4 *versus* número de onda (cm⁻¹).

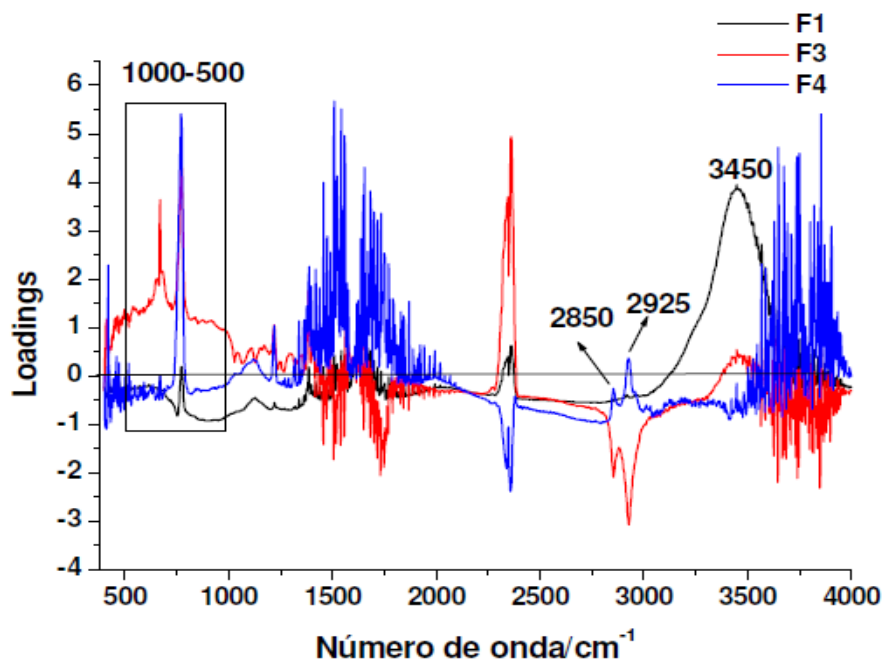


Figura 34 – Gráfico dos loadings das componentes 1x3x4 para os extratos da fase orgânica.

Na CP1 a região que discrimina é em torno de 3450 cm^{-1} característica de vibrações de deformação axial de O-H (ν O-H) de álcoois e fenóis ($3650\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$), com contribuições de absorções provenientes de deformação axial de N-H de amina secundária, amidas primárias, Figura 35. A CP3 separa as amostras na região em torno de 2925 e 2850 cm^{-1} que são picos característicos de deformações axiais simétricas e assimétricas de ν C-H de hidrocarbonetos alifáticos e de aldeídos.

A CP4 apresenta um pico intenso em 770 cm^{-1} maior que na CP1, que pode ser características de compostos com vibrações de deformação angular fora do plano de ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos ou de alquenos ($1000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$). Podem ser ainda vibrações de deformação angular simétrica fora do plano das ligações N-H de aminas ($909\text{-}667\text{ cm}^{-1}$) e amidas ($800\text{-}667\text{ cm}^{-1}$).

Na Figura 35 encontram-se os espectros das amostras 04 e 11 discriminadas pelas componentes 1x3x4, que confirmam os resultados da Figura 34. O extrato 04 que se encontra na região mais negativa da CP3 apresenta intensas bandas de absorção em 2850 e 2925 nm e em 3450 nm , porque está na região mais positiva da CP1. Na amostra 04 e amostra 11 observa-se um pico intenso em 770 nm , porque ambos se encontram na região positiva da CP4.

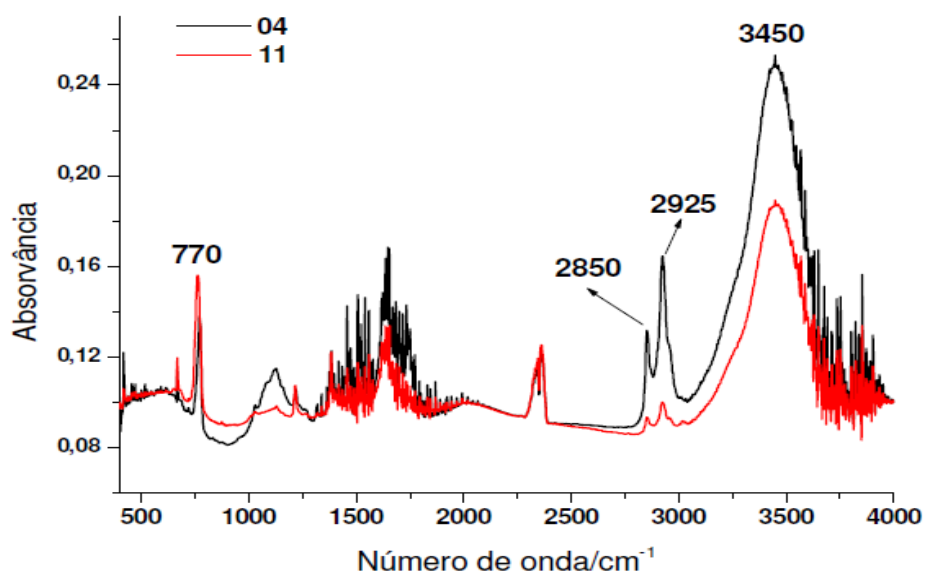


Figura 35 – Espectros de absorção no infravermelho para as amostras 04 e 11 obtidas na fase orgânica discriminadas pelas componentes 1x3x4.

A Figura 36 mostra o dendrograma obtido pela análise hierárquica, em que confirma os resultados obtidos pelo gráfico dos escores mostrado na Figura 34. Na distância de ligação de 0,75 é possível observar a separação dos oito grupos formados na projeção dos fatores varimax 1x3x4.

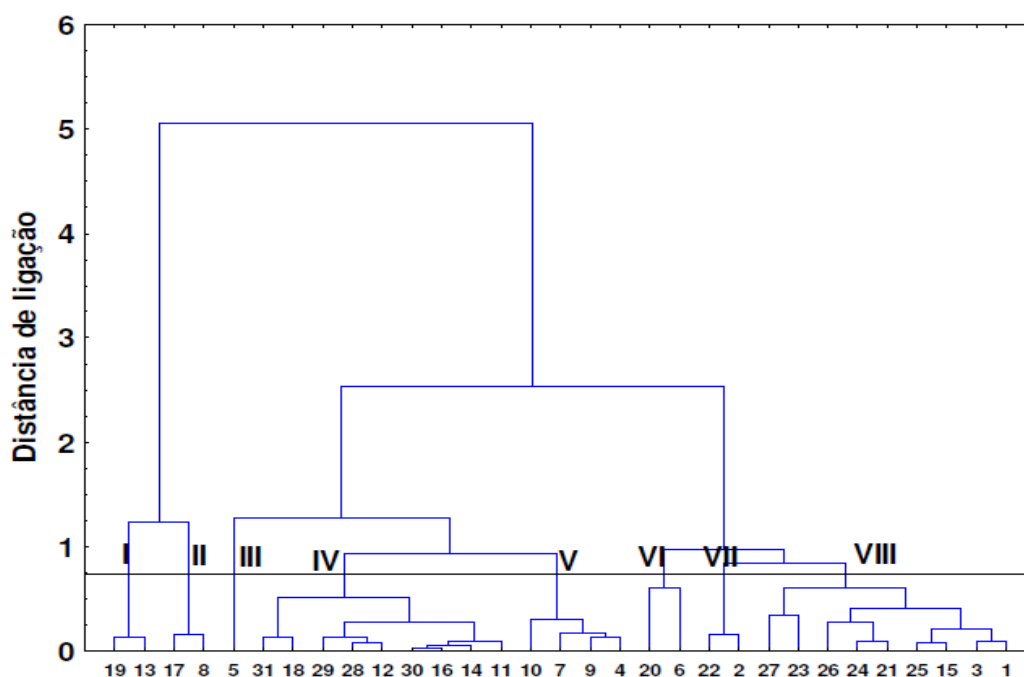


Figura 36 – Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR para as amostras da fase orgânica.

A fração básica também foi analisada por componentes principais (PCA) e análise hierárquica (HCA) para avaliar possíveis discriminações na composição química dos diversos extratos.

Os cromatogramas obtidos para os 31 pontos do planejamento com triplicata no ponto central, foram colocados na forma de uma matriz de 33x2814, que totalizou em 33 cromatogramas e 2814 variáveis, com valores de altura do pico (mV) nos diferentes tempos de retenção.

Cinco fatores varimax juntos explicam 87% da variância total contida nos dados. No gráfico dos escores estão as componentes principais 1x2x3 em três dimensões com rotação varimax que juntas explicam 81,4% da variância total, Figura 37.

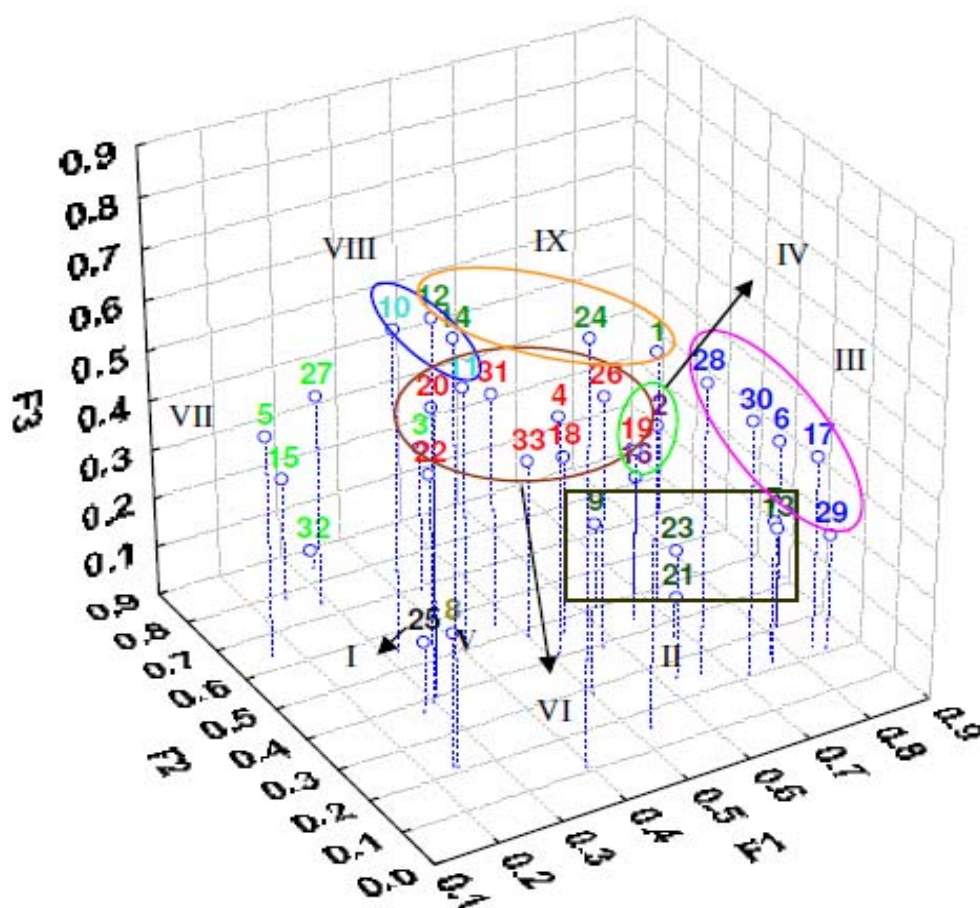


Figura 37 – Gráfico dos escores para as componentes 1x2x3 dos dados cromatográficos para os 31 extratos da fração básica.

Na Figura 37 é possível observar a separação das amostras em nove grupos distintos. Em que o grupo III encontra-se em todas as misturas o etanol como um dos solventes extratores, diferentemente do grupo VII que se encontra do lado oposto que apresenta na composição extratora os solventes diclorometano e clorofórmio em misturas ou puros. O grupo VI se difere por apresentar a maior parte misturas ternárias e quaternárias compostos pelos solventes extratores etanol acetato de etila-acetona. O grupo VIII possui todas as misturas binárias com acetato de etila, e o grupo IV encontra-se em todas as amostras acetona pura ou em misturas como um dos solventes extratores. O grupo I e V encontram-se próximos por apresentar em suas misturas etanol e acetona. Já o grupo IX se difere dos demais por apresentar em sua composição extratora maior parte dos solventes acetato de etila, acetona e clorofórmio.

Com estes resultados podemos inferir que as amostras se distanciaram com relação à composição dos extratores. Isso fica evidente quando comparamos o grupo III com o VII que estão em lados opostos na Figura 37.

Na Figura 38 encontra-se o gráfico dos loadings varimax dos fatores 1x2x3 versus tempo (min). Observa-se que o F2 discrimina as amostras que apresentam altas concentrações de compostos ou grupos de compostos que apresentam com tempos de eluição de 3,5 e 7,7 min. O F3 apresenta sinal mais intenso em 2,55 min. No fator 1, o maior valor de loading corresponde ao tempo de 2,74 min que desloca as amostras para a região mais positiva em F1 enquanto que, nos tempos de 2,55 e 7,7, min, deslocam para a região negativa em F1.

Comparando os cromatogramas das amostras separadas pelos fatores 1x2x3, Figura 39, observa-se as regiões discriminadas para as amostras 13 que apresenta um pico intenso em 2,74 min por se encontrar na região mais positiva do fator 1, enquanto que a amostra 24 apresenta um pico intenso em 2,55min discriminado pelo fator 3.

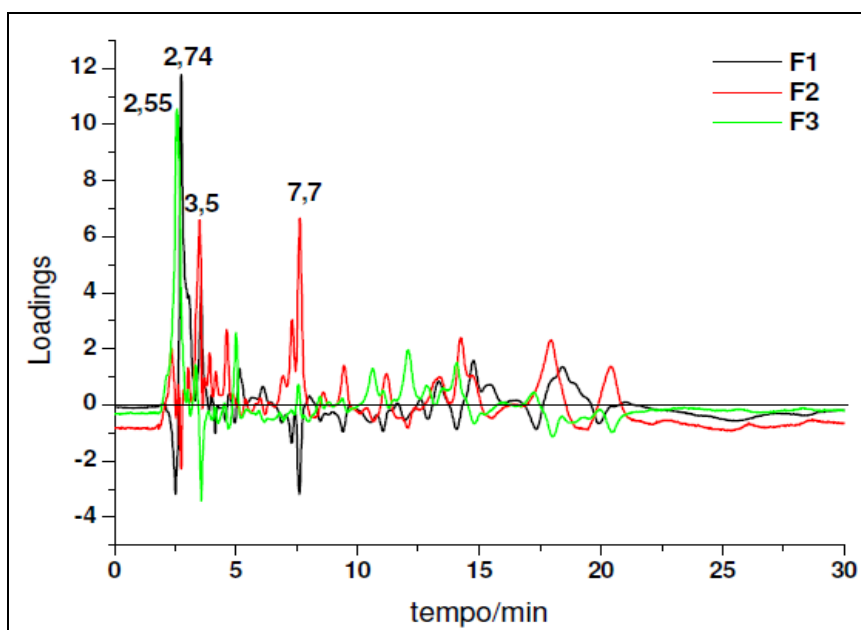


Figura 38 – Gráfico dos loadings das componentes 1x2x3 para os dados cromatográficos obtidos na fração básica.

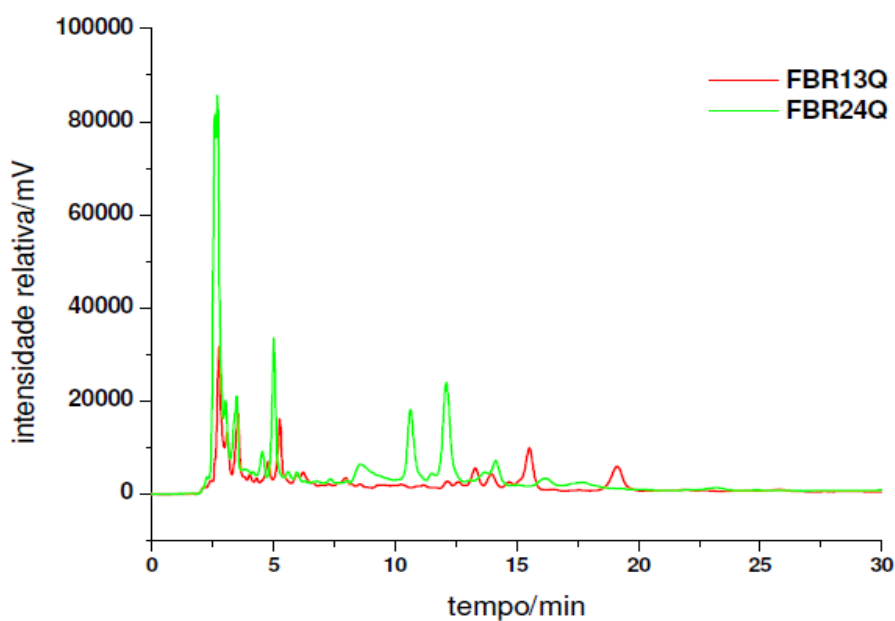


Figura 39 – Cromatogramas das amostras 13 e 24 discriminados pelos fatores 1x2x3.

Para confirmar os resultados obtidos nas componentes principais foi utilizada a análise hierárquica. E na distância Euclidiana de 0,6, do dendrograma pode-se observar os mesmos grupos formados, Figura 40.

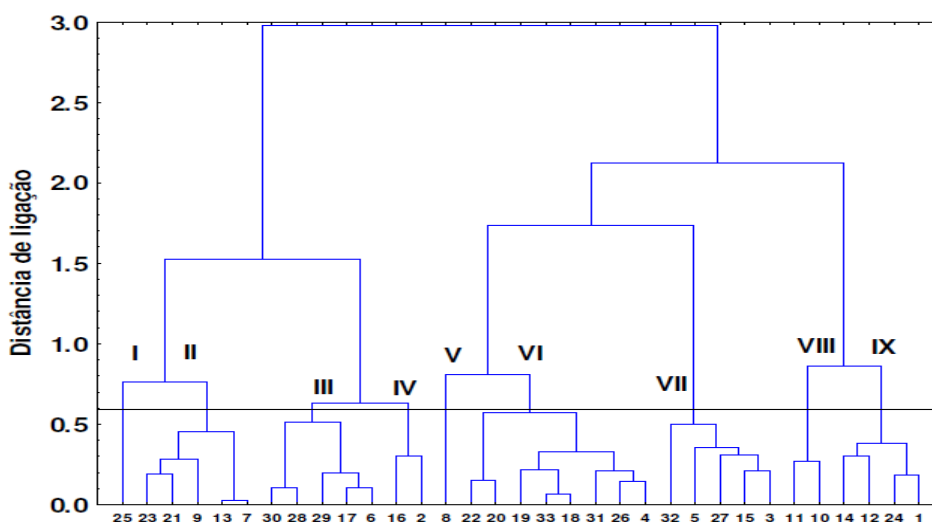


Figura 40 – Diagrama com base nos dados cromatográficos para a fração básica na fase móvel acetonitrila-metanol-água (17,5: 17,5: 65).

Os dados obtidos por FTIR para a fração básica para as 31 amostras do planejamento, Tabela 1, foram colocados em uma matriz 31x1866 (31 amostras e 1866 variáveis). A Figura 41 mostra o gráfico dos escores das componentes principais 1x2x3 em três dimensões com rotação varimax. As três componentes juntas explicam 89,9% da variância total contida nos dados. De acordo com a Figura 40 podemos observar a formação de seis grupos distintos.

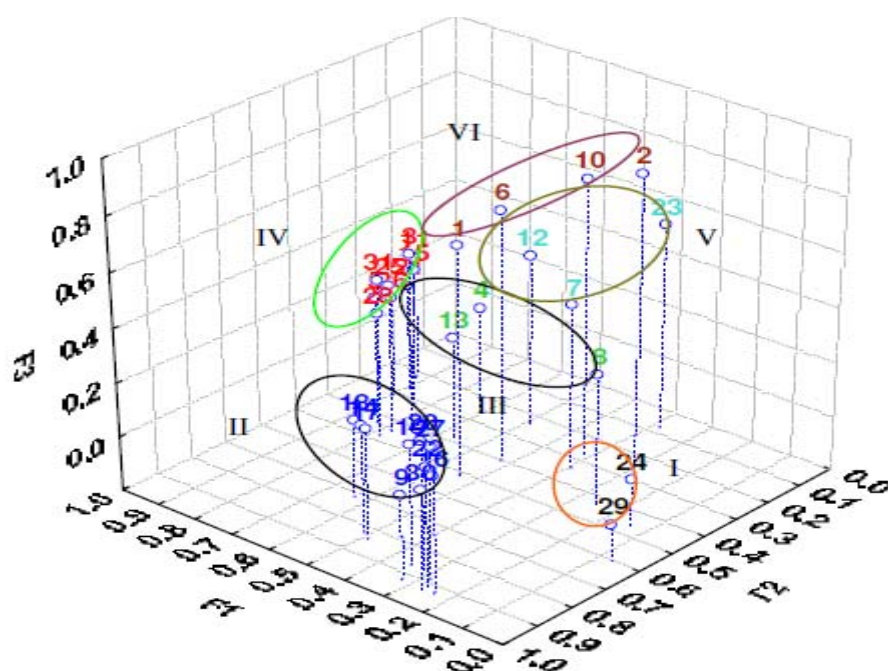


Figura 41 – Gráfico dos escores para as componentes principais 1x2x3, que juntas explicam 89,9 % da variância total dos dados.

O gráfico dos loadings dos fatores 1x2x3 versus número de onda (cm^{-1}) encontra-se na Figura 42.

A CP2 possui maior absorção na região em torno de 3440 cm^{-1} que é característica de vibrações de deformação axial de O-H (ν O-H) de álcoois e fenóis ($3650\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$), pode ter contribuições de absorções provenientes de deformação axial de N-H de amina ($3500\text{-}3310 \text{ cm}^{-1}$) e amidas ($3500\text{-}3060 \text{ cm}^{-1}$). Portanto estas vibrações de deformação podem caracterizar a presença de alcalóides que são compostos separados nesta fase do fracionamento.

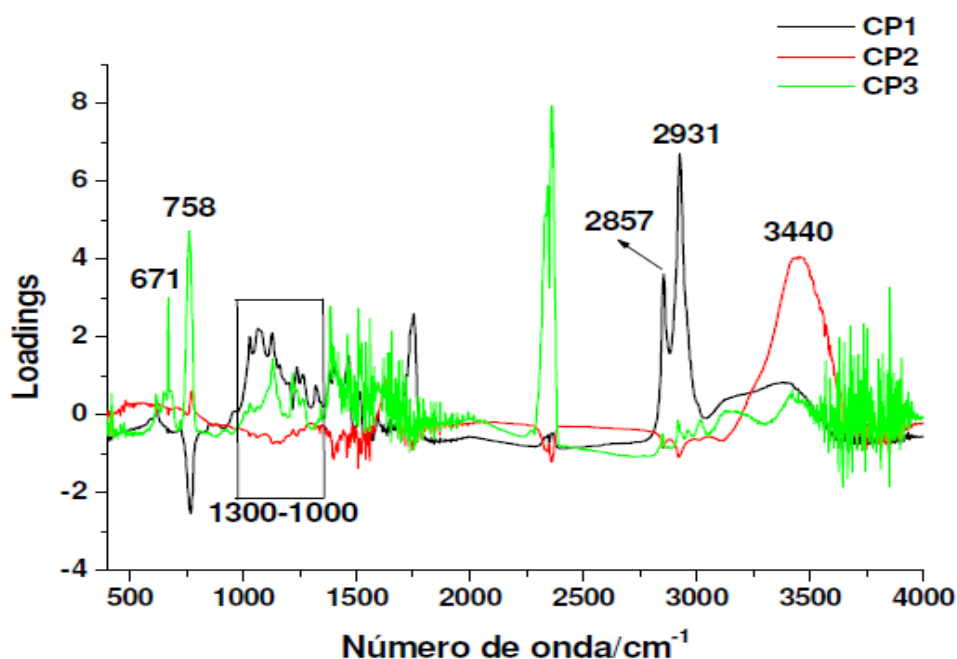


Figura 42 – Gráfico dos loadings das componentes 1x2x3 para os extratos da fração básica.

A CP1 é discriminada com intensas bandas de absorção na região entre 3000 e 2800 cm^{-1} característica de deformações axiais simétricas e assimétricas de ν C-H de hidrocarbonetos alifáticos ($3000\text{-}2840 \text{ cm}^{-1}$) e de aldeídos ($2830\text{-}2695 \text{ cm}^{-1}$).

Já a região com bandas de $1300\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ pode ser proveniente de vibrações de deformação axial de C-O de ésteres α , β -insaturados ($1300\text{-}1160 \text{ cm}^{-1}$), ou de lactonas ($1250\text{-}1111 \text{ cm}^{-1}$). Esta região pode indicar também vibrações de deformação axial de C-N de aminas aromáticas ($1342\text{-}1260 \text{ cm}^{-1}$), pode ser também a vibrações de deformação axial de C-O de ésteres de álcoois primários ($1164\text{-}1031 \text{ cm}^{-1}$) e secundários (1100 cm^{-1}). Ainda pode ser vibrações provenientes de

deformação axial da ligação C-N de aminas alifáticas ($1250-1020\text{ cm}^{-1}$), pode ser também vibrações de deformação angular da ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos ($1300-1000\text{ cm}^{-1}$), com absorção tanto para a CP1 quanto para a CP2.

A banda de absorção na região entre $1000-500\text{ cm}^{-1}$ pode ser contribuição de vibrações provenientes de deformação angular fora do plano de ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos ou de alquenos ($1000-650\text{ cm}^{-1}$). Podem ser ainda vibrações de deformação angular simétrica fora do plano das ligações N-H de aminas ($909-667\text{ cm}^{-1}$), amidas ($800-667\text{ cm}^{-1}$), ou vibrações de deformação axial de N-O de nitritos ($850-750\text{ cm}^{-1}$), região que discrimina a CP1 e a CP3.

Na Figura 43 encontra-se as bandas de infravermelho para as amostras 02 e 09 discriminadas pelas componentes 1x2x3, que comprova as regiões mostradas no gráfico dos Loadings. A amostra 09 apresenta picos de absorção intensos na região de absorção de 3440 nm , logo que se encontra na região mais positiva da CP2 que discrimina esta região. E picos intensos em 2857 e 2931 nm , discriminados pela CP1. A amostra 02 apresenta picos intensos na região de 758 nm , pois se encontra na região mais negativa da CP1.

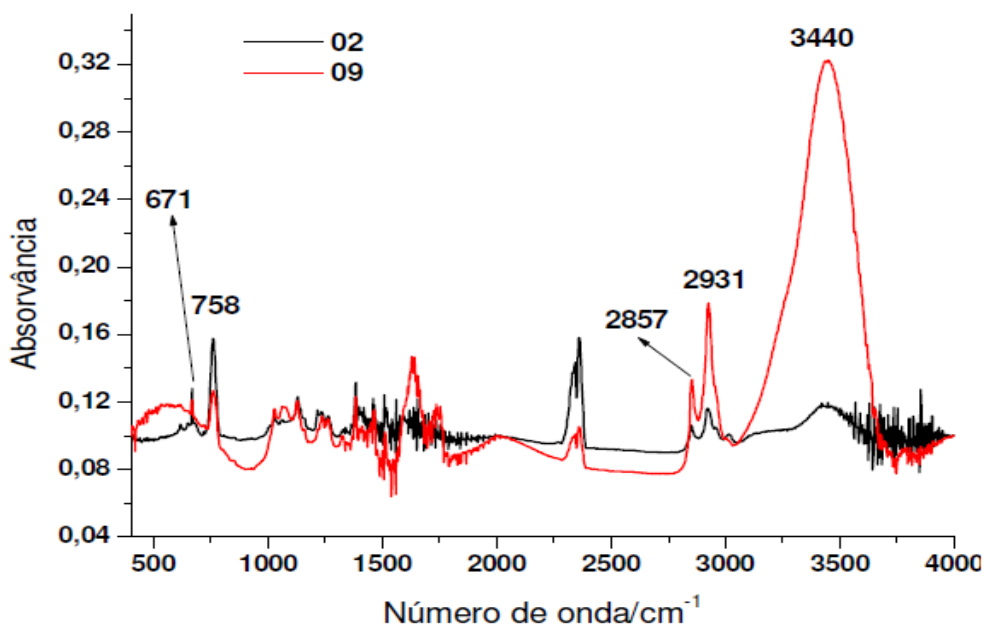


Figura 43 – Espectros de absorção no infravermelho da fração básica para as amostras 02 e 09 obtidas das folhas da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.

A Figura 44 mostra o dendrograma obtido pela análise hierárquica, em que confirma os resultados obtidos pelo gráfico dos escores mostrado na Figura

41. Na distancia de ligação 1 é possível observar a separação dos seis grupos formados na projeção das componentes 1x2x3.

No grupo I predomina os solventes extratores acetato de etila e acetona, que resulta em misturas com uma baixa acidez α , preferencialmente para a amostra 24 composta por acetato de etila-diclorometano-acetona. E o grupo III predomina em todos os extratos a acetona como solvente extrator puro ou em misturas. Estes grupos vão apresentar valores relativamente altos de π e β e baixos valores de α . Logo irá interagir melhor com substâncias de caráter mais ácido.

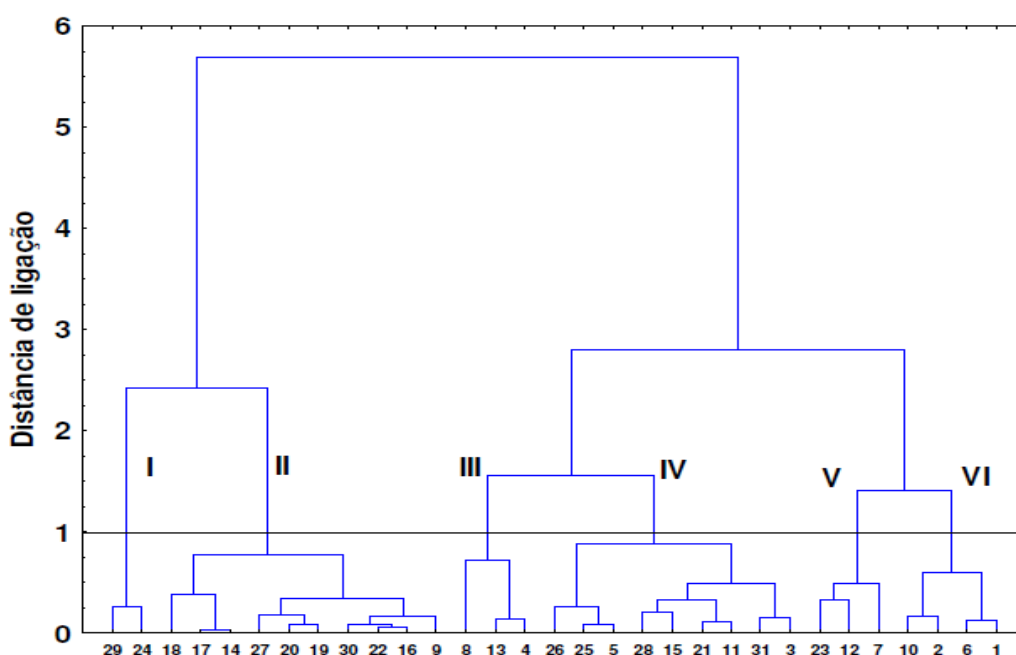


Figura 44 – Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR para as amostras da fração básica.

O grupo II possui a maior parte das amostras com misturas ternárias, e em torno de 80% destas misturas há como um dos solventes extratores o clorofórmio. Este grupo encontra-se com valores altos e baixos para α , β e π , sendo os maiores valores para π .

O grupo IV predomina em misturas ou puro o diclorometano como um dos solventes extratores, ele está presente em mais de 77% das composições. Estas amostras apresentam os maiores valores de π , e baixos valores de β . Portanto, este grupo irá extrair compostos quimicamente semelhantes, como éteres,

ésteres, sulfetos, sulfóxidos, tióis, hidroxilas, halogênios, aldeídos, cetonas, compostos com ligação nitro ($-\text{NO}_2$) e nitrila ($-\text{CN}$), entre outros.

O grupo V composto pelas misturas acetato de etila-diclorometano-clorofórmio, acetato de etila-clorofórmio e etanol-diclorometano apresenta altos valores de π e α e baixos valores de β , isso faz com que estes solventes extraiam preferencialmente compostos de caráter mais básico.

Já o grupo VI possui como solvente extrator o acetato de etila em torno de 60% nas misturas ou puro. Este grupo possui valores altos de β e π e baixos valores de α . Sendo fortes receptores de prótons, e irá interagir melhor com compostos que são fortes doadores de prótons, tais como ácidos carboxílicos, álcoois, fenóis, entre outros.

Para encontrar a relação entre os parâmetros de seletividade, polaridade (P) e constante dielétrica (E) e os rendimentos das frações, foi utilizada a projeção das variáveis no plano dos fatores 1x2 da análise de componentes principais. O gráfico desta projeção está ilustrado na Figura 45.

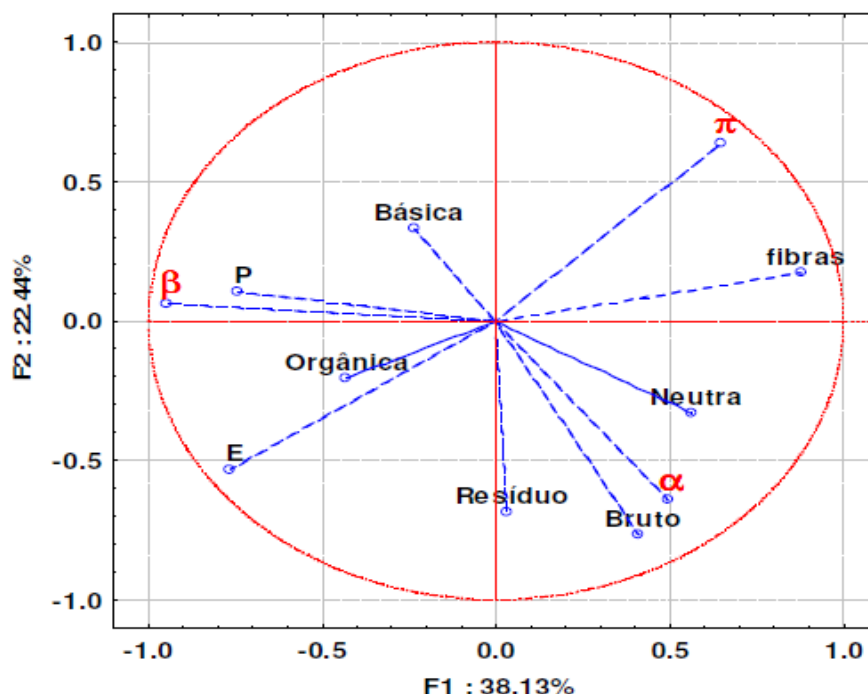


Figura 45 – Projeção das variáveis no plano dos fatores 1x2.

Nesta figura, observa-se que os rendimentos das frações resíduos (fração não solúvel no fracionamento) e a fração orgânica e o rendimento bruto, encontra-se entre os valores de α e β , enquanto que as frações neutras, fibras estão localizados entre os valores de a e p . O rendimento da fração básica está localizado entre os parâmetros β e π . Este resultado evidencia de modo geral a relação da composição dos extratos com os parâmetros de seletividade.



Capítulo V
Conclusão

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho com o auxílio do planejamento estatístico centróide simplex de cinco solventes para obtenção dos extratos a partir das folhas secas da *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill foi possível encontrar a melhor composição da mistura de solventes extratores para obter o maior rendimento do extrato bruto e quatro frações.

- ✓ Para o extrato bruto o rendimento foi 1,5380 g de extrato para 20 g de amostra obtido com uma mistura ternária etanol-diclorometano-clorofórmio (1/3: 1/3: 1/3) (v/v/v);
- ✓ Para a fração neutra o rendimento foi 0,5765 g obtido em uma mistura ternária etanol-diclorometano-clorofórmio (1/3:1/3:1/3) (v/v/v);
- ✓ Para a fase orgânica o rendimento foi 0,2373 g obtido em uma mistura quaternária etanol-acetato de etila-acetona-clorofórmio (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v/v);
- ✓ Para a fração básica o rendimento foi 0,0111 g para uma mistura quíntupla etanol-acetato de etila-diclorometano-acetona-clorofórmio (1/5: 1/5: 1/5: 1/5: 1/5) (v/v/v/v/v), com destaque para o acetato de etila que apresentou o maior rendimento na fração em misturas e puro em relação aos demais solventes extratores;
- ✓ E para as fibras o mais indicado é o solvente puro diclorometano que obteve um rendimento de 0,2772 g.

Com o auxílio da cromatografia líquida de alta eficiência foi possível distinguir qual composição do solvente extrator que removeu maior diversidade de metabólitos (maior número de picos cromatográficos) analisados na fase móvel acetonitrila metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v):

- ✓ Entre os solventes puros para a fase orgânica o extrato obtido com acetona foi o que apresentou menor número de picos cromatográficos (23 picos);
- ✓ O maior rendimento na fase orgânica foi obtido na mistura quaternária etanol-acetato de etila-acetona-clorofórmio, (1/4: 1/4: 1/4: 1/4)(v/v/v/v) que apresentou 31 picos cromatográficos;
- ✓ A mistura ternária composta por diclorometano-acetona-clorofórmio (1/3: 1/3: 1/3) (v/v/v) com o nono maior rendimento obteve o maior número de picos cromatográficos na fase orgânica de 39 picos;
- ✓ Os extratos preparados com os solventes puros diclorometano e acetona foram os únicos que apresentaram um pico cromatográfico no tempo de retenção de 37,3 min para a fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5:65 (v/v/v) na fase orgânica. Sendo que a maior intensidade do pico cromatográfico foi obtido em acetona pura. Este poderia ser um diferencial na espécie *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill;
- ✓ O extrato preparado na mistura quaternária etanol-acetato de etila diclorometano-acetona (1/4: 1/4: 1/4: 1/4) (v/v/v: v), foi o que apresentou picos cromatográficos em tempos de retenção diferente (35,8 min (1) e 44,8 min (2)) das demais amostras na fase móvel acetonitrila-metanol-água 17,5: 17,5: 65 (v/v/v).
- ✓ Na fração básica o extrato obtido com clorofórmio foi o que apresentou menor rendimento comparado aos demais solventes puros e 25 picos cromatográficos;
- ✓ Na fração básica a mistura quinária etanol-acetato de etila-diclorometano acetona-clorofórmio (1/5: 1/5: 1/5: 1/5/1/5)(v/v/v/v/v)

foi a que obteve o maior rendimento apresentando 22 de picos cromatográficos;

- ✓ A mistura etanol-acetona (1/2: 1/2) (v/v) apresentou o maior número de picos cromatográficos na fração básica, 45 picos;

De acordo com estes resultados podemos inferir que o maior rendimento não implica em maior diversidade de metabólitos tanto para a fase orgânica quanto para a fração básica.

- ✓ Para obter um perfil cromatográfico bem informativo para a espécie *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill é melhor utilizar a fase móvel composta por acetonitrilametanol- água na proporção 17,5:17,5:65 (v/v/v) junto com a mistura. Ternária composta por diclorometano-acetona-clorofórmio (1/3: 1/3: 1/3) (v/v/v) para a fase orgânica que apresentou 39 picos, e para a fração básica a mistura binária etanol-acetona (1/2: 1/2) (v/v) com 45 picos cromatográficos;

A aplicação dos métodos quimiométricos associados à análise pela CLAE foi possível:

- ✓ Separar os extratos em três grupos na fase orgânica conforme a composição extratora de cada grupo;
- ✓ Separar os extratos em nove grupos na fração básica conforme a composição extratora de cada grupo;

Este resultado mostra que a composição química da fase básica sofre mais influência do sistema extrator que a fase orgânica, ou seja, a fração básica tem nove conjuntos de composições químicas diferentes.

A aplicação dos métodos quimiométricos associados à análise por infravermelho foi possível:

- ✓ Traçar o perfil dos diferentes extratos identificando qualitativamente oito grupos na fração orgânica e seis grupos na fração básica;
- ✓ Identificar qualitativamente os grupos de composição química diferente presentes nos extratos da fração orgânica e da fração básica;
- ✓ Determinar as regiões discriminatórias de grupos funcionais para discriminar a composição química dos diferentes extratos;

Na escolha dos solventes extratores de acordo com os parâmetros de seletividade de Snyder, pode-se observar que:

- ✓ Os solventes ou misturas que apresentaram os parâmetros de seletividade similares são quimicamente semelhantes, embora possam apresentar diferentes valores de polaridade.



Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC. p. 1090, 2004
2. MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 9, n. 3, p. 89-99, 2007.
3. BARRACA, S. M. **Relatório do Estágio Supervisionado Produção Vegetal-II: manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas**. Piracicaba: Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura“Luiz de Queiroz” Departamento de Produção Vegetal, 1999.
4. ARAÚJO, M. E. M. **Química Analítica Aplicada aos Produtos Naturais**. Lisboa: FCUL, 2005. Curso de mestrado em Química Analítica Aplicada, Faculdade de Ciências da universidade de Lisboa, 2005.
5. PEREIRA, C. G.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, A. A. Extraction and isolation of índole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC: Technical and economical analysis. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 40, p. 232–238, 2007.
6. LING, J. Y.; ZHANG, G. Y.; CUI, Z. J.; ZHANG, C. K. Supercritical fluid extraction of quinolizidine alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. and purification by high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1145, p.123–127, 2007.
7. ZAGOSKINA, N. V.; OLENICHENKO, N. A.; YUN'VEI, C.; ZHIVUKHINA, E. A. Formation of Phenolic Compounds in Various Cultivars of Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 99-102, 2005.
8. BURNS, J.; FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. **Phytochemistry**. v. 62, p. 939–947, 2003.
9. TABART, J.; KEVERS, C.; SIPEL, A.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J.; DOMMES, J. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. **Food Chemistry**. v. 105, p. 1268-1275, 2007.
10. SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolics acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 910, p. 265-273, 2001.
11. SINGH, B.; KAUR, P.; GOPICHAND.; SINGH, R. D. AHUJA, P. S. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. **Fitoterapia**. v. 79, p. 401–418, 2008.

12. JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 799, p. 101-110, 1998.
13. ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. **The Analyst**. v. 122, p. 11-34, 1997.
14. HUCK, C. W.; BUCHMEISER, M. R.; BONN, G. K. Fast analysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection on poly(carboxylic acid)- coated silica and electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 943, p. 33–38, 2001.
15. ARCAS, M. C.; BOTÍA, J. M.; ORTUÑO, A. M.; DELRIO, J, A. UV irradiation alters the levels of flavonoids involved in the defence mechanism of *Citrus aurantium* fruits against *Penicillium digitatum*. **European Journal of Plant Pathology**. v. 106, p. 617–622, 2000.
16. TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**. v. 812, p. 85-99, 2004.
17. ALMELA, L.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, B.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A.; ROCA, M. J. RABE, V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography A**. v. 1120, p. 221-229, 2006.
18. MINHO, A. P. **Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódes gastrointestinais em ovinos**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2006. Tese de Doutorado, 2006.
19. MARTINO, E.; RAMAIOLA, I.; URBANO, M.; BACCO, F.; COLLINA, S. Microwaveassisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**. v. 1125, p. 147-151, 2006.
20. HOUGHTON, P. J.; MENSAH, A. Y.; LESSA, N.; HONG, L. Y. Terpenoids in Buddleja: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. **Phytochemistry**. v. 64, p. 385–393, 2003.
21. LIYANA-PATHIRANA, L. C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**. v. 93, p. 47-56, 2005.
22. GATTI, R.; GIOIA, M. G.; CAVRINE, V. Determination of *Cinchona* alkaloids and vitamin B6 by high-performanca liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**. v. 512, p. 85-91, 2005.
23. ROWLAND, I. Optimal nutrition: fibre and phytochemicals. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 58, p. 415-419, 1999.

24. CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaedum tuberosum* Ruiz e Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**. v. 55, p. 217-225, 2007.
25. CHRISTOV, R.; BANKOVA, V. Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents from propolis using an electron-capture detector. **Journal of Chromatography**. v. 623, p. 182-185, 1992.
26. XIE, J.; ZHU, L.; LUO, H.; ZHOU, L.; LI, C.; XU, X. Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginkgo leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin. **Journal of Chromatography A**. v. 934, p. 1–11, 2001.
27. WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**. v. 106, p. 804-810, 2008.
28. SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Ingá edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**. v. 55, p. 381-387, 2007.
29. VALANT-VETSCHERA, K. M.; FISCHER, R.; WOLLENWEBER, E. Exudate flavonoids in species of *Artemisia* (Asteraceae—Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p.487–498, 2003.
30. GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Determination of molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp) seed extracts: Correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**. v. 89, p. 1-9, 2005.
31. PAULO, A.; HOUGHTON, P. J. Chemotaxonomic analysis of the genus *Cryptolepis*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p. 155-166, 2003.
32. KEINÄNEN, M.; JULKUNEN-TITTO, R. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. **Journal of Chromatography A**. v. 793, p. 370–377, 1998.
33. PALOMINO, O. M.; GOMEZ-SERRANILLOS, P.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Highperformance liquid chromatography of flavonoids from *Sideritis* species. **Journal of Chromatography A**. v. 731, p. 103-108, 1996.
34. SHMIDT, T. J.; MERFORT, I.; WILLUHN, G. Gas chromatography-mass spectrometry of flavonoid aglyconesII*. Structure-retention relationships and a possibility of differentiation between isomeric 6- and 8-methoxyflavones. **Journal of Chromatography A**. v. 669, p. 236- 240, 1994.
35. SHMIDT, T. J.; MERFORT, I.; Matthiesen, U. Resolution of complex mixtures of flavonoid aglycones by analysis of gas chromatographic-mass spectrometric data. **Journal of Chromatography**. v. 634, p. 350-355, 1993.

36. BORDIGNON, S. A. L.; MONTANHA, J. A.; SCHENKEL, E. P. Flavones and flavanones from South American *Cunila* species (Lamiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p.785–788, 2003.
37. ZHANG, J.; YU, Y.; LIU, D.; LIU, Z. Extraction and composition of three naturally occurring anti-cancer alkaloids in *Camptotheca acuminata* seed and leaf extracts. **Phytomedicine**. v. 14, p. 50-56, 2007.
38. THEUNIS, M. H. B. L.; FOUBERT, K.; POLLIER, J. Determination of saponins in *Maesa lanceolata* by LC-UV: development and validation. **Phytochemistry**. v. 68, p. 2825-2830, 2007.
39. GANZERA, M.; GAMPENRIEDER, J.; PAWAR, R. S. Separation of the major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**. v. 516, p. 149-154, 2004.
40. LI, L.; TSAO, R.; DOU, J.; SONG, F.; LIU, Z.; LIU, S. Detection of saponins in extract of *Panax notoginseng* by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 536, p. 21-28, 2005.
41. BAETAS, A. C. S.; ARRUDA, M. S. P.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Coumarins and Alkaloids from the Stems of *Metrodorea Flavida*. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v. 10, n. 3, p. 181-183, 1999.
42. GONÇALVES, C. A.; LELIS, R. C. C. Teores de taninos da casca e da madeira de cinco leguminosas arbóreas. **Floresta e Ambiente**. v. 8, n.1, p.167-173, 2001.
43. BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M. A.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Anonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanismis of action. **The Royal Society of Chemistry**. v. 36, n. 31, 269-303, 2005.
44. SHI, G.; MACDOUGA, J. M. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from *rollinia mucosa*. **Phytochemistry**. v. 45, n. 4, p. 719-723, 1997.
45. LIAW, C.; CHANG, F.; CHEN, Y.; CHIU, H.; WU, M.; WU Y. New Annonaceous Acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**. v. 62, n. 12, p. 1613-1617, 1999.
46. CHEN, Y.; CHANG, F.; WU, Y. Isoquinoline Alkaloids and Lignans from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**. v. 59, n. 9, p. 904-906, 1996.
47. NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2 ed., Campinas: Editora da UNICAMP. p. 313- 319, 2001.
48. LONNI, A. A. S. G. **Caracterização e identificação química da carquejas do gênero Baccharis por métodos quimiométricos**. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

49. JORESKOG, K. G.; KLOVAN, J. E.; REYMENT, R. A. Geological factor Analysis. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v. 43, n. 3, p.450, 1976. 50. SILVA, L. M. C. **Estudo exploratório de extratos de carquejas por FTIR, CLAE e métodos quimiométricos**. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.
51. SNYDER, L. R.; CARR, P. W.; RUTAN, S. C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. **Journal of Chromatography A**. v. 656, n. 1-2, p. 537-547, 1993.
52. DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora Unesp, 1996.
53. Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. Editora American Society of Plant Physiologists. v. 24, p. 1250-1318, 2000.
54. DELAROZA, F.; SCARMINIO, I. S. Mixture design optimization of extraction and mobile phase media for fingerprint analysis of *Bauhinia variegata* L. **Journal of Separation Science**. v. 31, p. 1034-1041, 2008.