



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SABRINA AFONSO

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE PROCESSOS DE
SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM
ANNONACEAE**

Londrina
2016

SABRINA AFONSO

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE PROCESSOS DE
SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM
ANNONACEAE**

Tese apresentada por Sabrina Afonso ao Programa de Doutorado em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Afonso, Sabrina.

Análise exploratória de processos de separação de metabólitos secundários em Annonaceae / Sabrina Afonso. - Londrina, 2016.
130 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Annonaceae - Teses. 2. impressão digital - Teses. 3. planejamento centroide-simplex - Teses. 4. métodos quimiométricos - Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

SABRINA AFONSO

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ANNONACEAE**

Tese apresentada por Sabrina Afonso ao Programa de Doutorado em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora : Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Isabel Craveiro Moreira
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Profa. Dra. Audrey Alessandra Stingen Garcia
Lonni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Dionísio Borsato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de maio de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar o meu caminho.

A minha família, pela confiança depositada em mim, e em especial, a minha irmã Renata que esteve comigo me ajudando durante todo o tempo.

A Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio, pela orientação, apoio, confiança e amizade durante todo o trabalho.

Aos professores e técnicos do Departamento de Química e Programa de Doutorado em Química da Universidade Estadual de Londrina pela contribuição na minha formação.

Aos professores e amigos da Universidade Nacional de Rosário na Argentina, em especial ao Alejandro Olivieri e Pablo Pisano, pelos ensinamentos, carinho e confiança no trabalho.

Ao professor Roy Bruns e Arnaldo Silva, pela contribuição nas discussões do trabalho e realização dos cálculos teóricos.

Aos amigos e parceiros científicos do LQCN, Gustavo e Fabiano, pela amizade e contribuição em cada parte do trabalho.

Aos amigos do LQCN, Pedro, Galileu, Amélia, Guilherme Santana, Guilherme Scheel, Patrícia, Filipe, Fernanda, Elis e Ivanira, pela ajuda nas etapas do trabalho.

As amigas do LEMA, Renata e Adriana, pela amizade incondicional.

Aos amigos do LAES, Carlos e Jéssica, pela alegria em todos os momentos.

Ao CNPq, Capes e Fundação Araucária pelo financiamento e bolsas concedidas.

*Aos meus pais, Laudemiro e Fátima e às
minhas irmãs, Manoela e Renata, pelo
apoio, amor e confiança.*

AFONSO, Sabrina. **Análise exploratória de processos de separação de metabólitos secundários em Annonaceae**. 2016. 130 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Métodos quimiométricos foram associados a dados espectroscópicos e cromatográficos para discriminar amostras de folhas autossombreadas e expostas ao sol de *Annona muricata* e *Rollinia mucosa* coletadas nas diferentes estações climáticas. As extrações das folhas das duas espécies da família Annonaceae foram realizadas seguindo um planejamento de misturas do tipo centroide-simplex com cinco solventes: etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio. A impressão digital metabolômica das duas espécies foram obtidas por técnicas cromatográficas (CLAE-DAD) e espectroscópicas (UV-Vis, IV, EM, RMN). O rendimento dos extratos foi analisado por metodologia de superfície de resposta. Com a aplicação de modelos estatísticos foi possível verificar que o etanol ou suas misturas extraem maior quantidade de compostos das plantas, além de provar que o rendimento é influenciado pela época da coleta, exposição solar da planta e parâmetros solvatrocromicos dos solventes. Análise de componentes principais (ACP), resolução multivariada de curvas (MCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) aplicados aos dados cromatográficos e espectroscópicos mostraram ser ferramentas úteis na investigação da composição química dos extratos e indicaram a presença das acetogeninas, que são compostos que apresentam atividade antitumoral. Esse resultado foi confirmado pelos dados de espectroscopia de massas e RMN e cálculos teóricos da intensidade das bandas de infravermelho. Os métodos quimiométricos associados aos dados obtidos mostraram diferença de quantidade e/ou variedade de acetogeninas e pigmentos presentes na *Annona muricata* e *Rollinia mucosa* dependendo da quantidade de radiação solar que a planta recebe ou a época em que é coletada.

Palavras-chave: Annonaceae. Planejamento centroide-simplex. Impressão digital. Métodos quimiométricos.

AFONSO, Sabrina. **Exploratory analysis of secondary metabolites separation processes in Annonaceae.** 2016. 130 p. Thesis (Doctoral degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Chemometrics methods were associated with chromatographic and spectroscopic data to discriminate samples self-shaded and sun exposed leaves of *Annona muricata* and *Rollinia mucosa* collected in different seasons. Leaves extractions of both species of Annonaceae family were conducted using centroid simplex design mixtures with five solvents: ethanol, ethyl acetate, dichloromethane, acetone and chloroform. Metabolomics fingerprint of both species were obtained by chromatographic (HPLCDAD) and spectroscopic (UV-Vis, IR, MS, NMR) techniques. Extracts yields were analyzed by response surface methodology. With statistical models application was possible to verify that extracts of ethanol or mixtures thereof extracts the greater amount of plant compounds and proved that the yield is influenced by the season time, sun exposition and solvatochromic parameters of solvents. Principal component analysis (PCA), multivariate curve resolution (MCR) and partial least squares regression (PLS) applied to chromatographic and spectroscopic data have proved to be useful tools in the investigation of the chemical composition of extracts and indicated the presence of acetogenins, which are compounds which antitumor activity. This result was confirmed by mass spectroscopy and NMR data and theoretical calculations of the IR bands intensity. The chemometric methods associated with the data obtained show a difference of quantity and/or variety of acetogenins and pigments present in *Annona muricata* and *Rollinia mucosa* depending on the amount of sunlight the plant receives or the season it is collected.

Keywords: Annonaceae. Centroid-simplex design. Fingerprint. Chemometric methods.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

- Figura 1.** Esquema do metabolismo vegetal 2
- Figura 2.** Estrutura básica das acetogeninas..... 5
- Figura 3.** Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes 15

CAPÍTULO II - Planejamento estatístico de mistura de solventes como ferramenta no processo de extração de metabólitos extraídos de folhas de *Annona muricata*

- Figura 1.** Planejamento centroide simplex de misturas para os solventes: etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio, detalhados na Tabela 1 35
- Figura 2.** Triângulo de seletividade baseado nos dados solvatocrômicos da Tabela 2 38
- Figura 3.** Porcentagem dos rendimentos dos extratos brutos das folhas de *Annona muricata* expostas ao sol e autossombreadas, coletadas na Primavera, Verão, Outono e Inverno, de acordo com o planejamento experimental 41
- Figura 4.** Curvas de nível para os rendimentos dos extratos das folhas de *Annona muricata* expostas ao sol e autossombreadas, coletadas nas estações da Primavera, Verão, Outono e Inverno 47
- Figura 5.** Análise de fatores dos espectros na região do UV-Vis dos extratos das folhas de *Annona muricata* coletadas no verão 49
- Figura 6.** Escores dos fatores 1 e 3 dos espectros na região do infravermelho dos extratos das folhas autossombreadas e expostas ao sol e coletadas no verão 51
- Figura 7.** Espectros de infravermelho dos extratos discriminados nos escores do F1 × F3 das folhas de *Annona muricata* autossombreadas (Sb) e expostas ao sol (Sol) e coletadas no verão 52
- Figura 8.** Espectros de infravermelho discriminados no gráfico dos escores dos extratos de folhas de *Annona muricata* coletadas no verão..... 53
- Figura 9.** Número de picos cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para os extratos das folhas de *Annona muricata* autossombreadas e expostas ao sol, coletadas no verão..... 55

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 10. Escores do Fator 1 □ Fator 2 dos cromatogramas dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> autossombreadas e expostas ao sol coletadas no verão | 56 |
| Figura 11. Loadings do Fator 2 dos cromatogramas e espectros correspondentes aos picos cromatográficos em 0,91 min; 1,40 min e 2,58 min dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> autossombreadas e expostas ao sol coletadas no verão | 57 |

CAPÍTULO III - Evidência da ligação de hidrogênio nas estruturas moleculares das acetogeninas através de espectros de infravermelho e cálculos da teoria do funcional de densidade

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Estrutura molecular das acetogeninas: (1) goniotetracina, (2) (2,4-cis)-gonioeninine, (3) montecristina, (4) uvarigina, (5) rollidecina, (6) triobalicina e (7) geniotriocina | 68 |
| Figura 2. Espectros de infravermelho da amostra com a mistura etanol-acetato de etilclorofórmio (1:1:1) para as quatro estações em condições, a) expostas ao sol e b) sombreadas | 70 |
| Figura 3. Espectros de infravermelho da amostra com etanol puro para as quatro estações em condições, a) expostas ao sol e b) sombreadas..... | 71 |
| Figura 4. Escores das componentes principais para todas as quatro estações. Triângulos pretos representam amostras sombreadas e triângulos vermelhos representam amostras expostas ao sol..... | 73 |
| Figura 5. Loadings das componentes principais para todas as quatro estações..... | 74 |
| Figura 6. Esqueletos moleculares, estruturas teóricas de equilíbrio e detalhe das regiões de ligação de hidrogênio de algumas acetogeninas representativas..... | 77 |

CAPÍTULO IV - Determinação da influência das condições sazonais e luminosidade solar na composição dos metabólitos de folhas de *Rollinia mucosa* por técnicas espectroscópicas e cromatográficas

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Escores do Fator 1 × Fator 5 dos cromatogramas dos extratos do planejamento experimental de folhas de <i>Rollinia mucosa</i> sombreadas e expostas ao sol e coletadas no a) inverno e b) verão..... | 94 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 2. Escores do Fator 1 × Fator 5 dos cromatogramas dos extratos do planejamento experimental de folhas de <i>Rollinia mucosa</i> sombreadas e expostas ao sol e coletadas no verão excluindo o extrato diclorometano:clorofórmio..... | 95 |
| Figura 3. Loadings do Fator 5 da análise de fatores e os respectivos espectros UV-DAD de folhas sombreadas e expostas ao sol coletadas no inverno da <i>Rollinia mucosa</i> | 96 |
| Figura 4. Loadings do fator 5 da análise de fatores e os respectivos espectros UV-DAD de folhas sombreadas e expostas ao sol coletadas no verão da <i>Rollinia mucosa</i> | 97 |
| Figura 5. Escores da análise de fatores do F3 × F4 dos espectros de infravermelho dos extratos do planejamento experimental de folhas de <i>Rollinia mucosa</i> sombreadas e expostas ao sol coletadas na a) primavera, b) verão, c) outono e d) inverno..... | 99 |
| Figura 6. Loadings da ACP dos espectros de infravermelho de folhas de sombreadas e expostas ao sol coletadas na a) primavera, b) verão, c) outono e d) inverno..... | 100 |
| Figura 7. Estrutura da γ -lactona α,β -insaturada e do anel mono-tetrahidrofurano com duas hidroxilas nos carbonos adjacentes, presentes em diversas acetogeninas..... | 102 |

CAPÍTULO V - Discriminação dos extratos de *Annona muricata* e *Rollinia mucosa* por resolução multivariada de curvas e regressão por mínimos quadrados parciais dos dados de cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1. Superfície tri-dimensional dos dados obtidos por CLAE-DAD (0-5 min e 190- 400 nm) do extrato com etanol das folhas autossombreadas e coletadas no inverno da <i>Annona muricata</i> | 115 |
| Figura 2. Perfil do tempo de eluição para os 10 constituintes determinados por MCRALS para: (a) amostras extraídas com misturas de solventes contendo etanol, (c) amostras extraídas com misturas de solventes contendo acetona, e (d) amostras extraídas com misturas de solventes contendo clorofórmio. Em (b), perfil espectral no modo aumentado (5 amostras dos espectros recuperados da <i>Annona muricata</i> coletada no | |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| inverno em condições autossombreadas) para misturas de solventes contendo etanol..... | 119 |
| Figura 3. Discriminação das amostras de <i>Annona muricata</i> (A) em condições autossombreadas (Sb) e expostas ao sol (Sol) e coletadas durante o inverno (I) e verão (V) através da ACP dos escores do MCR-ALS. (a) amostras extraídas com etanol puro e suas misturas. (b) amostras extraídas com acetona pura e suas misturas. (c) amostras extraídas com clorofórmio puro e suas misturas..... | 121 |
| Figura 4. Loadings das componentes principais, em função dos dez componentes resolvidos por MCR-ALS. (a) amostras extraídas com etanol e as suas misturas; (b) amostras extraídas com acetona e suas misturas; e (c) amostras extraídas com clorofórmio e suas misturas | 122 |
| Figura 5. Espectros UV-Vis dos dois componentes relevantes resolvidos por MCR-ALS para cada solvente e suas misturas. (a) etanol e suas misturas (componentes 1 e 4); (b) acetona e suas misturas (componentes 4 e 7); e (c) clorofórmio e suas misturas (componentes 1 e 9)..... | 123 |
| Figura 6. Discriminação entre amostras de <i>Annona muricata</i> (A) e <i>Rollinia mucosa</i> (R) em condições autossombreadas (Sb) e expostas ao sol (Sol) e coletadas durante o inverno (I) e verão (V) por meio da análise por D-UPLS. Sendo: 1 (ASbI), 2 (ASbV), 3 (ASolI), 4 (ASolV), 5 (RSbI), 6 (RSbV), 7 (RSolI) e 8 (RSolV) | 125 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - Planejamento estatístico de mistura de solventes como ferramenta no processo de extração de metabólitos extraídos de folhas de *Annona muricata*

- Tabela 1.** Proporção dos solventes e suas misturas usadas na extração, de acordo com o planejamento experimental centroide simplex 34
- Tabela 2.** Classificação dos solventes de acordo com a seletividade normalizada 37
- Tabela 3.** ANOVA para os resultados da regressão dos modelos quadrático e cúbico especial para a porcentagem de rendimento dos extratos de folhas de *Annona muricata* expostas ao sol e autossombreadas e coletadas nas quatro estações do ano 44

CAPÍTULO III - Evidência da ligação de hidrogênio nas estruturas moleculares das acetogeninas através de espectros de infravermelho e cálculos da teoria do funcional de densidade

- Tabela 1.** Intensidades de absorção e variações das frequências nos espectros de infravermelho para as moléculas de acetogeninas 75
- Tabela 2.** Tipos de intensidades do estiramento O-H calculadas pelo funcional B3LYP para as moléculas escolhidas. Unidades em km.mol^{-1} . O número de cada tipo de ligação de H é dado entre parênteses após o valor da intensidade 79

CAPÍTULO IV - Determinação da influência das condições sazonais e luminosidade solar na composição dos metabólitos de folhas de *Rollinia mucosa* por técnicas espectroscópicas e cromatográficas

- Tabela 1.** Proporções dos solventes usados na extração de acordo com o planejamento centroide simplex 91
- Tabela 2.** Dados de RMN de ^{13}C do extrato *eadc* de folhas autossombreadas coletadas no verão e das acetogeninas annonacina A e annonastatina (DMSO, δ) 102

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 3 Dados de RMN 2D do mapa de contorno HMQC do extrato <i>eadc</i> de folhas autossombreadas coletadas no verão e das acetogeninas annonacina A e annonastatina (DMSO, δ) | 103 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

CAPÍTULO V - Discriminação dos extratos de *Annona muricata* e *Rollinia mucosa* por resolução multivariada de curvas e regressão por mínimos quadrados parciais dos dados de cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1. Proporção dos solventes e suas misturas usadas na extração de acordo com o planejamento experimental centroide simplex | 113 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------------------|----------------------------------------------------|
| α | acidez |
| β | basicidade |
| π | dipolaridade |
| ν | estiramento |
| ϕ_i | proporções de volume |
| 1D | uma dimensão |
| 2D | duas dimensões |
| a | acetato de etila |
| A | acetona |
| A | <i>Annona muricata</i> |
| ACP | Análise de Componentes Principais |
| ANOVA | Análise de variância |
| ATP | adenosina trifosfato |
| ATR | <i>Attenuated Total Reflectance</i> |
| BBI | <i>Broad Band Inverse Detection</i> |
| B3LYP | funcional de densidade de troca e correlação |
| c | clorofórmio |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CP | Componente Principal |
| d | diclorometano |
| DAD | Detector de Arranjo de Diodos |
| DFT | <i>Density Functional Theory</i> |
| DMSO-d6 | dimetilssulfóxido deuterado |
| D-UPLS | <i>Discriminant Unfolded Partial Least Squares</i> |
| e | etanol |
| EM | espectrometria de massas |
| F _{cal} | distribuição F calculada |
| FUEL | Fundação da Universidade Estadual de Londrina |
| g.l. | graus de liberdade |
| HMQC | <i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i> |
| HOMO | <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> |

| | |
|----------|----------------------------------------------------------------|
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| I | inverno |
| IV | infravermelho |
| LC-MS | <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> |
| LUMO | <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> |
| MCR-ALS | <i>Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares</i> |
| MQ | Média Quadrática |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> |
| MVC2 | <i>Multivariate Calibration 2</i> |
| <i>n</i> | número de solventes |
| O | outono |
| P | primavera |
| <i>P</i> | polaridade |
| R | <i>Rollinia mucosa</i> |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| Sb | folhas autossombreadas |
| Sol | folhas expostas ao sol |
| SQ | Soma Quadrática |
| THF | tetrahidrofurano |
| UEL | Universidade Estadual de Londrina |
| UV-DAD | Ultravioleta com Detector de Arranjo de Diodos |
| UV-Vis | Ultravioleta-Visível |
| V | verão |
| X | matriz de dados |

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO e OBJETIVOS

| | |
|-----------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO | 2 |
| 1. Metabolismo Vegetal | 2 |
| 2. Família Annonaceae | 4 |
| 2.1. <i>Annona muricata</i> | 5 |
| 2.2. <i>Rollinia mucosa</i> | 5 |
| 3. Técnicas de Análise Metabolômica | 6 |
| 3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | 7 |
| 3.2. Espectroscopia no Infravermelho | 7 |
| 3.3. Espectrometria de Massas | 9 |
| 3.4. Ressonância Magnética Nuclear | 10 |
| 4. Quimiometria | 11 |
| 4.1. Planejamento Experimental | 12 |
| 4.2. Análise de Componentes Principais | 14 |
| 4.3. Resolução Multivariada de Curvas | 15 |
| 4.4. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais | 17 |
| OBJETIVOS | 18 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 20 |

CAPÍTULO II - Planejamento estatístico de mistura de solventes como ferramenta no processo de extração de metabólitos extraído de folhas de *Annona muricata*

| | |
|------------------------------------------------------------|----|
| Resumo | 28 |
| INTRODUÇÃO | 29 |
| EXPERIMENTAL | 32 |
| Material Vegetal | 32 |
| Reagentes | 33 |
| Preparo dos extratos | 33 |
| Escolha do solvente | 35 |
| Análise espectroscópica na região do UV-Vis | 39 |
| Análise espectroscópica na região do infravermelho | 39 |
| Análise por cromatografia líquida de alta eficiência | 39 |

| | |
|-----------------------------------------|----|
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| CONCLUSÃO | 57 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |

CAPÍTULO III - Evidência da ligação de hidrogênio nas estruturas moleculares das acetogeninas através de espectros de infravermelho e cálculos da teoria do funcional de densidade

| | |
|-----------------------------------------|----|
| Resumo | 63 |
| INTRODUÇÃO | 64 |
| EXPERIMENTAL | 65 |
| Material Vegetal | 65 |
| Reagentes | 66 |
| Preparo do extrato | 66 |
| Análise por infravermelho | 67 |
| Cálculos | 67 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 68 |
| Experimental | 68 |
| Teórico | 74 |
| CONCLUSÃO | 81 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |

CAPÍTULO IV - Determinação da influência das condições sazonais e luminosidade solar na composição dos metabólitos de folhas de *Rollinia mucosa* por técnicas espectroscópicas e cromatográficas

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo | 86 |
| INTRODUÇÃO | 87 |
| EXPERIMENTAL | 89 |
| Material Vegetal | 89 |
| Reagentes | 89 |
| Preparo dos extratos | 90 |
| Análises por cromatografia líquida de alta eficiência | 90 |
| Análises espectroscópicas na região do infravermelho | 92 |
| Análises por ressonância magnética nuclear | 92 |

| | |
|----------------------------------------------------------|-----|
| Análises por espectrometria de massas | 92 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 93 |
| Impressão digital cromatográfica | 93 |
| Impressão digital espectroscópica no infravermelho | 98 |
| Análises por espectrometria de massas e RMN | 101 |
| CONCLUSÃO | 103 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 104 |

CAPÍTULO V - Discriminação dos extratos de *Annona muricata* e *Rollinia mucosa* por resolução multivariada de curvas e regressão por mínimos quadrados parciais dos dados de cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Resumo | 108 |
| INTRODUÇÃO | 109 |
| EXPERIMENTAL | 111 |
| Material Vegetal | 111 |
| Reagentes | 112 |
| Preparo dos extratos | 112 |
| Preparo das amostras | 113 |
| Análises por CLAE-DAD | 114 |
| Análises dos dados multivariados | 114 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 115 |
| Resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternantes | 115 |
| Modo discriminante no desdobramento da regressão por mínimos quadrados parciais | 124 |
| CONCLUSÃO | 125 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 126 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | |
| CONCLUSÃO | 130 |

Capítulo I

Introdução

e

Objetivos



INTRODUÇÃO

1. Metabolismo Vegetal

As plantas produzem diversos compostos orgânicos, divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Já os metabólitos secundários apresentam relevante importância por possuírem várias atividades biológicas, e, portanto, são usados como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos. A Figura 1 representa o esquema do metabolismo vegetal (Simões *et al.*, 2003).

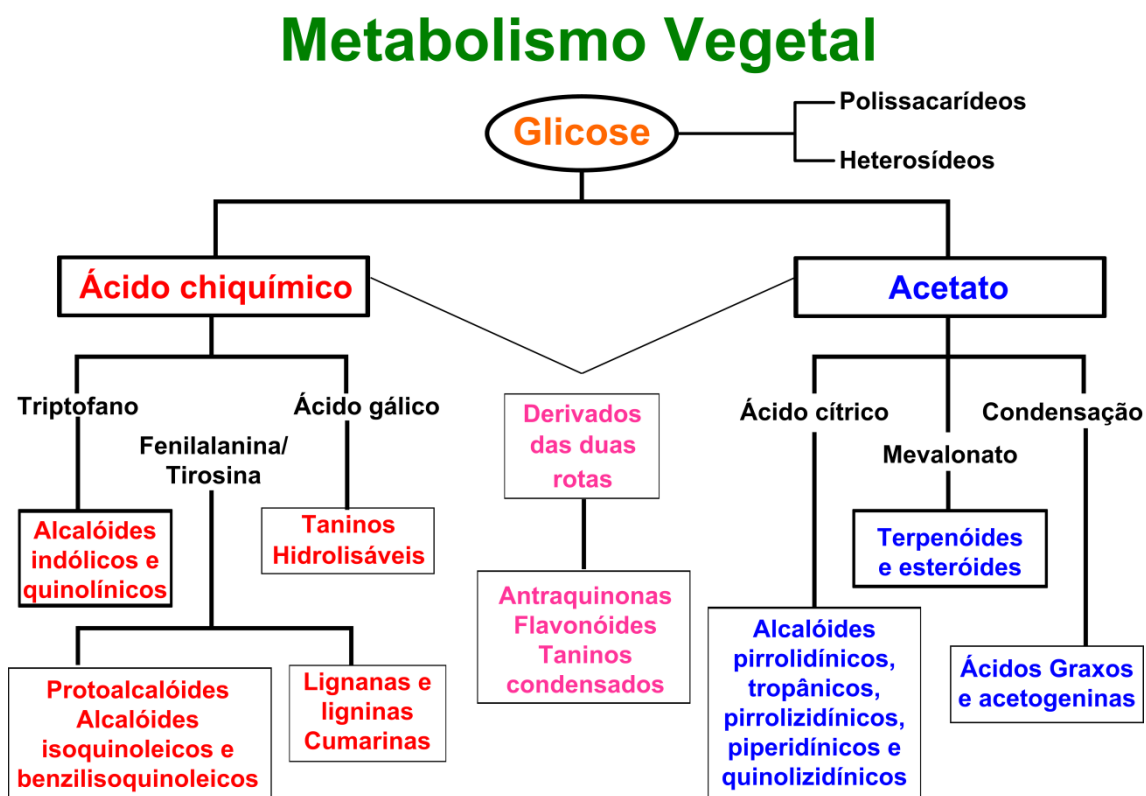


Figura 1. Esquema do metabolismo vegetal.

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente, sendo assim sua síntese é afetada por condições ambientais. Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos nas plantas são a sazonalidade, o ritmo circadiano, a temperatura, a disponibilidade hídrica, a radiação ultravioleta e a poluição atmosférica (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). A época em que a planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e às vezes até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante todo o ano. As diferentes espécies de plantas estão adaptadas a uma enorme variação na intensidade e quantidade de incidência luminosa. Sendo assim, a intensidade de luz solar é um fator que também influencia a concentração e/ou composição de classes de metabólitos secundários como terpenoides, glicosídeos, cianogênicos e alcaloides (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas também são influenciados pela intensidade e a quantidade da luz que a planta recebe durante o crescimento, o que também é essencial para a fotossíntese (Anderson, 1986). Sabe-se que as plantas necessitam de luz solar para sobreviver, mas nem sempre mais luz solar significa uma maior facilidade para a sobrevivência, e que folhas cultivadas na sombra e expostas ao sol diferem em suas características (March e Clark, 2011). Quando a planta recebe luz solar diretamente, as folhas são menores e mais grossas, enquanto que as sombreadas são maiores e mais finas. Devido às diferentes proporções de clorofilas *a* e *b*, as folhas cultivadas ao sol e a sombra têm diferentes colorações; folhas expostas ao sol têm coloração verde claro, enquanto folhas sombreadas contêm mais clorofila *b*, que é mais escura melhorando a capacidade de capturar a luz do cloroplasto.

Os metabólitos secundários extraídos de plantas têm uma grande importância para a fitoquímica e medicina, e possuem diversas aplicações industriais. Estes

metabólitos representam classes de diferentes compostos incluindo aminoácidos, gorduras, carboidratos e ácidos orgânicos. Este fato gera problemas na escolha do protocolo de extração, uma vez que as condições de extração diferem muito para os diferentes tipos de compostos. Desta forma, a escolha dos solventes é de suma importância, pois envolve um compromisso entre maximizar a eficiência das interações entre as moléculas e garantir o maior ou menor número de metabólitos, dependendo do caso em estudo (Dunn e Ellis, 2005).

2. Família Annonaceae

Espécies de plantas têm sido avaliadas cientificamente como possíveis aplicações terapêuticas, não somente pela falta de política de cuidados de saúde, mas também pela carência de metodologias adequadas e aceitas para avaliar amostras complexas (Gong *et al.*, 2003). No entanto, estudos fitoquímicos e farmacológicos com a família Annonaceae têm se intensificado cada vez mais devido à presença das acetogeninas (Figura 2), uma classe de compostos naturais (Santos e Sant'A, 2001) que apresenta propriedades biológicas, citotóxicas, antitumoral, antiparasita, antimicrobiana e agrotóxica (Yu *et al.*, 1998; Galvis *et al.*, 1999; Bermejo *et al.*, 2005; Liaw *et al.*, 2005; Konno *et al.*, 2008). O grande interesse nas acetogeninas é pela sua propriedade de inibir seletivamente o crescimento das células tumorais, pois afetam a produção de ATP (adenosina trifosfato) nas mitocôndrias (Yamamoto *et al.*, 2011). As acetogeninas apresentam uma conveniente classificação baseada no número e posição do anel tetrahydrofurano (THF): nenhum THF, um THF, dois THF adjacente, dois THF não adjacentes e três THF, e pelo tipo de terminação da cadeia, onde as mais comuns são:

lactona saturada, lactona insaturada e cetolactona (Arnason *et al.*, 1995; Rupprecht *et al.*, 1990). A Figura 2 mostra a estrutura básica das acetogeninas.

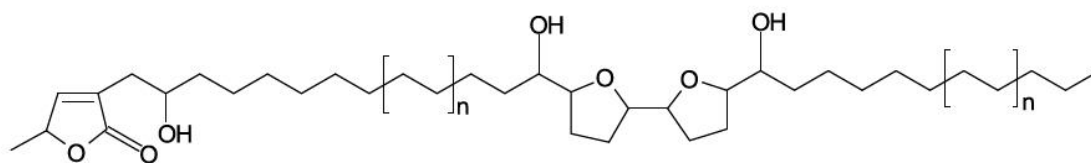


Figura 2. Estrutura básica das acetogeninas.

2.1. *Annona muricata*

A *Annona muricata* L., mais conhecida como graviola, pertence à família Annonaceae e é uma espécie muito difundida em países subtropicais e tropicais, bastante encontrada na região nordeste devido às condições climáticas compatíveis com suas exigências nutricionais e fisiológicas (Castro *et al.*, 1984; Pinto e Silva, 1994; Gleye *et al.*, 1999). A graviola apresenta propriedades diuréticas, anti-inflamatórias, antireumática, vitaminizante, entre outras; além de ser muito usada no tratamento de doenças cardíacas, asma e de artrite (Junqueira *et al.*, 1999) e, por isso, tem o interesse da população científica (Viegas e Frazão, 2004). Porém, uma das maiores descobertas sobre a graviola foi a sua capacidade de agir contra as células do câncer como mostrado em testes de laboratório na literatura (Yamamoto *et al.*, 2011). Esta propriedade é consequência das acetogeninas presentes nas raízes, troncos e folhas da graviola (Pinto *et al.*, 2005).

2.2. *Rollinia mucosa*

Outra espécie pertencente à família Annonaceae, que também apresentam acetogeninas em seus extratos é a *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill, que é conhecida popularmente como biribá, fruta do conde ou pinha (Silva, 2009). Biribazeiro é uma

planta frutífera, nativa da Amazônia e que se desenvolve bem em diferentes habitats. Com uma altura média de 8 m, seu fruto, quando maduro, é de coloração amarela, globoso, composto por diversas partes hexagonais, muito unidas, dando um aspecto característico, além de ter grande aceitação popular, sendo consumidos *in natura*. Sua polpa é de cor esbranquiçada a creme, com muitas sementes de cor escura, além de apresentar aroma agradável (Souza *et al.*, 2012).

3. Técnicas de Análise Metabolômica

Metabolômica é o termo usado para definir o conjunto de dados qualitativos e quantitativos sobre todos os metabólitos secundários de uma determinada matriz de origem biológica (Funari *et al.*, 2013). Na análise metabolômica, o objetivo é analisar tantos metabólitos quanto possíveis, em uma única análise (Weckwerth e Morgenthal, 2005). As técnicas metabolômicas são ferramentas eficazes para explicar e prever fenótipos em sistemas biológicos. Nessa área, os métodos quimiométricos são empregados para extrair informações de dados analíticos complexos. O mapeamento completo da constituição metabólica de uma espécie exige o uso de técnicas analíticas avançadas, pois o número de compostos em um extrato de planta pode chegar a milhares. Por isso, o acoplamento de uma técnica de separação de constituintes de uma amostra com uma ou mais técnicas espectroscópicas que forneça informações sobre a estrutura desses constituintes é usado para estabelecer o perfil metabolômico das amostras (Funari *et al.*, 2013). Dentre as técnicas instrumentais para obtenção dos dados analíticos, as mais utilizadas são: cromatografia líquida de alta eficiência (Simirgiotis *et al.*, 2012), espectroscopia no infravermelho (Skotti *et al.*, 2014), espectrometria de massas (Jiménez *et al.*, 2014), e ressonância magnética nuclear (Baddini *et al.*, 2014).

3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica de separação mais utilizada em estudos metabolômicos por serem adequadamente compatíveis com qualquer tipo de analito. A CLAE é uma técnica instrumental de fácil manuseio, boa resolução, reprodutibilidade e seletividade (Funari *et al.*, 2013), além disso, pode ser totalmente automatizada, facilitando a análise, inclusive quando a quantidade de amostras é muito grande.

Os detectores espectrofotométricos na região do ultravioleta com arranjo de diodos (UV-DAD) destacam-se pela obtenção de perfis metabólicos de amostras complexas e são os mais comumente acoplados a CLAE, pois apresentam alta sensibilidade e boa linearidade (Funari *et al.*, 2013). CLAE com detector UV-DAD é a técnica analítica hifenada mais popular baseada em cromatografia. O espectro UV de cada pico cromatográfico pode ser uma ferramenta útil para a identificação dos compostos da amostra (Moreira *et al.*, 2014), uma vez que, é possível descobrir o perfil espectroscópico do composto de interesse por meio de uma matriz 3D composta pelas intensidades das absorvâncias nos comprimentos de onda em cada tempo de retenção do cromatograma.

3.2. Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas. No caso da espectroscopia no infravermelho, são medidas os momentos vibracionais ou rotacionais das moléculas. Sendo assim, é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, e amplamente utilizada nas áreas de

química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (Lopes e Fascio, 2004).

O espectro infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, por conta disto a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação dos compostos. Outra importante aplicação do infravermelho, mas ainda bem menos utilizada, é a análise quantitativa de misturas de compostos. Como a intensidade de uma banda de absorção é proporcional a concentração do componente que causou esta banda, também é possível determinar a quantidade de um composto presente em uma amostra.

As intensidades no infravermelho são importantes no fornecimento de informações para uma variedade de objetivos, incluindo atribuições de bandas (Dimitrova e Steele, 1991; Steele e Muller, 1992), geometria molecular (Krohn *et al.*, 1976) e determinações de concentração quando aliada a métodos quimiométricos (Martens e Naes, 1989). Quando a intensidade da banda de infravermelho é associada aos cálculos teóricos da Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês, *Density Functional Theory*) torna-se possível prever estruturas moleculares de compostos químicos presentes em amostras complexas como em extratos de plantas. Nas últimas décadas, métodos baseados na DFT ganharam muita importância para estudos de estrutura molecular (Silva *et al.*, 2012).

Os cálculos de intensidades infravermelhas são bastante frequentes em pacotes de química quântica, onde estas propriedades são obtidas através da DFT. Seguindo esta metodologia, as intensidades infravermelhas das transições fundamentais de moléculas em fase gasosa podem ser calculadas com boa exatidão (Gomes *et al.*, 2008).

A DFT é um método mecânico quântico, que consiste em determinar a energia e as propriedades das moléculas pelo cálculo da densidade eletrônica em lugar da função

de onda, utilizado para investigar a estrutura eletrônica de sistemas com muitos corpos, como átomos, moléculas e fases condensadas. Com essa teoria, as propriedades de um sistema com muitos elétrons podem ser determinadas pelo uso de funcionais, isto é, funções de outra função, que neste caso é a densidade eletrônica espacialmente dependente (Duvoisin Jr. *et al.*, 2011).

Na análise metabolômica os dados de infravermelho são essenciais para obter um bom resultado em relação à detecção de uma substância em um extrato vegetal. Essa técnica é utilizada com frequência proporcionando resultados satisfatórios na identificação de acetogeninas em plantas da família Annonaceae (Rupprecht *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1998; Alali *et al.*, 1999; Jaramillo *et al.*, 2000; Melot *et al.*, 2009; Moghadamtousi *et al.*, 2015).

3.3. Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica de análise que permite determinar a distribuição das moléculas de uma substância em função da sua massa. O espectrômetro de massas é um equipamento que permite analisar com grande precisão a composição de diferentes elementos químicos, separando os núcleos atômicos em função da relação carga-massa (z/m).

É uma das técnicas mais usada na identificação de compostos isolados a partir de produtos naturais e quando acoplada como detector em técnicas cromatográficas se torna ainda mais eficiente para a obtenção de perfis metabólicos de matrizes vegetais (Afonso *et al.*, 2015a). A espectrometria de massas é a técnica que fornece, atualmente, a melhor relação custo-benefício, por ser extremamente sensível, utilizar quantidades mínimas de amostra e menor tempo de análise, proporcionando um arsenal de

informações valiosas quanto à estrutura dos metabólitos de interesse (Funari *et al.*, 2013).

A técnica de EM não é apenas altamente sensível e específica, mas também reprodutível e robusta. Assim, a EM pode proporcionar análises rápidas e precisas de compostos alvo em concentrações muito baixas, como é comum em extratos de plantas (Gu *et al.*, 1999).

Diversos trabalhos tem mostrado a importância da EM na identificação e quantificação de acetogeninas em plantas da família Annonaceae (Rupprecht *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1998; Liaw *et al.*, 1999; Jaramillo *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2001; Melot *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014). Por exemplo, de acordo com Gu *et al.*, 1999, as análises por EM indicaram que os níveis de acetogeninas bioativas nos extratos de uma espécie da família Annonaceae são otimizados quando os galhos são coletados no final da primavera e início do verão, mostrando a importância da época da coleta do material vegetal e dos dados obtidos a partir de análises por espectrometria de massas.

3.4. Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) tem um papel essencial na análise metabolômica por ser uma das técnicas mais usada na detecção e identificação de metabólitos secundários em amostras vegetais. Seu uso pode ser feito a partir da hifenação com a cromatografia líquida para determinação de constituintes majoritários ou pela análise de frações do extrato de produtos naturais quando os compostos estão disponíveis em pequenas quantidades. Juntamente com a espectrometria de massas, a RMN também é considerada uma técnica espectroscópica sensível. Por esse motivo é possível a detecção de compostos conhecidos por meio da obtenção de espectros de

RMN de moléculas individuais em misturas sem que haja necessidade de uma separação prévia (Funari *et al.*, 2013).

O uso do RMN na metabolômica vem crescendo exponencialmente devido a sua robustez e alta sensibilidade na quantificação de compostos químicos (Rupprecht *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997; Alali *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Fujioka *et al.*, 2012; Ragasa *et al.*, 2012; Ragasa *et al.*, 2014). No entanto, a sobreposição dos sinais em espectros de alta complexidade, como a matriz vegetal, é um desafio. Sendo assim, a utilização de experimentos bidimensionais, como o mapa de contorno HMQC, é uma alternativa interessante para vencer esse obstáculo (Nascimento *et al.*, 2003).

4. Quimiometria

A quimiometria pode ser definida como uma área da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar procedimentos experimentais de forma otimizada, e fornecer o máximo de informação química relevante com a análise de dados obtidos (Hopke, 2003). A quimiometria ganhou popularidade quando a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos (Sena *et al.*, 2000). A análise multivariada refere-se a todas as técnicas estatísticas que analisam simultaneamente medidas múltiplas de indivíduos ou objetos sob investigação. Assim, qualquer análise simultânea com mais de duas variáveis, podem ser consideradas, a princípio, como multivariada (Hair Jr. *et al.*, 2009). Técnicas estatísticas são utilizadas para desenvolver metodologias multivariadas e extrair informações de dados espectroscópicos e cromatográficos com o objetivo de identificar as espécies presentes e determinar quantitativamente as concentrações de algumas ou de todas elas (Scarminio *et al.*, 1998).

A geração de muitos dados coletados a partir do uso de técnicas analíticas modernas em estudos metabolômico, exige a associação de métodos quimiométricos para a análise dos dados. Para estudos taxonômicos ou para correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica, a aplicação de métodos quimiométricos de análise multivariada é recomendada, uma vez que permitem a classificação por meio da análise de componentes principais (ACP), análise hierárquica de agrupamentos (AHA), regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), entre outros (Funari *et al.*, 2013).

4.1. Planejamento experimental

Os planejamentos experimentais de misturas são fortes aliados no estudo das condições de extrações de compostos de plantas, uma vez que misturas de solventes com propriedades químicas diferentes muda o comportamento da interação soluto-solvente no processo extrativo (Borges *et al.*, 2007; Delarozza e Scarminio, 2008; Garcia *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2010; Risso *et al.*, 2010; Lonni *et al.*, 2012; Moreira e Scarminio, 2013; Delarozza *et al.*, 2014; Justo *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2014; Afonso *et al.*, 2015b; Pauli *et al.*, 2016). O planejamento estatístico de misturas para o desenvolvimento de perfis de impressões digitais dos metabólitos extraídos de plantas faz-se importante, haja vista as condições de extração muito diferentes para os diferentes tipos de compostos. (Dunn e Ellis, 2005).

As propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus componentes e não por valores absolutos, por esse motivo, o planejamento experimental de misturas restringe que a somatória dos componentes da mistura deve ser sempre 100% (Barros Neto *et al.*, 2010). Desta forma, para uma mistura qualquer de q componentes, podemos escrever:

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

onde os subíndices i e q representam os componentes da mistura e X_i representa a proporção do i -ésimo componente.

Modelos de misturas tem se mostrado ferramentas úteis para descrever o comportamento de misturas de solventes para extração de compostos de plantas (Garcia *et al.*, 2010). O material extraído depende das proporções dos solventes no meio extrator e pode ser entendido aplicando modelos linear, quadrático e cúbico especial para misturas (Barros Neto *et al.*, 2010). O modelo cúbico completo para uma mistura de q componentes é dado pela Equação 2:

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i x_i + \sum_{i < j}^q \sum_j^q b_{ij} x_i x_j + \sum_{i < j}^q \sum_{j < k}^q \sum_k^q b_{ijk} x_i x_j x_k \quad (2)$$

onde os subíndices i , j , k e q são os componentes da mistura, x é a proporção dos componentes da mistura, b é o efeito de interação das misturas e \hat{y} é o rendimento previsto para os pontos do planejamento estatístico.

A primeira parte da equação contém termos lineares para todos os componentes da mistura e descreve os efeitos dos componentes puros na mistura. A segunda parte descreve as interações das misturas binárias no processo de extração. A última parte contém os termos que serão importantes nas interações entre as misturas ternárias de solventes no processo de extração.

4.2. Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (ACP) é uma abordagem estatística que pode ser usada para analisar inter-relações entre um grande número de variáveis e explicar essas variáveis em termos de suas dimensões inerentes comuns (Hair Jr. *et al.*, 2009).

O objetivo é projetar os dados multivariados em um espaço de dimensão menor reduzindo assim a dimensionalidade do espaço original do conjunto dos dados, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas. Consequentemente, as informações relevantes são separadas e ampliadas, tornando-se mais evidentes à inspeção visual. Utilizando a ACP é possível descobrir, visualizar e interpretar as diferenças existentes entre as variáveis e examinar as relações que podem existir entre as amostras (Ferreira, 2015). Pelo fato de fornecer uma estimativa empírica da estrutura das variáveis consideradas, a ACP se torna uma base objetiva para criar escalas múltiplas (Hair Jr. *et al.*, 2009).

A ACP transforma a matriz de dados originais $\mathbf{X}_{n \times p}$, formada por n objetos e p variáveis, no produto de duas matrizes menores, como mostra a Equação 3.

$$\mathbf{X}_{n \times p} = \mathbf{T}_{n \times q} \times \mathbf{P}^t_{q \times p} + \boldsymbol{\varepsilon}_{n \times p} \quad (3)$$

onde, \mathbf{T} é a matriz dos escores, \mathbf{P} é a matriz dos pesos, $\boldsymbol{\varepsilon}$ 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. Como q normalmente é menor do que p ou n , uma matriz maior é transformada em duas matrizes menores tomando a análise da matriz mais simples como mostra a Figura 3.

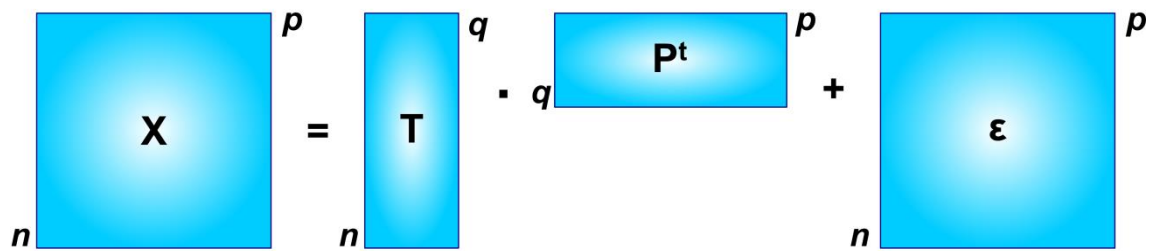


Figura 3. Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes.

A ACP pode ser realizada utilizando-se dois tipos de métodos, o método do tipo-R, que se refere ao estudo da relação entre as variáveis e o método do tipo-Q, que se refere ao estudo da relação entre as amostras (Manly, 2008).

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 (Manly, 2008).

4.3. Resolução Multivariada de Curvas

A Resolução Multivariada de Curvas (MCR, do inglês *Multivariate Curve Resolution*) refere-se a um grupo de métodos que ajudam a localizar os perfis de respostas puras dos constituintes de uma mistura não resolvida quando nenhuma informação prévia está disponível sobre a natureza e a composição destas misturas. Os dois requisitos necessários para aplicar o MCR a um sistema multi-componente são, em primeiro lugar, que os dados experimentais podem ser estruturados como uma matriz de dados de duas dimensões; e em segundo lugar, que este conjunto de dados pode ser explicado por um modelo linear com um número limitado de componentes (Afonso *et al.*, 2015b).

O modelo linear do MCR é análogo à lei generalizada de Lambert-Beer, onde as respostas individuais de cada componente são aditivas. Em forma de matriz, este modelo é expresso pela Equação 4.

$$D_{JxK} = C_{JxN} \times S^T_{NxK} + E_{JxK} \quad (4)$$

onde \mathbf{D} é a matriz dos dados experimentais, \mathbf{C} é a matriz cujas colunas contêm os perfis de concentração dos N componentes presentes nas amostras, \mathbf{S}^T é a matriz transposta que contêm os sinais dos espectros puros dos componentes e \mathbf{E} é a matriz dos erros da variância não explicada pelo modelo bilinear (Afonso *et al.*, 2015b).

O método de Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS, do inglês *Multivariate Curve Resolution with Alternating Least-Squares*) é um tipo de MCR no qual a resolução iterativa da Equação 4 é realizada por ALS. O cálculo realizado pelo MCR-ALS utiliza mínimos quadrados alternantes (ALS) para buscar o resultado que apresenta o melhor ajuste. Esse processo, chamado de otimização, permite recuperar perfis de concentrações individuais e sinais (espectros) de espécies que melhor explicam a variância dos dados observados (Março *et al.*, 2014).

As diversas formas de aplicação dos métodos de resolução de curvas mostram que a ambiguidade, inerente à decomposição na análise de fatores de uma matriz de dados bilineares, pode ser parcialmente superada pelo uso de restrições (Março *et al.*, 2014). As mais usadas são a não negatividade para concentração (\mathbf{C}) e sinal (\mathbf{S}) e unimodalidade, apenas para a concentração (\mathbf{C}).

A não negatividade restringe que nenhum sinal analítico seja negativo, isto é, um cromatograma ou um espectro tenha sempre a linha de base ajustada. E a uni-

modalidade restringe que não ocorram desvios nos sinais analíticos, por exemplo, de um cromatograma ou espectro (Afonso *et al.*, 2015b). A ideia geral é encontrar os limites dos perfis que fornecem as contribuições máximas e mínimas dos componentes do sinal global medido, porém quando as correções por restrições são muito abruptas, podem aparecer diferenças no processo de otimização e o efeito da restrição pode não ser tão positivo quanto se espera (Março *et al.*, 2014).

O MCR-ALS é um método quimiométrico bastante versátil, podendo ser aplicado em diferentes tipos de dados analíticos, por exemplo: fluorescência em diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão (Alcaráz *et al.*, 2015), cromatografia líquida com detecção fluorimétrica (Culzoni *et al.*, 2012), cromatografia líquida com detector UV-DAD (Pisano *et al.*, 2014), cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (Pauli *et al.*, 2016), entre outros.

4.4. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é o método de regressão mais popular na quimiometria e baseia-se em aproximar o espaço das medidas originais por um de dimensão reduzida, sendo que, uma restrição é imposta na decomposição da matriz \mathbf{X} direcionando-a para uma solução cujo alvo é a propriedade de interesse (Ferreira, 2015).

Quando aplicado no seu modo discriminante, este é baseado na análise supervisionada que tem como alvo a construção de modelos de classificação. Na análise supervisionada, seleciona-se uma série de amostras representativas de cada classe e para as quais as medidas experimentais são coletadas e o padrão de cada uma delas é definido. Este conjunto de amostras cuja propriedade de interesse é conhecida constitui o conjunto de treinamento, e então, utilizando as informações deste conjunto de

treinamento, é possível construir um modelo empírico ou uma regra de classificação (Ferreira, 2015).

No desdobramento da regressão por mínimos quadrados parciais (UPLS) os dados originais são desdobrados em vetores antes da aplicação do PLS. Neste caso, a informação sobre concentração é utilizada no momento da calibração, sem a inclusão dos dados da amostra desconhecida. A matriz de dados de calibração I_{cal} é primeiramente vetorizadas em um vetor $JK \times 1$, e então um modelo PLS é construído usando esses dados em conjunto com o vetor de calibração da concentração y (tamanho $I_{cal} \times 1$). Isto proporciona um conjunto de loadings P e peso dos loadings W (ambos de tamanho $JK \times A$, onde A é o número de fatores latentes), e os coeficientes de regressão v (tamanho $A \times 1$) (Afonso *et al.*, 2015b).

Na análise clássica do UPLS, os valores de y são as concentrações dos analitos ou características da amostra. Quando a classificação é o objetivo da modelagem por UPLS, os valores de y são codificados de forma a refletir as diferentes categorias de amostras. Isto pode ser feito usando valores digitais, tais como 0 e 1, ou 1, 2, 3, 4, etc. Desta maneira, o modelo é chamado de D-UPLS para a análise do UPLS no modo discriminante (Afonso *et al.*, 2015b).

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo utilizar ferramentas quimiométricas na análise exploratória de processos de separação de metabólitos secundários em folhas de duas espécies da família Annonaceae: *Annona muricata* e *Rollinia mucosa*, em diferentes estações climáticas e níveis de radiação solar.

Os objetivos específicos serão abordados nos Capítulos II, III, IV e V apresentados na forma de artigos.

O Capítulo II apresenta um manuscrito de título: “*Planejamento estatístico de mistura de solventes como ferramenta no processo de extração de metabólitos extraídos de folhas de Annona muricata*”. O objetivo deste trabalho foi utilizar planejamento estatístico de misturas e análise de componentes principais para avaliar o efeito do solvente e suas propriedades solvatocrômicas na impressão digital metabolômica de folhas de *Annona muricata* coletadas em diferentes níveis de radiação solar e estações climáticas.

No Capítulo III o artigo em discussão é intitulado como “*Evidência da ligação de hidrogênio nas estruturas moleculares das acetogeninas através de espectros de infravermelho e cálculos da teoria do funcional de densidade*”. Este trabalho tem como objetivo utilizar planejamento estatístico de misturas para extração de folhas de *Annona muricata* colhidas de áreas sombreadas e diretamente expostas à luz solar em todas as estações do ano para obtenção da impressão digital metabólica dos espectros de infravermelho interpretados com a ajuda de cálculos de funcional de densidade para auxiliar a correta atribuição das bandas e para obter estimativas das intensidades.

O Capítulo IV apresenta um manuscrito de título: “*Determinação da influência das condições sazonais e luminosidade solar na composição dos metabólitos de folhas de Rollinia mucosa por técnicas espectroscópicas e cromatográficas*”. O objetivo deste estudo foi usar dados cromatográficos e espectroscópicos para analisar a variação da composição dos metabólitos de folhas de *Rollinia mucosa* cultivadas na sombra e ao sol e coletadas nas quatro estações climáticas por meio de impressão digital metabólica.

No Capítulo V é apresentada a versão em português do artigo publicado com o título original “*Discrimination of Annona muricata and Rollinia mucosa extracts by*

using multivariate curve resolution and partial least-squares regression of liquid chromatography - diode array data” em 2015 no *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 26, No. 11, 2241-2248. Neste trabalho os objetivos foram a resolução quimiométrica de perfis das acetogeninas nos modos representados por tempo de eluição e perfis espectrais e a utilização destas informações na discriminação de amostras de acordo com a classificação taxonômica, exposição ao sol ou época de colheita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, S.; Matos, A. C. de; Marengo, V. A.; Moreira, E. G.; Soares, D. X.; Koolen, H. H. F.; Scarminio, I. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015a**, 26, 350.

Afonso, S.; Pisano, P. L.; Silva, F. B.; Scarminio, I. S.; Olivieri, A. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015b**, 26, 2241.

Alcaráz, M. R.; Bortolato, S. A.; Goicoechea, H. C.; Olivieri, A. C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 1999.

Alali, F. Q.; Liu, X. X.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 504.

Anderson, J. M.; *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1986**, 37, 93.

Arnason, J. T.; Mata, R.; Romeo, J. T.; *Phytochemistry of Medicinal Plants*, New York: Springer, **1995**.

Baddini, A. L. Q.; Netto, A. D. P.; Teixeira, V. L.; *Rev. Virtual Quim.*, **2014**, 6, 396.

Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 4^a ed., Porto Alegre: Bookman, **2010**.

Bermejo, A.; Figadère, B.; Polo, M. C. Z.; Barrachina, I.; Estornell, E.; Cortes, D.; *Nat. Prod. Rep.*, **2005**, *22*, **269**.

Borges, C. N.; Bruns, R. E.; Almeida, A. A.; Scarminio, I. S.; *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *595*, 28.

Castro, A. C.; Maia, G. A.; Holanda, L. F. F.; Guedes, Z. B. L.; Fé, J. A. M.; *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **1984**, *3*, 361.

Chen, Y-Y.; Chang, F-R.; Yen, H-F.; Wu, Y-C.; *Phytochem.* **1996**, *42*, 1081.

Culzoni, M. J.; Aucelio, R. Q.; Escandar, G. M.; *Anal. Chim. Acta.* **2012**, *740*, 27.

Delarozza, F.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1034.

Delarozza, F.; Rakocevic, M.; Malta, G. B.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 1929.

Dimitrova, Y.; Steele, D.; *Spectrochim. Acta A* **1991**, *47A*, 75.

Dunn, W. B.; Ellis, D.I.; *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 285.

Duvoisin Jr., S.; Lima, I. C. V.; Kuhnen, C. A.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1603.

Ferreira, M. M. C.; *Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações*, Campinas: Editora da Unicamp, **2015**.

Funari, C. S.; Castro-Gamboa, I.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. da S.; *Quim. Nova.* **2013**, *36*, 1605.

Fujioka, H.; Maehata, R.; Wakamatsu, S.; Nakahara, K.; Hayashi, T.; Oki, T.; *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 1054.

Galvis, L. B.; Saez, J.; Granados, H.; Salazar, A.; Ossa J.; *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1999**, 94, 531.

Garcia, L. M. Z.; Pauli, E. D.; Cristiano, V.; Câmara, C. A. P.; Scarminio, I. S.; Nixdorf, S. L.; *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, 47, 825.

Garcia, L. M. Z.; Oliveira, T. F.; Soares, P. K.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2010**, 103, 1.

Gleye, C.; Laurens, A.; Laprévotte, O.; Serani, L.; Hocquemiller, R.; *Phytochemistry*, **1999**, 52, 1403.

Gobbo-Neto, L. G.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova*. **2007**, 30, 374.

Gomes, T. C. F.; Silva Jr., J. V. da; Vidal, L. N.; Vazquez, P. A. M.; Bruns, R. E.; *Quim. Nova*, **2008**, 31, 1750.

Gong, F.; Liang, Y.; Xie, P.; Chau, F.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1002, 25.

Gu, Z-M.; Zhou, D.; Lewis, N. J.; Wu, J.; Shi, G.; McLaughlin, J. L.; *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 1911.

Gu, Z-M.; Zhou, D.; Lewis, N. J.; Wu, J.; Johnson, H. A.; McLaughlin, J. L.; Gordon, J.; *Phytochem. Anal.* **1999**, 10, 32.

Hair Jr., J. F.; Black, W. C.; Babin, B. J.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L.; *Análise multivariada de dados*, 6^a ed., Porto Alegre: Bookman, **2009**.

Hopke, P. K.; *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 500, 365.

Jaramillo, M. C.; Arango, G. J.; Gonzáles, M. C.; Robledo, S. M.; Velez, I. D.; *Fitoterapia*. **2000**, 71, 183.

Jiménez, V. M.; Gruschwitz, M.; Schweiggert, R. M.; Carle, R.; Esquivel, P.; *Food Res. Int.*, **2014**, *65*, 42.

Junqueira, N. T. V.; Oliveira, M. A. S.; Icuma, I. M.; Ramos, V. H. V.; *Cultura da graviola. In: incentivo a fruticultura no distrito federal: manual de fruticultura*, Distrito Federal: Editora Coolabora, **1999**.

Justo, R.; Afonso, S.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; *Anal. Methods*. **2014**, *6*, 9567.

Konno, H.; Okuno, Y.; Makabe, H.; Nosaka, K.; Onishi, A.; Abe, Y.; Sugimoto, A.; Akaji, K.; *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 782.

Krohn, B. J.; Person, W. B.; Overend, J.; *J. Chern. Phys.* **1976**, *65*, 969.

Kuo, R-Y.; Chang, F-R.; Chen, C-Y.; Teng, C-M.; Yen, H-F.; Wu, Y-C.; *Phytochemistry*. **2001**, *57*, 421.

Liaw, C. C.; Chang, F. R.; Chen, Y. Y.; Chiu, H. F.; Wu, M. J.; Wu, Y. C.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1613.

Liaw, C. C.; Chang, F. R.; Chen, S. L.; Wu, C. C.; Lee, K. H.; Wu, Y. C.; *Bioorgan. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 4767.

Lonni, A. A. S. G.; Longhini, R.; Lopes, G. C.; Mello, J. C. P. de; Scarminio, I. S.; *Anal. Chim. Acta*, **2012**, *719*, 57.

Lopes, W. A.; Fascio, M.; *Quim. Nova*. **2004**, *27*, 670.

Manly, B. F. J.; *Métodos estatísticos multivariados: uma introdução*, 3^a ed., Porto Alegre: Bookman, **2008**.

March, R. H.; Clark, L. G.; *Telopea*. **2011**, *13*, 93.

Março, P. H.; Valderrama, P.; Alexandrino, G. L.; Poppi, R. J.; Tauler, R.; *Quim. Nova* **2014**, *37*, 1525.

Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, New York: Wiley, **1989**.

Melot, A.; Fall, D.; Gleye, C.; Champy, P.; *Molecules*. **2009**, *14*, 4387.

Moghadamtousi, S. Z.; Rouhollahi, E.; Karimian, H.; Fadaeinasab, M.; Firoozinia, M.; Abdulla, M. A.; Kadir, H. A.; *PLoS ONE* **2015**, *4*, e0122288.

Moreira, I.; Scarminio, I. S.; *Talanta*. **2013**, *107*, 416.

Moreira, I.; Scheel, G. L.; Hatamura, P. H.; Scarminio, I. S.; *Quim. Nova*. **2014**, *37*, 39.

Nascimento, F. C.; Boaventura, M. A. D.; Assunção, A. C. S.; Pimenta, L. P. S.; *Quim. Nova*. **2003**, *26*, 319.

Pauli, E. D.; Scarminio, I. S.; Tauler, R.; *J. Chemometrics* **2016**; *30*, 75.

Pinto, A. C. Q.; Silva, E. M.; *Graviola para exportação: aspectos técnicos da produção*, Brasília: Embrapa, **1994**.

Pinto, A. C. Q.; Cordeiro, M. C. R.; Andrade, S. R. M.; Ferreira, F. R.; Filgueiras, H. A. C.; Alves, R. E.; Kinpara, D. I.; *Annona species*, Southampton: University of Southampton, **2005**.

Pisano, P. L.; Silva, M. F.; Olivieri, A. C.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2014**, *132*, 1.

Ragasa, C. Y.; Soriano, G.; Torres, O. B.; Don, M.-J.; Shen, C-C.; *Phcog. J.* **2012**, *4*, 32.

Ragasa, C. Y.; Galian, R. F.; Shen, C-C.; *Der Pharma Chemica* **2014**, *6*, 382.

Risso, W. E.; Scarminio, I. S.; Moreira, E. G.; *Indian J. Exp. Biol.* **2010**, *48*, 811.

Rupprecht, J. K.; Hui, Y-H.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 237.

Santos, A. F.; Sant'a, A. E. G.; *Phytomedicine*, **2001**, *8*, 115.

Scarminio, I. S.; Ishikawa, D. N.; Barreto, W. J.; Paczkowski, E. L.; Arruda, I. C.; *Quim. Nova*, **1998**, *21*, 590.

Shi, G.; McDougal, J. M.; McLaughlin, J. L.; *Phytochem.* **1997**, *45*, 719.

Sena, M. M.; Poppi, R. J.; Frighetto, R. T. S.; Valarini, P. J.; *Quim. Nova*, **2000**, *23*, 547.

Silva, A. F.; Richter, W. E.; Meneses, H. G. C.; Faria, S. H. D. M.; Bruns, R. E.; *J. Phys. Chem. A*. **2012**, *116*, 8238.

Silva, R. R.; *Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de Rollinia mucosa (Jacq.) Baill por métodos quimiométricos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, **2009**.

Simirgiotis, M. J.; Silva, M.; Becerra, J.; Schmeda-Hirschmann, G.; *Food Chem.*, **2012**, *131*, 318.

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^a ed., Florianópolis: Editora UFSC, **2003**.

Skotti, E.; Kountouri, S.; Bouchagier, P.; Tsitsigiannis, D. I.; Polissiou, M.; Tarantilis, P. A.; *Spectrochim. Acta A.*, **2014**, *127*, 463.

Soares, P. K.; Bruns, R. E.; Scarminio I. S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 644.

Souza, E. B. R. de; Silva, R. R. da; Afonso, S.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 4176.

Souza, M. F.; Martins, M. Q.; Silva, M. F. O.; Coelho, R. I.; *Agronomía Colombiana*, **2012**, *30*, 41.

Steele, D.; Muller, A.; *Spectrochim. Acta A* **1992**, *48A*, 495.

Sun, S.; Liu, J.; Kadouh, H.; Sun, X.; Zhou, K.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2773.

Viégas, I. J. M.; Frazão, D. A. C.; *Graviola: Nutrição, calagem e adubação. Circular Técnica*, Belém: Embrapa, *36*, **2004**.

Wang, L-Q.; Nakamura, N.; Meselhy, M. R.; Hattori, M.; Zhao, W. M.; Cheng, K- F.; Yang, R-Z.; Qin, G-W.; *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1109.

Weckwerth, W.; Morgenthal, K.; *Drug Discov. Today*, **2005**, *10*, 1551.

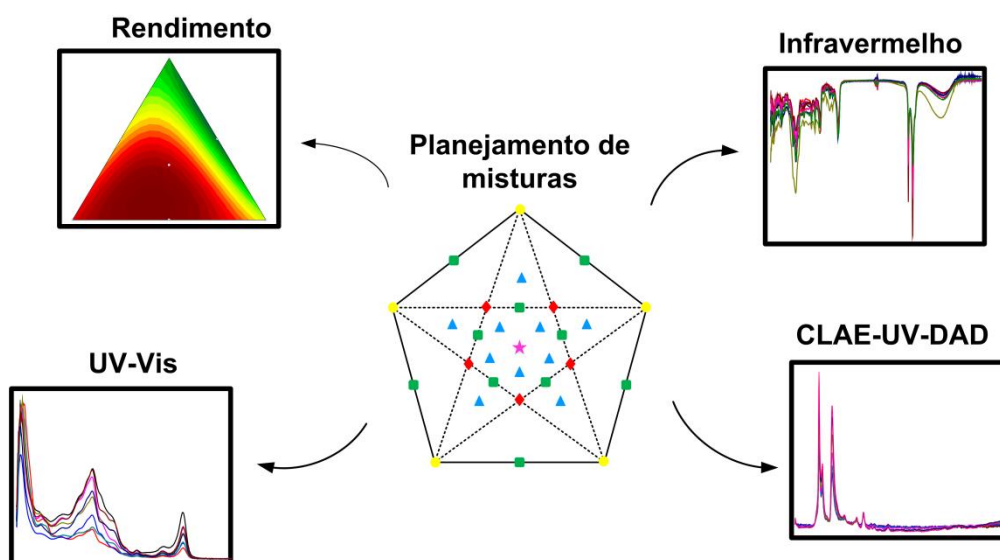
Wu, F.-E.; Gu, L. Z.; Zhao, G.-X.; Zhang, Y.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 830.

Yamamoto, S.; Abe, M.; Nakanishi, S.; Murai, M.; Miyoshi, H.; *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3090.

Yu, J.-G.; Gui, H.-Q.; Luo, X.-Z.; Sun, L.; *Phytochem.* **1998**, *49*, 1689.

Capítulo II

Planejamento estatístico de mistura de solventes como ferramenta no processo de extração de metabólitos extraídos de folhas de *Annona muricata*



Resumo

Planejamento estatístico de misturas de cinco solventes: etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio e análise de componentes principais foram usados para avaliar o efeito do solvente e suas propriedades solvatocrômicas na impressão digital metabolômica da *Annona muricata*. Os extratos de plantas preparados de acordo com o planejamento experimental de misturas de folhas coletadas nas diferentes estações climáticas (primavera, verão, outono e inverno) e condições de luminosidade solar foram analisados por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), espectroscopia no infravermelho (IV) e por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Nestes dados foram aplicados métodos quimiométricos como análise de componentes principais (ACP). Os resultados mostraram que o rendimento do extrato aumenta com a adição de etanol na composição do solvente extrator e indica que no decorrer das estações, há uma variação no teor total de metabólitos extraídos, tanto das folhas expostas ao sol quanto das autossombreadas. A associação de ferramentas quimiométricas aos dados espectroscópicos na região do UV-Vis, IV e de CLAE-DAD auxiliaram na escolha do solvente extrator diante da diversidade de classes de metabólitos que podem ser extraídas e no estudo das variações do meio ambiente em que a planta é cultivada.

Palavras-chave: *Annona muricata*, extração, planejamento estatístico de misturas, impressão digital.

INTRODUÇÃO

O estudo da composição química de material vegetal depende da escolha adequada dos métodos de extração, uma vez que interfere diretamente no resultado final da análise. O desenvolvimento de métodos extrativos envolvem técnicas de extração convencionais e não convencionais. Juntamente com os métodos convencionais já estabelecidos na literatura, diversos novos métodos têm sido usados, mas nenhum método é considerado padrão para extração. A eficiência dos métodos de extração convencionais e não convencionais na sua maioria depende de parâmetros inerentes a extração, conhecimento da matriz vegetal e química dos compostos bioativos (Azmir *et al.*, 2013).

Os métodos convencionais baseiam-se no poder extrativo do solvente e na técnica utilizada, como: maceração, percolação e turbo-extração. A partir destas é possível derivar outras técnicas com a aplicação de calor e/ou agitação, sendo elas: extração por Soxhlet, hidrodestilação, digestão, entre outras (Azmir *et al.*, 2013). Os métodos não convencionais são utilizados para superar as limitações dos métodos convencionais de extração sendo as mais utilizadas o ultrassom (Zhou *et al.*, 2015), micro-ondas (Liazid *et al.*, 2011), fluido supercrítico (Daneshvand *et al.*, 2012), líquido pressurizado (Foan e Simon, 2012), entre outros. Essas técnicas reduzem o tempo operacional e melhoram o rendimento no processo extrativo.

Os trabalhos envolvendo processos extrativos e metodologias para melhorar a condição experimental envolvem em sua grande maioria planejamentos fatoriais com o propósito de aumentar o rendimento dos extratos vegetais ou otimizar as condições para extração de uma classe específica de compostos (Bogusz Jr. *et al.*, 2011; Liazid *et al.*, 2011; Michel *et al.*, 2011; Paiva *et al.*, 2012). Os planejamentos fatoriais com a

metodologia de superfície de resposta têm sido aplicados extensivamente em desenvolvimento de processos extrativos em material vegetal (Santos *et al.*, 2008).

Esses métodos multivariados podem ser aplicados em diferentes métodos de extração, principalmente nas técnicas não convencionais envolvendo diferentes fatores experimentais, como agitação, volume do meio extrator (Liazid *et al.*, 2011), número de ciclos, potência (Michel *et al.*, 2011), temperatura (Bogusz Jr. *et al.*, 2011), tempo (Paiva *et al.*, 2012), entre outros.

O processo extrativo depende de interações moleculares entre a fase extratora (solvente) e os constituintes químicos do soluto. Diferentes interações regem os perfis metabolômicos, sendo as ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações dipolo-dipolo, transferência de cargas e propriedades ácido-base, as principais. Em matrizes complexas, tais interações são de difícil controle diante da diversidade de compostos químicos e teores quantitativos, o que impede estabelecer parâmetros únicos e globais em extrações de material vegetal. Sendo assim, não há como prever a impressão digital metabolômica estabelecida para determinado material, sem antes estabelecer as relações de interações oriundas do solvente com o material (Soares *et al.*, 2011).

A extração muito se assemelha a técnicas cromatográficas no que diz respeito as interações entre soluto e solvente, sendo que, na cromatografia já existem alguns fatores experimentais bem estabelecidos que podem auxiliar a extração/separação. Os parâmetros de Snyder que englobam acidez, basicidade e dipolaridade dos solventes são um exemplo pertinente e fundamentado (Snyder *et al.*, 1993).

Solventes com valores baixos de acidez são fortes receptores de prótons ou fortes doadores de elétrons, isto é, bases de Lewis e interagem preferencialmente com compostos que possuem caráter ácido, ou seja, fortes doadores de prótons, como ácidos

carboxílicos, álcoois, fenóis, entre outros. Já os solventes com baixa basicidade tem preferência por compostos nitrogenados, principalmente aminas, e os solventes com alto valor de dipolaridade extraem preferencialmente compostos que contêm moléculas com grupo funcional polar tais como éteres, ésteres, sulfetos, sulfóxidos, tióis, hidroxilas, halogênios, aldeídos, cetonas, compostos com ligação nitro (-NO₂) e nitrila (-CN). Como forma de conhecer a interação do material com a variação dos parâmetros de Snyder tem-se os planejamentos estatísticos de misturas. O uso de um planejamento assegura a confiabilidade do estudo experimental, uma vez que os experimentos são realizados de forma ordenada. O planejamento experimental de misturas restringe que a somatória dos componentes da mistura deve ser sempre 100% (Barros Neto *et al.*, 2010).

Para obtenção do metaboloma de uma planta, muitas vezes são empregados solventes em sua forma pura. No entanto, conforme já demonstrado por nosso grupo de pesquisa, a utilização de planejamentos estatísticos de misturas de solventes é um forte aliado para este procedimento (Delaroza e Scarminio, 2008; Garcia *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2010). A escolha do solvente extrator deve ser referida em conjunto com a matriz vegetal, como forma de analisar a interação dos compostos na extração, viabilizando a otimização do processo através do máximo rendimento (Delaroza *et al.*, 2014, Moreira e Scarminio, 2013), do maior número de metabólitos extraídos (Souza *et al.*, 2009), da variedade de classes (Justo *et al.*, 2014), do estudo fitoquímico (Lonni *et al.*, 2012), de biomarcadores (Pauli *et al.*, 2016) e metabólitos alvo (Moreira *et al.*, 2014). As combinações de solventes podem variar as interações solvatocrômicas e a polaridade do meio extrator, o que influencia na classe de compostos extraídos do metaboloma (Kamlet *et al.*, 1979; Buncel e Rajagop, 1989; Buncel e Rajagop, 1990; Snyder *et al.*, 1993). Este metaboloma representa o grupo de

todos os metabólitos presentes em seu tecido celular, sendo este conjunto de substâncias químicas propiciador de uma visão geral das condições da planta. Os metabólitos presentes na matriz vegetal apresentam variação de sua quantidade e/ou variedade, assim como pode haver variações dentro de uma mesma espécie ocasionada por diversos fatores, tais como sazonalidade (Salminen *et al.*, 2004) e radiação solar incidente na planta (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

A metabolômica aplicada a materiais vegetais surge para propor metodologias analíticas para identificação e/ou quantificação dos metabólitos, em que se objetiva conseguir o máximo de informação química do material de interesse em uma única análise. As técnicas comumente utilizadas para esse fim são: espectroscopia no infravermelho (IV), espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN 1D e 2D) (Soares e Scarminio, 2008; Funari *et al.*, 2013; Funari *et al.*, 2014).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar planejamento estatístico de misturas e análise de componentes principais para avaliar o efeito do solvente e suas propriedades solvatocrômicas na impressão digital metabolômica de folhas de *Annona muricata* coletadas em diferentes níveis de radiação solar e estações climáticas.

EXPERIMENTAL

Material Vegetal

A espécie estudada neste trabalho foi *Annona muricata* pertencente à família Annonaceae. As folhas autossombreadas e expostas ao sol foram coletadas durante as quatro estações climáticas (de abril de 2011 a janeiro de 2012) no campus da

Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. As exsiccatas das amostras de *Annona muricata* autossombreada (FUEL nº 49.284) e expostas ao sol (FUEL nº 49.285) foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Londrina. A secagem das folhas foi feita a 25 °C por nove dias e as amostras foram estocadas em local com temperatura controlada.

Reagentes

Todos os solventes utilizados na extração foram de grau analítico: etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio adquiridos por FMaia. Para a fase móvel das análises cromatográficas foram utilizados metanol e acetonitrila (LiChrosolv), grau cromatográfico e água ultrapura com sistema de purificação Millipore Plus Milli-Q.

Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados usando uma mistura de cinco componentes: etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d), acetona (A) e clorofórmio (c), e as suas proporções variam de acordo com um planejamento experimental centroide simplex (Figura 1) (Barros Neto *et al.*, 2010). A proporção de cada solvente usado na extração está especificada na Tabela 1. Foram preparados 31 diferentes extratos com o ponto central realizado em triplicata. Cada extrato foi preparado pesando 2,0 g de folhas secas e adicionado 15,0 mL de solvente extrator, de acordo com a Tabela 1. Estas misturas foram deixadas em banho de ultrassom (Unique Ultracleaner) por 60 minutos. Os extratos foram filtrados com papel de filtro para separar a solução das folhas. A maceração em banho de ultrassom realizada mais 14 vezes e o volume total de solvente extrator adicionado às folhas foi 225,0 mL. O solvente foi evaporado em evaporador

rotatório (Fisaton 801) removendo todo o solvente que estivesse presente na amostra até atingir peso constante (Souza *et al.*, 2009; Afonso *et al.*, 2015b).

Tabela 1. Proporção dos solventes e suas misturas usadas na extração, de acordo com o planejamento experimental centroide simplex.

| | Amostras | Solvente Extrator | | | | |
|----|----------------------|-------------------|------------------|---------------|---------|-------------|
| | | etanol | acetato de etila | diclorometano | acetona | clorofórmio |
| 1 | etanol (e) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | acetato de etila (a) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | diclorometano (d) | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 4 | acetona (A) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 5 | clorofórmio (c) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | e:a | 1/2 | 1/2 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | e:d | 1/2 | 0 | 1/2 | 0 | 0 |
| 8 | e:A | 1/2 | 0 | 0 | 1/2 | 0 |
| 9 | e:c | 1/2 | 0 | 0 | 0 | 1/2 |
| 10 | a:d | 0 | 1/2 | 1/2 | 0 | 0 |
| 11 | a:A | 0 | 1/2 | 0 | 1/2 | 0 |
| 12 | a:c | 0 | 1/2 | 0 | 0 | 1/2 |
| 13 | d:A | 0 | 0 | 1/2 | 1/2 | 0 |
| 14 | A:c | 0 | 0 | 0 | 1/2 | 1/2 |
| 15 | d:c | 0 | 0 | 1/2 | 0 | 1/2 |
| 16 | e:a:d | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 0 | 0 |
| 17 | e:A:c | 1/3 | 0 | 0 | 1/3 | 1/3 |
| 18 | e:a:c | 1/3 | 1/3 | 0 | 0 | 1/3 |
| 19 | e:d:c | 1/3 | 0 | 1/3 | 0 | 1/3 |
| 20 | e:a:A | 1/3 | 1/3 | 0 | 1/3 | 0 |
| 21 | d:A:c | 0 | 0 | 1/3 | 1/3 | 1/3 |
| 22 | a:A:c | 0 | 1/3 | 0 | 1/3 | 1/3 |
| 23 | a:d:c | 0 | 1/3 | 1/3 | 0 | 1/3 |
| 24 | a:d:A | 0 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 0 |
| 25 | e:d:A | 1/3 | 0 | 1/3 | 1/3 | 0 |
| 26 | e:a:d:A | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 0 |
| 27 | a:d:A:c | 0 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| 28 | e:d:A:c | 1/4 | 0 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| 29 | e:a:A:c | 1/4 | 1/4 | 0 | 1/4 | 1/4 |
| 30 | e:a:d:c | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 0 | 1/4 |
| 31 | e:a:d:A:c | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 |

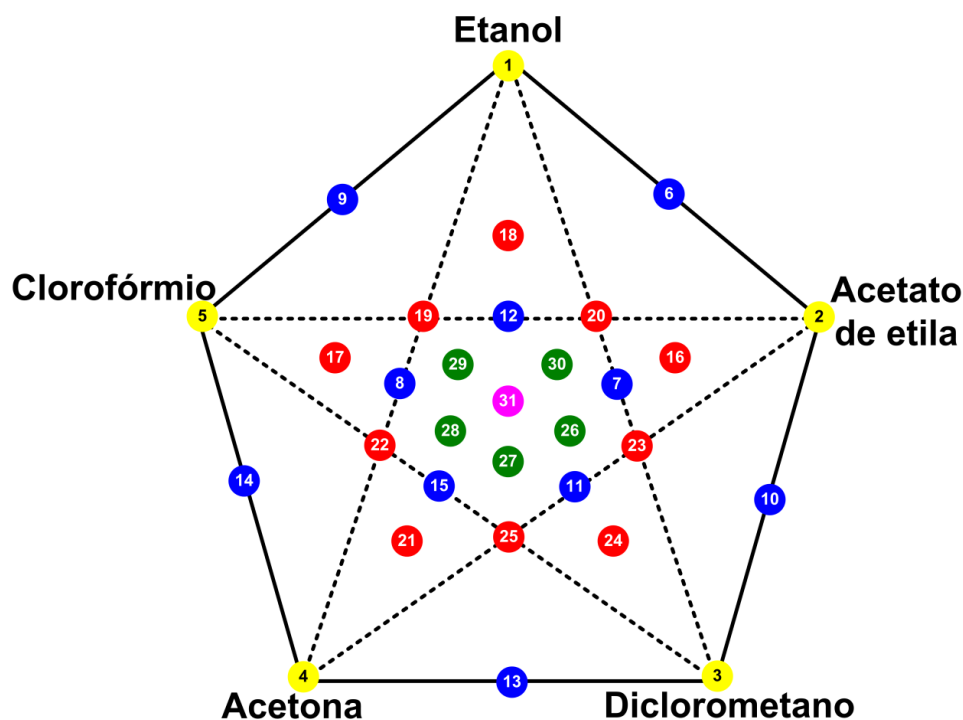


Figura 1. Planejamento centroide simplex de misturas para os solventes: etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio, detalhados na Tabela 1.

A porcentagem de rendimento dos extratos foi calculada pela Equação 1.

$$\%R = \frac{P_{ext}}{P_{fol}} \times 100 \quad (1)$$

onde, %R é a porcentagem de rendimento, P_{ext} é o peso em gramas do extrato e P_{fol} é o peso em gramas de folhas usadas na extração.

Escolha do solvente

A escolha do solvente foi baseada no triângulo de seletividade (Snyder *et al.*, 1993) em que os solventes são agrupados, segundo o tipo de interação em que participam e não apenas o valor da polaridade total. A Tabela 2 apresenta os valores de α (acidicidade), β (basicidade) e π (dipolaridade) normalizados, bem como o valor do índice de polaridade (P) dos solventes puros e das misturas do planejamento experimental.

Esses valores foram calculados pelas equações:

$$\alpha = \sum_{i=1}^n \alpha_i \varphi_i \quad (2)$$

$$\beta = \sum_{i=1}^n \beta_i \varphi_i \quad (3)$$

$$\pi = \sum_{i=1}^n \pi_i \varphi_i \quad (4)$$

$$P = \sum_{i=1}^n P_i \varphi_i \quad (5)$$

em que, n é o número de solventes, α_i, β_i, π_i e P_i são os valores dos solventes puros e φ_i são as proporções das misturas.

A Figura 2 apresenta o triângulo de seletividade dos solventes para os componentes puros e misturas da Tabela 2. Os parâmetros solvatocrômicos, α , β e π são medidas relativas da força e tipo de interação molecular do soluto com os solventes.

A vantagem de usar os valores desses parâmetros é o agrupamento dos solventes, conforme o tipo de interação com os compostos de interesse. Solventes quimicamente semelhantes possuem parâmetros de seletividade similares e fazem parte do mesmo grupo, embora possam apresentar diferentes valores de polaridades.

Apesar dos parâmetros solvatocrômicos terem sido feitos para uso na cromatografia, também podem ser calculados para solventes usados na extração ou qualquer outra análise, uma vez que foram medidos experimentalmente por espectroscopia (Snyder *et al.*, 1993).

Tabela 2. Classificação dos solventes de acordo com a seletividade normalizada.

| Planejamento | Solventes | α | π | β | P |
|--------------|----------------------|----------|-------|---------|------|
| 1 | etanol (e) | 0,39 | 0,25 | 0,36 | 4,30 |
| 2 | acetato de etila (a) | 0,00 | 0,55 | 0,45 | 4,40 |
| 3 | diclorometano (d) | 0,27 | 0,73 | 0,00 | 3,10 |
| 4 | acetona (A) | 0,06 | 0,56 | 0,38 | 5,10 |
| 5 | clorofórmio (c) | 0,43 | 0,57 | 0,00 | 4,10 |
| 6 | e:a | 0,19 | 0,4 | 0,41 | 4,35 |
| 7 | e:d | 0,33 | 0,49 | 0,18 | 3,70 |
| 8 | e:A | 0,23 | 0,40 | 0,37 | 4,70 |
| 9 | e:c | 0,41 | 0,41 | 0,18 | 4,20 |
| 10 | a:d | 0,14 | 0,64 | 0,22 | 3,75 |
| 11 | a:A | 0,03 | 0,56 | 0,41 | 4,75 |
| 12 | a:c | 0,21 | 0,56 | 0,23 | 4,25 |
| 13 | d:A | 0,16 | 0,65 | 0,19 | 4,10 |
| 14 | A:c | 0,24 | 0,57 | 0,19 | 4,60 |
| 15 | d:c | 0,35 | 0,65 | 0,00 | 3,60 |
| 16 | e:a:d | 0,22 | 0,51 | 0,27 | 3,90 |
| 17 | e:A:c | 0,29 | 0,46 | 0,25 | 4,50 |
| 18 | e:a:c | 0,27 | 0,46 | 0,27 | 4,30 |
| 19 | e:d:c | 0,36 | 0,52 | 0,12 | 3,80 |
| 20 | e:a:A | 0,15 | 0,45 | 0,40 | 4,60 |
| 21 | d:A:c | 0,25 | 0,62 | 0,13 | 4,10 |
| 22 | a:A:c | 0,16 | 0,56 | 0,28 | 4,50 |
| 23 | a:d:c | 0,23 | 0,62 | 0,15 | 3,87 |
| 24 | a:d:A | 0,11 | 0,62 | 0,27 | 4,20 |
| 25 | e:d:A | 0,24 | 0,51 | 0,25 | 4,17 |
| 26 | e:a:d:A | 0,18 | 0,52 | 0,30 | 4,22 |
| 27 | a:d:A:c | 0,19 | 0,60 | 0,21 | 4,17 |
| 28 | e:d:A:c | 0,29 | 0,53 | 0,18 | 4,15 |
| 29 | e:a:A:c | 0,22 | 0,48 | 0,30 | 4,48 |
| 30 | e:a:d:c | 0,27 | 0,53 | 0,20 | 3,98 |
| 31 | e:a:d:A:c | 0,23 | 0,53 | 0,24 | 4,20 |

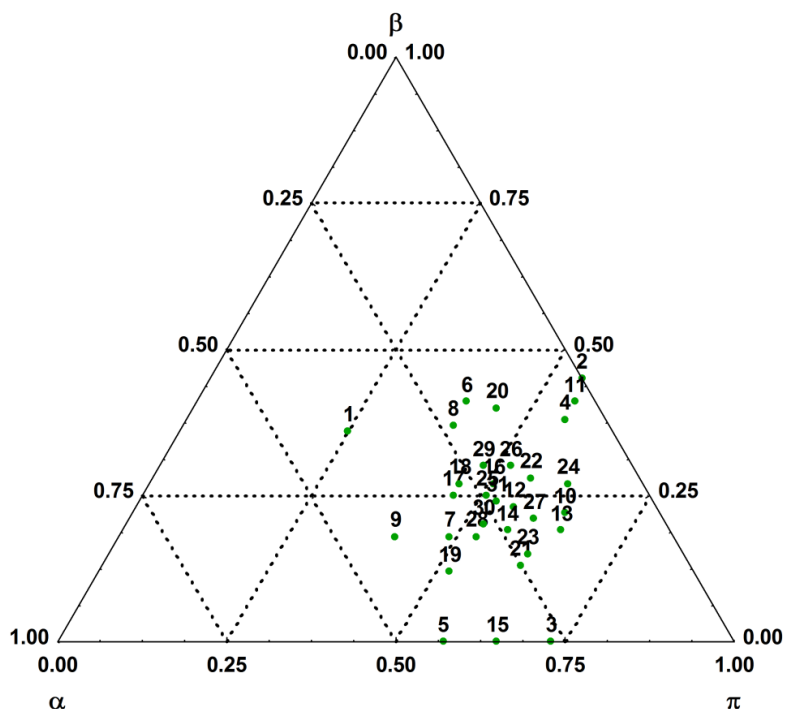


Figura 2. Triângulo de seletividade baseado nos dados solvatocrômicos da Tabela 2.

O etanol está localizado no centro do triângulo, visto que apresenta valores similares para os três parâmetros, ou seja, é um solvente tanto doador quanto receptor de prótons, assim como pode realizar interações dipolo-dipolo. Acetato de etila, acetona e a mistura binária destes solventes apresentam caráter básico e dipolar, isto é, valores próximos para π e β , com α próximo de zero. O diclorometano e o clorofórmio possuem altos valores de π e valores de β igual a 0, por isso estão localizados sobre o eixo acidez-dipolaridade, apresentando um caráter altamente dipolar.

A maior parte das misturas está localizada próxima ao eixo π e β . Isso ocorre porque o acetato de etila e a acetona apresentam valores de $\alpha \cong 0$ e o diclorometano e o clorofórmio $\beta = 0$. Em compensação, estes solventes apresentam altos valores de π , fazendo com que as misturas que contêm estes solventes apresentem principalmente interação dipolar e, no processo de extração, estas misturas extraem preferencialmente compostos com interação dipolo.

Análise espectroscópica na região do UV-Vis

As amostras foram preparadas pesando 3,0 mg do extrato seco, solubilizados em 1,5 mL do solvente extrator e diluídos na proporção de 1:10. Os espectros foram registrados na região de 200 a 800 nm em um espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 60.

Análise espectroscópica na região do infravermelho

Os espectros foram registrados em % de transmitância com resolução de 4,0 cm^{-1} na região de 4000-650 cm^{-1} em espectrômetro infravermelho Thermo Scientific FT-IR Nicolet iS10.

Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

As amostras foram preparadas pesando-se 3,0 mg do extrato concentrado, redissolvendo em 1,00 mL de metanol seguido de diluição na fase móvel (1:500). Os extratos diluídos foram filtrados em filtro de 0,20 μm CHROMAFIL[®] XTRA PTFE-20/25. A coluna cromatográfica utilizada foi Kinetex C18 2.6 μm da Phenomenex, com dimensões de 100 x 4,6 mm e pré-coluna Kinetex C18 da Phenomenex, com dimensões de 50 x 4,6 mm. O tempo de corrida foi de 15 minutos, o volume de injeção de 20 μL , com eluição isocrática, em fase reversa, com vazão da fase móvel de 1,0 mL min^{-1} e monitorada no comprimento de onda de 220 nm. A fase móvel foi constituída por 35% de acetonitrila, 35% de metanol e 30% de água (v/v/v), com força cromatográfica 2,0. A água utilizada para a fase móvel foi obtida em um purificador de água Millipore Plus e as análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de diodos (DAD) da Thermo-Electron Corporation.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de rendimento do extrato bruto das folhas de *Annona muricata* foi usada para comparar e diferenciar as amostras autossombreadas e expostas diretamente ao sol e coletadas nas quatro estações climáticas. O efeito da composição dos solventes: etanol (e), acetato de etila (a), diclorometano (d), acetona (A) e clorofórmio (c) sobre o rendimento dos extratos das folhas de *Annona muricata* expostas ao sol e autossombreadas de folhas coletadas nas estações da primavera, verão, outono e inverno está mostrado na Figura 3.

No verão, as folhas autossombreadas apresentaram rendimentos inferiores do que aquelas expostas diretamente ao sol. O mesmo ocorreu no outono, com maior diferença pronunciada para esta estação. Já no inverno e primavera esta diferença no rendimento entre folhas autossombreadas e expostas diretamente ao sol foi minimizada.

De modo geral dentre os solventes puros, o etanol apresentou maior eficiência no rendimento total do processo extrativo em todas as estações, para ambas as coletas. Os demais solventes apresentam oscilações pertinentes à estação e à coleta. Dentre as composições binárias, ainda é visível que todas as misturas contendo etanol apresentam rendimento superior, o mesmo acontece para as misturas ternárias. Diante dos rendimentos totais para os diversos sistemas extratores o teor total de metabólitos nas folhas de *Annona muricata* é dependente da condição de luminosidade somente nas estações do verão e outono. Este resultado pode ser explicado pelo fato que no outono há a troca das folhas da planta, por esse motivo, as folhas que nasceram no verão são substituídas no outono.

As diversas oscilações dos valores dos rendimentos para as estações e amostras de folhas autossombreadas e expostas diretamente ao sol pode ser mais bem analisado e compreendido por meio das superfícies de resposta para o rendimento do extrato bruto, em função da composição do solvente extrator.

Os efeitos dos solventes foram calculados nos modelos linear, quadrático e cúbico especial, a fim de obter ajustes de mínimos quadrados dos rendimentos totais dos extratos. Os modelos foram validados pela realização de análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste, Tabela 3.

O modelo linear apresentou falta de ajuste para todos os processos extrativos no nível de 95% de confiança. Os rendimentos brutos para as folhas coletadas na primavera sob sol e sombra, verão sob sombra, outono sob sol e inverno sob sombra não mostraram falta de ajuste no nível de confiança de 95% para o modelo quadrático. Os rendimentos extrativos das folhas provenientes da estação verão sob sol, outono sob sombra e inverno sob sol ajustaram ao modelo cúbico especial, também no nível de 95% de confiança.

As equações simplificadas (6-13) dos modelos quadráticos e cúbicos para os rendimentos previstos dos extratos das folhas coletadas nas estações da primavera (P), verão (V), outono (O) e inverno (I) sob condições de sol (sol) e autossombreamento (sb), para os diferentes solventes e suas misturas, são:

$$\hat{y}_{P_{sol}} = 10,41e + 3,29a + 1,89d + 7,95A + 2,75c + 7,96ea + 17,83ed + 10,04eA + 9,06ad + 10,21ac + 9,97dc \quad (6)$$

$(\pm 0,72) \quad (\pm 0,72) \quad (\pm 0,72) \quad (\pm 0,72) \quad (\pm 0,72) \quad (\pm 2,91) \quad (\pm 2,91) \quad (\pm 2,91)$
 $(\pm 2,91) \quad (\pm 2,91) \quad (\pm 2,91)$

$$\hat{y}_{P_{sb}} = 10,81e + 6,76a + 8,46d + 7,91A + 6,76c + 4,27ea + 10,10ed + 4,52eA + 11,91ec + 4,87ac + 4,39Ac \quad (7)$$

$(\pm 0,35) \quad (\pm 0,35) \quad (\pm 0,35) \quad (\pm 0,35) \quad (\pm 0,35) \quad (\pm 1,40) \quad (\pm 1,40) \quad (\pm 1,40)$
 $(\pm 1,40) \quad (\pm 1,40) \quad (\pm 1,40)$

extrato, enquanto para as folhas autossombreadas este efeito tem menor significância. Por outro lado os coeficientes lineares acetato de etila, diclorometano e clorofórmio são mais significativos para a extração em folhas autossombreadas, uma vez que o teor quantitativo total para estes solventes é superior quando comparado com as folhas expostas ao sol.

As equações previstas 8 e 9 para os rendimentos das folhas coletadas no verão apresentam coeficientes lineares superiores para folhas expostas ao sol e inferiores para as folhas autossombreadas. Dentre os termos binários, não há efeito de grande relevância entre os modelos. No outono as equações previstas 10 e 11 mostram efeito sinérgico para a mistura etanol/acetona para as folhas coletadas ao sol, enquanto a mistura diclorometano/acetona tem efeito antagônico para o rendimento de folhas autossombreadas. No inverno, as equações previstas 12 e 13 para os modelos apresentam termos lineares próximos entre as folhas expostas ao sol e autossombreadas.

De forma geral, a maioria dos coeficientes significativos das equações 6-13 apresenta o solvente etanol na composição da mistura.

Tabela 3. ANOVA para os resultados da regressão dos modelos quadrático e cúbico especial para a porcentagem de rendimento dos extratos de folhas de *Annona muricata* expostas ao sol e autossombreadas e coletadas nas quatro estações do ano.

| Equação | Fonte de variação | SQ | g.l. | MQ | Fcal ^c |
|----------------|---------------------------------|----------|------|----------|-------------------|
| 6 ^a | Regressão | 173,3887 | 14 | 12,3849 | 22,53882 |
| | Resíduos | 9,8909 | 18 | 0,54949 | |
| | Falta de ajuste | 9,2911 | 16 | 0,58070 | 1,93650 |
| | Erro Puro | 0,5997 | 2 | 0,29987 | |
| | Total | 183,2795 | 32 | 5,72749 | |
| | % de variação explicada | 94,60 | | | |
| | % máxima de variação explicável | 99,67 | | | |
| 7 ^b | Regressão | 118,9588 | 21 | 5,664703 | 23,29854 |
| | Resíduos | 2,67450 | 11 | 0,243135 | |
| | Falta de ajuste | 2,64120 | 9 | 0,293463 | 17,61474 |

| | | | | | |
|-----------------|---------------------------------|----------|----|----------|----------|
| | Erro Puro | 0,03330 | 2 | 0,016660 | |
| | Total | 121,6333 | 32 | 3,801039 | |
| | % de variação explicada | 97,80 | | | |
| | % máxima de variação explicável | 99,97 | | | |
| 8 ^a | Regressão | 121,9628 | 14 | 8,71163 | 8,063330 |
| | Resíduos | 19,4472 | 18 | 1,08040 | |
| | Falta de ajuste | 18,7642 | 16 | 1,17276 | 3,433979 |
| | Erro Puro | 0,6830 | 2 | 0,34152 | |
| | Total | 141,4100 | 32 | 4,41906 | |
| | % de variação explicada | 86,25 | | | |
| | % máxima de variação explicável | 99,52 | | | |
| 9 ^b | Regressão | 130,3970 | 20 | 6,51985 | 13,38282 |
| | Resíduos | 5,8462 | 12 | 0,48718 | |
| | Falta de ajuste | 5,7762 | 10 | 0,57762 | 16,50470 |
| | Erro Puro | 0,0700 | 2 | 0,03500 | |
| | Total | 136,2432 | 32 | 4,25760 | |
| | % de variação explicada | 95,71 | | | |
| | % máxima de variação explicável | 99,95 | | | |
| 10 ^a | Regressão | 64,1629 | 14 | 4,58307 | 36,0372 |
| | Resíduos | 2,28917 | 18 | 0,12718 | |
| | Falta de ajuste | 2,2105 | 16 | 0,13816 | 3,51271 |
| | Erro Puro | 0,07866 | 2 | 0,03933 | |
| | Total | 66,45210 | 32 | 2,07663 | |
| | % de variação explicada | 96,56 | | | |
| | % máxima de variação explicável | 99,88 | | | |
| 11 ^a | Regressão | 29,97989 | 14 | 2,14142 | 11,83994 |
| | Resíduos | 3,25555 | 18 | 0,18086 | |
| | Falta de ajuste | 3,22703 | 16 | 0,20169 | 14,14262 |
| | Erro Puro | 0,02852 | 2 | 0,01426 | |
| | Total | 33,23544 | 32 | 1,03861 | |
| | % de variação explicada | 90,20 | | | |
| | % máxima de variação explicável | 99,91 | | | |
| 12 ^b | Regressão | 41,92410 | 24 | 1,74684 | 8,92769 |
| | Resíduos | 1,56532 | 8 | 0,19567 | |
| | Falta de ajuste | 1,37225 | 6 | 0,22871 | 2,36922 |
| | Erro Puro | 0,19307 | 2 | 0,09653 | |
| | Total | 43,48942 | 32 | 1,35904 | |

| | | | | | |
|-----------------|---------------------------------|----------|----|---------|----------|
| | % de variação explicada | 96,40 | | | |
| | % máxima de variação explicável | 99,56 | | | |
| 13 ^a | Regressão | 66,56205 | 14 | 4,75443 | 12,44100 |
| | Resíduos | 6,87885 | 18 | 0,38216 | |
| | Falta de ajuste | 6,69820 | 16 | 0,41864 | 4,63479 |
| | Erro Puro | 0,18065 | 2 | 0,09033 | |
| | Total | 73,44090 | 32 | 2,29503 | |
| | % de variação explicada | 90,63 | | | |
| | % máxima de variação explicável | 99,75 | | | |

^a modelo quadrático, ^b modelo cúbico especial, ^c Valores da distribuição F no nível de 95% de confiança para os modelos quadrático e cúbico especial: $F_{14,18,5\%}=2,30$; $F_{16,2,5\%}=19,43$; $F_{24,8,5\%}=3,12$; $F_{6,2,5\%}=19,33$; $F_{20,12,5\%}=2,54$; $F_{10,2,5\%}=19,40$; $F_{21,11,5\%}=2,65$; $F_{9,2,5\%}=19,38$.

As curvas de nível contendo os rendimentos máximos previstos para os solventes extratores etanol/diclorometano/acetona para as equações 6-13 são apresentados na Figura 4. Foram escolhidos esses três solventes, pois os solventes acetato de etila e clorofórmio apresentaram baixo valores de rendimento.

Para as folhas coletadas na primavera, as curvas de nível preveem um rendimento máximo de 10 % para as folhas expostas diretamente ao sol e de 12 % para as autossombreadas. A superfície apresenta diferenças no que diz respeito a contribuições dos solventes extratores; para as folhas expostas ao sol a acetona está presente no máximo da superfície em associação com o etanol e o diclorometano, enquanto para as folhas autossombreadas, a superfície prevê um máximo com a mistura etanol/diclorometano.

Na estação verão, o rendimento máximo previsto pelo modelo é superior para as folhas expostas ao sol. O máximo da curva é semelhante à primavera, com maior porcentagem de etanol.

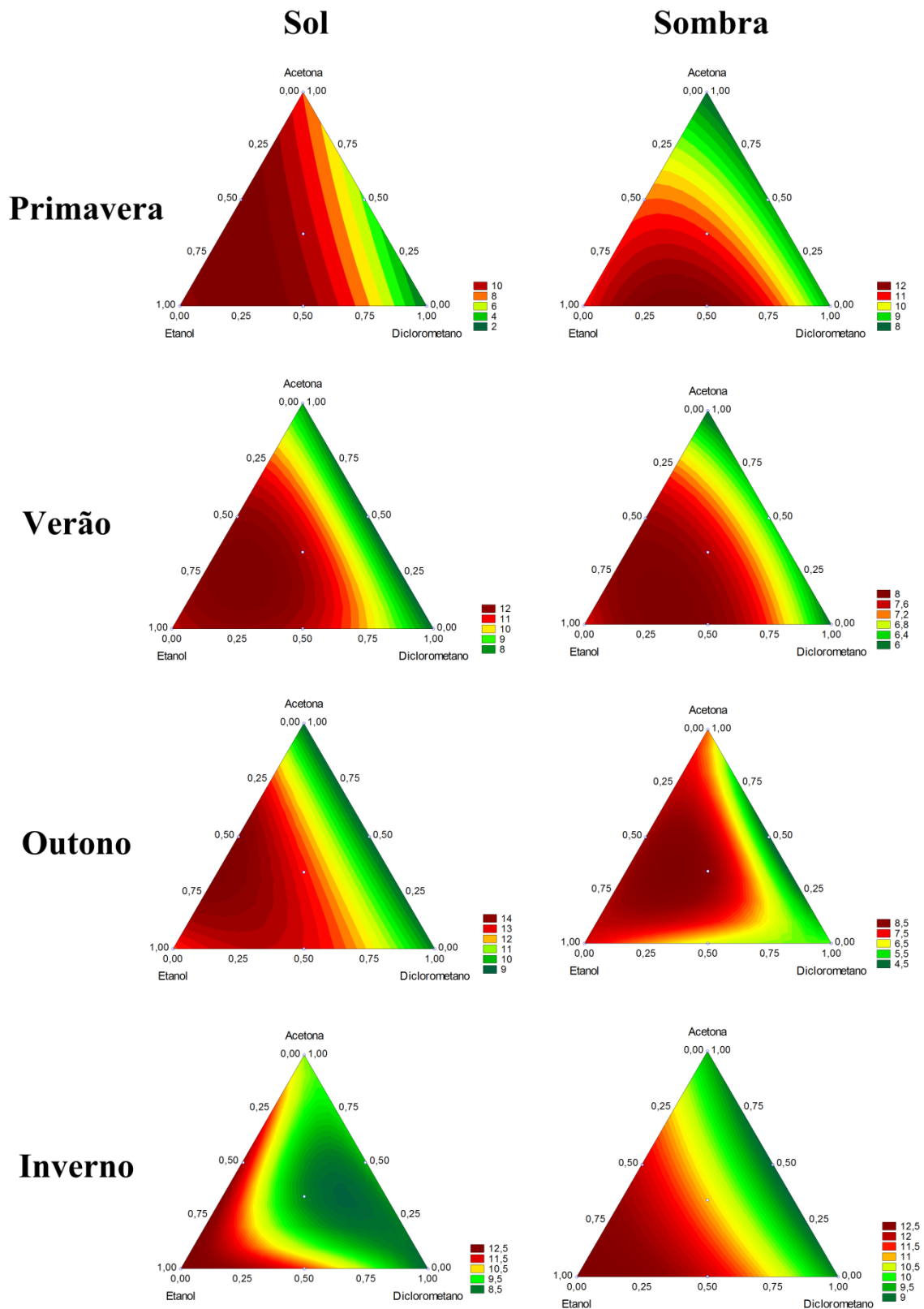


Figura 4. Curvas de nível para os rendimentos dos extratos das folhas de *Annona muricata* expostas ao sol e autossombreadas, coletadas nas estações da Primavera, Verão, Outono e Inverno.

No outono, o rendimento também é superior para as folhas expostas ao sol. Nestas, a superfície já sofre um deslocamento para a região binária de etanol/acetona, sinergismo visto na equação 10 para as folhas expostas diretamente ao sol. Na estação do inverno, os rendimentos máximos previstos pelo modelo são iguais, sendo deslocada para as regiões com maior volume de etanol.

O rendimento previsto e a mudança no perfil da curva de nível para os solventes extratores indica que no decorrer das estações primavera, verão e outono há uma variação no teor total de metabólitos extraídos tanto das folhas expostas diretamente ao sol quanto das autossombreadas (Faini *et al.*, 1999). Já entre as estações para as folhas expostas diretamente ao sol o rendimento máximo é visto no outono e mínimo na primavera, enquanto para as autossombreadas as estações primavera e inverno têm rendimentos máximos e as estações intermediárias verão e outono tem rendimento mínimo.

Outro fator que deve ser analisado para inferir a diversidade de metabólitos extraídos em cada ponto do planejamento de misturas diante da mudança de estação e das folhas expostas diretamente ao sol e autossombreadas tem-se as técnicas espectroscópicas e cromatográficas em que se avaliam a composição metabólica a partir de sua separação e perfis espectrais.

Visto que as amostras de folhas coletadas no verão autossombreadas e expostas ao sol mostraram diferenças em relação ao teor de compostos químicos extraídos, os extratos provenientes das folhas de *Annona muricata* coletadas nesta estação climática foram analisados por espectroscopia na região do ultravioleta-visível e infravermelho e obtido como informação os perfis espectrais.

Os dados obtidos pelas análises por UV-Vis foram submetidos à análise de componentes principais normalizados pelo autovalor (análise de fatores) para avaliar as

diferenças dos perfis espectrais. A matriz de dados foi composta de 601 linhas \times 33 colunas, as linhas representam os comprimentos de onda e as colunas as absorvâncias de cada ponto do planejamento.

A Figura 5 mostra as análises de fatores entre os fator 1 e fator 2, que explicam 89,64% da variância total dos dados para as amostras de folhas autossombreadas e 91,09% para as amostras de folhas expostas ao sol, ambas coletadas no verão.

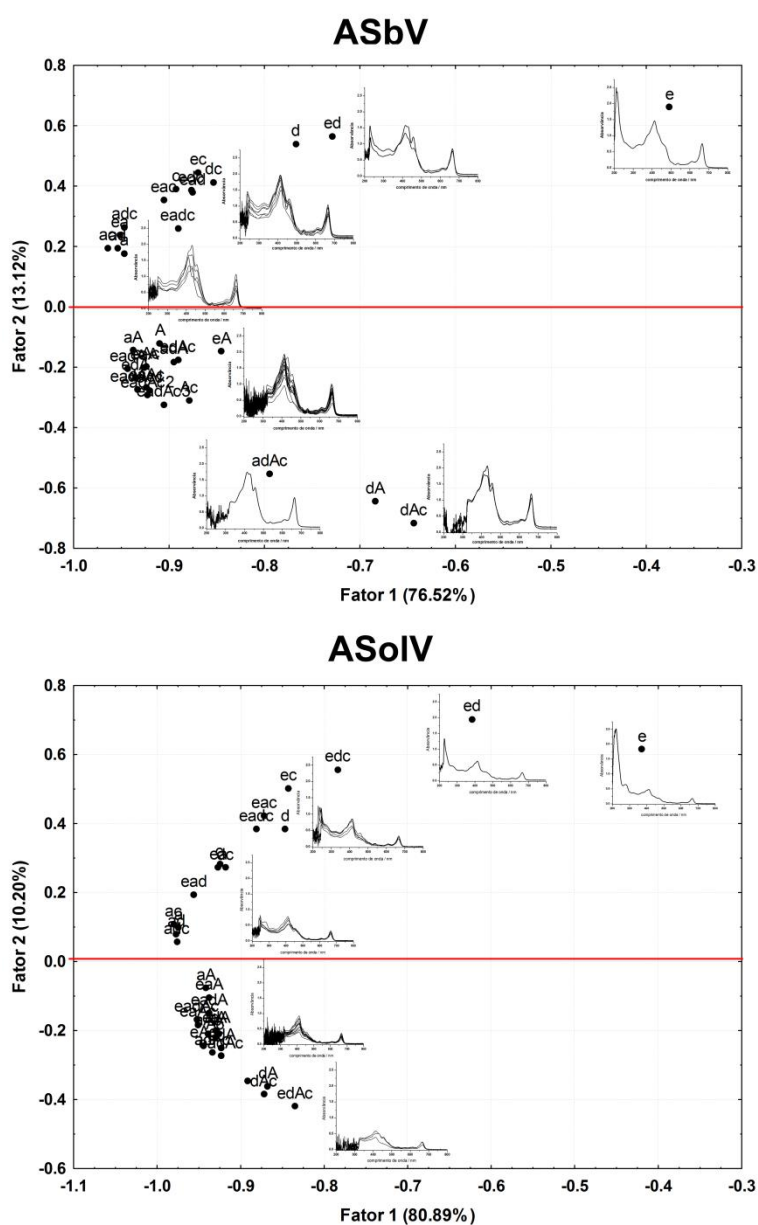


Figura 5. Análise de fatores dos espectros na região do UV-Vis dos extratos das folhas de *Annona muricata* coletadas no verão.

Os gráficos trazem uma correlação entre os espectros: quanto mais distantes os perfis estão, menor a similaridade entre estes. Todas as amostras discriminadas na região negativa do fator 2, para ambas amostras, são compostas por acetona na sua mistura do solvente extrator e apresentam perfis espectrais característicos de pigmentos (Schoefs, 2002). No entanto, há uma diferença nas intensidades das bandas nesta região em relação à exposição solar que a planta recebe, sendo mais intensas para as amostras de folhas autossombreadas.

No fator 2 positivo, a amostra extraída com etanol puro está mais distante das amostras extraídas com acetona ou suas misturas e a região mais intensa do espectro do extrato com etanol é característica de grupos nitro (210 nm), carboxila (200-210 nm) e éster (205 nm) (Arnason *et al.*, 1995), sendo este último característico da classe das acetogeninas, em virtude da presença de lactonas (Rupprecht *et al.*, 1990).

A correlação formada indica a presença de grupos cromóforos distintos em virtude dos solventes extratores etanol e acetona. Diante do parâmetro solvatocrômico α (acidicidade), este apresenta baixo valor para a acetona e alto valor para o etanol.

Como forma de avaliar o conjunto de metabólitos extraídos dentro do planejamento de misturas têm-se os perfis espectrais na região do infravermelho. Em análise de material vegetal essa técnica, além de simples e rápida, fornece muita informação sobre a composição química da matriz vegetal.

Os dados espectrais na região do infravermelho trazem informação referente a presença de grupos funcionais e a possível diversidade do metaboloma da planta. Os espectros foram dispostos em uma matriz de 1725 linhas (número de onda) por 66 colunas (% de transmitância para cada ponto do planejamento de misturas para amostras de folhas autossombreadas e expostas ao sol e coletadas no verão) e submetidos à análise de fatores.

A Figura 6 mostra a análise de fatores dos extratos obtidos do planejamento para as amostras de *Annona muricata* coletadas no verão de folhas autossombreadas (ASbV) e expostas ao sol (ASoIV). Os fatores F1 e F3 explicam 97,37% da variância total dos dados. As amostras expostas ao sol (ASoIV) estão discriminadas na região positiva do F3 e as autossombreadas (ASbV) na região negativa deste mesmo fator.

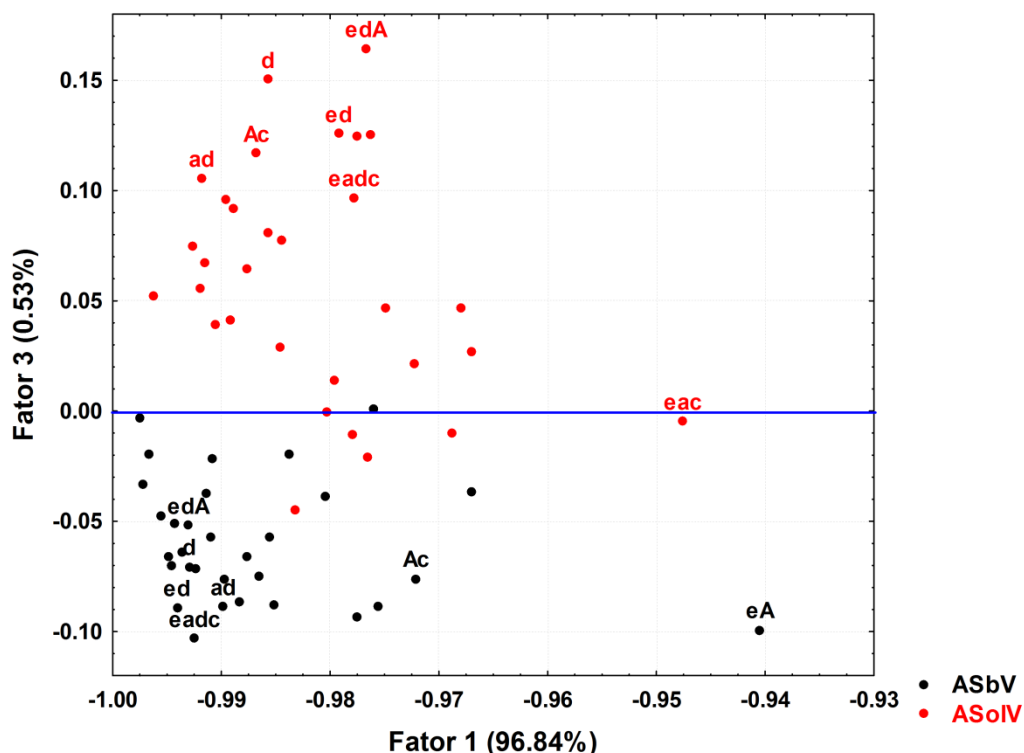


Figura 6. Escores dos fatores 1 e 3 dos espectros na região do infravermelho dos extratos de folhas autossombreadas e expostas ao sol e coletadas no verão.

As amostras em destaque no gráfico dos escores são as mais discriminantes em relação à exposição solar da planta. Além da evidente separação entre amostras autossombreadas e expostas ao sol, também é possível observar que a mistura binária *eA* (ASbV) e a ternária *eac* (ASoIV) são *outliers* do conjunto de amostras de folhas autossombreadas e expostas ao sol coletadas no verão da *Annona muricata*.

Comparando os espectros na Figura 7 das amostras de folhas expostas ao sol extraídas com diclorometano (d), etanol e diclorometano (ed), acetato de etila e

diclorometano (ad), acetona e clorofórmio (Ac), etanol, diclorometano e acetona (edA) e etanol, acetato de etila, diclorometano e clorofórmio (eadc) que estão localizados na região mais positiva do F3 com os mesmos extratos das folhas autossombreadas é possível observar diferenças nas intensidades das bandas.

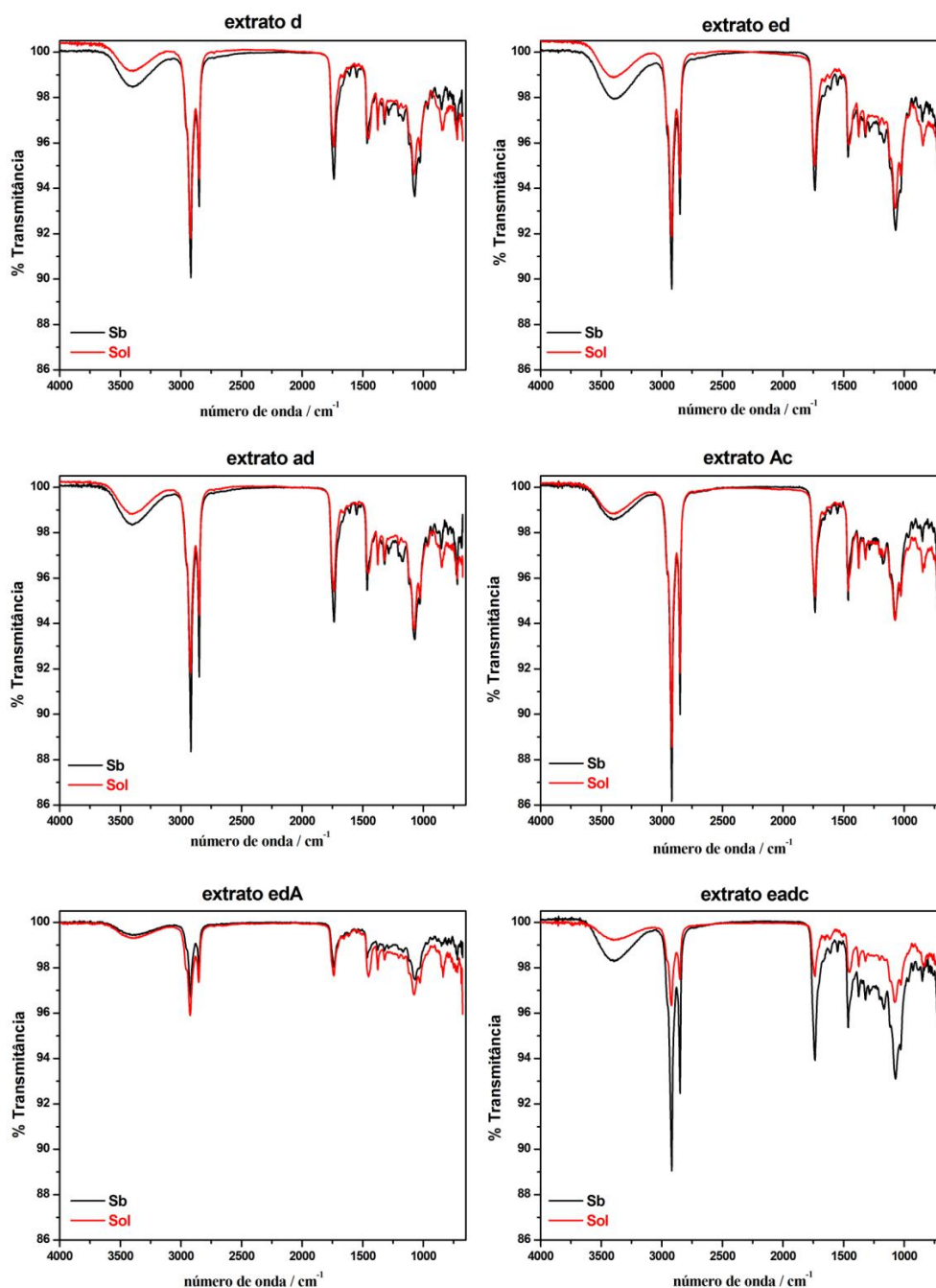


Figura 7. Espectros de infravermelho dos extratos discriminados nos escores do F1 × F3 das folhas de *Annona muricata* autossombreadas (Sb) e expostas ao sol (Sol) e coletadas no verão.

Essa diferença é mais evidente no extrato *eadc* e ocorre principalmente nas bandas em 3362 cm^{-1} característico de $\nu\text{O-H}$, 2919 e 2848 cm^{-1} característico de $\nu\text{C-H}$ e 1745 cm^{-1} característico de $\nu\text{C=O}$, sendo essas bandas mais intensas para as amostras de folhas autossombreadas. Essas bandas são características de moléculas de acetogeninas.

A mistura binária *Ac* mostra uma maior intensidade nas bandas em 2919 e 2848 cm^{-1} , característico de $\nu\text{C-H}$. As bandas em 3362 cm^{-1} , característico de $\nu\text{O-H}$ é mais intensas na mistura *ed*. Todas as amostras da Figura 8 apresenta maior intensidade nas amostras autossombreadas, com exceção da mistura *edA* que, apesar de apresentar menor intensidade de bandas quando comparadas com as outras amostras, apresenta maior intensidade nas amostras expostas ao sol, quando comparada com a mesma amostra autossombreadas.

A variação ocorrida nos perfis espectroscópicos na região do infravermelho para amostras coletadas no verão evidencia que folhas com diferentes acessibilidades à luz solar influenciam na composição química do material vegetal. Na Figura 6 a mistura binária *eA* de folhas autossombreadas e a mistura ternária *eac* de folhas expostas ao sol estão separadas do restante do conjunto de amostras de *Annona muricata* coletadas no verão. Essa separação pode ser explicada devido à elevada intensidade da banda de infravermelho em 1070 cm^{-1} característico de $\nu\text{C-O}$ nas duas amostras (Figura 8).

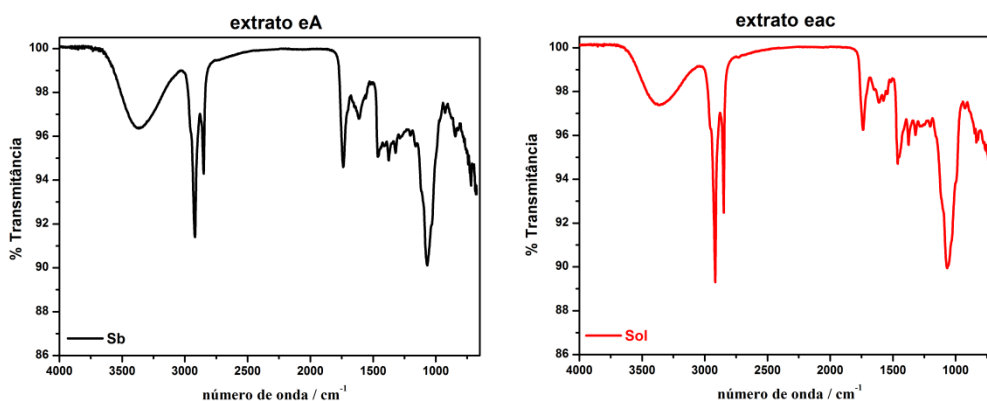


Figura 8. Espectros de infravermelho discriminados no gráfico dos escores dos extratos de folhas de *Annona muricata* coletadas no verão.

Uma vez que as amostras de folhas de *Annona muricata* autossombreadas e expostas ao sol e coletadas no verão diferem na quantidade de metabólitos extraídos, nos perfis espectrais UV-Vis e nas intensidades de bandas no infravermelho, essas amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos para uma investigação sobre a diversidade do metaboloma e obtenção do perfil cromatográfico dessas amostras. Sendo assim, a Figura 9 mostra o número de picos cromatográficos obtidos a partir dos extratos brutos de folhas autossombreadas e expostas ao sol para *Annona muricata* coletada no verão para cada ponto do planejamento.

O máximo de informação do perfil metabolômico para as folhas coletadas no verão foi obtido com a mistura *eadA* (etanol:acetato de etila:diclorometano:acetona) com 54 picos cromatográficos para as folhas autossombreadas. Já as folhas expostas ao sol apresentaram máximo de 47 picos cromatográficos para a mistura *eA* (etanol:acetona). De acordo com a Figura 3, estas misturas apresentaram altos rendimentos dentro do planejamento estatístico, podendo, neste caso, inferir uma condição que estabeleça a relação entre variedade metabolômica e rendimento bruto do extrato. Apesar da mistura *eadA* de folhas autossombreadas apresentar maior número de picos cromatográficos, quando somamos todos os números de picos as amostras expostas ao sol apresentam maior quantidade com um total de 1225 picos cromatográficos somados de todos os pontos do planejamento de misturas contra 1162 picos das amostras autossombreadas.

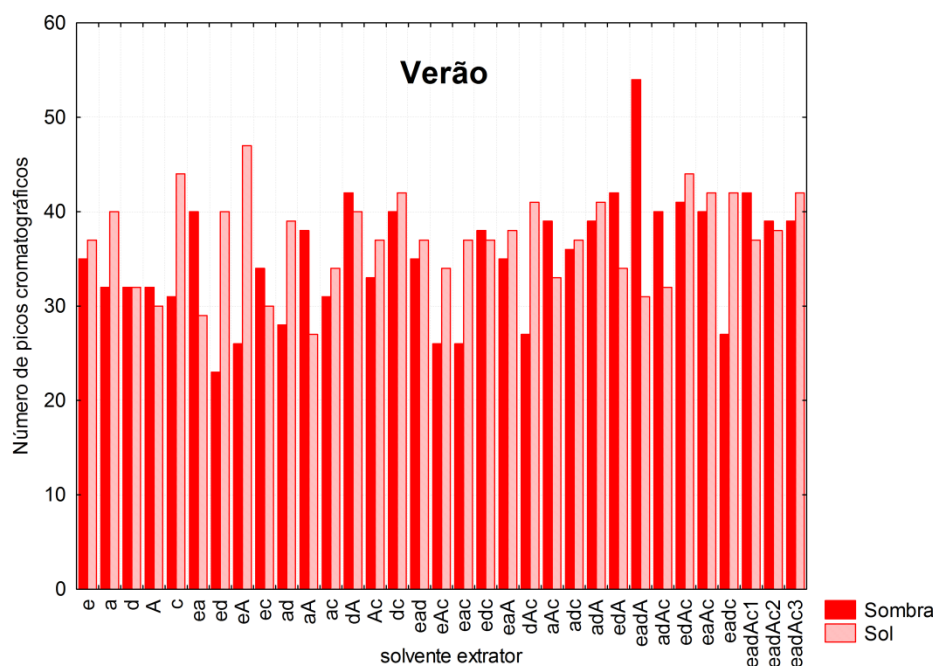


Figura 9. Número de picos cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para os extratos das folhas de *Annona muricata* autossombreadas e expostas ao sol, coletadas no verão.

Para investigar a diferença que foi observada na Figura 9 em relação ao total de número de picos cromatográficos das amostras de *Annona muricata* coletadas no verão de folhas autossombreadas e expostas ao sol os dados cromatográficos dessas amostras foram submetidos à análise de fatores. A matriz de dados foi composta de 1800 linhas (absorvância em cada tempo de retenção) \times 66 colunas (intensidade do pico cromatográfico de cada ponto do planejamento de misturas para as amostras autossombreadas e expostas ao sol). Os escores dos cromatogramas dos extratos das folhas coletadas no verão de *Annona muricata* autossombreadas e expostas ao sol, Figura 10, discriminou as amostras em relação à exposição solar. O fator 2 positivo discrimina os extratos de folhas autossombreadas, enquanto que amostras expostas ao sol são discriminadas, em sua maioria, pelo fator 2 negativo.

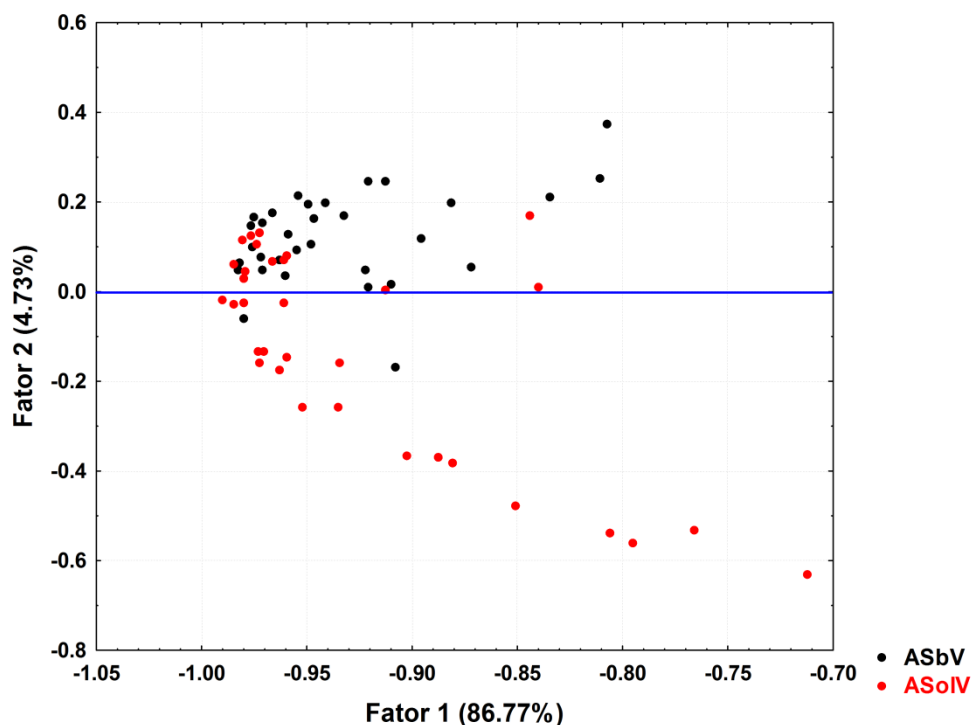


Figura 10. Escores do Fator 1 × Fator 2 dos cromatogramas dos extratos das folhas de *Annona muricata* autossombreadas e expostas ao sol coletadas no verão.

Os extratos de folhas de *Annona muricata* autossombreadas e coletadas no verão estão no fator 2 positivo, sendo o pico cromatográfico no tempo de retenção de 1,40 e 2,58 minutos as principais regiões discriminantes, de acordo com a Figura 11. O perfil espectral desta substância, correspondente ao tempo de 1,40 minutos, tem máximo de absorção em 206 nm e no tempo de 2,58 minutos a absorção máxima dos espectros correspondentes são em 204 e 215 nm. Na região negativa deste mesmo fator, encontram-se as amostras expostas ao sol com pico cromatográfico no tempo de retenção de 0,91 minutos com alta intensidade no loading e perfil espectral com absorção máxima em 208 nm. A discriminação amostral dos cromatogramas dos extratos no escore e os diferentes números de picos cromatográficos mostram a variedade de metabólitos extraídos e as diferenças ocasionadas pela exposição solar que a planta recebe quando suas folhas são coletadas na estação do verão.

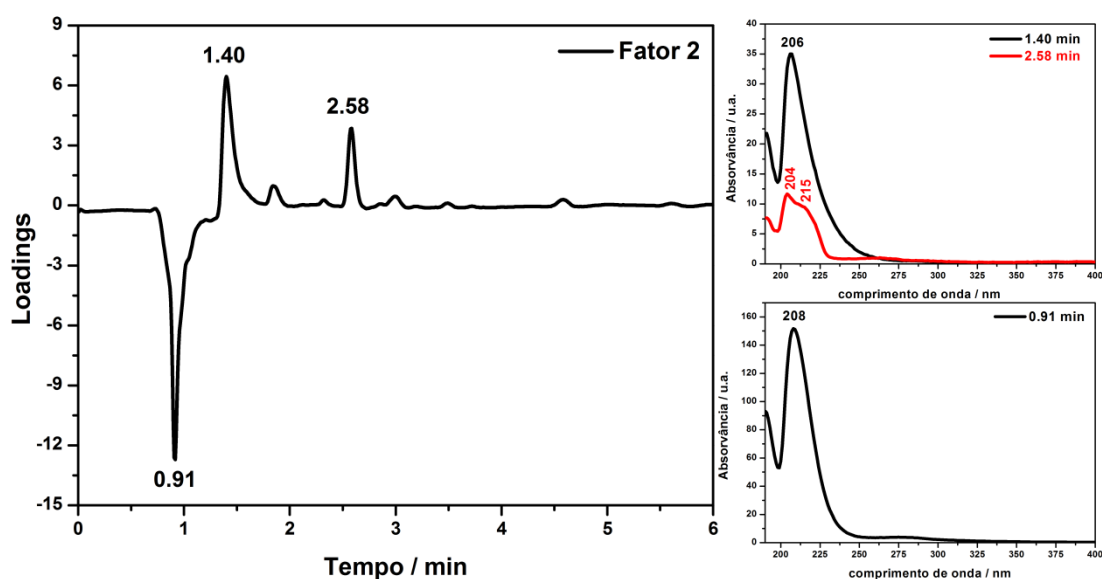


Figura 11. Loadings do Fator 2 dos cromatogramas e espectros correspondentes aos picos cromatográficos em 0,91 min; 1,40 min e 2,58 min dos extratos das folhas de *Annona muricata* autossombreadas e expostas ao sol coletadas no verão.

CONCLUSÃO

Por meio do planejamento experimental, os maiores rendimentos dos extratos foram obtidos com etanol e suas misturas, evidenciando que o rendimento extrativo é dependente das características solvatocrômicas de cada solvente, da época de colheita e da exposição solar das folhas da *Annona muricata*, sendo que nas estações do verão e outono a variação no rendimento entre amostras com diferente exposição solar é maior.

Pela análise de componentes principais dos perfis espectrais na região do ultravioleta-visível, ficou evidenciada a separação por efeito do solvente extrator diante da diversidade metabolômica extraída em cada ponto do planejamento tanto para amostras autossombreadas quanto para aquelas expostas ao sol. Além disso, a correlação obtida pelos espectros mostraram que o extrato etanólico extrai compostos

com absorção entre 200-230 nm, característico de acetogeninas e amostras extraídas com acetona ou suas misturas extraem principalmente pigmentos, sendo este mais abundante nas folhas autossombreadas.

A análise de fatores dos dados na região do infravermelho mostrou uma variação de intensidades para as bandas vibracionais em relação às diferentes misturas de solventes e exposição solar que a planta recebe.

A separação cromatográfica mostrou variações quanto ao número de picos em relação à exposição solar das folhas de *Annona muricata* e ainda o máximo de informação é obtido com solventes extratores diferentes, o que esclarece a importância de estudos sobre meios extratores em relação aos diferentes perfis metabolômicos que podem ser encontrados para uma mesma planta, além das variações sazonais e de incidência de luz solar. A diferença entre amostras autossombreadas e expostas ao sol fica evidenciada na separação da análise de fatores dos cromatogramas, em que essas amostras apresentaram picos cromatográficos discriminantes e estes são associados a perfis espectrais diferentes.

A associação de dados espectroscópicos, cromatográficos e ferramentas quimiométricas auxiliam na escolha do solvente extrator diante da diversidade de classes de metabólitos que podem ser extraídas e no estudo das variações do meio ambiente em que a planta é cultivada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, S.; Pisano, P. L.; Silva, F. B.; Scarminio, I. S.; Olivieri, A. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015b**, 26, 2241.

Arnason, J. T.; Mata, R.; Romeo, J. T.; *Phytochemistry of Medicinal Plants*, New York: Springer, **1995**.

Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, K. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M.; *J. Food Eng.* **2013**, *117*, 426.

Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 4^a ed., Porto Alegre: Bookman, **2010**.

Bogusz Jr., S.; Melo, A. M. T. de; Zini, C. A.; Godoy, H. T.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 3345.

Buncel, E.; Rajagop, S.; *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 798.

Buncel, E.; Rajagop, S.; *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 226.

Daneshvand, B.; Ara, K. M.; Raofie, F.; *J. Chromatogr. A* **2012**, *1252*, 1.

Delarozza, F.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1034.

Delarozza, F.; Rakocevic, M.; Malta, G. B.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 1929.

Faini, F.; Labbé, C.; Coll, J.; *Biochem. Sys. Ecol.* **1999**, *27*, 673.

Foan, L.; Simon, V.; *J. Chromatogr. A* **2012**, *1256*, 22.

Funari, C. S.; Castro-Gamboa, I.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. da S.; *Quim. Nova.* **2013**, *36*, 1605.

Funari, C. S.; Carneiro, R. L.; Andrade, A. M.; Hilder, E. F.; Cavalheiro, A. J.; *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 37.

Garcia, L. M. Z.; Pauli, E. D.; Cristiano, V.; Câmara, C. A. P.; Scarminio, I. S.; Nixdorf, S. L.; *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47*, 825.

Garcia, L. M. Z.; Oliveira, T. F.; Soares, P. K.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2010**, *103*, 1.

Gobbo-Neto, L. G.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova.* **2007**, *30*, 374.

Justo, R.; Afonso, S.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; *Anal. Methods.* **2014**, *6*, 9567.

Kamlet, M. J.; Hall, T. N.; Boykin, J.; Taft, R. W.; *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2599.

Liazid, A.; Guerrero, R. F.; Cantos, E.; Palma, M.; Barroso, C. G.; *Food Chem.* **2011**, *124*, 1238.

Lonni, A. A. S. G.; Longhini, R.; Lopes, G. C.; Mello, J. C. P. de; Scarminio, I. S.; *Anal. Chim. Acta*, **2012**, *719*, 57.

Michel, T.; Destandau, E.; Elfakir, C.; *Food Chem.* **2011**, *126*, 1380.

Moreira, I.; Scarminio, I. S.; *Talanta.* **2013**, *107*, 416.

Moreira, I.; Scheel, G. L.; Hatamura, P. H.; Scarminio, I. S.; *Quim. Nova.* **2014**, *37*, 39.

Paiva, E. P. de; Azevedo Filho, C. A. de; Ferreira, S. G.; Stamford, T. L. M.; Paixão, J. A. da; *J. Chromatogr. A* **2012**, *1260*, 33.

Pauli, E. D.; Scarminio, I. S.; Tauler, R.; *J. Chemometrics* **2016**; *30*, 75.

Rupprecht, J. K.; Hui, Y-H.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 237.

Salminen, J. P.; Roslin, T.; Karonen, M.; Sinkkonen, J.; Pihlaja, K.; Pulkkinen, P.; *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 1693.

Santos, S. F. M.; Macedo, G. R.; Silva, F. L. H. da; Souza, R. L. A. de; Pinto, G. A. S.; *Quim. Nova*, **2008**, *31*, 1973.

Schoefs, B.; *Trends Food Sci. Tech.* **2002**, *13*, 361.

Snyder, L. R.; Carr, P. W.; Rutan, S. C.; *J. Chromatogr. A.* **1993**, *656*, 537.

Soares, D. X.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Anal. Chim. Acta.* **2011**, *702*, 288.

Soares, P. K.; Scarminio, I. S.; *Phytochem. Analysis.* **2008**, *19*, 78.

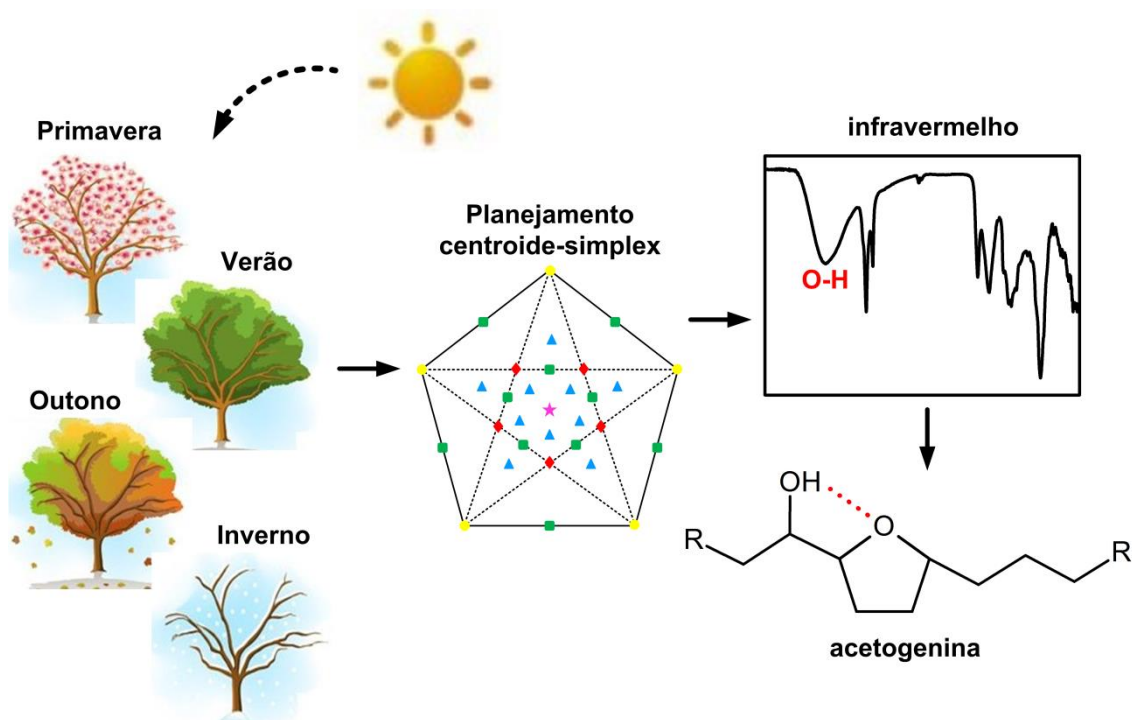
Soares, P. K.; Bruns, R. E.; Scarminio I. S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 644.

Souza, E. B. R. de; Silva, R. R. da; Afonso, S.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 4176.

Zhou, G.; Fu, L.; Li, X.; *Food Chem.* **2015**, *170*, 186.

Capítulo III

**Evidência da ligação de hidrogênio nas estruturas
moleculares das acetogeninas através de
espectros de infravermelho e cálculos da teoria do
funcional de densidade**



Resumo

Os espectros de infravermelho foram medidos para os 31 diferentes extratos do planejamento centroidal simplex de misturas de cinco componentes de folhas de *Annona muricata* autossombreadas e expostas ao sol, e coletadas nas quatro estações do ano. Os sinais observados são característicos de acetogeninas sendo este metabólito um dos principais componentes da família Annonaceae. As bandas espectrais de estiramento OH na região de 3100-3600 cm^{-1} fornecem evidências de mudanças de intensidade para as folhas sombreadas e expostas ao sol. A Análise de Componentes Principais (ACP) envolvendo 264 espectros mostram que amostras sombreadas tendem a ter bandas de estiramento OH mais intensas que as expostas ao sol. Cálculos do funcional de densidade B3LYP indicam significativas mudanças nesta região da banda de estiramento OH devido à formação da ligação de hidrogênio. Um pequeno aumento na intensidade da banda de OH cerca de 40 km mol^{-1} , ocorre quando um grupo OH forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio do anel tetrahydrofurano adjacente. Um aumento muito mais intenso, 400 a 500 km mol^{-1} , está previsto para ocorrer em acetogeninas com dois anéis tetrahydrofurano para o qual as ligações de hidrogênio do grupo OH estão mais distantes do oxigênio do anel tetrahydrofurano. Considerando que as baixas intensidades do estiramento da ligação de hidrogênio são encontradas para acetogeninas com estruturas da cadeia de carbono moderadamente dobradas, intensidades mais fortes da ligação de hidrogênio são calculadas para moléculas com uma estrutura dobrada do tipo V com um ângulo de 45°.

Palavras-chave: Acetogeninas, ligação de hidrogênio, infravermelho, quimiometria, cálculos do funcional de densidade B3LYP.

INTRODUÇÃO

A família Annonaceae inclui cerca de 130 gêneros e 2.300 espécies distribuídas, em sua maior parte, em áreas tropicais e subtropicais e são uma fonte de matérias-primas farmacêuticas. As acetogeninas são consideradas o principal metabólito, as quais apresentam atividade antitumoral (Astirin *et al.*, 2013), antiparasitária, sedativa (Uzel *et al.*, 2004), hipotensora (Mekhfí *et al.*, 2004), anti-helmíntica, antibacteriana, antiviral e antifúngica (Fennell *et al.*, 2004). Mais de 350 acetogeninas foram relatadas na virada do século (Alali *et al.*, 1999). Elas normalmente têm cadeias longas de carbono (C32/C34) com um terminal metil substituído com anel α,β -insaturado γ -lactona, e um, dois ou mesmo três anéis tetrahydrofurano localizados ao longo da cadeia de hidrocarbonetos, juntamente com hidroxilas ou outros grupos contendo oxigênio. Algumas acetogeninas têm uma estrutura ceto-lactona, em vez de um anel lactona, e outras têm cadeias de carbono insaturado que contêm ligações duplas entre carbonos. Dos 137 compostos listados na revisão segundo Alali *et al.*, 1999, 99 tem um anel lactona, 15 compostos têm a estrutura de ceto-lactona, 55 têm um anel tetrahydrofurano, 38 têm dois anéis tetrahydrofurano adjacentes, enquanto 10 têm várias ligações duplas conjugadas com dois grupos hidroxilas adjacentes.

A impressão digital metabólica tem sido cada vez mais usada para fornecer informações sobre o material vegetal, analisar simultaneamente vários metabólitos, identificar as diferenças entre eles, classificar as amostras e discriminar componentes que apresentem características espectrais distintas. Uma variedade de técnicas analíticas apropriadas são descritas para estes fins, e a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (Gad *et al.*, 2013) fornece uma das ferramentas mais eficaz.

Nosso grupo tem utilizado planejamento estatístico de misturas para o desenvolvimento de perfis de impressões digitais dos metabólitos extraídos de plantas (Delaroza e Scarminio, 2008; Soares e Scarminio, 2008; Garcia *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2010). Este estudo é importante, porque as condições de extração diferem para os variados tipos de compostos. A escolha de solventes envolve um compromisso entre a maximização da eficiência das interações entre as moléculas para garantir a extração de uma maior ou menor quantidade de metabólitos, dependendo do caso em estudo (Dunn e Ellis, 2005).

Neste trabalho foi utilizado planejamento estatístico de misturas para extração de compostos das folhas de *Annona muricata*, uma fonte de acetogeninas, colhidas de áreas sombreadas pela própria árvore e diretamente expostas à luz solar em todas as estações do ano para obtenção da impressão digital metabólica. Espectros de infravermelho foram interpretados com a ajuda de cálculos de funcional de densidade para auxiliar a correta atribuição das bandas e para obter estimativas das intensidades. As intensidades são tão importantes quanto a distribuição de acetogeninas específicas, bem como os seus valores totais, e são esperadas mudanças devido à sazonalidade e às condições de acessibilidade luminosa.

EXPERIMENTAL

Material Vegetal

As folhas foram coletadas entre abril de 2011 e janeiro de 2012 na Universidade Estadual de Londrina (UEL), em Londrina, Paraná, Brasil. As exsiccatas das amostras de *Annona muricata* coletadas em diferentes condições de luminosidade solar (autossombreada FUEL 49.284 e exposta ao sol FUEL 49.285) estão armazenadas no

herbário da UEL. A secagem ocorreu em temperatura controlada em 27°C por nove dias.

Reagentes

Os solventes de grau analítico, etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio, usados na extração foram adquiridos de FMaia.

Preparo do extrato

Os extratos foram preparados usando cinco diferentes solventes, (e) etanol, (a) acetato de etila, (d) diclorometano, (A) acetona e (c) clorofórmio, e suas proporções variaram de acordo com um planejamento centroide simplex (Barros Neto *et al.*, 2010). As proporções de cada solvente usado para a extração foram os cinco solventes puros, dez misturas binárias na proporção de 1:1, dez misturas ternárias (1:1:1), cinco misturas quaternárias (1:1:1:1) e uma mistura com os cinco solventes (1:1:1:1:1). Trinta e um extratos foram realizados com diferentes misturas de solventes, sendo que a mistura de cinco componentes foi feita em triplicata. Cada extrato foi preparado pesando 2g de folhas secas e trituradas e adicionado 15 mL da mistura de solvente. Estas misturas foram colocadas num banho ultrassônico (Unique, modelo USC 1400) durante 60 minutos, com a água do banho trocada a cada 30 minutos para evitar o aquecimento. Os extratos foram filtrados usando papel de filtro. Cada solução do extrato foi colocada em um frasco previamente pesado e identificado. Este procedimento foi repetido mais catorze vezes, de modo que o volume total da mistura de solventes adicionada foi de 225 mL. O restante foi evaporado num evaporador rotativo, removendo todo o solvente ainda presente na amostra até obter peso constante (Souza *et al.*, 2009; Afonso *et al.*, 2015b).

Análise por infravermelho

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos extratos do planejamento de misturas foram obtidos diretamente pelo modo de Refletância Total Atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*). Os espectros foram adquiridos na região de 4000-675 cm^{-1} , com 4 cm^{-1} de resolução e 32 scans, usando um espectrofotômetro Thermo Scientific FT-IR Nicolet iS 10. Os extratos secos foram colocados em um suporte de amostra e pressionados sobre uma superfície de germânio formando um filme de comprimento da trajetória óptica constante para todas as amostras.

Cálculos

Em adição às análises experimentais, foi realizado um estudo teórico dos espectros de infravermelho de sete moléculas de acetogeninas. A estrutura das acetogeninas estão representadas na Figura 1 por (1) goniotetracina, (2) (2,4-cis)-gonioeninine, (3) montecristina, (4) uvarigina, (5) rollidecina, (6) triobalicina e (7) geniotriocina. Estas moléculas foram selecionadas para verificar os grupos funcionais presentes na estrutura de acetogeninas. A geometria das moléculas foi avaliada por otimizações com um funcional de troca-correlação B3LYP (Lee *et al.*, 1988; Becke, 1993; Stephens *et al.*, 1994) e um conjunto de base triplo-zeta, 6-311 (Jensen, 2007). Todos os cálculos descritos foram realizados com GAUSSIAN09 (Gaussian, 2004). Nestes cálculos, os resultados foram obtidos rapidamente mesmo com um computador modesto, um AMD 64 Opteron. Os espectros de infravermelho foram calculados em fase gasosa e na aproximação duplamente harmônica.

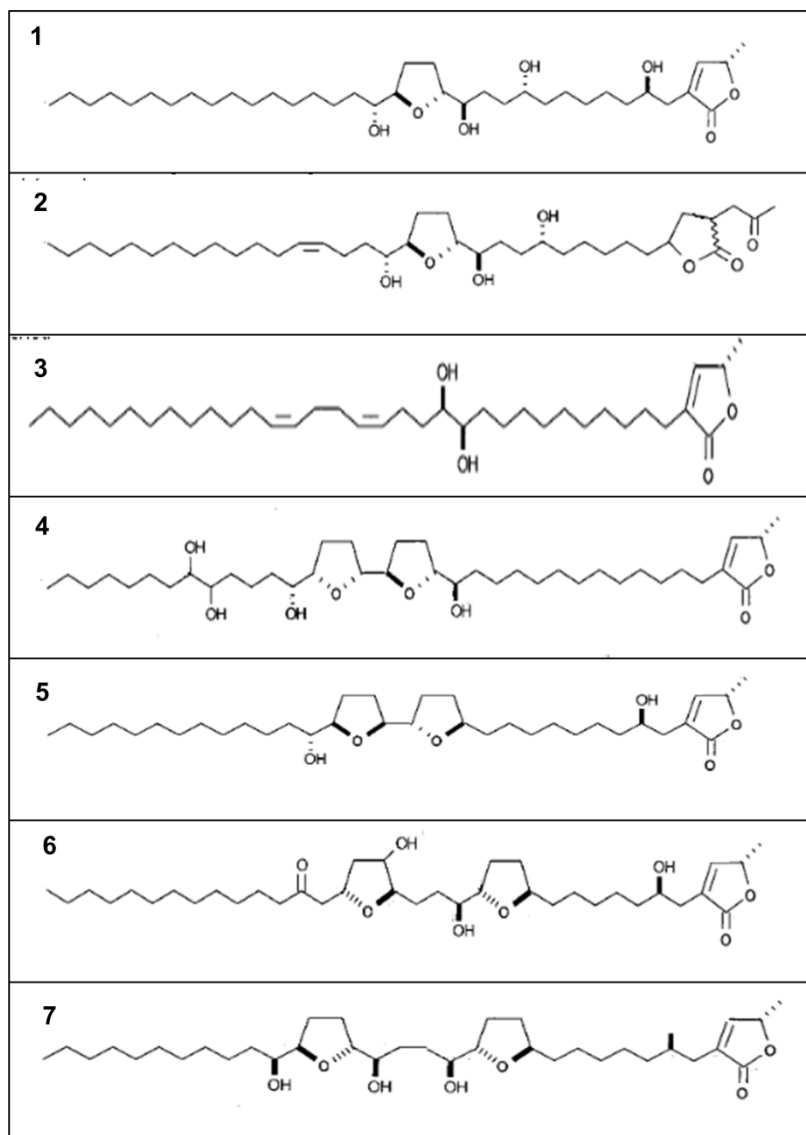


Figura 1. Estrutura molecular das acetogeninas: (1) goniotetracina, (2) (2,4-cis)-gonioeninine, (3) montecristina, (4) uvarigina, (5) rollidecina, (6) triobalicina e (7) geniotriocina

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimental

Para obter informações relevantes sobre a influência das mudanças sazonais na composição dos metabólitos das folhas de *Annona muricata* autossombreadas e expostas ao sol, os espectros de infravermelho dos extratos obtidos com diferentes

proporções de solventes para as quatro estações do ano foram comparados pela análise de componentes principais (Sharaf *et al.*, 1986). A matriz de dados \mathbf{X} consiste em 1725 linhas e 66 colunas. Cada linha contém as intensidades de transmitância nos diferentes números de onda, e cada coluna corresponde a um espectro de um extrato obtido usando as misturas de solventes do planejamento centroide simplex de folhas autossombreadas e expostas ao sol para cada estação do ano.

A pesquisa foi realizada para determinar qual mistura do planejamento forneceu uma melhor separação dos extratos de folhas para as quatro estações. A mistura ternária etanol: acetato de etila: clorofórmio (1:1:1 v/v/v) teve uma boa separação para todas as estações, enquanto as outras misturas do planejamento apresentaram agrupamentos mais próximos. Evidentemente, a composição de metabólitos extraídos a partir da mistura *eac* (etanol: acetato de etila: clorofórmio) é mais diversificada do que aqueles extraídos por outras misturas, e são os mais adequados para investigar as mudanças sazonais devido à composição de metabólitos das amostras de folhas expostas ao sol.

A Figura 2 mostra os espectros de infravermelho da mistura ternária *eac* (1:1:1 v/v/v), na região de 675-4000 cm^{-1} para as quatro estações em condições autossombreadas e expostas ao sol. Estes espectros mostram uma banda larga na região de 3100-3600 cm^{-1} (estiramento N-H e O-H), duas bandas intensas na região de 2800-2950 cm^{-1} (característicos de estiramento C-H de carbonos sp^3), e bandas em 1750 cm^{-1} (C=O), 1450 cm^{-1} (deformação C-H) e 1050 cm^{-1} (deformação C-C) que são sinais característicos de acetogeninas de Annonaceae. Na revisão de McLaughlin e colaboradores (Alali *et al.*, 1999), dos 137 compostos listados, 86 relataram frequências entre 3300-3522 cm^{-1} , 89 entre 2910-2938 cm^{-1} , 82 entre 2830-2866 cm^{-1} , 98 entre 1734-1770 cm^{-1} , 52 entre 1600-1742 cm^{-1} , 68 entre 1423-1474 cm^{-1} , 26 entre 1318-1398 cm^{-1} , 32 entre 1100-1270 cm^{-1} e 53 entre 1028-1086 cm^{-1} .

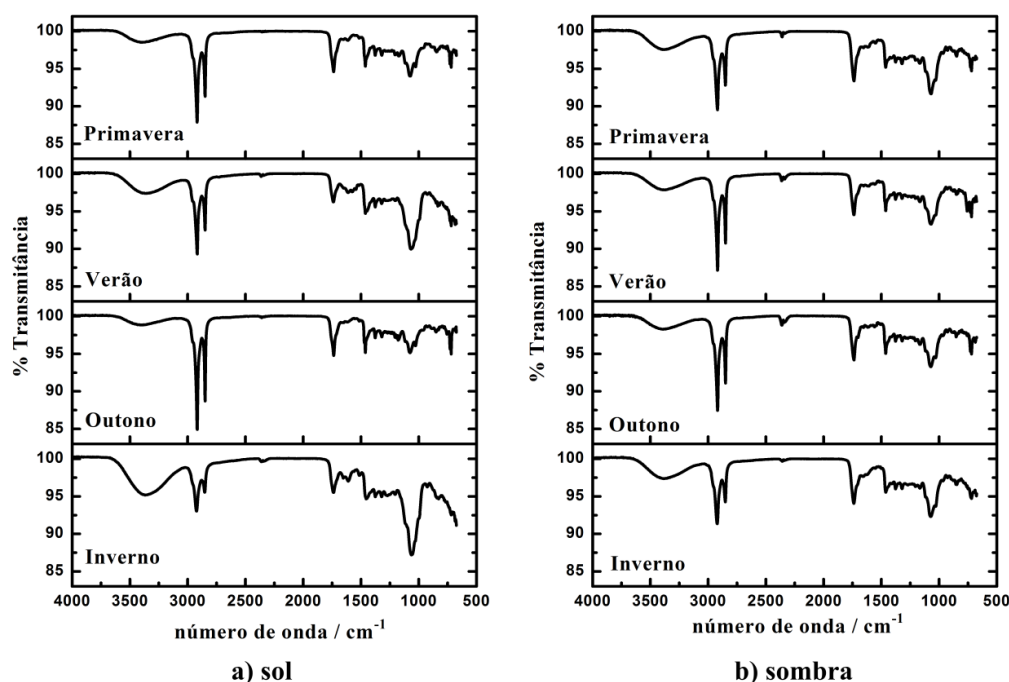


Figura 2. Espectros de infravermelho da amostra com a mistura etanol-acetato de etil-clorofórmio (1:1:1) para as quatro estações em condições, a) expostas ao sol e b) sombreadas.

Como pode ser visto na Figura 2, o espectro das amostras de folhas expostas ao sol mostraram mudanças significativas de acordo com a época de coleta, enquanto as amostras obtidas a partir de folhas sombreada têm espectros mais similares. No inverno e no verão, as bandas em 3400 e 1070 cm^{-1} dos extratos de folhas expostas ao sol apresentaram maiores intensidades enquanto as bandas intensas de estiramento C-H na região de 2920 cm^{-1} ocorrem no outono e na primavera. As mudanças sazonais são menos pronunciadas nas amostras sombreadas, embora as amostras do inverno também apresentem bandas mais intensas nas regiões de 3400 e 1070 cm^{-1} em comparação com as bandas próximas a 2920 cm^{-1} . A porcentagem de transmitância das bandas de estiramento O-H no inverno parece ser um pouco mais intensa para as amostras de folhas expostas ao sol, que para as sombreadas.

Os espectros de infravermelho das amostras extraídas com etanol para as folhas expostas ao sol e sombreadas, para todas as quatro estações, estão na Figura 3.

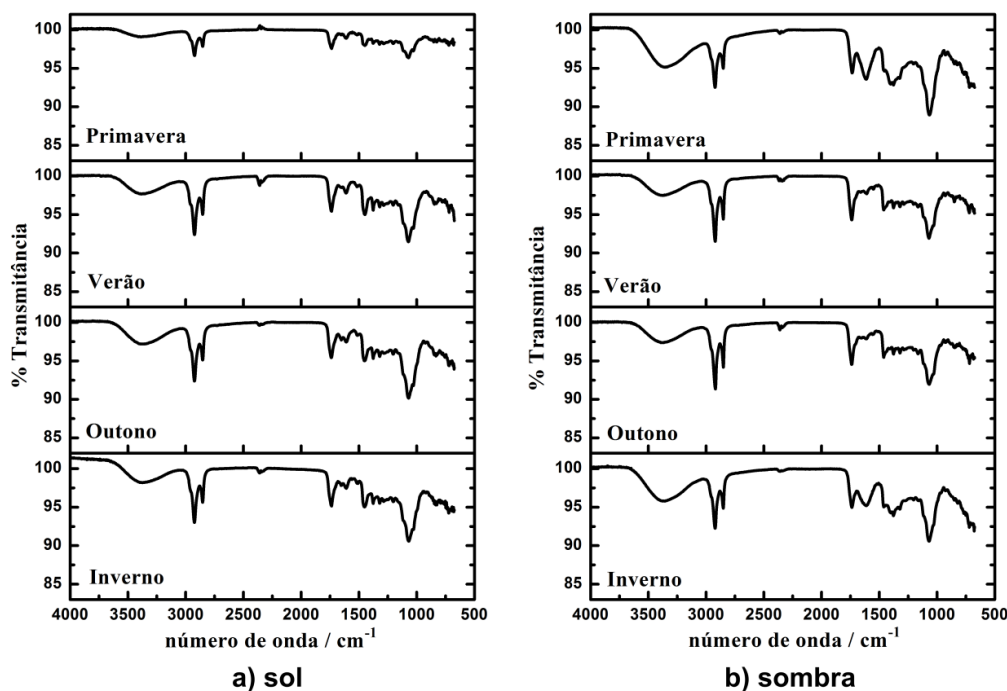


Figura 3. Espectros de infravermelho da amostra com etanol puro para as quatro estações em condições, a) expostas ao sol e b) sombreadas.

As intensidades relativas das bandas em 3400 e 1070 cm^{-1} são mais similares para todas as estações e condições de acesso à luz, que para as amostras extraídas com a mistura ternária *eac*. Este fato é verdade para os espectros das folhas da primavera expostas ao sol, nos quais todas as bandas são evidentemente muito mais fracas e têm uma baixa quantidade de material total extraído. As bandas de estiramento O-H do extrato com etanol parecem ser mais intensas que as dos espectros do extrato *eac*. Além disso, elas são notavelmente maiores para as amostras sombreadas da primavera e do inverno que aquelas para as amostras expostas ao sol.

As notáveis mudanças espectrais podem ser observadas na região de 1750 cm^{-1} . Para ambas amostras das folhas sombreadas do inverno e da primavera, duas bandas em 1740 e 1630 cm^{-1} aparecem claramente separadas, enquanto que as amostras das folhas

sombreadas do verão e outono, bem como as expostas ao sol, mostraram a faixa de frequência mais alta com um ombro muito mais fraco, por volta de 1630 cm^{-1} . Os espectros do extrato *eac* também têm uma intensa banda de frequência elevada e um ombro de baixa frequência. Isto pode indicar a existência de alguma estrutura cetolactona, juntamente com os que têm um anel lactona.

Examinando todos os espectros dos extratos do planejamento centroidal simples, estes mostraram que mais amostras sombreadas parecem ter maiores bandas de estiramento O-H do que as amostras expostas ao sol. Os espectros médios de dois tipos de amostras mostram que o grande aumento da intensidade espectral de amostras sombreadas ocorre em $3100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ região de estiramento da ligação de hidrogênio.

A Figura 4 contém as componentes principais do gráfico dos escores dos espectros de infravermelho de todas essas misturas do planejamento. Embora o fator 3 represente menos de 1% da variância total dos dados, existe uma separação clara entre amostras de extratos de folhas sombreadas e de expostas ao sol.

Isso pode ser entendido comparando os escores com os loadings na Figura 5. Na primavera, verão e inverno; os loadings na região de $3100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ são negativos indicando valores de transmitância mais elevados para as amostras expostas ao sol na parte inferior dos escores. Assim, as amostras sombreadas têm maiores absorvâncias nesta região indicando a existência de uma maior quantidade e/ou ligações mais fortes de hidrogênio. Como o sinal da componente principal é arbitrário, ambos os escores e loadings no outono são invertidos em comparação com aqueles para as outras estações.

Os extratos com etanol das amostras coletadas na primavera e no inverno mostram as maiores intensidades na Figura 3. Na Figura 4, as amostras com etanol sombreadas e expostas ao sol, indicadas por *e*, são bem separadas ao longo da terceira componente principal para ambas as estações, primavera e inverno. Nenhuma

intensidade pode ser observada nas bandas de estiramento da ligação de hidrogênio nos espectros do verão e outono dos extratos com etanol, na Figura 3. Para estas duas estações, a terceira componente principal dos escores dos extratos com etanol é muito semelhante. O extrato *eac* têm quase os mesmos escores nesta componente para todas as estações. Por esta razão, é difícil observar as diferenças nos espectros de amostras sombreadas e expostas à luz solar, desta mistura de solvente, na Figura 2.

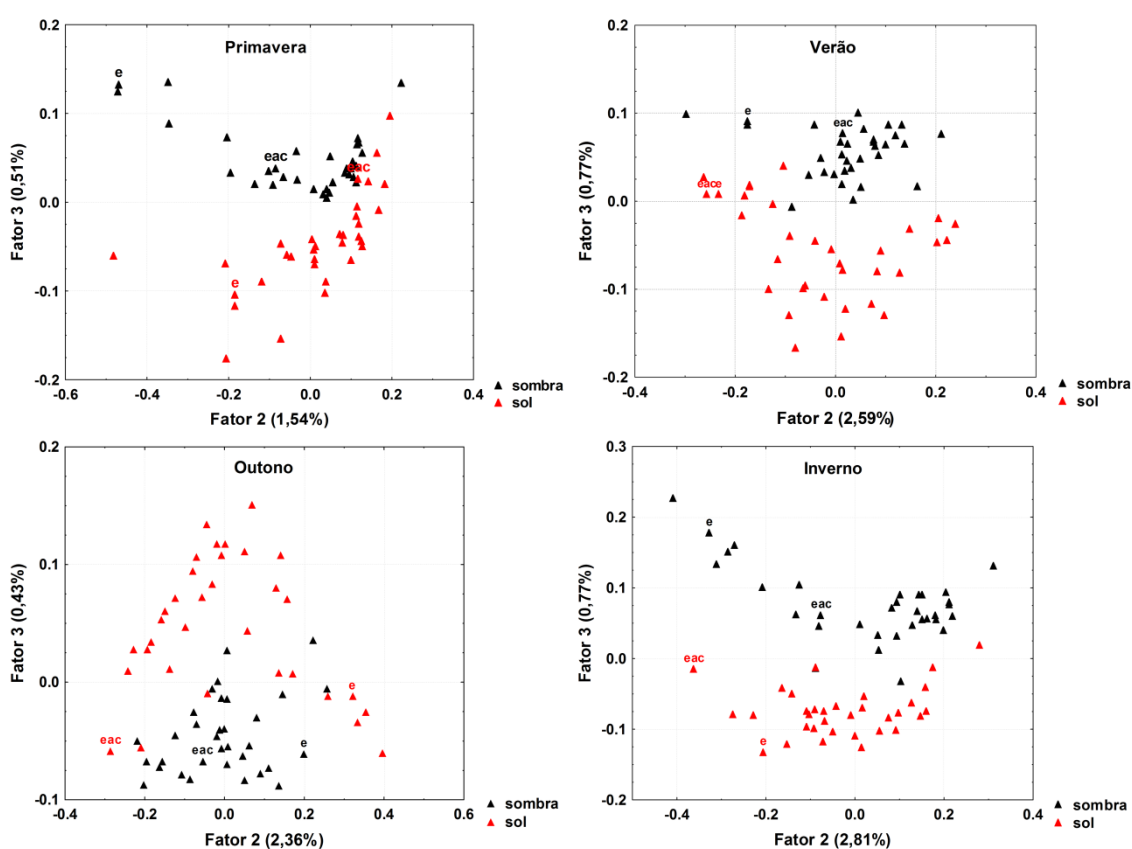


Figura 4. Escores das componentes principais para todas as quatro estações. Triângulos pretos representam amostras sombreadas e triângulos vermelhos representam amostras expostas ao sol.

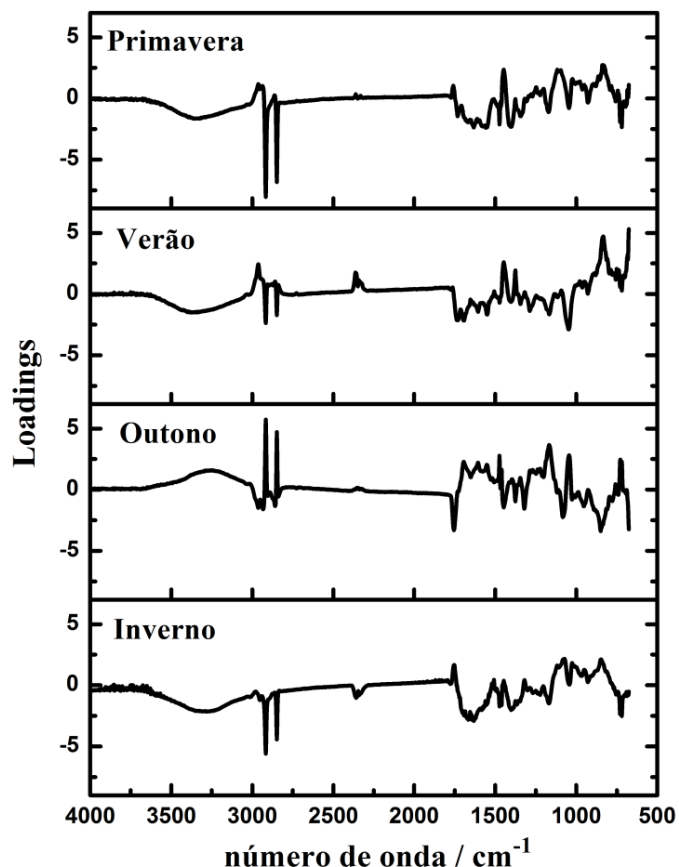


Figura 5. Loadings das componentes principais para todas as quatro estações.

Teórico

Os resultados dos cálculos teóricos indicados na Tabela 1 foram usados para interpretar as mudanças espectrais. As moléculas escolhidas são muito grandes, contendo cerca de 100 átomos. Uma molécula vibrando possui $3N-6$ coordenadas normais, o que significa que a análise gera resultados de cerca de 300 bandas de vibrações para cada molécula. A fim de fazer nossa análise de infravermelho, apenas bandas de absorção viáveis com intensidades maiores do que 5 km.mol^{-1} foram estudadas em detalhe.

Os cálculos B3LYP das acetogeninas representativas resultou em intervalos de $3219-3653 \text{ cm}^{-1}$ para o estiramento O-H, $3020-3106 \text{ cm}^{-1}$ para os estiramentos C-H, $1724-1825 \text{ cm}^{-1}$ para o C=O, $1170-1445 \text{ cm}^{-1}$ para as deformações C-H e $1019-1103$

cm^{-1} para as deformações C-C ou C-O. Estes intervalos estão em boa concordância com os relatados na revisão por McLaughlin (Alali *et al.*, 1999) e os mostrados nas Figuras 2 e 3, com exceção da faixa de 2830-2938 cm^{-1} observado para os estiramentos C-H. Os valores calculados são notavelmente mais elevados como seria de esperar, uma vez que foram obtidos na aproximação duplamente harmônica. Para as outras vibrações, mesmo para o estiramento O-H, os valores de frequência estão de acordo.

Não há informações sobre os valores de intensidade relativa para as acetogeninas na literatura. Os resultados dos cálculos B3LYP para as acetogeninas representativas, indicados na Tabela 1, têm valores relativamente constantes para todas as vibrações características exceto o estiramento O-H. Estes dados mostram três intensidades de bandas diferentes, fracas para a molécula montecristina com uma intensidade calculada de 8 km.mol^{-1} , moderada para goniotetracina, (2,4-cis)-gonioneninone, triobalicina e goniotriocina entre 43 e 85 km.mol^{-1} e muito fortes com intensidades de 394 km.mol^{-1} para uvarigina e 585 km.mol^{-1} para rollidecina. Estas grandes variações devem-se a ligação de hidrogênio, isto ocorre porque a intensidade aumenta com o número e a estabilidade das ligações de H. Sendo que, bandas mais largas e nesta região indica presença de pontes de hidrogênio intramolecular.

Tabela 1. Intensidades de absorção e variações das frequências nos espectros de infravermelho para as moléculas de acetogeninas.

| Geniotetracina | | |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| | Frequência (cm^{-1}) | Intensidades (km.mol^{-1}) |
| O-H (estiramento) | 3480-3495 (4 bandas) | 43,2 |
| C-H (estiramento assimétrico) | 3037-3153 | 1077,7 |
| C-H (estiramento simétrico) | 2974-3037 | 783,1 |
| C=O | 1727 | 313,6 |
| C-H (deformação fora do plano) | 1171-1562 | 538,0 |
| C-C (deformação) | 1000-1171 | 527,3 |
| (2,4-cis)-gonioneninone | | |
| | Frequência (cm^{-1}) | Intensidades (km.mol^{-1}) |
| O-H (estiramento) | 3591-3653 (3 bandas) | 68,9 |

| | | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| C-H (estiramento assimétrico) | 3060-3172 | 975,3 |
| C-H (estiramento simétrico) | 2969-3057 | 717,7 |
| C=O | 1724 e 1770 | 106,9 e 326,9 |
| C-H (deformação) | 1169-1562 | 823,4 |
| C-C (deformação) | 1000-1169 | 535,3 |
| Montecristina | | |
| | Frequência (cm ⁻¹) | Intensidades (km.mol ⁻¹) |
| O-H (estiramento) | 3451-3453 (2 bandas) | 7,9 |
| C-H (estiramento assimétrico) | 3069-3155 | 953,5 |
| C-H (estiramento simétrico) | 2985-3068 | 870,9 |
| C=O | 1825 | 319,1 |
| C-H (deformação fora do plano) | 1153-1556 | 177,6 |
| C-C (deformação) | 1000-1153 | 254,5 |
| Uvarigina | | |
| | Frequência (cm ⁻¹) | Intensidades (km.mol ⁻¹) |
| O-H (estiramento) | 3219-3460 (3 bandas) | 394 |
| C-H (estiramento assimétrico) | 3068-3161 | 973,5 |
| C-H (estiramento simétrico) | 3000-3065 | 1263 |
| C=O | 1822 | 335,5 |
| O-H (deformação) | 1498 e 1237 | 150,4 |
| C-H (deformação) | 1151-1561 | 398,8 |
| C-C (deformação) | 1000-1147 | 566,8 |
| Rollidecina | | |
| | Frequência (cm ⁻¹) | Intensidades (km.mol ⁻¹) |
| O-H (estiramento) | 3460-3634 (2 bandas) | 581,6 |
| C-H (estiramento assimétrico) | 3065-3159 | 1002,65 |
| C-H (estiramento simétrico) | 2974-3063 | 778,1 |
| C=O | 1778 | 316,6 |
| O-H (deformação) | 1446-1476 | 40 |
| C-H (deformação) | 1136-1563 | 296,3 |
| C-C (deformação) | 1000-1130 | 528 |
| Triobalicina | | |
| | Frequência (cm ⁻¹) | Intensidades (km.mol ⁻¹) |
| O-H (estiramento) | 3586-3653 (4 bandas) | 85,2 |
| C-H (estiramento assimétrico) | 3066-3156 | 850,7 |
| C-H (estiramento simétrico) | 2961-3066 | 836,4 |
| C=O | 1769 | 318,9 |
| C-H (deformação) | 1168-1562 | 591,2 |
| C-C (deformação) | 1000-1162 | 750,6 |
| Goniotriocina | | |
| | Frequência (cm ⁻¹) | Intensidades (km.mol ⁻¹) |
| O-H (estiramento) | 3586-3653 (3 bandas) | 46,4 |
| C-H (estiramento assimétrico) | 3072-3156 | 813,4 |
| C-H (estiramento simétrico) | 2966-3068 | 919,2 |
| C=O | 1706 e 1769 | 73,7 e 320,9 |
| C-H (deformação) | 1182-1564 | 645,5 |
| C-C (deformação) | 1000-1162 | 738,8 |

*Apenas as bandas mais fortes que 5 km.mol⁻¹ foram consideradas.

A Figura 6 mostra o esqueleto das moléculas, a estrutura da geometria de equilíbrio do cálculo B3LYP e as regiões críticas da ligação de hidrogênio das moléculas representativas. Montecristina não faz ligações de hidrogênio, enquanto as outras fazem. Goniotetracina e (2,4-cis)-gonioneninone têm estruturas moderadamente dobradas e formam pontes de hidrogênio fracas com uma intensidade total de estiramento O-H de 43 e 69 km.mol^{-1} , respectivamente. As distâncias das ligações de hidrogênio são cerca de 2,2 Å e apresentam ângulos em torno de 115°. As intensidades do estiramento assimétrico O-H são cerca de quatro vezes mais fortes que os simétricos.

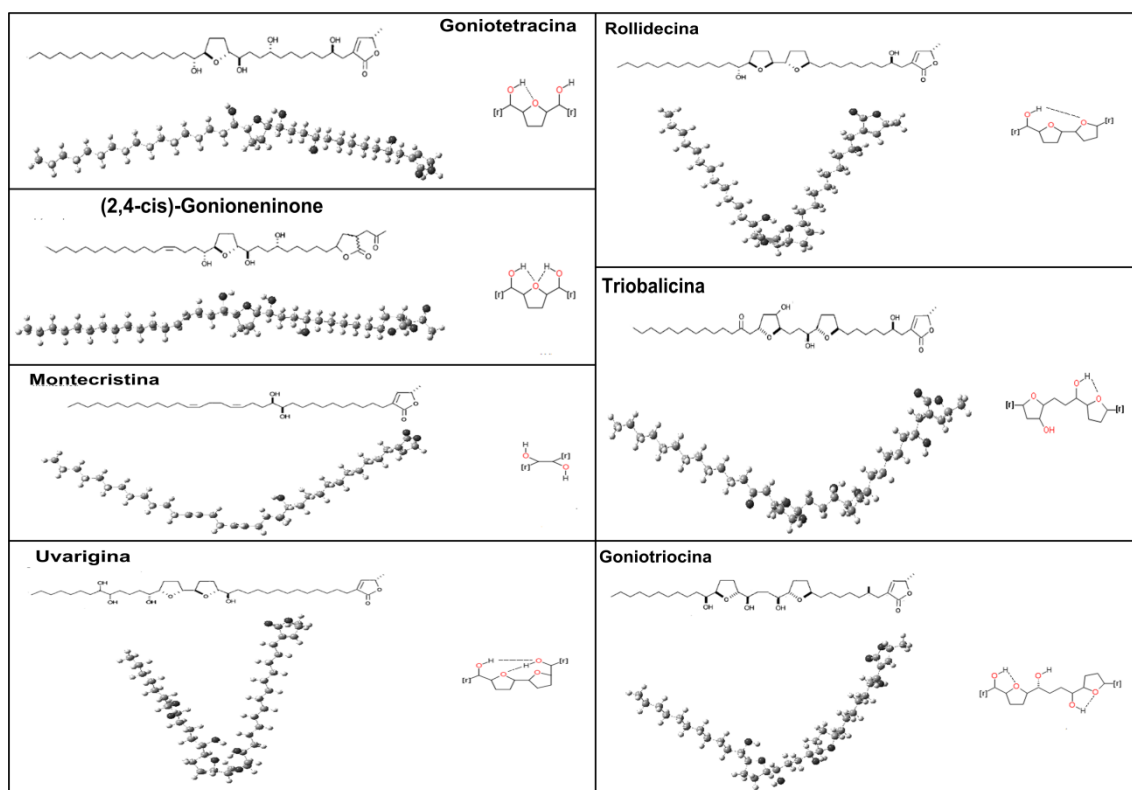


Figura 6. Esqueletos moleculares, estruturas teóricas de equilíbrio e detalhe das regiões de ligação de hidrogênio de algumas acetogeninas representativas.

Para estas moléculas, os grupos OH do anel tetrahydrofurano vizinho formam ligações de H em um anel de cinco membros com o oxigênio do tetrahydrofurano, uma ligação de H para goniotetracina (intensidade de 43 km.mol^{-1}) e duas ligações de H for

(2,4-cis)-gonioneninone ($68,9 \text{ km.mol}^{-1}$). Goniotriocina, assim como gionotetracina, também formam um anel de cinco membros de ligação de hidrogênio e tem uma intensidade de estiramento O-H de 46 km.mol^{-1} , da mesma forma também ocorre com gionotetracina (43 km.mol^{-1}) e são cerca da metade da intensidade na triobalicina (85 km.mol^{-1}). Triobalicina tem dois anéis tetrahydrofurano separados por cinco ligações C-C, um grupo OH ao lado do anel forma uma ligação de hidrogênio com o oxigênio do anel tetrahydrofurano adjacente. A intensidade da ligação de H da (2,4-cis)-gonioneninone é intermediária comparando com as da gionotetracina e triobalicina, porque estas duas ligações de hidrogênio partilham o mesmo átomo de oxigênio.

Intensidades muito mais fortes para as ligações de hidrogênio ocorrem para uvarigina e rollidecina. A uvarigina tem ligação de H do estiramento OH com intensidade de 385 km.mol^{-1} com uma distância de ligação de $1,8 \text{ \AA}$ e ângulo de cerca de 150° . A molécula rollidecina mostra uma distância e ângulo de ligação semelhante, $1,8 \text{ \AA}$ e 165° , e como a uvarigina, também forma um anel de oito membros. Estas ligações muito fortes só parecem ocorrer em moléculas com dois anéis tetrahydrofurano e resultam em moléculas com cadeias laterais de carbono formando ângulos agudos em torno de 45° , em contraste com as estruturas de esqueletos mais lineares das outras moléculas para os quais foram feitos os cálculos. Para estas moléculas um grupo OH constitui uma ligação de H com o oxigênio do anel tetrahydrofurano mais distante e não adjacente, como ocorre com as moléculas com intensidades moderadas da ligação de H.

Observando atentamente os estiramentos OH das moléculas parece útil classificá-las em três categorias de acordo com a presença e estabilidade de suas ligações de hidrogênio: i) estiramento OH não complexado (pontes de hidrogênio intermolecular), ii) moderadas ligações de hidrogênio do estiramento OH (pontes de hidrogênio intramolecular tensionada) e iii) fortes ligações de hidrogênio do estiramento

OH (pontes de hidrogênio intramolecular não tensionada). Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Tipos de intensidades do estiramento O-H calculadas pelo funcional B3LYP para as moléculas escolhidas. Unidades em $\text{km}\cdot\text{mol}^{-1}$. O número de cada tipo de ligação de H é dado entre parênteses após o valor da intensidade.

| | Regular | Moderada | Forte | Total |
|-------------------------|----------|----------|-----------|-------|
| Goniotetracina | 21,1 (3) | 22,1 (1) | - | 43,2 |
| (2,4-cis)-gonioneninone | 4,5 (1) | 64,4 (2) | - | 68,9 |
| Montecristina | 7,9 (2) | - | - | 7,9 |
| Uvarigina | 8,6 (2) | - | 385,4 (1) | 394,0 |
| Rollidecina | 0,9 (1) | - | 580,7 (1) | 581,6 |
| Triobalicina | 9,7 (2) | 75,5 (2) | - | 85,2 |
| Goniotriocina | 11,7 (2) | 34,7 (1) | - | 46,4 |

*Apenas as bandas mais fortes que $5 \text{ km}\cdot\text{mol}^{-1}$ foram consideradas.

A contribuição total do estiramento OH para cada molécula é aproximadamente determinada pelo número de cada tipo de ligação de H presente na sua estrutura. O tipo mais fraco é o estiramento OH regular. A sua intensidade média é cerca de $5 \text{ km}\cdot\text{mol}^{-1}$, e que ocorre em todas as moléculas. O segundo é o estiramento OH da ligação de hidrogênio que ocorre entre uma hidroxila e um átomo de oxigênio do anel tetrahydrofurano adjacente. O comprimento médio da ligação de hidrogênio envolvido para este tipo de estiramento é $2,1 \text{ \AA}$ e o ângulo da ligação é de cerca de 115° . A intensidade média neste caso é de cerca de $33 \text{ km}\cdot\text{mol}^{-1}$, pelo aumento de intensidade moderada, devido à ocorrência da ligação de hidrogênio. A última e mais intensa banda corresponde a forte ligação de hidrogênio do estiramento OH que ocorre entre um grupo hidroxila e um oxigênio do anel tetrahydrofurano não adjacente. O comprimento médio da ligação de hidrogênio envolvido é muito menor, $1,7 \text{ \AA}$ e o ângulo de ligação mais

linear que varia de 138°-165°. Neste último caso, o aumento da intensidade é imenso, superando 500 km.mol⁻¹ na molécula rollidecina.

A intensidade total calculada para o estiramento C-H abrangem de 832-1108 km.mol⁻¹. Das duas vibrações de estiramento C-H as bandas de frequências mais altas são mais intensas que as frequências mais baixas nas Figuras 2 e 3, consistentes com os valores do B3LYP e com observações feitas em moléculas em fase gasosa menores, como os halometanos, em que normalmente a alta frequência das bandas mais intensas é atribuída ao estiramento assimétrico e as de baixa frequência das bandas mais fracas ao estiramento simétrico (Silva *et al.*, 2012). Os resultados do B3LYP mostram intensidades do estiramento C-H assimétrico de 472 a 625 km.mol⁻¹ considerando que a variação da intensidade do estiramento simétrico está no intervalo de 353-544 km.mol⁻¹. Os espectros nas Figuras 2 e 3 também têm intensidades do estiramento C-H muito mais fortes comparadas às intensidades do C=O também consistentes com os resultados do B3LYP.

As bandas de estiramento C=O têm intensidades muito semelhantes que vão de 314 a 335 km.mol⁻¹, exceto para (2,4-cis)-gonioneninone que tem duas vibrações de estiramento C=O, a banda de frequência mais alta tem intensidade de 327 km.mol⁻¹ e a menor de 107 km.mol⁻¹. As duas bandas podem ser esperadas para esta molécula, uma vez que tem uma estrutura de ceto-lactona. Todos os espectros da amostra com *eac* tem uma banda de estiramento C=O em torno de 1760 cm⁻¹. No entanto, os extratos das amostras com etanol de folhas sombreadas mostram duas bandas de estiramento C=O muito distintas com intensidades semelhantes, uma perto de 1750 cm⁻¹ e outra perto de 1650 cm⁻¹, no inverno e na primavera. Os outros espectros dos extratos com etanol mostram uma forte banda em 1750 cm⁻¹ e um ombro de baixa frequência. Estes espectros mostram que as moléculas com estrutura de ceto-lactona, como (2,4-cis)-

gonioneninone, são extraídas com etanol puro enquanto que quantidades insignificantes ou muito pequenas são extraídos com a mistura ternária *eac*.

A vibração de deformação C-C têm intensidades relativamente constantes entre 127 e 221 km.mol^{-1} . As vibrações da deformação CH têm pequenas intensidades, entre 47 e 203 km.mol^{-1} , exceto para (2,4-cis)-gonioneninone com 467 km.mol^{-1} . Em parte, isto pode explicar o aumento na intensidade observada nas Figuras 1 e 2 entre 1000-1450 cm^{-1} que parece estar associada à presença de bandas e ombros de baixa frequência do estiramento C-O.

CONCLUSÃO

A variação mais importante observada nos 264 espectros de infravermelho das acetogeninas investigadas ocorre para as intensidades das bandas de estiramento OH na região de 3100-3600 cm^{-1} .

Os cálculos teóricos preveem intensidades muito fortes para o estiramento OH, característico da ligação de hidrogênio e da geometria de equilíbrio dobrada do tipo V (ângulo de 45°) para duas acetogeninas com anéis tetrahydrofurano adjacentes, uvarigina e rolledecina. Acetogeninas com apenas um anel tetrahydrofurano, gioniotetracina, (2,4-cis)-gonioneninone, triobalicina e gioniotriocina, são previstas para ter intensidades do estiramento OH menores cerca de dez vezes em comparação com uvarigina e rolledecina, e estrutura da cadeia de carbono moderadamente angulada (cerca de 120°). Montecristina não tem anéis tetrahydrofurano e apresenta uma intensidade de estiramento OH cem vezes menor que aquelas com dois anéis tetrahydrofurano adjacentes, além de uma estrutura quase linear.

Esta diferença na estrutura devido à ligação de hidrogênio pode estar relacionada à atividade biológica antitumoral. Bullatacina tem uma estrutura com dois anéis tetrahidrofurano adjacentes tal como uvarigina e rolledecina e estas moléculas possuem uma potente atividade antitumoral (Hui *et al.*, 1989; Naito *et al.*, 1995; Chih *et al.*, 2001). Os cálculos do funcional B3LYP da bullatacina também preveem uma intensa banda de estiramento OH, $520,7 \text{ km.mol}^{-1}$, e uma estrutura muito dobrada com um ângulo de cerca de 45° , semelhantes aos da uvarigina e rolledecina.

Recentemente Mangal e colaboradores (Mangal *et al.*, 2015) forneceu uma lista detalhada de 133 compostos para os quais a atividade antitumoral foi documentada na literatura. Eles encontraram a seguinte ordem decrescente de atividade antitumoral classificada de acordo com o tipo de estrutura da acetogenina, em relação ao anel tetrahidrofurano (THF): dois THF adjacentes > dois THF não adjacentes > um THF > sem THF. Estas correlações merecem um estudo mais aprofundado e mostram a importância da evidência espectral e caracterização teórica da ligação de hidrogênio para sistemas biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, S.; Pisano, P. L.; Silva, F. B.; Scarminio, I. S.; Olivieri, A. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015b**, *26*, 2241.

Alali, F. Q.; Liu, X. X.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 504.

Astirin, O. P.; Artanti, A. N.; Fitria, M. S.; Perwitasari, E. A.; Prayitno, A.; *J. Cancer Ther.* **2013**, *4*, 1244.

Becke, A. D.; *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.

Chih, H-W.; Chiu, H-F.; Tang, K-S.; Chang, F-R.; Wu, Y-C.; *Life Sci.* **2001**, *69*, 1321.

Delaroza, F.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1034.

Dunn, W. B.; Ellis, D.I.; *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 285.

Fennell, C. W.; Lindsey, K. L.; McGaw, L. J.; Sparg, S. G.; Stafford, G. I.; Elgorashi, E. E.; Grace, O. M.; Staden, J. van; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 205.

Gad, H. A.; El-Ahmady, S. H.; Abou-Shoer, M. I.; Al-Azizi, M. M.; *Phytochem. Analysis.* **2013**, *24*, 1.

Garcia, L. M. Z.; Pauli, E. D.; Cristiano, V.; Câmara, C. A. P.; Scarminio, I. S.; Nixdorf, S. L.; *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47*, 825.

Garcia, L. M. Z.; Oliveira, T. F.; Soares, P. K.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2010**, *103*, 1.

Gaussian 03, Revision D.02, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant J. C.; *et al.*; Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.

Hui, Y-H.; Rupprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Anderson, J. E.; Smith, D. L.; Chang, C-J.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 463.

Jensen, F.; *Introduction to Computational Chemistry*, 2nd ed., Chichester: John Wiley and Sons, **2007**.

Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G.; *Phys. Rev. B.* **1988**, *37*, 785.

Mangal, M.; Khan, M. I.; Agarwal, S. M.; *Anticancer Agents Med. Chem.* **2015**, *16*, 138.

Mekhfi, H.; El Haouari, M.; Legssyer, A.; Bnouham, M.; Aziz, M.; Atmani, F.; Remmal, A.; Ziyat, A.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 317.

Naito, H.; Kawahara, E.; Maruta, K.; Maeda, M.; Sasaki, S.; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4419.

Sharaf, M. A.; Illman, D. L.; Kowalski, B. R.; *Chemometrics*, In *Chemical Analysis*. Elving, P. J.; Windfordner, J. D.; Eds. Vol. 82, New York: Wiley, **1986**.

Silva, A. F.; Richter, W. E.; Meneses, H. G. C.; Faria, S. H. D. M.; Bruns, R. E.; *J. Phys. Chem. A.* **2012**, *116*, 8238.

Soares, P. K.; Scarminio, I. S.; *Phytochem. Analysis.* **2008**, *19*, 78.

Soares, P. K.; Bruns, R. E.; Scarminio I. S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 644.

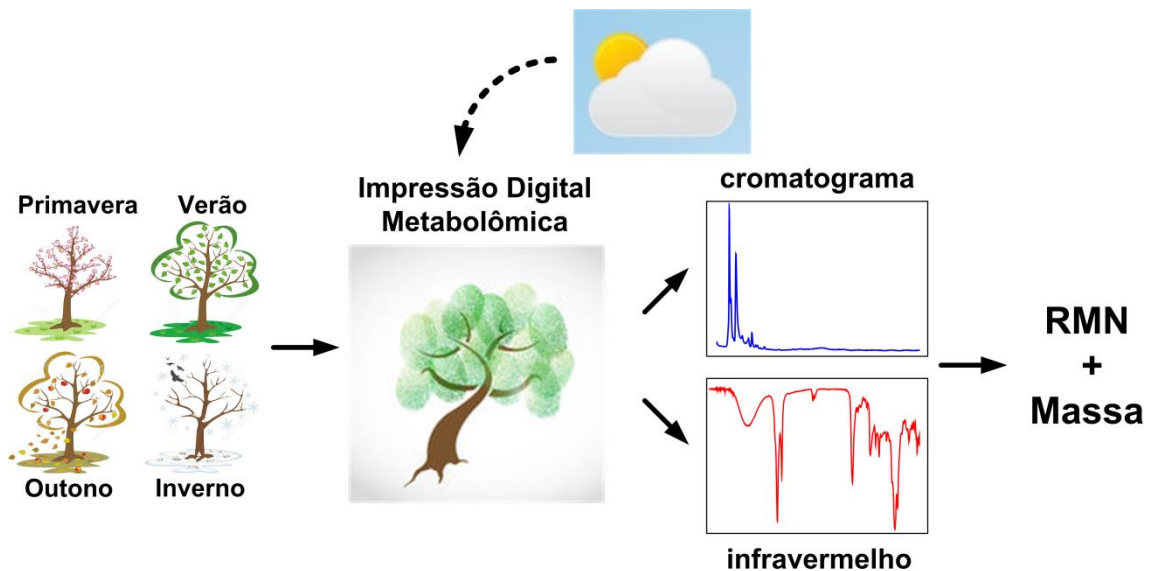
Souza, E. B. R. de; Silva, R. R. da; Afonso, S.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 4176.

Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J.; *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623.

Uzel, A.; Guvensen, A.; Cetin, E.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 151.

Capítulo IV

**Determinação da influência das condições
sazonais e luminosidade solar na composição dos
metabólitos de folhas de *Rollinia mucosa* por
técnicas espectroscópicas e cromatográficas**



Resumo

Neste trabalho um planejamento estatístico de misturas e análise de componentes principais associados a dados cromatográficos, espectroscópicos no infravermelho, de massas e de ressonância magnética nuclear foram usados para comparar as impressões digitais obtidas em diferentes épocas do ano e condições de radiação solar. As folhas autossombreadas e expostas ao sol de *Rollinia mucosa* foram coletadas nas quatro estações climáticas. Os resultados dos dados cromatográficos e espectroscópicos mostraram que o extrato preparado com a mistura quaternária de solventes *eadc* (etanol:acetato de etila:diclorometano:clorofórmio) foi discriminado em função da acessibilidade de luz solar que a folha recebeu ao longo de cada estação. Os espectros ultravioletas dos dados cromatográficos com detector de arranjo de diodos mostrou absorvância máxima entre 200 a 230 nm, característicos de grupamento éster, como as lactonas. Os números de onda característicos de grupos funcionais presentes nas acetogeninas, como C-H, C=O, C-O e O-H, tiveram maior influência na discriminação das amostras de *Rollinia mucosa* expostas ao sol. Os dados de espectrometria de massas e RMN apresentaram sinais característicos do anel tetrahydrofurano e da γ -lactona α,β -insaturada, confirmando a presença de acetogeninas nos extratos das folhas de *Rollinia mucosa*.

Palavras-chave: *Rollinia mucosa*, variação sazonal, exposição solar, impressão digital, métodos quimiométricos

INTRODUÇÃO

Uma das espécies mais consumidas da família Annonaceae é a *Rollinia mucosa*. *Rollinia mucosa* é uma árvore frutífera tropical indígena da Índia Ocidental e América Central (Pettit *et al.*, 1987). O fruto desta planta é conhecido como fruta do conde, pinha e biribá. É uma árvore tropical popular no Brasil, México, Bolívia, Venezuela, entre outros. Conhecida como uma árvore medicinal, diferentes partes da planta como, raízes, caules, cascas, sementes e folhas podem ser empregadas na medicina popular por apresentarem as seguintes propriedades: atividade antitumoral (Gu *et al.*, 1997), antineoplásica (Figueiredo *et al.*, 1999), antimicrobiana e antifúngica (Kuo *et al.*, 2001). Entre os constituintes desta planta, as acetogeninas, conhecidas por apresentarem uma potente atividade anticancerígena, são consideradas como os maiores princípios ativos. Uma vez que é frequentemente utilizada como fonte de matéria-prima, é importante entender como a composição química desta planta varia de acordo com o tempo de colheita e acessibilidade à luz.

As plantas produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos primários de crescimento e desenvolvimento metabólico. Os metabólitos secundários são exclusivos para cada espécie de planta e suas composições variam durante o ano e de acordo com diferentes acessibilidades à luz (Hussain *et al.*, 2010; March e Clark, 2011). Eles representam muitas classes de compostos de diferentes solubilidades, polaridades e também variação nas quantidades. Os fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos são sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade de água, radiação ultravioleta e poluição do ar (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Considerando que todos estes fatores afetam a quantidade de metabólitos é importante considerar

principalmente quando o material vegetal é utilizado como suplemento dietético. O momento em que a planta é coletada é um dos fatores mais importantes, uma vez que a quantidade e, até mesmo a natureza dos componentes ativos, não é constante ao longo do ano (Hussain *et al.*, 2010).

Vários pesquisadores têm estudado a adaptação das plantas em termos da captação de energia da planta (irradiação), parâmetros fisiológicos das folhas expostas ao sol e sombreadas, características foliares de plantas cultivadas em níveis altos e baixos de irradiação (Nobel, 1976; McCain *et al.*, 1988; Terashima *et al.*, 2001; Terashima *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2007), variação genética e da resposta fenotípica em parâmetros eco fisiológicos e morfológicos (Ramalho *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2007; Zhang e Björn, 2009).

A impressão digital metabolômica fornece informações sobre a composição química do material vegetal com a finalidade de analisar simultaneamente vários metabólitos e é descrita por uma variedade de técnicas analíticas apropriadas como, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IV), entre outros (Gad *et al.*, 2013). Por outro lado, poucos estudos foram encontrados na literatura sobre a influência da condição sazonal e luminosidade solar sobre a composição dos metabólitos.

Considerando a relevante atividade da *Rollinia mucosa*, mais estudos são necessários, tendo em vista a condição sazonal e radiação solar sobre a composição de seus metabólitos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi usar dados cromatográficos, espectroscópicos no infravermelho, de massas e de ressonância magnética nuclear para analisar a variação da composição química dos metabólitos de folhas de *Rollinia mucosa* cultivadas na sombra e ao sol e coletadas nas quatro estações climáticas por

meio de impressão digital metabólica. O planejamento de misturas de cinco componentes, etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio, e análise de componentes principais (ACP) associados a dados espectroscópicos e cromatográficos foram usados para comparar as impressões digitais obtidas.

EXPERIMENTAL

Material Vegetal

As folhas de *Rollinia mucosa* foram coletadas entre abril de 2011 e janeiro de 2012 na Universidade Estadual de Londrina (UEL). As exsiccatas da espécie *Rollinia mucosa* cultivadas ao sol (FUEL 49.286) e autossombreada (FUEL 49.287) estão depositadas no Herbário da UEL. A secagem das folhas foi feita em temperatura controlada (27°C) por nove dias.

Reagentes

Os solventes acetonitrila e metanol grau CLAE foram adquiridos da LiChrosolv. A fase móvel para cromatografia líquida de alta eficiência foi preparada usando água ultra pura preparada com um sistema de purificação Millipore Plus Milli-Q. Etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio foram adquiridos da FMaia e são todos de grau analítico. Para o preparo das amostras analisadas por espectrometria de massa foi utilizado ácido fórmico P.A. 85% da VETEC e metanol grau LC-MS da Sigma-Aldrich. Para as análises por RMN foi utilizado dimetilssulfóxido deuterado (DMSO-d₆) com 99,9% de pureza da Sigma-Aldrich.

Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados usando misturas de cinco componentes, (e) etanol, (a) acetato de etila, (d) diclorometano, (A) acetona e (c) clorofórmio, e suas proporções variam de acordo com um planejamento centroide simplex (Barros Neto *et al.*, 2010). A proporção de cada solvente usado na mistura para a extração estão especificadas na Tabela 1. Trinta e três extrações foram realizadas com 31 misturas diferentes e dois outros ensaios foram realizados no ponto central. Cada extrato foi preparado pesando-se 2 g de folhas secas e adicionado 15 ml de solvente puro ou da mistura de solventes de acordo com a Tabela 1. Estas misturas foram colocadas num banho de ultrassom (Unique, modelo USC 1400) durante 60 minutos com a água do banho trocada a cada 30 minutos para evitar o aquecimento. Os extratos foram filtrados através de papel de filtro para separar a solução dos pequenos pedaços de folhas, e a solução foi armazenada em frascos previamente identificados e pesados. Este procedimento foi repetido mais catorze vezes, de modo que o volume total da mistura de solvente adicionado às folhas foi de 225 mL. O excesso de solvente foi evaporado num evaporador rotativo, removendo todo o solvente ainda presente na amostra até atingir peso constante (Souza *et al.*, 2009; Afonso *et al.*, 2015b).

Análises por cromatografia líquida de alta eficiência

Para as análises cromatográficas, 3,0 mg do extrato foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol. Foi adicionado 20 µL desta solução em 10 mL da fase móvel composta por 35% de metanol, 35% de acetonitrila e 30% de água. As amostras foram filtradas em filtro de nylon de 0,20 µm da Chromafil e analisadas imediatamente. As condições cromatográficas foram: coluna C18 Kinetex 2,6 µm 100 Å Phenomenex, com dimensões de 100 mm x 4,6 mm, volume de injeção de 20 µL e vazão da fase móvel de

1,0 mL min⁻¹. A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido Finnigan Surveyour Thermo Scientific equipado com detector de arranjo de diodos. O tempo de corrida foi de 15 minutos, com eluição isocrática e monitorada em 210, 220 e 280 nm. Os dados foram processados usando o programa ChromQuest 4.2.

Tabela 1. Proporções dos solventes usados na extração de acordo com o planejamento centroide simplex.

| | Amostras | Solvente Extrator | | | | |
|----|----------------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|
| | | e | a | d | A | c |
| 1 | etanol (e) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | acetato de etila (a) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | diclorometano (d) | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 4 | acetona (A) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 5 | clorofórmio (c) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | e:a | 1/2 | 1/2 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | e:d | 1/2 | 0 | 1/2 | 0 | 0 |
| 8 | e:A | 1/2 | 0 | 0 | 1/2 | 0 |
| 9 | e:c | 1/2 | 0 | 0 | 0 | 1/2 |
| 10 | a:d | 0 | 1/2 | 1/2 | 0 | 0 |
| 11 | a:A | 0 | 1/2 | 0 | 1/2 | 0 |
| 12 | a:c | 0 | 1/2 | 0 | 0 | 1/2 |
| 13 | d:A | 0 | 0 | 1/2 | 1/2 | 0 |
| 14 | A:c | 0 | 0 | 0 | 1/2 | 1/2 |
| 15 | d:c | 0 | 0 | 1/2 | 0 | 1/2 |
| 16 | e:a:d | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 0 | 0 |
| 17 | e:A:c | 1/3 | 0 | 0 | 1/3 | 1/3 |
| 18 | e:a:c | 1/3 | 1/3 | 0 | 0 | 1/3 |
| 19 | e:d:c | 1/3 | 0 | 1/3 | 0 | 1/3 |
| 20 | e:a:A | 1/3 | 1/3 | 0 | 1/3 | 0 |
| 21 | d:A:c | 0 | 0 | 1/3 | 1/3 | 1/3 |
| 22 | a:A:c | 0 | 1/3 | 0 | 1/3 | 1/3 |
| 23 | a:d:c | 0 | 1/3 | 1/3 | 0 | 1/3 |
| 24 | a:d:A | 0 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 0 |
| 25 | e:d:A | 1/3 | 0 | 1/3 | 1/3 | 0 |
| 26 | e:a:d:A | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 0 |
| 27 | a:d:A:c | 0 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| 28 | e:d:A:c | 1/4 | 0 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| 29 | e:a:A:c | 1/4 | 1/4 | 0 | 1/4 | 1/4 |
| 30 | e:a:d:c | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 0 | 1/4 |
| 31 | e:a:d:A:c | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 |

Análises espectroscópicas na região do infravermelho

Para a análise por infravermelho foi usado um espectrofotômetro FT-IR Nicolet iS 10 no modo ATR (do inglês, *Attenuated Total Reflection*) da Thermo Scientific. Os extratos secos foram colocados no cristal de germânio e com o auxílio de uma prensa foi obtido um filme de mesma espessura para todas as amostras sobre este cristal. Os espectros foram registrados na região de 4000-675 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scans.

Análises por ressonância magnética nuclear

A análise por RMN foi realizada a 25°C em um espectrômetro Advance III 400 MHz da Bruker acoplado com uma sonda BBI de 5 mm para espectros de ^1H e ^{13}C . Os parâmetros de aquisição dos espectros de RMN de ^1H foram: 65.536 números de pontos de dados; 8.012 Hz de largura espectral; tempo de aquisição de 4,000 s; tempo de atraso de 1,0 s; 128 números de scans. Os parâmetros para a aquisição dos espectros de RMN de ^{13}C foram: número de pontos de dados de 32.768; largura espectral de 24.038 Hz; tempo de aquisição de 1,363 s; tempo de atraso de 2,0 s; número de scans de 9.216. Para o preparo da amostra foi pesado 80 mg do extrato e adicionado 0,50 ml de solvente dimetilssulfóxido deuterado (DMSO- d_6).

Análises por espectrometria de massas

As amostras foram preparadas pesando-se 3,0 mg do extrato bruto e dissolvendo em 1,0 mL de metanol grau MS. Esta solução foi diluída em metanol com 1% de ácido fórmico seguida de diluição para obtenção de uma solução de concentração 1×10^{-6} mg mL^{-1} . A análise foi operada em um espectrômetro de massas LC-MS/MS da Bruker quadrupolo no modo positivo como forma de avaliar as diferentes propriedades dos

compostos presentes no extrato. Os dados foram adquiridos no modo de varredura usando uma gama de m/z de 83 a 1500 Da. Os dados foram processados usando o software Compass data analysis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Impressão digital cromatográfica

Os dados cromatográficos foram submetidos à análise de componentes principais normalizadas pelo autovalor (análise de fatores) para visualizar a discriminação das amostras em virtude da separação dos metabolitos presentes nas folhas nas diferentes condições de luminosidade (Figura 1). Os cromatogramas foram organizados em uma matriz de 1800 linhas e 66 colunas, onde cada linha representa a absorvância em unidade arbitrária em cada tempo de retenção e as colunas os extratos (33 extratos de acordo com o planejamento estatístico de misturas para cada amostra). Os cinco primeiros fatores explicam 95,87% da variância total dos dados para as amostras coletadas no inverno, sendo que o 1º e a 5º explicam 82,22% da variância total dos dados. Já para as amostras coletadas no verão, a variância total acumulada para os 5 primeiros fatores é de 95,45%, e o 1º e 5º juntos explicam 84,64%. Embora o 5º fator tenha baixa variância ele traz informação química relevante quanto as espécies químicas presentes na discriminação amostral.

A Figura 1a mostra a variação dos dados distribuídos no gráfico dos escores do Fator 1 × Fator 5 para os extratos de folhas coletadas no inverno em condições de sol e sombra. O gráfico de discriminação mostra aleatoriedade dos extratos, não ocorrendo separação de todos os pontos do planejamento de misturas em virtude da exposição solar da folha nesta estação. A separação em relação à luminosidade solar que as folhas

recebem ocorre nas amostras extraídas com as misturas ternárias etanol:acetato de etila:diclorometano (*ead*) e acetato de etila:acetona:clorofórmio (*aAc*) e a quaternária etanol:acetato de etila:diclorometano:clorofórmio (*eadc*), sendo o Fator 5 o responsável por essa discriminação.

No verão (Figura 1b) a discriminação das amostras ocorreu majoritariamente em virtude da disposição das folhas nas duas diferentes condições de luminosidade solar. Na região negativa do fator 5 localizaram-se principalmente as amostras de folhas expostas ao sol, enquanto no Fator 5 positivo os extratos de folhas autossombreadas estão presentes. Destacando-se os mesmos extratos que foram discriminados no gráfico dos escores das amostras coletadas no inverno, apenas o extrato da mistura quaternária *eadc* mostrou separação em relação à exposição solar das folhas coletadas no verão. Neste sentido, entende-se que amostras de folhas com diferente exposição ao sol apresentam variações metabômicas relacionadas à sazonalidade, e que a variação nas propriedades do solvente extrator discrimina amostras de folhas autossombreadas e expostas ao sol.

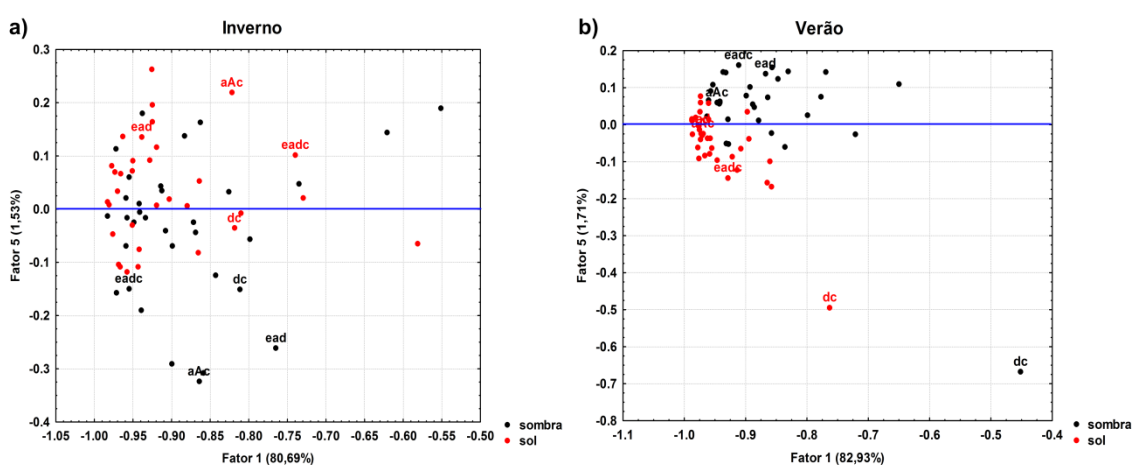


Figura 1. Escores do Fator 1 × Fator 5 dos cromatogramas dos extratos do planejamento experimental de folhas de *Rollinia mucosa* sombreadas e expostas ao sol e coletadas no **a)** inverno e **b)** verão.

A Figura 3 mostra os loadings do Fator 5. Neste fator é possível visualizar os loadings responsáveis pela discriminação das amostras coletadas no inverno em relação aos solventes e os espectros UV-DAD para estes loadings.

Os extratos localizados na região positiva do Fator 5 (extratos *ead*, *aAc* e *eadc* de folhas expostas ao sol) contém maior abundância relativa de metabólitos com tempo de retenção de 0,90; 1,22 e 1,41 minutos, enquanto que na região negativa do Fator 5 (extratos *ead*, *aAc* e *eadc* de folhas autossombreadas) estão localizados os extratos com maior quantidade de compostos com tempo de retenção em 1,85 e 2,56 minutos.

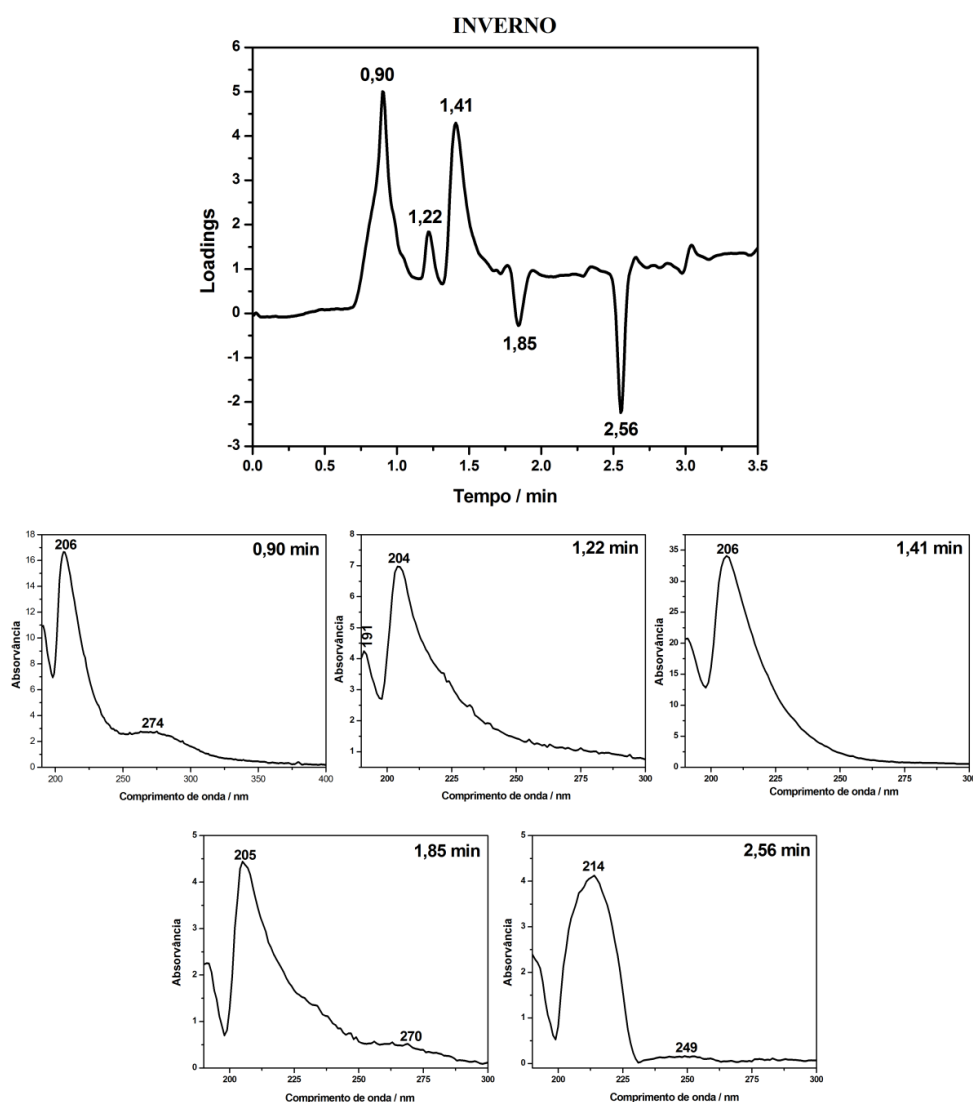


Figura 3. Loadings do Fator 5 da análise de fatores e os respectivos espectros UV-DAD de folhas sombreadas e expostas ao sol coletadas no inverno da *Rollinia mucosa*.

A Figura 4 mostra os loadings do Fator 5 para as amostras coletadas no verão. Observa-se nesta figura 9 picos de maior peso na discriminação amostral, contra 5 das amostras coletadas no inverno.

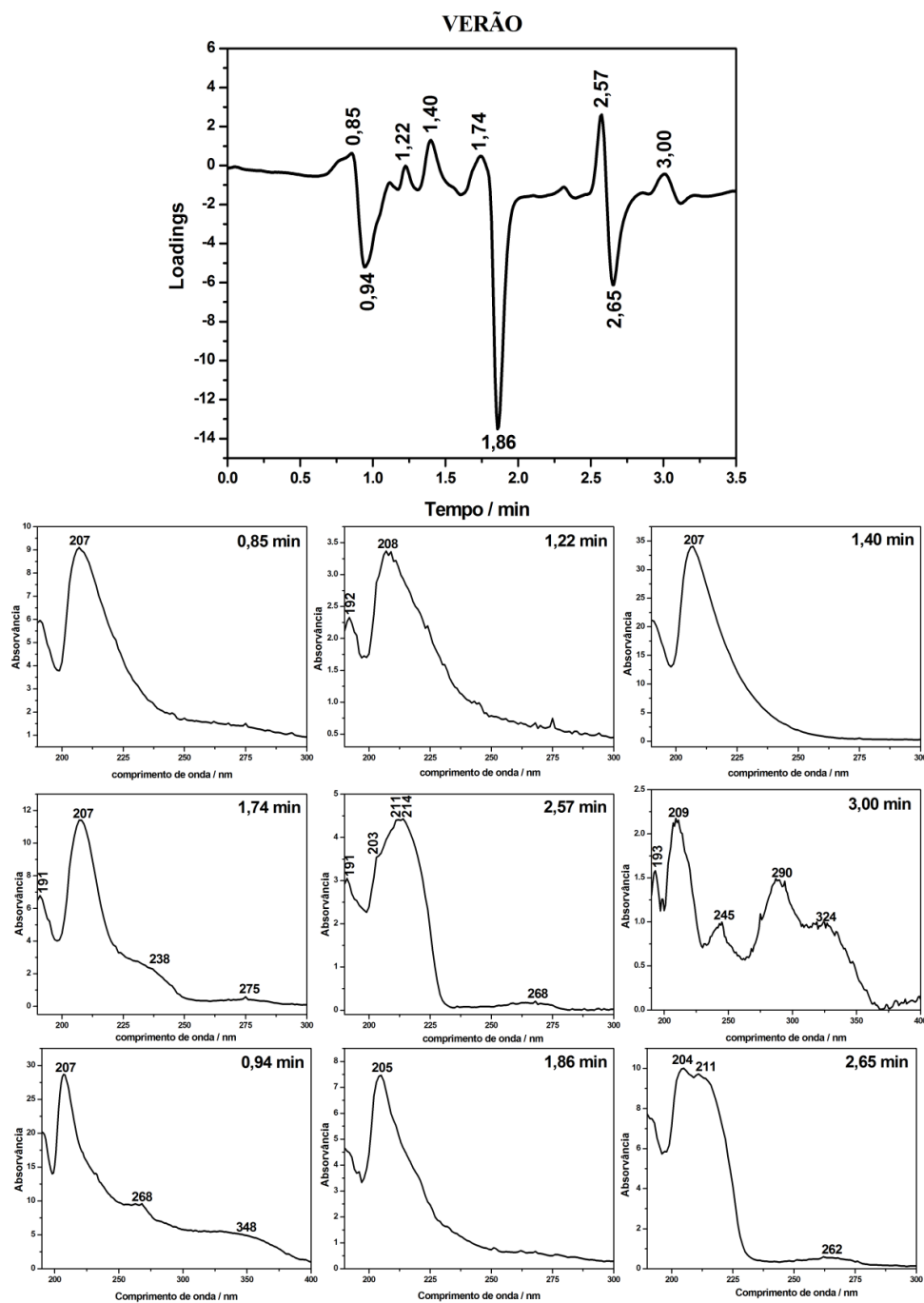


Figura 4. Loadings do Fator 5 da análise de fatores e os respectivos espectros UV-DAD de folhas sombreadas e expostas ao sol coletadas no verão da *Rollinia mucosa*.

As amostras expostas ao sol, que majoritariamente se encontram na região negativa do Fator 5 (expostas ao sol), apresentam três perfis de maior peso no processo de discriminação amostral. São os perfis nos tempos de retenção de 0,94; 1,86 e 2,65 minutos. Apesar do Fator 5 apresentar maior número de picos com loadings positivos, os picos do fator negativo apresentam maior peso. As amostras coletadas no verão apresentaram maior diversidade de metabólitos comparada com aquelas do inverno.

A maioria dos perfis UV-DAD de maior peso apresentam absorvância entre 200 e 215 nm, que são atribuídas às transições eletrônicas do tipo HOMO →LUMO (orbital molecular ocupado de mais alta energia →Orbital molecular desocupado de mais baixa energia). Absorção nesta região é característico de grupos cromóforos, principalmente nitro (-NO₂; 210 nm), carboxila (-COOH; 200-210 nm) e éster (-COOR; 205 nm) (Arnason *et al.*, 1995). Sendo as acetogeninas, compostos especializados presentes nas plantas da família Annonaceae, estas apresentam absorção nesta região em função do grupo éster presente nas γ -lactonas.

Impressão digital espectroscópica no infravermelho

A análise de fatores também foi realizada no espectro completo de infravermelho composta de uma matriz de 1725 variáveis por 66 amostras (extratos obtidos pelo planejamento de misturas para folhas coletadas ao sol e sombra), para quatro conjuntos de dados (primavera, verão, outono e inverno). Os quatro primeiros fatores, para primavera, verão, outono e inverno apresentam variância acumulada de 99,27%, 99,36%, 99,61% e 99,77%, respectivamente.

A figura 5 mostra os escores da análise de fatores para as quatro estações climáticas. Fica evidente que as estações verão e outono apresentam diferença metabolômica mais acentuada entre as amostras de sol e sombra.

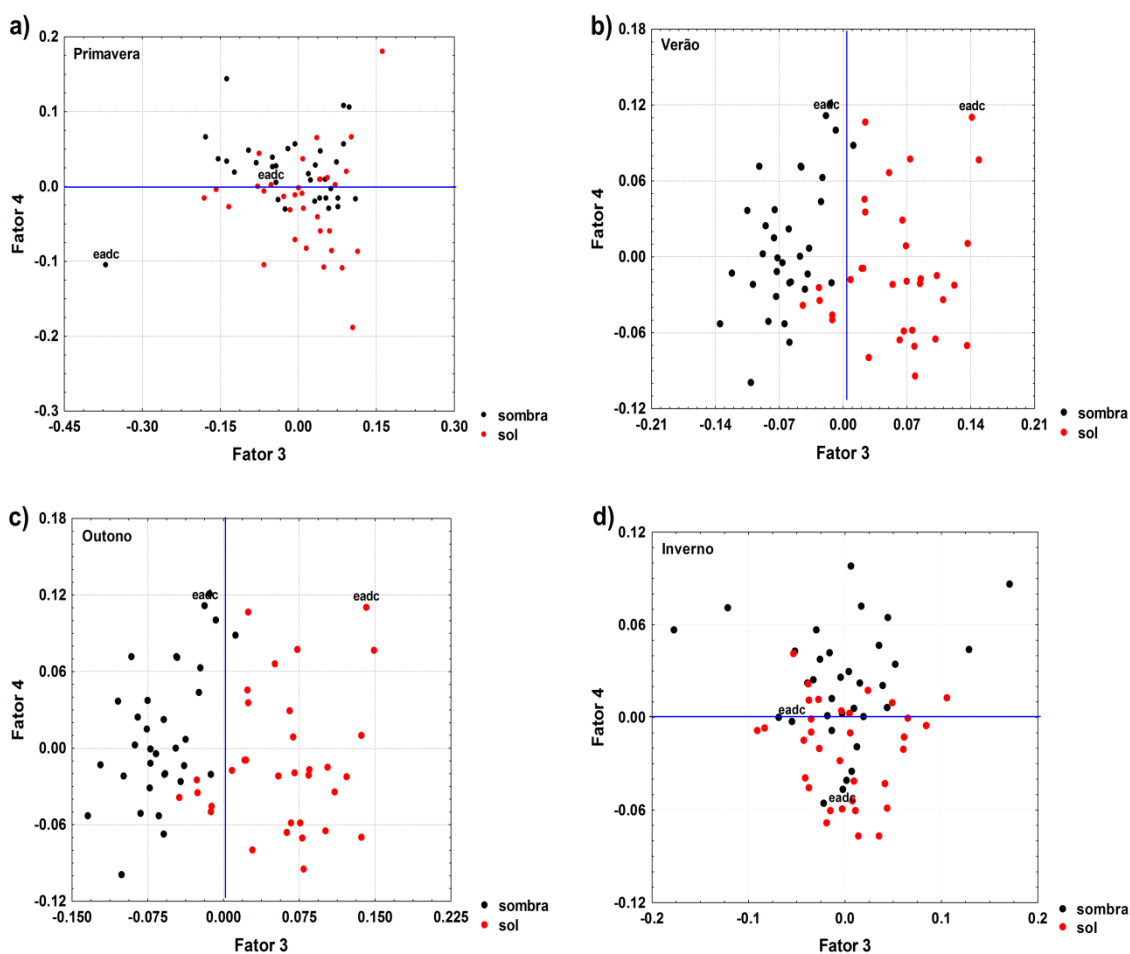


Figura 5. Escores da análise de fatores do F3 × F4 dos espectros de infravermelho dos extratos do planejamento experimental de folhas de *Rollinia mucosa* sombreadas e expostas ao sol coletadas na **a)** primavera, **b)** verão, **c)** outono e **d)** inverno.

Assim como nos dados cromatográficos, a análise de fatores dos dados de infravermelho mostrou discriminação em função da acessibilidade de luz solar que a folha recebe ao longo das quatro estações climáticas nos extratos *eadc*. A separação é mais efetiva nas amostras provenientes de folhas coletadas no verão e no outono. As amostras de folhas expostas ao sol estão localizadas na região na região positiva do F3 tanto no verão quanto no outono e mostram que nessas estações a incidência de radiação solar interfere na produção e/ou quantidade de metabólitos da planta.

O gráfico dos loadings dos Fatores 3 e 4 (Figura 6) mostra as variáveis com maior influência na separação das amostras. Na primavera (Figura 6a) e inverno (Figura

6d) o Fator 4 foi responsável pela separação dos extratos *eadc* do sol e da sombra pelos números de onda em 1755 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), 2856 e 2927 cm^{-1} ($\nu\text{C-H}$) e 3435 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$) na primavera e em 1758 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), 2850 e 2920 cm^{-1} ($\nu\text{C-H}$) no inverno. Nas Figuras 6b (verão) e 6c (outono) observa-se uma boa separação entre as amostras do sol e da sombra, sendo que os maiores pesos para a discriminação dessas amostras são os números de onda em 1061 cm^{-1} ($\nu\text{C-O}$), 1755 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$), 2850 e 2920 cm^{-1} ($\nu\text{C-H}$) e 3312 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$) para o verão e em 1049 cm^{-1} ($\nu\text{C-O}$), 1475 ($\nu\text{C=C}$), 2850 e 2920 cm^{-1} ($\nu\text{C-H}$) e 3305 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$) para o outono. Esses números de onda são característicos de grupos funcionais presentes nas acetogeninas, e tem maior influência na separação das amostras de folhas expostas ao sol, com destaque para a mistura quaternária *eadc*.

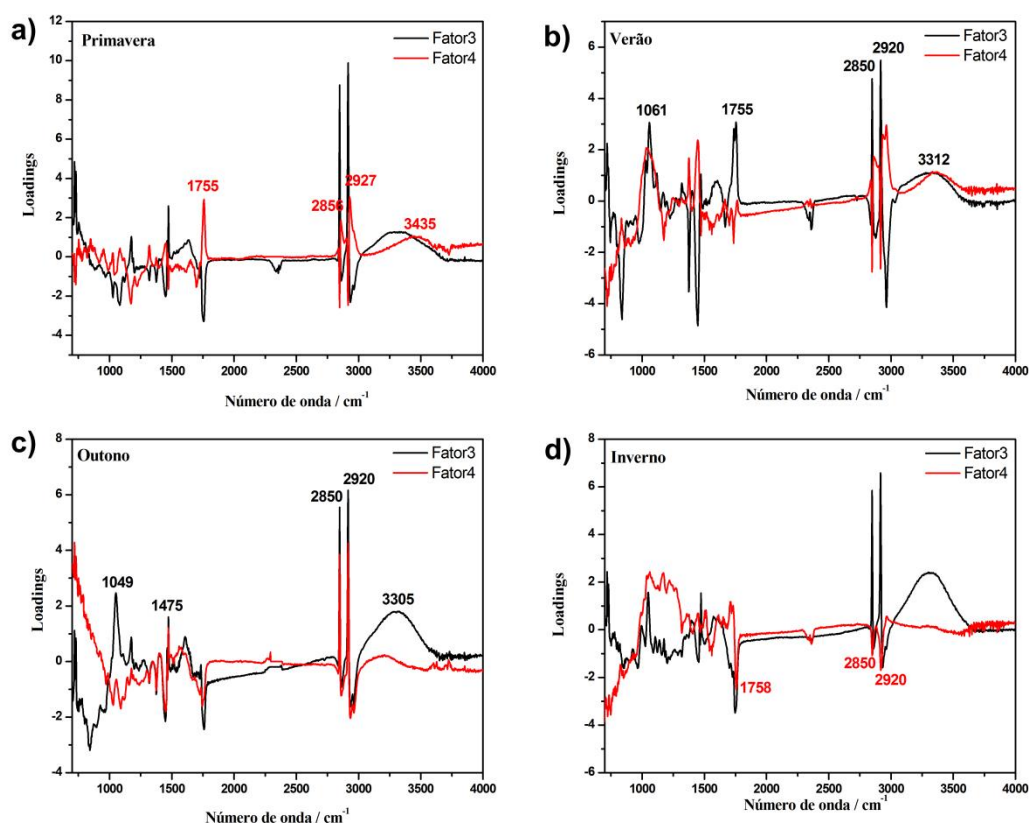


Figura 6. Loadings da ACP dos espectros de infravermelho de folhas sombreadas e expostas ao sol coletadas na **a)** primavera, **b)** verão, **c)** outono e **d)** inverno.

A variação de bandas e suas intensidades nos espectros de infravermelho podem estar relacionadas com o tipo de acetogenina presente em cada extrato, de acordo com a quantidade de anel tetrahydrofurano e tipo de lactona na extremidade da cadeia carbônica. Essas mudanças em relação ao anel tetrahydrofurano e a terminação lactona provocam variações nas frequências e intensidades dos sinais nos espectros de infravermelho, por exemplo, lactona saturada apresenta banda em 1770 cm^{-1} enquanto que a insaturada em 1745 cm^{-1} (Rupprecht *et al.*, 1990).

A produção de diferentes acetogeninas e seus precursores em virtude dessas variações também pode ter significativas mudanças na quantidade ou até mesmo no tipo de compostos produzidos nas diferentes estações do ano ou em relação à variação de exposição solar da planta.

Análises por espectrometria de massas e RMN

Para explorar os principais compostos encontrados nas plantas da família Annonaceae, a análise por espectrometria de massas foi baseada na estrutura básica das acetogeninas. O extrato com a mistura quaternária *eadc* de folhas autossombreadas e coletadas no verão mostrou pico $[M + Na]^+$ de m/z 619,46 e 645,47 podendo ser atribuídos, respectivamente, às acetogeninas annonacina A ($C_{35}H_{64}O_7$), que tem massa calculada de 619,45 e annonastatina ($C_{38}H_{70}O_6$), que tem massa calculada de 645,50 (Rupprecht *et al.*, 1990). De acordo com a literatura, também foram observados os fragmentos no espectro de massa dessas substâncias, sugerindo a presença das mesmas ou de outras acetogeninas com o mesmo tipo de estrutura no extrato das folhas de *Rollinia mucosa*, e este resultado é confirmado pelos dados de ressonância magnética nuclear.

Os resultados obtidos por RMN mostraram sinais característicos de anel mono-tetrahidrofurano com duas hidroxilas nos carbonos adjacentes e de γ -lactona α,β -insaturada confirmando os resultados obtidos nas análises por espectroscopia no infravermelho. A Figura 7 mostra os carbonos numerados na estrutura do anel THF e da γ -lactona presente nas acetogeninas.

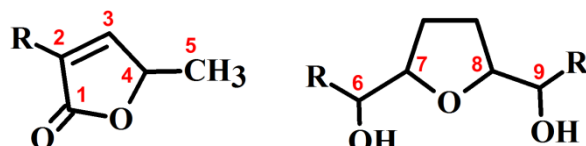


Figura 7. Estrutura da γ -lactona α,β -insaturada e do anel mono-tetrahidrofurano com duas hidroxilas nos carbonos adjacentes, presentes em diversas acetogeninas.

A Tabela 2 mostra os dados de RMN de ^{13}C dos carbonos que não realizam ligações com o hidrogênio, afim de, comparar os valores experimentais com os da literatura que são característicos de cada carbono na estrutura das acetogeninas. A Tabela 3 mostra os dados de RMN 2D do mapa de contorno HMQC onde é possível observar os valores dos carbonos e hidrogênios que estão ligados e compara-los com os valores encontrados na literatura das acetogeninas annonacina A e annonastatina (Rupprecht *et al.*, 1990).

Tabela 2. Dados de RMN de ^{13}C do extrato *eadc* de folhas autossombreadas coletadas no verão e das acetogeninas annonacina A e annonastatina (DMSO, δ).

| Posição | extrato <i>eadc</i> | annonacina A* | annonastatina* |
|---------|---------------------|---------------|----------------|
| 1 | 174,74 | 174,68 | 174,65 |
| 2 | 131,19 | 131,14 | 131,21 |

*Rupprecht *et al.*, 1990

Tabela 3. Dados de RMN 2D do mapa de contorno HMQC do extrato *eadc* de folhas autossombreadas coletadas no verão e das acetogeninas annonacina A e annonastatina (DMSO, δ).

| Posição | extrato <i>eadc</i> | | annonacina A* | | annonastatina* | |
|---------|---------------------|------|---------------|------|----------------|------|
| | C | H | C | H | C | H |
| 3 | 151,68 | 7,37 | 151,93 | 7,17 | 151,81 | 7,17 |
| 4 | 77,93 | 5,09 | 78,03 | 5,02 | 77,99 | 5,05 |
| 5 | 19,41 | 1,50 | 19,10 | 1,42 | 19,12 | 1,42 |
| 6 | 73,03 | 3,26 | 71,62 | 3,40 | 74,08 | 3,40 |
| 7 | 82,32 | 3,71 | 82,32 | 3,82 | 83,21 | 3,84 |
| 8 | 82,05 | 3,76 | 82,31 | 3,82 | 81,82 | 3,84 |
| 9 | 74,20 | 3,16 | 74,36 | 3,40 | 74,07 | 3,40 |

*Rupprecht *et al.*, 1990

CONCLUSÃO

A quimiometria aliada aos dados obtidos por técnicas analíticas provou ser uma ferramenta útil na investigação da composição química dos extratos. Com a aplicação de métodos quimiométricos associados aos dados espectroscópicos e cromatográficos foi possível traçar o perfil dos diferentes extratos identificando qualitativamente os grupos de composições químicas diferentes.

As análises de fatores aplicadas nos espectros cromatográficos indicaram que o extrato quaternário *eadc* é discriminado em função da acessibilidade de luz solar que a folha recebe tanto nas amostras do inverno quanto no verão e os espectros UV-DAD mostrou absorção na região característica do grupo éster, que está presente nas acetogeninas por meio da terminação γ -lactona.

Os escores dos dados espectroscópicos mostraram que as amostras expostas ao sol são discriminadas das autossombreadas, principalmente, de folhas coletadas no verão e outono com destaque para a mistura quaternária *eadc* do planejamento experimental centroide simplex. Os números de onda de estiramento C-H, estiramento C=O, estiramento C-O e estiramento O-H nos espectros de infravermelho tiveram maior influência na separação das amostras de folhas expostas ao sol na análise de fatores e são característicos de grupos funcionais presentes nas acetogeninas.

Os dados de espectrometria de massa e RMN apresentaram sinais característicos do anel tetrahydrofurano e da γ -lactona α,β -insaturada, indicando a presença de acetogeninas nos extratos das folhas de *Rollinia mucosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, S.; Pisano, P. L.; Silva, F. B.; Scarminio, I. S.; Olivieri, A. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015b**, 26, 2241.

Arnason, J. T.; Mata, R.; Romeo, J. T.; *Phytochemistry of Medicinal Plants*, New York: Springer, **1995**.

Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 4^a ed., Porto Alegre: Bookman, **2010**.

Coelho, G. C.; Rachwal, M. F. G.; Dedecek, R. A.; Curcio, G. R.; Nietsche, K; Schenkel, E. P.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, 35, 75.

Dias, J.; Pimenta, J. A.; Medri, M. E.; Boeger, M. R. T.; Freitas, C. T. de; *Braz. Arch. Biol. Techn.* **2007**, 50, 91.

Figueiredo, S. F. L.; Viana, V. R. C.; Simões, C.; Albarello, N.; Trugo, L. C.; Kaplan, M. A. C.; Krul, W. R.; *Plant. Cell. Tiss. Org.* **1999**, *56*, 121.

Gad, H. A.; El-Ahmady, S. H.; Abou-Shoer, M. I.; Al-Azizi, M. M.; *Phytochem. Analysis.* **2013**, *24*, 1.

Gobbo-Neto, L. G.; Lopes, N. P.; *Quim. Nova.* **2007**, *30*, 374.

Gu, Z-M.; Zhou, D.; Lewis, N. J.; Wu, J.; Shi, G.; McLaughlin, J. L.; *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1911.

Hussain, A. I.; Anwar, F.; Nigam, P. S.; Ashraf, M.; Gilani, A. H.; *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1827.

Kuo, R-Y.; Chang, F-R.; Chen, C-Y.; Teng, C-M.; Yen, H-F.; Wu, Y-C.; *Phytochemistry.* **2001**, *57*, 421.

March, R. H.; Clark, L. G.; *Telopea.* **2011**, *13*, 93.

McCain, D. C.; Croxdale, J.; Markley, J. L.; *Plant Physiol.* **1988**, *86*, 16.

Nobel, P. S.; *Plant Physiol.* **1976**, *58*, 218.

Pettit, G. R.; Cragg, G. M.; Polonsky, J.; Herald, D. L.; Goswami, A.; Smith, C. R.; Moretti, C.; Schmidt, J. M.; Weisleder, D.; *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 1433.

Ramalho, J. C.; Marques, N. C.; Semedo, J. N.; Matos, M. C.; Quartin, V. L.; *Plant Biol.* **2002**, *4*, 112.

Rupprecht, J. K.; Hui, Y-H.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 237.

Souza, E. B. R. de; Silva, R. R. da; Afonso, S.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 4176.

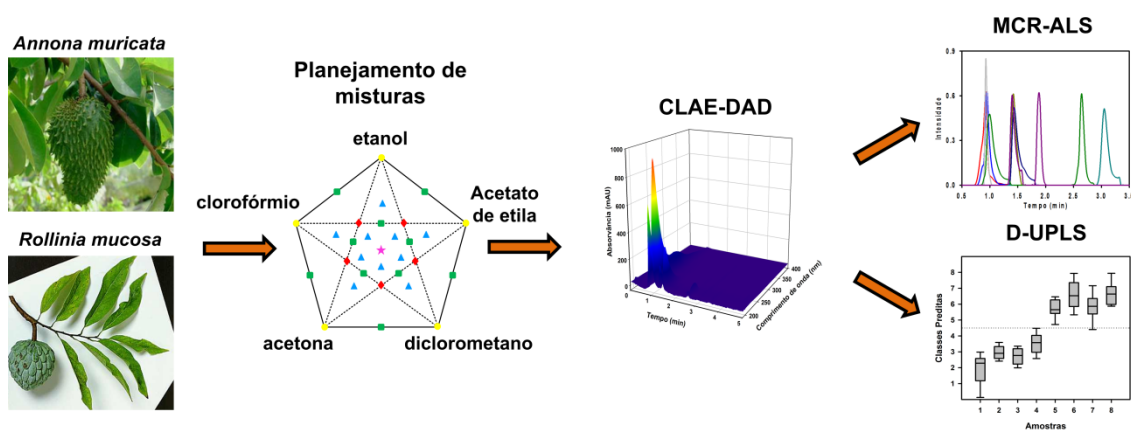
Terashima, I.; Miyazawa, S-I.; Hanba, Y. T.; *J. Plant Res.* **2001**, *114*, 93.

Terashima, I.; Hanba, Y. T.; Tazoe, Y.; Vyas, P.; Yano, S.; *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 343.

Zhang, W. J.; Björn, L. O.; *Fitoterapia.* **2009**, *80*, 207.

Capítulo V

Discriminação dos extratos de *Annona muricata* e *Rollinia mucosa* por resolução multivariada de curvas e regressão por mínimos quadrados parciais dos dados de cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos



<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150210>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 26, No. 11, 2241-2248, 2015.
Printed in Brazil - ©2015 Sociedade Brasileira de Química
0103 - 5053 \$6.00+0.00

Article

Discrimination of *Annona muricata* and *Rollinia mucosa* Extracts by Using Multivariate Curve Resolution and Partial Least-Squares Regression of Liquid Chromatography-Diode Array Data

Sabrina Afonso,^a Pablo L. Pisano,^b Fabiano B. Silva,^a Ieda S. Scaminio*^a and Alejandro C. Olivieri*^b

Resumo

Espécies da família Annonaceae são utilizadas na medicina tradicional e várias acetogeninas antitumorais foram isoladas das folhas de *Annona muricata* e *Rollinia mucosa*. Amostras de folhas (autossombreadas e expostas ao sol) destas espécies foram coletadas durante o inverno e o verão. Os extratos foram preparados a partir de misturas de cinco solventes de acordo com um planejamento centroide simplex. Os extratos das plantas foram analisados num cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) e processados por resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS) e modo discriminante no desdobramento da regressão por mínimos quadrados parciais (D-UPLS). O objetivo foi verificar se a resolução quimiométrica dos perfis cromatográficos poderia ajudar na discriminação de amostras de acordo com a classificação taxonômica, exposição ao sol e/ou época de colheita. Os resultados indicaram que os extratos contendo etanol como solvente principal apresentaram discriminação de plantas autossombreadas das plantas expostas ao sol e a época da colheita da *Annona muricata*. Além disso, a análise por D-UPLS permitiu a discriminação taxonômica entre os extratos de *Annona muricata* e *Rollinia mucosa*.

Palavras-chave: *Annona muricata*, *Rollinia mucosa*, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, resolução multivariada de curvas, regressão por mínimos quadrados parciais.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas como medicamento por centenas de anos em todo o mundo. No entanto, elas não foram reconhecidas oficialmente devido à falta de metodologia de pesquisa para avaliação dessas plantas e suas preparações (Gad *et al.*, 2013). As plantas tem recebido atenção especial na área da farmacologia devido às propriedades farmacológicas de seus metabólitos ativos. Porém, ainda existem inúmeras espécies de plantas que não foram identificadas e suas propriedades medicinais são desconhecidas (Moghadamtousi *et al.*, 2014).

A Annonaceae é uma família de árvores tropicais e subtropicais, compreendendo mais de 2000 espécies. Muitas espécies desta família são utilizadas na medicina tradicional (Rupprecht *et al.*, 1990), devido à presença das acetogeninas de anonácea, um grupo de compostos derivados de ácidos graxos de cadeia longa com propriedades antitumorais, encontrada exclusivamente na família Annonaceae (Alali *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 1999). *Annona muricata* e *Rollinia mucosa* são espécies importantes pertencentes à família Annonaceae. Estas duas espécies são amplamente encontradas em várias regiões do Brasil. *Annona muricata* é uma pequena árvore cultivada ao longo dos países tropicais e é conhecida popularmente como graviola (Moghadamtousi *et al.*, 2014). Suas folhas, raízes, frutos e sementes têm sido usados na medicina natural (Souza *et al.*, 2009) pelo seu efeito antioxidante e pelo tratamento de diabetes (Florence *et al.*, 2014) e câncer (Astirin *et al.*, 2013). Ciclohexapeptídeo e acetogeninas foram os principais compostos fitoquímicos descritos na literatura, a partir desta planta medicinal (Gajalakshmi *et al.*, 2012). *Rollinia mucosa* também é uma árvore tropical indígena originária das Antilhas e América Central. Folhas, caules e raízes desta espécie, ou espécies estreitamente relacionadas, têm sido utilizados para o tratamento médico

tradicional de tumores na Índia Ocidental e na Indonésia (Shi *et al.*, 1997). Assim como na *Annona muricata*, muitas acetogeninas têm sido isoladas a partir das folhas de *Rollinia mucosa* (Chen *et al.*, 1996). Além disso, em muitos estudos descritos na literatura, alcalóides aporfínicos foram isolados desta planta (Kuo *et al.*, 2001). A diversidade estrutural das acetogeninas e seletividade das ações biológicas, contra células tumorais, tem estimulado a pesquisa por novos compostos dessa classe de substâncias bioativas (Gu *et al.*, 1997). Sua estrutura básica tem geralmente o anel tetrahydrofurano (THF) e um terminal γ -lactona (Shi *et al.*, 1996).

Como não existe um método padrão para diferenciar extratos de plantas é necessário desenvolver um método de impressão digital para discriminação taxonômica, autenticidade ou classificação de diferentes plantas medicinais. A técnica mais utilizada para este fim é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a diferentes detectores como o arranjo de diodos (DAD) e/ou espectrometria de massas (EM) (Qin *et al.*, 2009; Gad *et al.*, 2013). No entanto, a complexidade dos resultados analíticos obtidos por CLAE na análise de plantas medicinais têm sido um obstáculo (Garza-Juárez *et al.*, 2011). Portanto, a combinação de técnicas instrumentais com análise quimiométrica multivariada pode ajudar a solucionar este problema revelando padrões latentes nos dados, o que pode permitir a discriminação das amostras (Soares e Scarminio, 2008; Cheng *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Seifi *et al.*, 2014). Em muitos trabalhos o conjunto de dados das amostras analisadas consistiu em um vetor com a informação relevante que é organizada em uma matriz das amostras a serem processadas com ferramentas quimiométricas (dados de primeira ordem). Técnicas espectroscópicas tais como ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho com transformada de Fourier, combinada à análise multivariada têm sido usadas com sucesso para resolver problemas como discriminação de espécies e formas

de cultivo de plantas, perfil de metabólitos e controle de qualidade de alimentos ou medicamentos (Zhao *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foi realizado um estudo dos extratos das folhas (autossombreadas e expostas ao sol) coletadas durante o inverno e verão das plantas *Annona muricata* e *Rollinia mucosa*. Os extratos foram injetados num sistema de CLAE-DAD e os conjuntos de dados obtidos (dados de segunda ordem, isto é, uma matriz de tempos de eluição vs perfis espectrais UV-visível para cada amostra) foram processados por dois diferentes algoritmos quimiométricos: resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternantes (MCR-ALS, do inglês *multivariate curve resolution alternating least squares*) (Tauler, 1995) e desdobramento na regressão por mínimos quadrados parciais (UPLS, do inglês *unfolded partial least squares*) (Wold *et al.*, 1987) empregado no seu modo discriminante (D-UPLS) (Arancibia *et al.*, 2008). Os objetivos foram a resolução quimiométrica de perfis das acetogeninas nos modos representados por tempo de eluição e perfis espectrais, e a utilização destas informações na discriminação de amostras de acordo com a classificação taxonômica, exposição ao sol ou época de colheita.

EXPERIMENTAL

Material Vegetal

As folhas foram coletadas durante o inverno (julho de 2011) e verão (janeiro 2012) de acordo com as condições de luminosidade solar (folhas autossombreadas e expostas ao sol) no campus da Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, Paraná, Brasil. A excisata da *Annona muricata* de folhas autossombreadas (49.284), *Annona muricata* de folhas expostas ao sol (49.285), *Rollinia mucosa* de folhas

expostas ao sol (49.286) e *Rollinia mucosa* de folhas autossombreadas (49.287) foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Londrina. A secagem das folhas foi feita em 25°C por nove dias e as amostras foram estocadas em local com temperatura e umidade controlada.

Reagentes

Os solventes de grau analítico etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio foram adquiridos da FMaia. As misturas para a fase móvel foram feitas usando água ultrapura preparada com sistema de purificação Millipore Plus Milli-Q e os solventes acetonitrila e metanol grau CLAE foram adquiridos da LiChrosolv.

Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados usando mistura de cinco solventes: (e) etanol, (a) acetato de etila, (d) diclorometano, (A) acetona, e (c) clorofórmio, e as suas proporções variam de acordo com um planejamento experimental centroide simplex (Barros Neto *et al.*, 2010). Foram preparados 31 diferentes extratos sendo o ponto central realizado em triplicata. Cada extrato foi preparado pesando 2,0 g de folhas secas e adicionado 15,0 mL de solvente extrator de acordo com a Tabela 1. Estas misturas foram deixadas em banho de ultrassom (Unique, modelo Ultracleaner 1400) por 60 minutos. Os extratos foram filtrados com papel de filtro para separar a solução das folhas. Este procedimento foi repetido por mais 14 vezes, e o volume total de solvente extrator adicionado às folhas foi 225,0 mL. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório (Fisaton 801) removendo todo o solvente que estivesse presente na amostra, até atingir peso constante (Souza *et al.*, 2009).

Tabela 1. Proporção dos solventes e suas misturas usadas na extração de acordo com o planejamento experimental centroide simplex.

| | Amostras | Solvente Extrator | | | | |
|----|----------------------|-------------------|------------------|---------------|---------|-------------|
| | | etanol | acetato de etila | diclorometano | acetona | clorofórmio |
| 1 | etanol (e) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | acetato de etila (a) | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | diclorometano (d) | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 4 | acetona (A) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 5 | clorofórmio (c) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | e:a | 1/2 | 1/2 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | e:d | 1/2 | 0 | 1/2 | 0 | 0 |
| 8 | e:A | 1/2 | 0 | 0 | 1/2 | 0 |
| 9 | e:c | 1/2 | 0 | 0 | 0 | 1/2 |
| 10 | a:d | 0 | 1/2 | 1/2 | 0 | 0 |
| 11 | a:A | 0 | 1/2 | 0 | 1/2 | 0 |
| 12 | a:c | 0 | 1/2 | 0 | 0 | 1/2 |
| 13 | d:A | 0 | 0 | 1/2 | 1/2 | 0 |
| 14 | A:c | 0 | 0 | 0 | 1/2 | 1/2 |
| 15 | d:c | 0 | 0 | 1/2 | 0 | 1/2 |
| 16 | e:a:d | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 0 | 0 |
| 17 | e:A:c | 1/3 | 0 | 0 | 1/3 | 1/3 |
| 18 | e:a:c | 1/3 | 1/3 | 0 | 0 | 1/3 |
| 19 | e:d:c | 1/3 | 0 | 1/3 | 0 | 1/3 |
| 20 | e:a:A | 1/3 | 1/3 | 0 | 1/3 | 0 |
| 21 | d:A:c | 0 | 0 | 1/3 | 1/3 | 1/3 |
| 22 | a:A:c | 0 | 1/3 | 0 | 1/3 | 1/3 |
| 23 | a:d:c | 0 | 1/3 | 1/3 | 0 | 1/3 |
| 24 | a:d:A | 0 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 0 |
| 25 | e:d:A | 1/3 | 0 | 1/3 | 1/3 | 0 |
| 26 | e:a:d:A | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 0 |
| 27 | a:d:A:c | 0 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| 28 | e:d:A:c | 1/4 | 0 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| 29 | e:a:A:c | 1/4 | 1/4 | 0 | 1/4 | 1/4 |
| 30 | e:a:d:c | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 0 | 1/4 |
| 31 | e:a:d:A:c | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 |

Preparo das amostras

Cada amostra foi preparada pesando-se 3,00 mg do extrato bruto e dissolvendo em 1,00 mL de metanol. 20,0 μ L de cada extrato foi adicionado a 10,0 mL da fase móvel (35% de metanol, 35% de acetonitrila e 30% de água). Em seguida, as amostras

foram filtradas em filtro de 0,20 μm CHROMAFIL[®] XTRA PTFE-20/25 e analisadas imediatamente.

Análises por CLAE-DAD

A separação foi feita em uma coluna cromatográfica Kinetex C18 2.6 μm com dimensões de 100 mm x 4,6 mm (Phenomenex). O tempo de eluição foi de 15 minutos, vazão da fase móvel de 1,00 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20,0 μL . A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de diodos (DAD) da Thermo-Electron Corporation. A eluição foi isocrática em fase reversa monitorada de 190 a 800 nm e os dados processados usando o programa ChromQuest 4.2.

Análise dos dados multivariados

Os dados cromatográficos foram processados por MCR-ALS e D-UPLS e aplicados usando MVC2 (do inglês, *multivariate calibration 2*) escritos para MATLAB (versão 7.0) (Olivieri e Escandar, 2014). Análise das componentes principais (ACP) também foi aplicada usando o programa MATLAB. Para realizar o estudo, em tempos computacionais aceitáveis, foi necessário reduzir os dados obtidos por CLAE-DAD. Cada amostra submetida à análise gerou uma matriz de dados de 200 x 106 pontos (tempos de eluição de 0 a 5 minutos medidos a cada 6 segundos, e os espectros UV de 190 a 400 nm medidos em intervalos de 2 nm, respectivamente).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resolução multivariada de curvas por mínimos quadrados alternantes

Os dados obtidos por CLAE-DAD do extrato com etanol das folhas autossombreadas e coletadas no inverno da *Annona muricata* esta mostrado na Figura 1 na forma de uma superfície tri-dimensional. Como pode ser visto, a identificação de um composto em particular (por exemplo, acetogeninas) por inspeção visual deste tipo de conjuntos de dados exigiria muito tempo e seria ineficiente. Portanto, a seleção adequada de algoritmos de processamento de dados pôde permitir a extração de padrões para resolver perfis dos componentes em termos dos seus cromatogramas e espectros de UV-Visível. A informação obtida por UV-Visível pode auxiliar na identificação de acetogeninas, que têm absorção espectral conhecida com bandas na faixa de 200-230 nm (Rupprecht *et al.*, 1990).

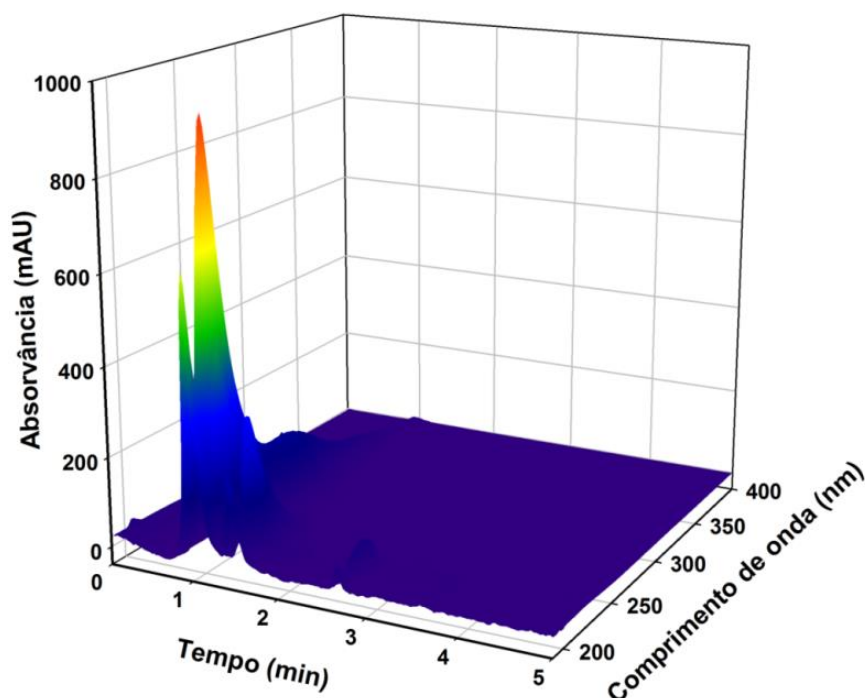


Figura 1. Superfície tri-dimensional dos dados obtidos por CLAE-DAD (0-5 min e 190-400 nm) do extrato com etanol das folhas autossombreadas e coletadas no inverno da *Annona muricata*.

A resolução multivariada de curvas refere-se a um conjunto de métodos que se propõe a recuperar perfis de resposta (perfis espectrais UV-Visível, perfis de eluição, etc.) dos constituintes químicos não resolvidos de uma mistura. Para processar os dados de segunda ordem obtidos por CLAE-DAD para um grupo de amostras, o MCR-ALS foi aplicado, o que gerou uma matriz de dados aumentada, colocando todas as matrizes de amostras individuais adjacentes umas as outras, no sentido de aumentar as colunas ou as linhas das matrizes. Isto permite que um modelo, por meio de restrições adequadas que dão significado físico para as soluções obtidas, resolva os perfis de cada um dos componentes nas várias amostras.

Várias abordagens foram testadas no processamento dos dados obtidos pelos diferentes meios de extração do planejamento centroide-simplex. Primeiramente foram estudados os dados gerados de cada extrato das plantas, aplicando o MCR-ALS com a intenção de discriminar simultaneamente as amostras extraídas de acordo com a classificação taxonômica (*Annona muricata* (A) ou *Rollinia mucosa* (R)), tempo de colheita (inverno (I) ou verão (V)), e também condições de luminosidade solar (autossombreada (Sb) ou exposição solar (Sol)). Portanto, oito classes foram consideradas: 1 (ASbI), 2 (ASbV), 3 (ASolI), 4 (ASolV), 5 (RSbI), 6 (RSbV), 7 (RSolI) e 8 (RSolV). Porém, a ACP dos dados processados por MCR-ALS dos extratos da *Rollinia mucosa* não permitiram uma classificação satisfatória como para a *Annona muricata*.

As amostras foram divididas em cinco categorias, de acordo com a presença de um determinado solvente em cada extrato. Isso significa que todas as amostras de extrato com etanol pertenciam ao mesmo grupo e com os outros solventes foi realizado um processo análogo. O objetivo desta divisão foi explorar a diversidade da composição dos metabólitos extraídos de um solvente particular que estivesse sempre presente em

cada extrato. Posteriormente, o MCR-ALS foi aplicado aos dados de CLAE-DAD de três diferentes amostras de plantas: *Annona muricata* autossombreadas coletadas no verão (ASbV), *Annona muricata* expostas ao sol coletadas no inverno (ASoII) e *Annona muricata* expostas ao sol coletadas no verão (ASoIV).

Para organizar as matrizes de dados, cada amostra de planta (ASbV, ASoII ou ASoIV) foi dividida de acordo com o solvente, de tal maneira que 16 misturas experimentalmente obtidas continha um solvente em comum. Os dados foram dispostos de forma que o modo aumentado da matriz ocorresse na direção das colunas, ou seja, uma matriz de dados foi colocada ao lado uma das outras para dividirem o subespaço espectral para criar o chamado matriz de dados aumentada para ser submetido à decomposição por MCR-ALS. Assim, cada amostra foi composta de uma matriz de 16 misturas de solventes, e a matriz de dados aumentada de 48 matrizes de amostras (3 amostras de plantas \times 16 misturas de solventes) combinando as matrizes das três amostras de plantas. Subsequentemente, a análise de MCR-ALS foi aplicada na matriz aumentada (uma matriz de 200×5088 pontos de dados, correspondendo a 48 amostras, cada uma com 106 pontos de dados). O número de componentes foi estimado pela análise das componentes principais (ACP) da matriz aumentada, inspecionando os valores individuais como uma função do aumento da quantidade de componentes verificadas (Jolliffe, 2002). Desse modo, o MCR-ALS foi testado selecionando 8, 9 e 10 componentes. No entanto, quantidades menores de componentes levaram a resultados insatisfatórios em relação ao objetivo de classificar as amostras. Assim, 10 componentes foram selecionados, que explica entre 99,1 e 99,4% da variância dos dados, de acordo com as cinco categorias de solventes.

A fim de obter uma resolução bem-sucedida, as seguintes restrições foram aplicadas no ajuste por mínimos quadrados: não negatividade (tanto nos espectros

quanto nos cromatogramas) e unimodalidade (ou seja, um único máximo apenas nos cromatogramas sucessivas vezes até o ajuste residual atingir valor menor do que 0,1%). Em adição, para a resolução dos perfis espectrais e cromatográficos, a aplicação do MCR-ALS nos dados do CLAE-DAD mostra a área sob a resolução do perfil cromatográfico para cada componente em uma amostra particular, isto é, chamado escores do MCR-ALS. Esta resolução foi obtida com bons parâmetros, ou seja, o ajuste do erro de 0,8% e 6,9% (em relação à ACP e dados experimentais, respectivamente) e 99,5% da variância explicada.

A Figura 2 mostra os cromatogramas das 10 componentes resolvidas pela análise do MCR-ALS do planejamento experimental de misturas que contêm (a) etanol, (c) acetona, e (d) clorofórmio. Pode-se observar que os componentes semelhantes foram resolvidos quando etanol e acetona estavam presentes nas misturas, enquanto dois diferentes componentes (em 1,9 e 3,1 min) foram resolvidos nas amostras dos extratos com clorofórmio. Embora a concentração dos perfis resolvidos por MCR-ALS foram bastante similares (Figura 2a, 2c, 2d), os espectros recuperados a partir destes compostos apresentam pequenas diferenças. Além disso, a figura 2b mostra o perfil espectral para uma determinada amostra (representativo das restantes). Na figura 2b, pode-se observar que os 10 cromatogramas determinados têm bandas de absorção no intervalo de 200-230 nm, característicos de acetogeninas, confirmando que os componentes resolvidos por MCR-ALS pertencem a esta família de compostos.

As informações de impressão digital obtida pela resolução MCR-ALS foi organizado em uma matriz de 48×10 (48 amostras e 10 componentes). Esta matriz foi submetida à ACP para fins de discriminação, com o propósito de estudar a relação entre o MCR-ALS e as informações de impressão digital das acetogeninas, com as diferentes condições de exposição solar e as estações do ano das amostras de *Annona muricata*.

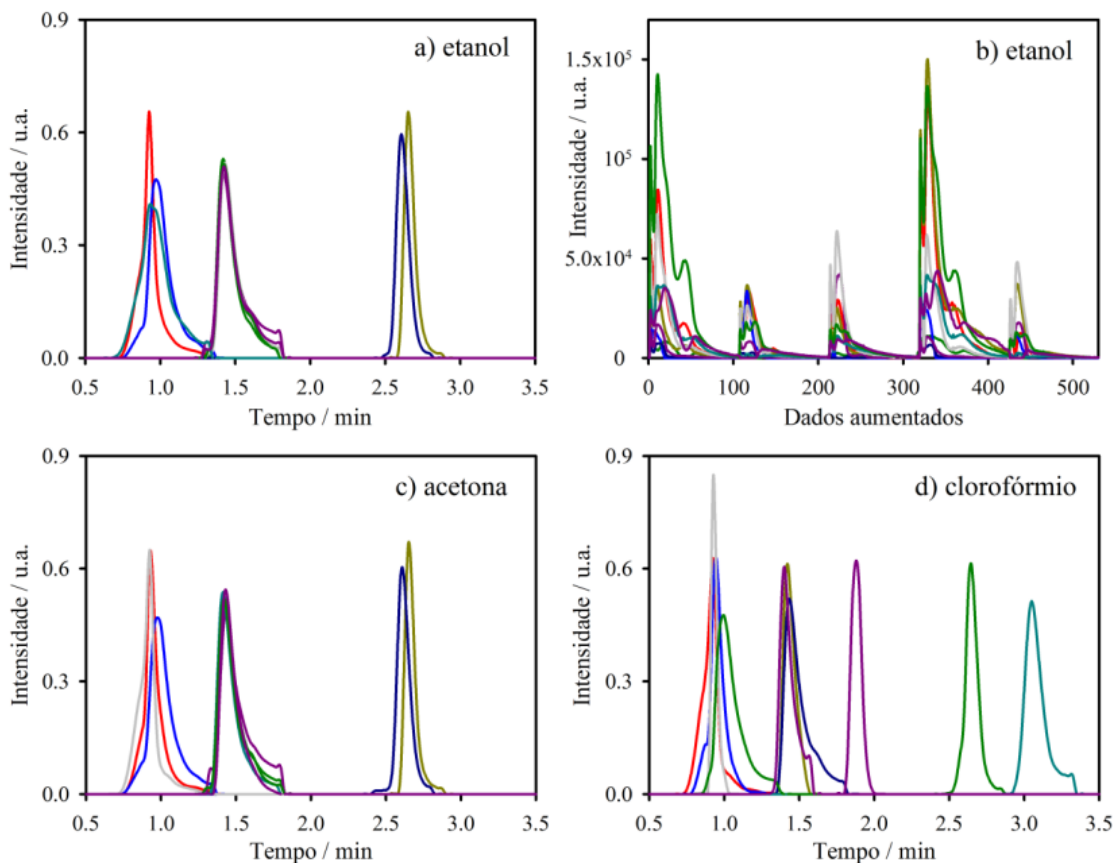


Figura 2. Perfil do tempo de eluição para os 10 constituintes determinados por MCR-ALS para: **(a)** amostras extraídas com misturas de solventes contendo etanol, **(c)** amostras extraídas com misturas de solventes contendo acetona, e **(d)** amostras extraídas com misturas de solventes contendo clorofórmio. Em **(b)**, perfil espectral no modo aumentado (5 amostras dos espectros recuperados da *Annona muricata* coletada no inverno em condições autossombreadas) para misturas de solventes contendo etanol.

A Figura 3a mostra o gráfico dos escores da primeira *versus* a segunda componente principal (57,58% e 24,46% da variância explicada por CP1 e CP2, respectivamente) das amostras contendo etanol na mistura do solvente extrator. Nesta figura, observa-se a discriminação entre as amostras de *Annona muricata* em condições autossombreadas (ASbV) e expostas ao sol (ASolV) coletadas durante o verão. Além disso, ambas as amostras foram discriminadas das amostras coletadas no inverno (ASolI). Por outro lado, a Figura 3b mostra um gráfico da CP1 (44,66%) \times CP3

(13,84%) das amostras extraídas com misturas de solventes contendo acetona, no qual a discriminação parcial é detectada entre as amostras coletadas no verão (ASbV e ASolV) das amostras coletadas no inverno (ASolI). Finalmente, a Figura 3c mostra o gráfico dos escores da CP1 (49,76%) × CP2 (24,78%) das amostras contendo clorofórmio na mistura do solvente extrator, porém a discriminação entre as amostras ASbV, ASolV e ASolI é menos notável neste caso. Deve-se ressaltar ainda que as amostras de *Annona muricata* em condições autossombreadas coletadas durante o verão (ASbV) aparecem muito mais condensadas (ou seja, têm relativamente maior similaridade nos escores das CP) para o etanol (Figura 3a), a acetona (Figura 3b) e o clorofórmio (Figura 3c), que as amostras ASolV e ASolI

A informação de impressão digital obtida pela resolução MCR-ALS (matriz de 48 amostras × 10 componentes) foi submetido à ACP para fins de discriminação. As contribuições, ou seja, os loadings, de cada componente principal dos dez constituintes resolvidos por MCR-ALS revelam que os compostos foram decisivos para a discriminação das amostras por condições de luminosidade solar e época da colheita. A Figura 4 mostra os loadings das componentes principais que foram usadas para a discriminação (CP1 e CP2 para o etanol e suas misturas, CP1 e CP3 para a acetona e as suas misturas, e CP1 e CP2 para o clorofórmio e suas misturas). Como pode ser observado, independentemente do sinal (ou seja, em valor absoluto), os constituintes 4 e 1 apresentaram as maiores contribuições para a CP1 e CP2, respectivamente, para as amostras extraídas com etanol e suas misturas; constituintes 4 e 7 apresentaram as maiores contribuições para a CP1 e CP3, respectivamente, para as amostras extraídas com acetona e suas misturas; e constituintes 9 e 1 mostram as maiores contribuições para a CP1 e CP2, respectivamente, para as amostras extraídas com clorofórmio e suas misturas.

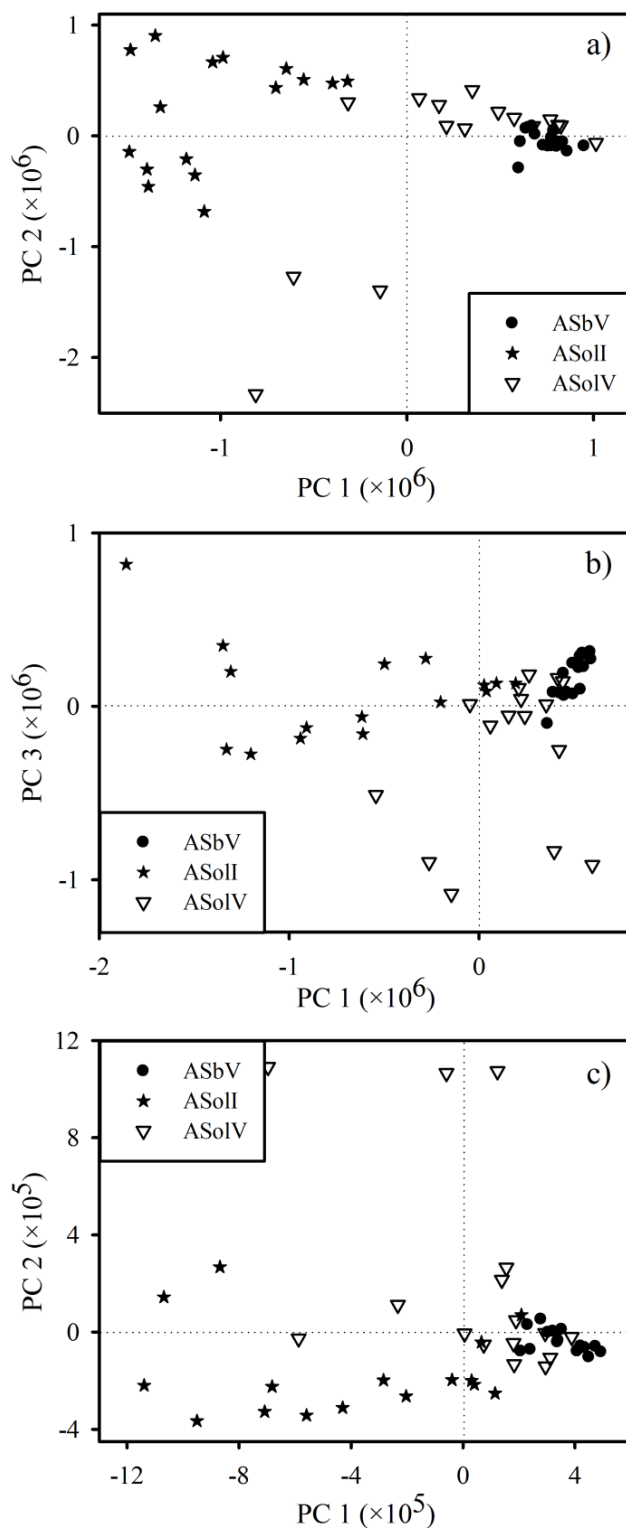


Figura 3. Discriminação das amostras de *Annona muricata* (A) em condições autossombreadas (Sb) e expostas ao sol (Sol) e coletadas durante o inverno (I) e verão (V) através da ACP dos escores do MCR-ALS. **(a)** amostras extraídas com etanol puro e suas misturas. **(b)** amostras extraídas com acetona pura e suas misturas. **(c)** amostras extraídas com clorofórmio puro e suas misturas.

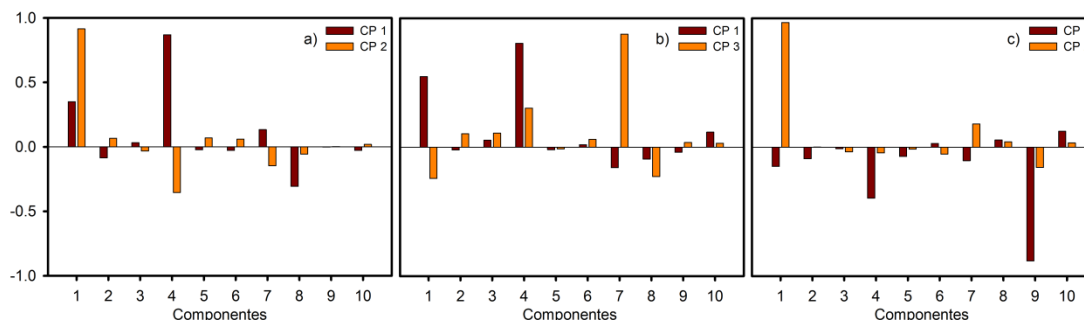


Figura 4. Loadings das componentes principais, em função dos dez componentes resolvidos por MCR-ALS. **(a)** amostras extraídas com etanol e as suas misturas; **(b)** amostras extraídas com acetona e suas misturas; e **(c)** amostras extraídas com clorofórmio e suas misturas.

A Figura 5 mostra os espectros resolvidos dos constituintes relevantes, em que todos os constituintes apresentam espectros com bandas de absorção na região de 200-230nm (atribuída as acetogeninas). Isso significa que diferentes acetogeninas foram responsáveis por discriminar os extratos em condições de luminosidade solar e época da coleta. Em resumo, a resolução MCR-ALS dos dados do CLAE-DAD e processamento posterior com ACP permite a discriminação de amostras de *Annona muricata* com as diferentes condições de exposição solar e épocas de coleta, separadas por solventes. Extratos com etanol e suas misturas (Figura 3a) mostraram a melhor separação para as amostras de *Annona muricata*. Este último resultado, sem dúvida, deve estar ligado aos melhores rendimentos de extrações obtidos utilizando misturas de etanol.

Como mencionado anteriormente, a ACP dos escores do MCR-ALS obtidos das amostras de *Rollinia mucosa* não mostrou discriminação em termos de exposição solar ou época da coleta. Esse fato indica que ambas as espécies da mesma família de planta, mesmo quando são conhecidas por conterem substâncias ativas semelhantes, apresentam rendimentos de extração de compostos diferentes mediante ao solvente. Esta diferença não contribuiu para a obtenção de classificação dos extratos das plantas,

portanto, por uma questão de brevidade, os resultados da aplicação do MCR-ALS dos dados das amostras de *Rollinia mucosa* não foram mostrados.

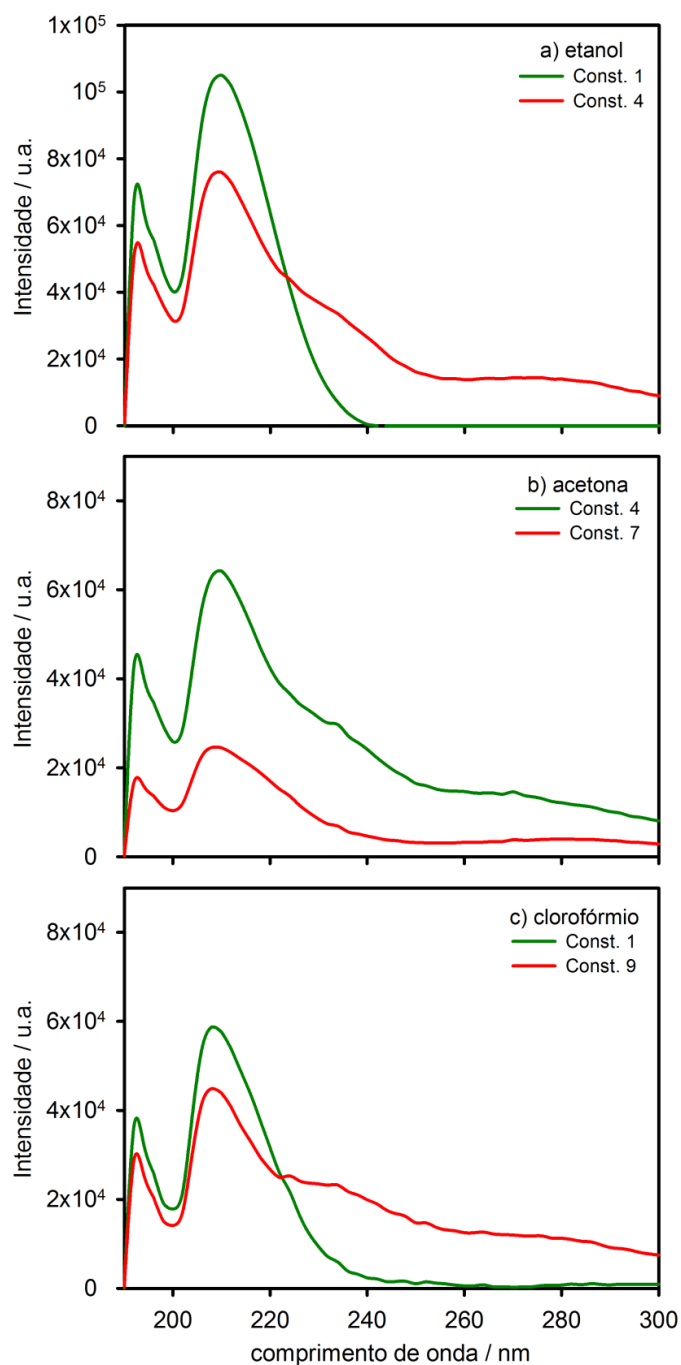


Figura 5. Espectros UV-Vis dos dois componentes relevantes resolvidos por MCR-ALS para cada solvente e suas misturas. **(a)** etanol e suas misturas (componentes 1 e 4); **(b)** acetona e suas misturas (componentes 4 e 7); e **(c)** clorofórmio e suas misturas (componentes 1 e 9).

Modo discriminante no desdobramento da regressão por mínimos quadrados parciais

Mínimos quadrados parciais é um método de regressão que tem provado ser um método muito versátil para a análise multivariada de dados (Escandar *et al.*, 2007). O modo discriminante da regressão por mínimos quadrados parciais (D-PLS) é uma variante do PLS no qual as variáveis previstas são códigos ou valores categóricos, permitindo a separação de amostras em diferentes classes. No caso de dados de segunda ordem tais como os dados de CLAE-DAD presentemente estudados, o PLS pode ser aplicado depois de desdobrar as matrizes, ordenando todos os perfis de tempo de eluição em um único vetor de coluna. Isto dá origem ao modelo UPLS, que significa PLS desdobrado (do inglês “*unfolded*”).

O modelo de classificação foi projetado com a intenção de discriminar amostras de extrato de acordo com a classificação taxonômica (*Annona muricata* (A) ou *Rollinia mucosa* (R)), condições de exposição solar (autossombreadas (Sb) ou expostas ao sol (Sol)) e época da coleta (inverno (I) ou verão (V)). Em suma, oito classes foram consideradas: 1 (ASbI), 2 (ASbV), 3 (ASolI), 4 (ASolV), 5 (RSbI), 6 (RSbV), 7 (RSolI) e 8 (RSolV). A Figura 6 mostra os resultados da análise por D-UPLS para as classes previamente descritas. Como pode observar, embora não haja uma boa discriminação em relação à época da coleta ou as condições de exposição solar, uma separação perfeita entre os extratos de *Annona muricata* e *Rollinia mucosa* (classificação taxonômica) foi alcançado com a aplicação deste modelo.

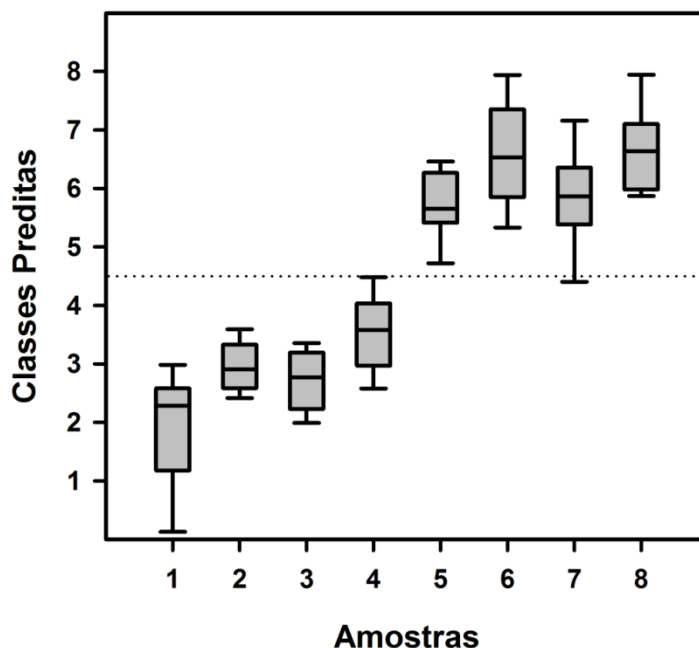


Figure 6. Discriminação entre amostras de *Annona muricata* (A) e *Rollinia mucosa* (R) em condições autossombreadas (Sb) e expostas ao sol (Sol) e coletadas durante o inverno (I) e verão (V) por meio da análise por D-UPLS. Sendo: **1** (ASbI), **2** (ASbV), **3** (ASoII), **4** (ASoIV), **5** (RSbI), **6** (RSbV), **7** (RSoII) e **8** (RSoIV).

CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados indicam que a extração com etanol, acetona ou clorofórmio e suas misturas como solvente extrator, discriminaram amostras autossombreadas das expostas ao sol e a época em que a planta é coletada da *Annona muricata* (ASbV, ASoIV e ASoII). Mostraram ainda que os extratos contendo etanol são os melhores discriminadores dessas amostras. Curiosamente, os maiores rendimentos dos extratos das folhas de *Annona muricata* foram obtidos quando se utiliza o etanol como solvente. Isto sugere fortemente que os rendimentos mais elevados de extratos com etanol estão associados à obtenção de mais metabólitos das plantas. Eles podem ser responsáveis pelo sucesso da classificação obtida, quando os dados de CLAE-DAD dos

extratos que contêm etanol como solvente foram usados para análise por MCR-ALS. Examinando a contribuição dos constituintes resolvidos por MCR-ALS em cada componente principal, essa indica que diferentes acetogeninas foram responsáveis pela discriminação das amostras, pelas condições de luminosidade solar e época da coleta. Por fim, a análise por D-UPLS permite a discriminação taxonômica entre os extratos das folhas de *Annona muricata* e *Rollinia mucosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alali, F. Q.; Liu, X. X.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 504.

Arancibia, J. A.; Boschetti, C. E.; Olivieri, A. C.; Escandar, G. M.; *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2789.

Astirin, O. P.; Artanti, A. N.; Fitria, M. S.; Perwitasari, E. A.; Prayitno, A.; *J. Cancer Ther.* **2013**, *4*, 1244.

Chen, Y-Y.; Chang, F-R.; Yen, H-F.; Wu, Y-C.; *Phytochem.* **1996**, *42*, 1081.

Cheng, X-M.; Zhao, T.; Yang, T.; Wang, C-H.; Annie Bligh, S. W.; Wang, Z-T.; *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 279.

Escandar, G. M.; Faber, N. K. M.; Goicoechea, H. C.; Muñoz de la Peña, A.; Olivieri, A. C.; Poppi, R. J.; *Trend. Anal. Chem.* **2007**, *26*, 752.

Florence, N. T.; Benoit, M. Z.; Jonas, K.; Alexandra, T.; Désiré, D. D. P.; Pierre, K.; Théophile, D.; *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *151*, 784.

Gad, H. A.; El-Ahmady, S. H.; Abou-Shoer, M. I.; Al-Azizi, M. M.; *Phytochem. Analysis.* **2013**, *24*, 1.

Gajalakshmi, S.; Vijayalakshmi, S.; Rajeswari, V. D.; *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *4*, 3.

Garza-Juárez, A.; Salazar-Cavazos, M. de la L.; Salazar-Aranda, R.; Pérez-Meseguer, J.; Torres, N. W. de; *Planta Med.* **2011**, *77*, 958.

Gu, Z-M.; Zhou, D.; Lewis, N. J.; Wu, J.; Shi, G.; McLaughlin, J. L.; *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1911.

Gu, Z-M.; Zhou, D.; Lewis, N. J.; Wu, J.; Johnson, H. A.; McLaughlin, J. L.; Gordon, J.; *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 32.

Jolliffe, I. T.; *Principal component analysis*, 2nd ed., New York: Springer, **2002**.

Kuo, R-Y.; Chang, F-R.; Chen, C-Y.; Teng, C-M.; Yen, H-F.; Wu, Y-C.; *Phytochemistry*. **2001**, *57*, 421.

Moghadamtousi, S. Z.; Karimian, H.; Rouhollahi, E.; Paydar, M.; Fadaeinasab, M.; Kadir, H. A.; *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *156*, 277.

Olivieri, A. C.; Escandar, G. M.; *Practical three-way calibration*, 1st ed., Amsterdam: Elsevier, **2014**.

Qin, X-M.; Dai, Y-T.; Zhang, L-Z.; Guo, X-Q.; Shao, H-X.; *Phytochem. Anal.* **2009**, *20*, 307.

Rupprecht, J. K.; Hui, Y-H.; McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 237.

Seifi, H.; Masoum, S.; Seifi, S.; Ebrahimabadi, E. H.; *Phytochem. Anal.* **2014**, *25*, 273.

Shi, G.; Kozlowski, J. F.; Schwedler, J. T.; Wood, K. V.; McDougal, J. M.; McLaughlin, J. L.; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7988.

Shi, G.; McDougal, J. M.; McLaughlin, J. L.; *Phytochem.* **1997**, *45*, 719.

Soares, P. K.; Scarminio, I. S.; *Phytochem. Analysis.* **2008**, *19*, 78.

Souza, E. B. R. de; Silva, R. R. da; Afonso, S.; Scarminio, I. S.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 4176.

Sun, S.; Chen, J.; Zhou, Q.; Lu, G.; Chan, K.; *Planta Med.* **2010**, *76*, 1987.

Tauler, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, *30*, 133.

Wang, L.; Wang, X.; Kong, L.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2012**, *40*, 138.

Wold, S.; Geladi, P.; Esbensen, K.; Öhman, J.; *J. Chemom.* **1987**, *1*, 41.

Zhao, J.; Avula, B.; Joshi, V. C.; Techen, N.; Wang, Y-H.; Smillie, T. J.; Khan, I. A.; *Planta Med.* **2011**, *77*, 851.

CONSIDERAÇÕES

FINAIS



CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a exposição solar das folhas interfere na quantidade e até mesmo na variedade de metabólitos produzidos nas plantas. As folhas coletadas em diferentes épocas produzem diferentes metabólitos, além de apresentarem variação na quantidade. O planejamento experimental mostrou ser um método eficaz na otimização de misturas de solventes para a extração de metabólitos de plantas, e os modelos estatísticos indicaram que o etanol, por apresentar valores altos para os três parâmetros solvatocrômicos, aumenta o rendimento dos extratos das plantas *Annona muricata* e *Rollinia mucosa*, pois isso faz com que ele consiga extrair uma maior variedade de compostos das plantas. Também indicaram que misturas de solventes diferentes extraem compostos químicos diferentes, de acordo com a interação que estes solventes têm com os compostos da planta.

Os cálculos teóricos da DFT foram usados para prever as intensidades das bandas de infravermelho da ligação de hidrogênio do anel THF com um grupo hidroxila nas estruturas das acetogeninas dos extratos das folhas de *Annona muricata*. Por meio das análises de infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, foi possível inferir a presença de acetogeninas que apresentam propriedades antitumorais, nos extratos das plantas da família Annonaceae.

Os dados cromatográficos de segunda ordem, resolvidos por métodos quimiométricos, como o MCR e PLS, mostraram diferenças entre as duas espécies, além de discriminar amostras de folhas expostas ao sol e autossombreadas e coletadas nas quatro estações climáticas. As técnicas espectroscópicas e cromatográficas, aliadas aos métodos quimiométricos, foram essenciais para a impressão digital metabolômica da *Annona muticata* e *Rollinia mucosa*.