



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

**Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química**

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE
NA ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS
FOLHAS DE *Annona Muricata* L. POR MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS**

Eloana Benassi Ribeiro de Souza

Dissertação de Mestrado em Química dos Recursos Naturais

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

**Londrina
Fevereiro de 2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Eloana Benassi Ribeiro de Souza

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE NA ANÁLISE
DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS DE *Annona Muricata*
L. POR MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

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

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

Londrina - 2009

PROGRAMA DE MESTRADO EM QUÍMICA DOS RECURSOS NATURAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

*ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE NA ANÁLISE
DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS DE *Annona Muricata* L.
POR MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS*

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (UNICAMP)

Prof^a. Dr^a Isabel Craveiro Moreira (UTFPR- Londrina)

Londrina, 06 de fevereiro de 2009

*“Sabemos que a alegria da vitória
Compensa qualquer sacrifício.
Somente pessoas corajosas, constantes e
Decididas chegam ao fim.”*

(Autor desconhecido)

*Aos meus pais, Italina e Antônio,
que são o meu alicerce e os responsáveis
por mais um sonho realizado.*

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus primeiramente pela minha vida que Ele me concedeu. Agradeço também pelos momentos difíceis e alegres, que me trouxeram os verdadeiros aprendizados. E pela força e perseverança que fez com que eu chegasse até aqui.
- À Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio pela amizade, dedicação, excelente orientação e ensinamentos transmitidos durante esse período.
- Aos professores do Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais pelos conhecimentos que contribuíram com minha formação profissional.
- Aos meus pais, Italina e Antônio, que são meus verdadeiros amigos e me apoiaram em todos os momentos de minha vida.
- À minha irmã Polliana, pela amizade, apoio e compreensão durante os dois anos de mestrado.
- Ao meu namorado Sandro, pelo carinho, apoio e muita compreensão durante o desenvolvimento da tese.
- Às minhas amigas Renata, Luciana, Claudinha, Elisângela, Sabrina, Raquel Justo, Renata Afonso e Fróes. Amigas e companheiras inesquecíveis.
- Às companheiras de apartamento Marli e Raquel Moreira pela paciência, compreensão e principalmente por me agüentar durante tantos anos.
- À todos os colegas de mestrado pelos momentos divertidos.
- Ao Departamento de Química pelo empréstimo do infravermelho.
- Ao laboratório LAPA pelo empréstimo do Cromatógrafo Líquido.
- E a todos que contribuíram com o meu crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	2
CAPÍTULO II	10
2. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	11
2.1 Modelagem de mistura	11
2.2 Análise exploratória de dados	16
2.3 Análise de componentes principais	18
2.4 Análise hierárquica	19
CAPÍTULO III	21
3. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL	22
3.1 Planta	23
3.2 Característica da planta	23
3.3 Coleta	24
3.4 Reagentes	24
3.5 Aparelhos e equipamentos	24
3.6 Programa computacional	25
3.7 Planejamento experimental	25
3.8 Preparo dos extratos brutos	30
3.9 Fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos	31

3.10	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos fracionados	33
3.11	Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier dos extratos fracionados	34
	CAPÍTULO IV	35
	4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
	CAPÍTULO V	76
	5. CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica das acetogeninas das Annonaceae	7
Figura 2 - Espaço experimental para processos com três fatores independentes inclui todos os pontos dentro do cubo. O espaço experimental para misturas de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo.	12
Figura 3 - Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).	17
Figura 4 - Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes.	18
Figura 5 - Procedimento experimental para a obtenção dos extratos brutos, fracionamento dos extratos, obtenção dos dados espectroscópicos e cromatográficos das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	22
Figura 6 - Exsicata da <i>Annona muricata</i> L. depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina.	23
Figura 7 - Triângulo de seletividade baseado nos dados solvatocrômicos da Tabela 2.	28
Figura 8 - Esquema do procedimento para o preparo dos extratos brutos para obter os rendimentos.	31
Figura 9 - Esquema geral do fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos.	32
Figura 10 - Resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial no estudo do rendimento do extrato bruto da <i>Annona muricata</i> L.	38
Figura 11 - Rendimentos previstos pelo modelo cúbico especial no estudo do rendimento do extrato bruto da <i>Annona muricata</i> L.	39
Figura 12 - Curvas de nível ajustadas ao rendimento do extrato bruto obtido no planejamento de misturas de cinco componentes.	39
Figura 13 - Gráfico do rendimento da fração neutra obtida pelo planejamento de misturas de cinco componentes (et: etanol; ae: acetato de etila; di: diclorometano; ac: acetona e cl: clorofórmio).	41
Figura 14 - Gráfico do rendimento da fração da fase orgânica obtido pelo planejamento de misturas de cinco componentes (et: etanol; ae: acetato de etila; di: diclorometano; ac: acetona e cl: clorofórmio).	43
Figura 15 - Gráfico do rendimento da fração básica obtido pelo planejamento de	

misturas de cinco componentes (et: etanol; ae: acetato de etila; di: diclorometano; ac: acetona e cl: clorofórmio).	46
Figura 16 - Gráfico do rendimento da fibra obtida pelo planejamento de misturas de cinco componentes (et: etanol; ae: acetato de etila; di: diclorometano; ac: acetona e cl: clorofórmio).	47
Figura 17 - Número de picos cromatográficos da fração da fase orgânica das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	50
Figura 18 - Cromatogramas das frações da fase orgânicas (a) etanol 100%, (b) acetato de etila 100%, (c) diclorometano 100%, (d) acetona 100% e (e) clorofórmio 100%. Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v).	51
Figura 19 - Cromatograma da fração da fase orgânica obtida com a mistura ternária etanol:diclorometano:acetona (1/3:1/3:1/3) (v:v:v). Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v).	52
Figura 20. Cromatograma da fração da fase orgânica obtida com 100% de diclorometano. Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v).	53
Figura 21 - Número de picos cromatográficos da fração básica das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	55
Figura 22 - Cromatogramas das frações básicas (a) etanol 100%, (b) acetato de etila 100%, (c) diclorometano 100%, (d) acetona 100% e (e) clorofórmio 100%. Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v).	56
Figura 23 - Cromatograma da fração básica obtida com a mistura binária etanol:diclorometano (1/2:1/2) (v/v). Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v).	57
Figura 24 - Cromatograma da fração básica obtida com a mistura ternária etanol:acetato de etila:acetona (1/3:1/3:1/3) (v/v/v). Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v).	57
Figura 25 - Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos dados espectrais das 31 frações da fase orgânica das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	59
Figura 26 - Dendrograma dos espectros IVTF dos extratos das 31 frações da fase orgânica obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	59
Figura 27 - Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 31 frações da fase orgânica no IVTF.	60
Figura 28 - Espectros no infravermelho das frações da fase orgânica 15 e 31 obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	60

Figura 29 - Espectros no infravermelho das frações da fase orgânica 5 e 21 obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	61
Figura 30 - Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos dados espectrais das 31 frações básica das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	63
Figura 31 - Dendograma obtido baseado nos dados dos espectros IVTF das 31 frações básica obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	64
Figura 32 - Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 31 frações básica no IVTF	65
Figura 33 - Espectros no infravermelho das frações básica 3 e 6 obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	65
Figura 34 - Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos dados cromatográficos das 33 frações da fase orgânica obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	67
Figura 35 - Dendograma obtido baseado nos dados cromatográficos das 33 frações da fase orgânica obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	67
Figura 36 - Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para os dados cromatográficos das 33 frações da fase orgânica obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	68
Figura 37 - Cromatogramas da CLAE das frações da fase orgânica 5 e 24 obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	69
Figura 38 - Gráfico dos escores dos fatores 1 e 3 dos dados cromatográficos das 33 frações básica obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	70
Figura 39 - Dendograma obtido baseado nos dados cromatográficos das 33 frações básica obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	71
Figura 40 - Gráfico dos loadings dos fatores 1 e 3 para os dados cromatográficos das 33 frações básica obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	72
Figura 41 - Cromatogramas da CLAE das frações básica 3 e 33 obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	73
Figura 42 - Cromatogramas da CLAE das frações básica 9 e 22 obtidas das folhas da <i>Annona muricata</i> L.	73
Figura 43. Projeção das variáveis no plano dos fatores 1×2	75

RESUMO

Planejamento estatístico de mistura de cinco componentes foi usado para investigar a influência dos solventes na extração dos metabólitos secundários das folhas da *Annona muricata* L.. Os rendimentos dos extratos brutos, das frações da fase neutra, básica, orgânica e das fibras foram investigados. O poder de extração de cada solvente ou mistura de solventes foi comparado com a diversidade de compostos extraídos das folhas da graviola. Os extratos das frações das fases orgânica e básica também foram analisados por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Duas fases móveis com diferentes forças cromatográficas foram investigadas. Modelos de análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica foram aplicados aos dados cromatográficos e espectroscópicos. As características da impressão digital cromatográfica foram sensíveis à mistura de solventes e a força cromatográfica. A melhor fase móvel para produzir impressão digital informativa foi 26% acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v). Os extratos da fração da fase orgânica de maior diversidade de compostos (29 picos) foram obtidos em misturas de etanol:diclorometano e etanol:clorofórmio (1/2:1/2) (v/v) e na mistura etanol:diclorometano:clorofórmio (1/3:1/3:1/3) (v/v). A fração básica com maior número de picos (19 picos) foi obtida com a mistura etanol:acetato de etila:acetona (1/3:1/3:1/3) (v/v/v). O maior rendimento do extrato bruto foi obtido com a mistura ternária etanol:diclorometano:clorofórmio (1/3:1/3:1/3) (v/v/v). A fração neutra de menor rendimento foi obtida com etanol. Rendimentos elevados da fração da fase orgânica foram obtidos com o etanol e com a mistura ternária etanol:diclorometano:acetona (1/3:1/3:1/3) (v/v/v). Já as frações básicas de maiores rendimentos foram obtidas com as misturas quaternárias (1/4:1/4:1/4:1/4) (v/v/v/v) etanol:acetato de etila:acetona:clorofórmio e etanol:acetato de etila:diclorometano:clorofórmio e a mistura quinária (1/5:1/5:1/5:1/5:1/5) (v/v/v/v/v). A mistura binária acetato de etila:diclorometano mostrou um forte poder de extração das fibras.

ABSTRACT

The effects of different solvents on the yield of secondary metabolites of the unfractionated and fractionated extracts of the *Annona muricata* L. were investigated by simplex centroid design mixtures of ethanol, ethyl acetate, dichloromethane, acetone and chloroform. The effect of the composition of mobile phase on the chromatographic separation of the extracts of the organic and basic fractions also was investigated. The number of peaks was used to evaluate the extraction efficiency. A mixture of acetonitrile:methanol:water (26:27:47% v/v/v) was chosen as the mobile phase. The largest unfractionated yield was obtained using a ternary mixture of ethanol, dichloromethane and chloroform (1/3:1/3:1/3 v/v/v). The lowest yield of the neutral fraction occurs for the pure ethanol solvent. The largest yields of the organic fraction were obtained for the pure ethanol solvent and ternary mixture of ethanol, dichloromethane and acetone (1/3:1/3:1/3 v/v/v). Ethanol:ethyl acetate:acetone:chloroform (1/4,1/4,1/4,1/4v/v/v/v) and ethanol: ethyl acetate dichloromethane:chloroform (1/4,1/4,1/4,1/4v/v/v/v) and the five component mixtures were more efficient at extracting the basic fractions. The largest yield of the fiber fraction was obtained for the binary mixture of ethyl acetate: dichloromethane (1/2:1/2 v/v). Principal component analysis and hierarquical cluster analysis models were applied to chromatograms and middle infrared (FTIR) spectral data of different extracts to discriminate the chemical compositions as mixture composition changes.



Capítulo I

*Introdução
e
Objetivos*

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A medicina tradicional é um conjunto de conhecimentos adquirido pela população no decorrer de milhares de anos. Seus praticantes se baseiam em experiências indígenas e crenças de diferentes culturas para prevenir e tratar de doenças físicas e mentais. É por razões histórica e cultural que as plantas medicinais ainda mantêm sua popularidade até os dias atuais¹.

Há centenas de anos que as plantas e os extratos vegetais têm sido usados na produção de compostos fitoquímicos, que são muito utilizados na preparação de suplementos dietéticos, alimentos funcionais, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos, agrícolas e cosméticos^{2,3}. Esta variedade de aplicação pode ser consequência da quantidade e da diversidade de metabólitos secundários presentes nas plantas.

Para a planta produzir os metabólitos secundários é necessário que ela apresente possibilidade biossintética³. Além desse controle genético, a síntese dos metabólitos secundários também depende das condições ambientais em que a planta está exposta. Alguns dos fatores ambientais que influenciam na produção desses metabólitos são: sazonalidade, ritmo circadiano (ciclo noite/dia), temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes, altitudes, poluição atmosférica, ataque por microorganismos, entre outros. Um outro fator de grande importância é a época em que o material vegetal é coletado, já que a quantidade dos constituintes ativos não permanece constante o ano todo. Estudos realizados mostraram também uma correlação entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos, como os flavonóides, taninos e antocianinas. A intensidade de luz também altera a concentração e/ou composição dos terpenóides e alcalóides. A idade e o desenvolvimento da planta também podem influenciar na quantidade total de metabólitos secundários⁴, como também nas quantidades relativas dos compostos químicos da

mistura^{4,5}. O valor terapêutico dos fitoterápicos produzidos a partir das plantas sofre influência dos fatores ambientais⁴.

Os metabólitos secundários agem como mecanismos de autodefesa, para garantir a sobrevivência da planta no ecossistema. Eles também atraem polinizadores e contribuem assim para a perpetuação da espécie. Essas funções desempenhadas pelos metabólitos secundários não são essenciais para as plantas, ao contrário dos metabólitos primários que são indispensáveis a vida e comuns aos seres vivos³.

O interesse pelas inúmeras propriedades terapêuticas dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas tem aumentado muito nos últimos anos, como por exemplo, potencial preventivo para as doenças crônicas cardiovasculares e para o câncer. Deste modo a extração desses metabólitos deve ser realizada de tal forma a garantir as propriedades profiláticas ou terapêuticas à saúde humana², e também obter um rendimento desejável desses compostos⁶. Entretanto para extrair os metabólitos de interesse é necessário otimizar o processo de extração, afim de quantificar e identificar os compostos. Esta otimização é necessária porque o processo de extração é influenciado de maneira significativa pela natureza química dos compostos, pelo método de extração empregado, pelo tempo e condições de estocagem, pelas substâncias interferentes, composição do solvente, entre outros⁷. Em geral, a otimização do processo de extração pode ser alcançada por métodos empíricos ou estatísticos² de forma a permitir a completa extração e evitar a modificação química dos metabólitos secundários⁶.

As principais classes dos metabólitos secundários são os alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos³.

Os compostos fenólicos presentes nas plantas compreendem uma grande diversidade de compostos como os flavonóides (antocianinas, flavanas, flavanonas) e várias classes de não-flavonóides (ácidos fenólicos)⁷. Essa classe de compostos apresenta diversidade estrutural, mas

possui pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila³.

A maioria dos extratos vegetais que mostram uma forte atividade antioxidante apresenta em sua composição química, compostos fenólicos que são os principais responsáveis por esta atividade⁵. Os compostos fenólicos são compostos fitoquímicos essenciais na dieta alimentar com capacidade de prevenir o aparecimento e/ou o progresso de patologias oxidativas⁶ além de poder reduzir o risco de doenças, como o câncer, artrite, diabetes e outras doenças causadas pelo envelhecimento⁷. Essa proteção é fornecida ao organismo humano através dos alimentos⁶ como frutas, vegetais e fibras². Também apresentam propriedades antibactericida, antimutagênico, anti-inflamatória e atividades vasodilatória⁶⁻¹⁰. O mecanismo de ação mais aceito, realizado por esses compostos, é a ação contra radicais livres que contribui na redução dos processos oxidativos⁹.

Os flavonóides são metabólitos secundários muito importantes que geralmente apresentam-se com um átomo de oxigênio na estrutura ligado com açúcares, conhecidos como heterosídeos. Quando os flavonóides estão ligados aos açúcares por uma hidroxila podem ser nomeados de *O*-heterosídeos e quando a ligação se dá por um átomo de carbono são denominados de *C*-heterosídeos³. Eles também apresentam na estrutura química pelo menos dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono. A biossíntese desses compostos ocorre através da via do ácido chiquímico e do acetato, e pela via do ácido malônico. Possivelmente os flavonóides desempenham funções de defesa e são responsáveis pela pigmentação das flores e folhas com coloração vermelho, amarelo e azul o que atraem polinizadores para as plantas, contribuindo assim para a sobrevivência da espécie^{3,11}.

Atualmente existe um grande interesse econômico e farmacêutico pelos flavonóides por consequência das diversas propriedades que eles apresentam, entre elas, antitumoral, anti-inflamatória e antiviral³.

Classicamente, a extração desses compostos é realizada utilizando solventes com polaridade crescente. Assim, inicia-se o processo de extração com um solvente apolar para retirar os óleos, gorduras, esteróis e pigmentos e finaliza com água quente para extrair os heterosídeos mais polares³.

Os alcalóides também são metabólitos secundários encontrados nas plantas constituídos por uma enorme quantidade de substâncias estruturalmente diferentes, e por isso a definição química para essa classe de compostos é muito difícil³.

Os alcalóides são produzidos através dos precursores aminoácidos, terpenos ou esteróides, que colaboram com a sua formação. As estruturas desses metabólitos apresentam cadeias carbônicas cíclicas que determinam à classificação dos mesmos³.

Outros metabólitos secundários são as cumarinas, estruturalmente lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico, podendo ser encontradas em todas as partes da planta. O anel lactônico presente na estrutura desses metabólitos secundários pode contribuir no processo de extração. Isto ocorre porque em pH elevado o anel se rompe proporcionando a obtenção das substâncias na forma de sais solúveis em água³.

As plantas com alta produção de cumarinas têm um valor comercial significativo, pois apresentam várias propriedades terapêuticas de interesse¹², como por exemplo, atividade vasodilatadora podendo ser utilizadas no tratamento da impotência masculina. Além de mostrarem atividades farmacológicas potentes, as cumarinas apresentam baixa toxicidade para os mamíferos³.

Na literatura encontram-se vários estudos sobre a extração dos metabólitos secundários. A extração depende do meio extrator. A escolha dos reagentes extratores envolve um compromisso entre maximizar a eficiência da extração e garantir o maior ou o menor número de metabólitos dependendo do caso em estudo¹³. Diferentes solventes ou misturas de solventes têm sido usados

para extrair metabólitos secundários, por exemplo, o clorofórmio foi usado na extração dos flavonóides das partes aéreas da planta *Cunila* (Lamiaceae)¹⁴. Também há estudos em que a extração dos flavonóides foi feita com metanol 62,5%¹⁵. Na extração dos flavonóides das sementes da uva *Vitis vinifera* sp foi utilizado acetato de etila¹⁶, na extração dos compostos fenólicos presentes no própolis utilizou o metanol¹⁷. Já para a extração dos polifenóis do bagaço da pera foi utilizado acetona 70% (v/v) em temperatura ambiente¹⁸. Os compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos) das folhas secas das espécies *Cryptolepis* foram extraídos em etanol 96%¹⁹. Para extrair os compostos fenólicos da Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) foi utilizado o solvente puro metanol⁷. Os compostos fenólicos da *Rosmarinus officinalis* também foram extraídos com metanol⁵. A extração desses metabólitos secundários dos caules e folhas da groselha preta foi realizada com metanol 80%, acetona 50% e 70% e água⁶. No estudo com o farelo de trigo foi utilizado metanol 70% (v/v), etanol 70% (v/v) e acetona 70% (v/v)¹⁰. Os compostos fenólicos das folhas da *Inga edulis* foram extraídos com etanol:água 50:50 (v/v)⁹.

Os alcalóides das folhas e raízes da *C. acuminata* foram extraídos com os solventes puros: metanol, diclorometano e acetona²⁰. No estudo da casca da *Cinchona* determinaram alcalóides utilizando metanol como solvente extrator²¹. As saponinas das folhas secas da *M. Lanceolata* foram extraídas com metanol 50% (v/v)²².

Poucas espécies de plantas têm sido avaliadas cientificamente como possíveis aplicações medicinais¹, não somente pela falta de política de cuidados de saúde, mas também pela carência de metodologias adequadas e aceitas para avaliar amostras complexas²³. No entanto, estudos fitoquímico e farmacológico com a família Annonaceae têm-se intensificado nos últimos anos, devido à descoberta das acetogeninas de Annonaceas, uma classe de compostos naturais²⁴ que exhibe várias propriedades biológicas, citotóxicas, antitumoral, antiparasita, antimicrobiana e agrotóxica²⁵⁻²⁹. A literatura mostra que mais de 400 acetogeninas annonaceas foram isoladas das

plantas da família Annonaceae²⁸. Esta classe de compostos é caracterizada pela longa cadeia alifática de hidrocarboneto, tendo um anel γ -lactona α, β -insaturado, com 1,2 ou 3 tetraidrofurano localizado ao longo da cadeia, além da presença de grupos funcionais oxigenados (hidroxilas, cetonas, epóxi) e/ou duplas ligações³⁰. A estrutura básica da acetogenina²⁹ está representada na Figura 1.

As acetogeninas das Annonaceae também são fortes candidatas para as próximas gerações de drogas no combate a tumores resistentes a quimioterapia²⁹ devido a sua atuação como inibidores do complexo I da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias de vários organismos, inclusive em células tumorais, levando à depleção dos níveis de ATP^{29,30}.

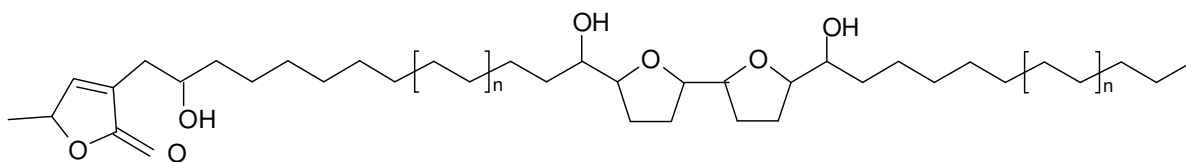


Figura 1. Estrutura básica das acetogeninas das Annonaceae

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 brasileira devido as condições climáticas compatíveis com suas exigências nutricionais e fisiológicas³¹⁻³³. A graviola apresenta propriedades diuréticas, anti-inflamatórias, antireumático, vitaminizante, entre outras, além de ser muito usada no tratamento de doenças cardíacas, asma e

de artrite³⁴ e por isso vem despertando o interesse da população científica³⁵. Porém, uma das maiores descobertas sobre a graviola foi a sua sensacional capacidade de agir contra as células do câncer, mostrando em testes de laboratório um potencial extraordinário³⁴. Esta propriedade é consequência das acetogeninas presentes nas raízes, troncos e folhas da graviola³⁶. Desde 1996 o Instituto de Ciências e Saúde dos Estados Unidos coleta e estuda dados sobre a graviola para o tratamento do câncer. Os cientistas procuram comprovar sua real eficiência no combate às células cancerígenas. Além de melhorar a perspectiva de vida do doente, o tratamento natural dá, na maioria das vezes, a sensação de força e vitalidade necessária para sua recuperação. Uma terapia natural em complemento às terapias tradicionais, como quimioterapia e radioterapia, está sendo investigada por não causar efeitos secundários severos, como náuseas e perda de cabelo, efeitos provenientes da quimioterapia. Evitar possíveis infecções protegendo o sistema imunológico também está sendo considerado possível com o uso da graviola, porque, diferente da quimioterapia, a graviola é seletiva, não destrói células saudáveis³⁴.

Os trabalhos encontrados na literatura revelam que tradicionalmente a extração dos metabólitos secundários é realizada com solventes puros ou com solventes misturados em água. Dessa maneira existe a necessidade de explorar extratos de plantas obtidos com as misturas dos solventes, afim de verificar o efeito dos solventes na extração de metabólitos secundários.

Considerando que as propriedades terapêuticas da graviola estão relacionadas aos metabólitos secundários presentes nesta planta e a necessidade de extraí-los em quantidades

desejadas, este trabalho teve como objetivo obter subsídios para a extração de metabólitos secundários da *Annona muricata* L.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar o efeito do solvente no processo de extração de metabólitos secundários das folhas da *Annona muricata* L..
- b) Investigar o efeito da força cromatográfica no número de picos nos cromatogramas.
- c) Comparar a composição química dos diferentes extratos por meio do perfil espectral infravermelho e cromatográficos por métodos quimiométricos.



Capítulo II

Métodos Quimiométricos

2. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

2.1 Modelagem de Misturas

Mistura é o ato ou efeito de associar vários ingredientes para formar um produto. O produto resultante de uma mistura tem características que dependem da natureza de seus ingredientes e das proporções relativas dos mesmos, não da quantidade total da mistura.

A soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%. Para uma mistura qualquer de q componente, pode-se escrever:

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

onde x_i representa a proporção do i -ésimo componente. Esta equação retira um grau de liberdade das proporções. Para especificar a composição da mistura, só precisam fixar as proporções de $q-1$ componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100%³⁷.

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

Para sistemas com três fatores independentes, podem-se realizar experimentos correspondentes a qualquer ponto dentro do cubo da Figura 2. Caso o sistema seja uma mistura de três componentes, porém, terá de obedecer à restrição $x_1 + x_2 + x_3 = 1$, que define um triângulo equilátero inscrito no cubo, também mostrado na Figura 2.

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

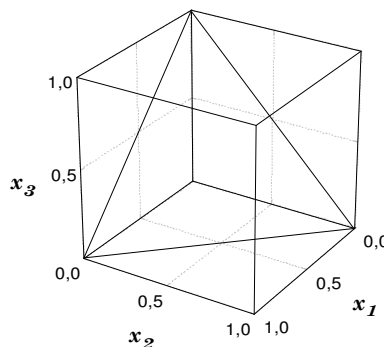


Figura 2-Espaço experimental para processos com três fatores independentes incluindo todos os pontos dentro do cubo. O espaço experimental para misturas de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo.

Além da restrição natural mostrada na equação 1, pode-se também ter restrições superiores e inferiores dos teores dos componentes na mistura, por motivos tecnológicos ou econômicos, entre outros. Obviamente a soma de todos esses limites tem de ser menor que um, senão será impossível preparar a mistura. Tais restrições para um caso geral de q componentes são escritas conforme a equação 2. Estes pontos são chamados os vértices do simplex³⁷.

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

onde α_i são os limites inferiores não-nulos.

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

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

onde y_i é um valor experimental da resposta de interesse, β_0 , β_1 e β_2 são os parâmetros do modelo e ε_i representa o erro aleatório associado à determinação do valor de y_i . Ajustando o modelo às observações feitas com essa finalidade, obtém-se a expressão:

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

que permite estimar a resposta média num ponto qualquer de composição (x_1, x_2, x_3) . O acento circunflexo é para diferenciar um valor populacional de uma estimativa.

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

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

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

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

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (6)$$

Substituindo as relações $1 \times b_0 = (x_1 + x_2 + x_3) \times b_0$ e $b_{11}x_1^2 = b_{11}x_1(1 - x_2 - x_3)$, além de expressões análogas para $b_{22}x_2^2$ e $b_{33}x_3^2$, tem-se:

$$\hat{y} = b_0(x_1 + x_2 + x_3) + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1(1 - x_2 - x_3) + b_{22}x_2(1 - x_1 - x_3) + b_{33}x_3(1 - x_1 - x_2) + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

Agrupando os termos, obtém-se finalmente:

$$\hat{y} = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 + b_{12}^*x_1x_2 + b_{13}^*x_1x_3 + b_{23}^*x_2x_3 \quad (7)$$

onde $b_i^* = b_0 + b_i + b_{ii}$ e $b_{ij}^* = b_{ij} - b_{ii} - b_{jj}$, com $i \neq j$.

Se o modelo quadrático se mostrar insuficiente, precisa acrescentar-lhe termos cúbicos.

O modelo cúbico completo para uma mistura de três componentes é dado pela equação:

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i \leq j}^3 \sum_j^3 b_{ij} x_i x_j + \sum_{i \leq j \leq k}^3 \sum_j^3 \sum_k^3 b_{ijk} x_i x_j x_k . \quad (8)$$

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

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{23}^* x_2 x_3 + d_{12}^* x_1 x_2 (x_1 - x_2) \\ & + d_{13}^* x_1 x_3 (x_1 - x_3) + d_{23}^* x_2 x_3 (x_2 - x_3) + b_{123}^* x_1 x_2 x_3 \end{aligned} \quad (9)$$

Como esta equação tem dez termos, ter-se-ia de fazer no mínimo dez ensaios diferentes para determinar os valores de todos os seus coeficientes. Muitas vezes, basta introduzir um único termo cúbico para que o modelo passe a descrever satisfatoriamente toda a região experimental. Neste caso, tem-se a expressão do modelo cúbico especial, que possui apenas um termo a mais que o modelo quadrático, e portanto, só precisa de um ensaio adicional:

$$\hat{y} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{23}^* x_2 x_3 + b_{123}^* x_1 x_2 x_3 \quad (10)$$

O planejamento experimental normalmente empregado para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico especial é o chamado centróide simplex, que se obtém acrescentando ao simplex em rede um ponto central correspondendo à mistura ternária em partes iguais, $(x_1, x_2, x_3) = \left(\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}\right)$.

2.2 Análise Exploratória de Dados

A sequência básica da análise multivariada de dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 3. Antes de proceder à análise dos dados é feita uma inspeção visual para verificar problemas de variação da linha de base, sobreposição de picos e ruídos. Os dados são convertidos na forma de uma matriz (tabela de resultados), na qual será representada por \mathbf{X} . As n linhas da matriz representam as amostras (ou objetos), nas quais cada valor corresponde a uma propriedade medida para uma amostra específica, enquanto que as p colunas são variáveis que correspondem a uma propriedade medida para cada amostra. Em seguida, é realizada uma pré-seleção das variáveis quando necessário para definir a região do espectro ou cromatograma que contém a informação que será utilizada no cálculo.

O pré-processamento é uma etapa importante da análise, pois os dados de uma forma geral contêm fontes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos ou unidades diferentes. Ele é definido como qualquer manipulação matemática nos dados com o objetivo de remover ou reduzir estas fontes irrelevantes de variação. Pode ser dividido em dois tipos básicos, dependendo se são operados nos valores relacionados às amostras ou às variáveis, e a sua escolha vai depender do conjunto de dados e do objetivo³⁸. A normalização nas amostras é feita dividindo

cada variável por uma constante. Os dois tipos mais comuns são a normalização por área unitária ou por comprimento do vetor unitário. Neste trabalho foi usada a normalização por comprimento de vetor unitário.

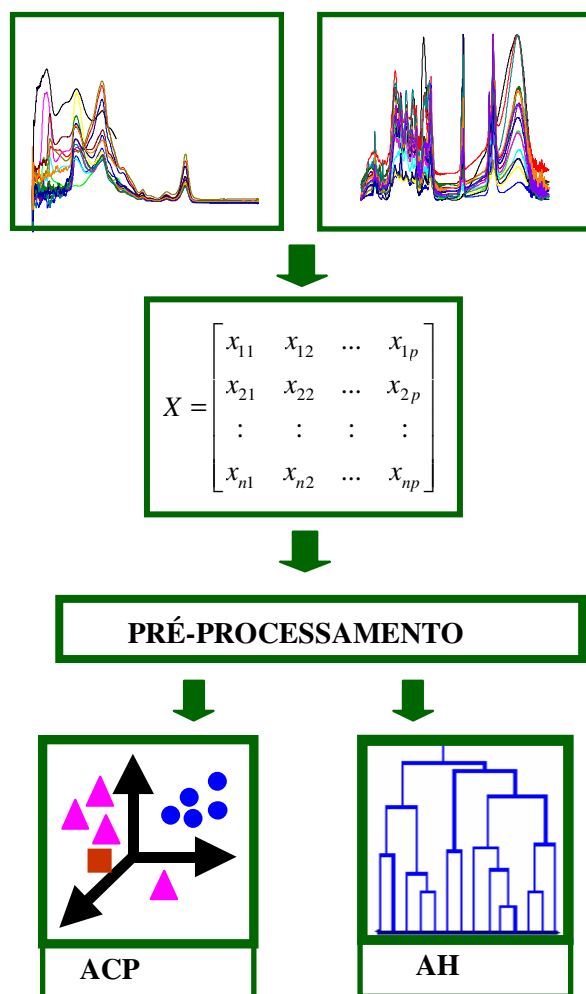


Figura 3: Esquema da sequência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).

Esta normalização é feita dividindo cada valor original pela soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha, Equação 11. A finalidade é remover a variação sistemática, normalmente associada com a quantidade total da amostra³⁸.

$$x' = x_{ij} / \sqrt{\sum_{j=1}^p x_{ij}^2} . \tag{11}$$

2.3 Análise de Componentes Principais (ACP)

A ACP é um método que tem por finalidade básica, a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais³⁸. Na ACP, a decomposição é calculada através da diagonalização da matriz X^tX e XX^t . A matriz X ($n \times p$), formada por n objetos e p variáveis é decomposta no produto de duas matrizes menores:

$$X = T \times P' + \varepsilon, \quad (12)$$

no qual T é a matriz dos escores das componentes principais, P é a matriz “loadings” (pesos) das componentes principais, ε é a matriz dos resíduos. O sobrescrito t indica a transposta da matriz e q é um escalar que indica o número de componentes principais que descreve a maior parte da variância dos dados. Este procedimento está representado esquematicamente na Figura 4.

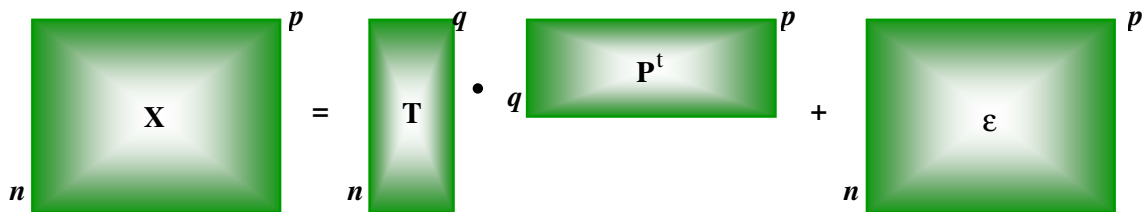


Figura 4: Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes.

Após os cálculos, os resultados são utilizados para interpretar a distribuição das amostras num gráfico bidimensional das componentes principais e posteriormente identificar e julgar a importância das variáveis originais escolhidas, pois as variáveis originais com maiores valores de

loadings na combinação linear das componentes principais são as mais importantes do ponto de vista estatístico.

A matriz **T** ou **P** (dependendo se o espaço é das variáveis ou das amostras) pode sofrer uma rotação rígida chamada varimax. A rotação varimax³⁹ maximiza a variância dos pesos das componentes principais (agora nominadas de fatores), sujeitos a restrição que eles retenham a ortogonalidade.

2.4 Análise Hierárquica (AH)

A análise de agrupamentos é um nome coletivo dado a uma grande variedade de técnicas que permitem a separação dos objetos ou variáveis em grupos diferentes. O método mais utilizado é a análise hierárquica de agrupamentos (AH)⁴⁰.

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

Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos no espaço p-dimensional. A maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos (amostras) que estão mais próximos, usando a distância Euclidiana definida na Equação 13, e substituí-los por um novo ponto, localizado na metade da distância entre eles.

$$d_{ik} = \left[\sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2}. \quad (13)$$

Nesta equação, d_{ik} é a distância Euclidiana entre os pontos i e k . O procedimento descrito é repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, levando à construção do dendrograma, no qual no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical à distância. Considera-se que quanto menor a distância entre os pontos, maior a similaridade entre as amostras representadas por eles. A similaridade é convenientemente definida pela Equação 14,

$$s_{ik} = \left[1 - \frac{d_{ik}}{(d_{ik})_{\text{máx}}} \right], \quad (14)$$

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

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



Capítulo III

*Descrição
Experimental*

3. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo, serão abordados os aspectos relacionados aos procedimentos experimentais para a obtenção dos extratos brutos, fracionamento dos extratos, obtenção dos dados espectroscópicos e cromatográficos das folhas da *Annona muricata* L. Um resumo do procedimento experimental está representado na Figura 5.

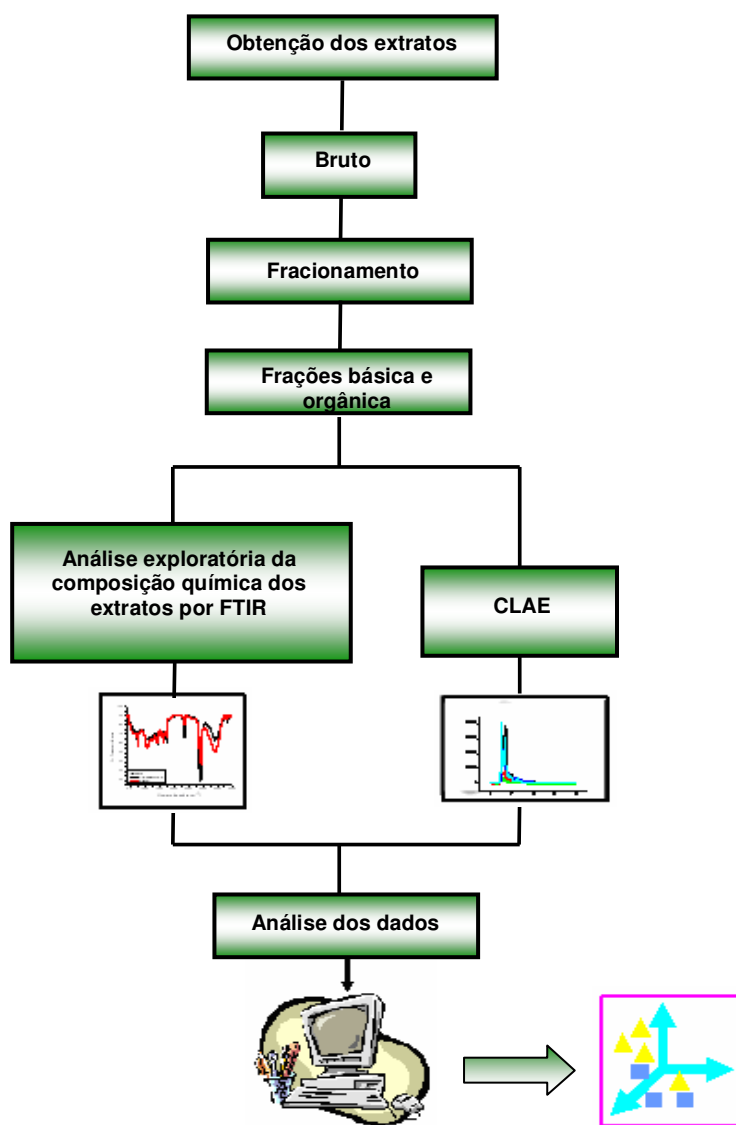


Figura 5: Procedimento experimental para a obtenção dos extratos brutos, fracionamento dos extratos, obtenção dos dados espectroscópicos e cromatográficos das folhas da *Annona muricata* L.

3.1 Planta

A planta utilizada neste estudo foi a *Annona muricata* L., Figura 6. A exsicata está depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina com o número 42.918.

3.2 Características da planta

Nome científico: *Annona muricata* L.

Determinado por: A. O. S. Vieira & L. R. Bargoena.

Família: ANNONACEAE.

Nome vulgar: Graviola.

Local de coleta: Departamento de química, CCE, Campus Universitário, UEL.

Cidade: Londrina.

UF: Paraná.

País: Brasil.

Observação: Árvore com frutos e flores.

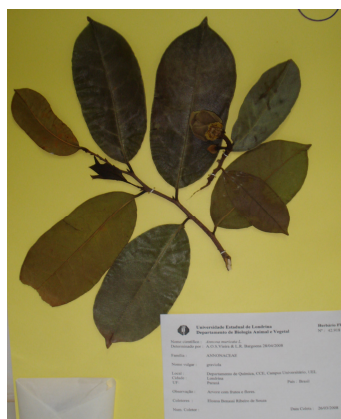


Figura 6. Exsicata da *Annona muricata* L. depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina.

3.3 Coleta

A coleta das folhas da graviola foi realizada no jardim experimental do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina no período de 24/04/2007 à 20/01/2008, no horário das 7:50 às 8:30h. Após a coleta, as plantas foram fragmentadas com tesoura e secas por onze dias em lugar arejado e à temperatura ambiente. As folhas também foram protegidas da luz, umidade, ataque de fungos, insetos e roedores. A moagem foi realizada com o auxílio de um liquidificador e em seguida o material foi armazenado em embalagem de papelão.

3.4 Reagentes

Para a realização dos experimentos foram utilizados os reagentes álcool etílico hidratado com 92,8% de pureza produzido pela MONTENEGRO, acetato de etila P.A. VETEC, 99,5%, diclorometano P.A. VETEC, 99,5%, acetona P.A. VETEC, 99,5%, clorofórmio P.A. VETEC, 99,5%, ácido sulfúrico P.A. VETEC, 99%, hidróxido de amônio MERCK, 97%, brometo de potássio P.A. ACS (P.M. 119,00 g/mol), água destilada e ultrapura. Também foram utilizados os reagentes acetonitrila e metanol de grau HPLC da marca VETEC.

3.5 Aparelhos e equipamentos

Utilizou-se balança analítica Scientech AS 120, evaporador rotativo FISATOM 801, ultrassom ULTRACLEANER 1400 UNIQUE, liquidificador SKYMSEN TA-02, pHmetro HANNA HI9321 e para as análises espectrômetro de absorção no Infravermelho Shimadzu FTIR-8300 e o cromatógrafo a líquido Shimadzu modelo LC-10AT com injetor manual, alça de amostragem de 20 µL e o detector espectroscópico por arranjo de diodos SPD-M10A.

3.6 Programa Computacional

Os processamentos dos dados do planejamento estatísticos e gráficos foram feitos com o software Statistica 6.0⁴¹. Os demais cálculos foram executados com programas em FORTRAN, desenvolvidos pela professora Doutora Ieda Spacino Scarminio – Departamento de Química – UEL.

3.7 Planejamento experimental

Os solventes utilizados na extração foram etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio. As proporções dos solventes foram escolhidas de acordo com o planejamento experimental de misturas de cinco componentes⁴¹, como mostra a Tabela 1.

A escolha dos solventes foi baseada no triângulo de seletividade primeiramente proposto por Snyder para cromatografia. A Tabela 2 apresenta os valores de α (acidicidade), β (basicidade) e π (dipolaridade) normalizados bem como o valor da polaridade dos solventes puros e das misturas do planejamento experimental. A Figura 7 apresenta o triângulo de seletividade dos solventes para os componentes puros e misturas da Tabela 2. Os parâmetros α (acidicidade), β (basicidade) e π (dipolaridade) são medidas relativas da força de interação molecular do soluto com os solventes. Os valores destes parâmetros para diferentes solventes foram derivados da espectroscopia, daí o nome de solvatocrômico⁴². A vantagem de usar os valores de α , β e π é o agrupamento dos solventes de acordo com o tipo de interação com os compostos de interesse. Solventes quimicamente semelhantes possuem parâmetros de

seletividade similares e fazem parte do mesmo grupo, embora possam apresentar diferentes valores de polaridades.

Tabela 1 - Planejamento de misturas de cinco solventes.

Amostra	Solventes Extratores				
	Etanol	Acetato de etila	Diclorometano	Acetona	Clorofórmio
01	1	0	0	0	0
02	0	1	0	0	0
03	0	0	1	0	0
04	0	0	0	1	0
05	0	0	0	0	1
06	1/2	1/2	0	0	0
07	1/2	0	1/2	0	0
08	1/2	0	0	1/2	0
09	1/2	0	0	0	1/2
10	0	1/2	1/2	0	0
11	0	1/2	0	1/2	0
12	0	1/2	0	0	1/2
13	0	0	1/2	1/2	0
14	0	0	0	1/2	1/2
15	0	0	1/2	0	1/2
16	1/3	1/3	1/3	0	0
17	1/3	0	0	1/3	1/3
18	1/3	1/3	0	0	1/3
19	1/3	0	1/3	0	1/3
20	1/3	1/3	0	1/3	0
21	0	0	1/3	1/3	1/3
22	0	1/3	0	1/3	1/3
23	0	1/3	1/3	0	1/3
24	0	1/3	1/3	1/3	0
25	1/3	0	1/3	1/3	0
26	1/4	1/4	1/4	1/4	0
27	0	1/4	1/4	1/4	1/4
28	1/4	0	1/4	1/4	1/4
29	1/4	1/4	0	1/4	1/4
30	1/4	1/4	1/4	0	1/4
31	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
32	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
33	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5

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

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

O etanol tem valores de α e β mais ou menos igual, com baixo valor de π . O acetato de etila apresenta valores próximos para π e β . O diclorometano apresenta o maior valor de π . A acetona pertence ao mesmo grupo do acetato de etila. O clorofórmio possui valor de α maior, em relação ao diclorometano.

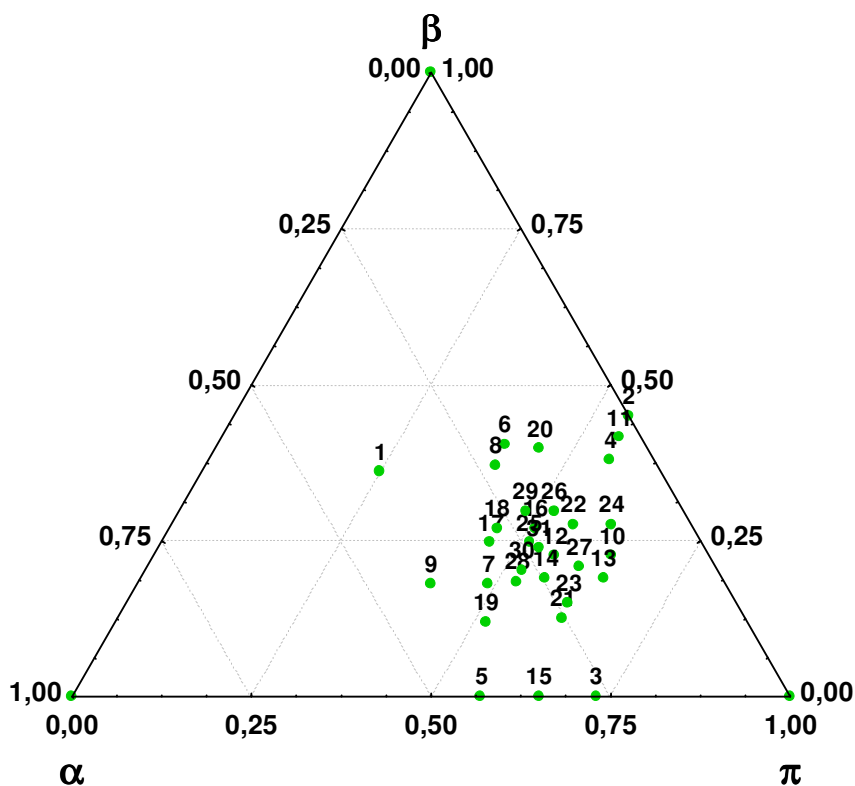


Figura 7: Triângulo de seletividade baseado nos dados solvatocrômicos da Tabela 2.

O posicionamento dos diferentes tipos de solventes ou misturas de solventes na Figura 7 é esperado. Por exemplo, diclorometano é um forte doador de prótons e um fraco receptor, além de ter um caráter altamente dipolar e por isso está localizado sobre o eixo acidez-dipolaridade. Devido ao alto valor de dipolaridade, o diclorometano extrai preferencialmente 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), etc.

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

como ácidos carboxílicos, álcoois, fenóis, etc. Já o clorofórmio apresenta caráter ácido extraindo preferencialmente compostos básicos.

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

$$\alpha = \sum_{i=1}^n \alpha_i \varphi_i \quad (15)$$

$$\pi = \sum_{i=1}^n \pi_i \varphi_i \quad (16)$$

$$\beta = \sum_{i=1}^n \beta_i \varphi_i \quad (17)$$

$$P = \sum_{i=1}^n P_i \varphi_i, \quad (18)$$

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

3.8 Preparo dos extratos brutos

Para obter o rendimento de cada extrato bruto foram utilizados 20,00 g de folhas secas moídas e 150 mL do solvente extrator. Os solventes do meio extrator foram: etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio. As proporções dos solventes deste meio foram escolhidas de acordo com o planejamento de misturas de cinco componentes⁴¹, sendo que o ponto central foi feito em triplicata, totalizando 31 combinações diferentes de solventes, mostrado na Tabela 1,

Para a obtenção de cada extrato, o sistema foi submetido à extração por maceração em banho de ultrassom por 30 minutos. Em seguida os extratos foram filtrados em algodão e realizada a remaceração por 2 vezes nas mesmas condições da maceração. Os extratos obtidos foram submetidos à evaporação num evaporador rotativo a uma temperatura de 70 °C e colocados para secar a temperatura ambiente até atingir peso constante. As condições experimentais foram escolhidas de acordo com trabalhos realizados anteriormente pelo grupo de estudo e o procedimento experimental está resumido na Figura 8.

Os extratos foram armazenados em uma temperatura de 4 °C até o fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos.

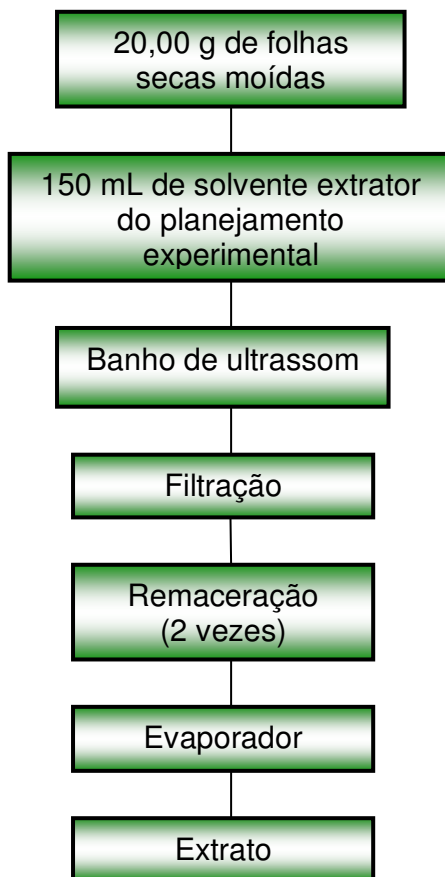


Figura 8. Esquema do procedimento para o preparo dos extratos brutos para obterem os rendimentos.

3.9 Fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos

Para fracionar os extratos brutos foi necessário solubilizá-los em 20 mL dos respectivos solventes extratores e adicionar em cada um deles 4 mL de água destilada e 16 mL de metanol. As misturas foram homogeneizadas em banho de ultrassom por 5 minutos. A solução ficou em repouso por 1 hora e em seguida foi filtrada em papel de filtro comum.

O esquema geral está ilustrado na Figura 9⁴³.

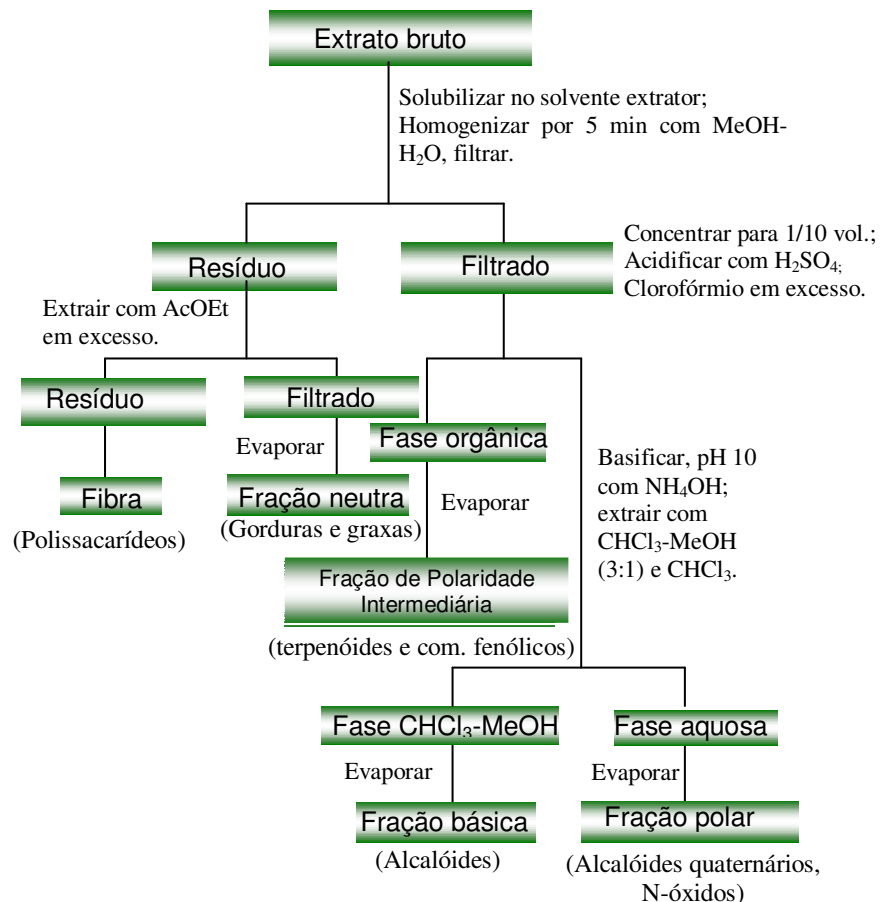


Figura 9. Esquema geral do fracionamento líquido-líquido dos extratos brutos⁴³.

O filtrado foi concentrado no evaporador rotativo a uma temperatura de 70 °C, acidificado com ácido sulfúrico e transferido para um funil de separação no qual foi realizada extração exaustiva com clorofórmio. Neste momento, foi obtida a fração da fase orgânica (fração de polaridade intermediária), que apresenta grande quantidade de terpenóides e compostos fenólicos e também a outra fase que foi basificada e fracionada com clorofórmio e metanol na proporção

3:1 (15 mL de clorofórmio e 5 mL de metanol). Em seguida realizou extração exaustiva com clorofórmio. Neste fracionamento, originou a fração básica e a fração polar. A fração básica contém grande quantidade de alcalóides, enquanto que a fração polar contém grande quantidade de alcalóides quaternários e N-óxidos.

O resíduo foi lavado com acetato de etila em excesso para extrair completamente as gorduras e graxas, fração neutra, da fibra do material vegetal.

As frações da fase orgânica, básica e neutra foram evaporadas no evaporador rotativo a uma temperatura de 70 °C e colocadas para secar à temperatura ambiente até atingirem peso constante, o que permitiu o cálculo do rendimento de cada fração. As frações foram armazenadas a uma temperatura de 4 °C.

3.10 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos fracionados

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas com as frações da fase orgânica e a fração básica obtidas no fracionamento totalizando 66 amostras.

As frações da fase orgânica e básica foram dissolvidas em 3 mL de metanol. Para facilitar a dissolução do extrato fracionado, estes foram submetidos ao banho de ultrassom por 10 minutos. Após 1 hora, cada solução foi filtrada em papel de filtro comum. O filtrado foi armazenado em freezer e o resíduo foi descartado.

No momento da análise foram tomadas alíquotas de 200 µL do filtrado e 50 µL da fase móvel (4:1) (v:v). Em seguida as amostras diluídas foram filtradas em filtro Millipore Millex com poros de 0,22 µm, para evitar qualquer dano à coluna cromatográfica ou entupimento no sistema causado por possíveis impurezas ou por precipitação.

As análises foram feitas com uma coluna cromatográfica C18 ODS Metasil da Phenomenex, com dimensões de 250 x 4,6 mm, com tamanho de partícula 5 µm, pré-coluna C18 ODS Metasil da Phenomenex, com dimensões de 50 x 4,6 mm, com tamanho de partícula 5 µm, a temperatura do forno foi 50 °C, o volume injetado 20 µL, a eluição foi isocrática com vazão da fase móvel de 1,0 mL/min nos comprimentos de onda 210, 220, 254 e 260 nm, lâmpada de deutério e o detector espectrofotométrico por arranjo de diodos. As condições experimentais foram escolhidas de acordo com trabalhos realizados anteriormente pelo grupo de estudo.

Para as análises foram testadas duas fases móveis com composições químicas diferentes, a fase móvel E foi preparada usando 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v), resultando uma força cromatográfica igual a 1,5. A fase móvel R foi constituída por 35% de acetonitrila, 35% de metanol e 30% de água (v/v/v), neste caso a força cromatográfica foi 2,0.

3.11 Análise por Espectroscopia de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier dos extratos fracionados

O procedimento utilizado para a obtenção do extrato bruto foi o mesmo do item 3.8, variando apenas a massa e o volume dos solventes. As folhas secas moídas (10,00 g) foram submetidas à extração em 90 mL de solvente extrator. As proporções dos solventes foram escolhidas conforme o planejamento experimental de cinco misturas⁴¹, mostrado na Tabela 1. O sistema foi colocado no banho de ultra-som por 30 minutos e os extratos foram filtrados em algodão. O procedimento foi repetido por 2 vezes. Os extratos foram evaporados num evaporador rotativo à temperatura de 70 °C e colocados para secar à temperatura ambiente até atingir peso constante. O fracionamento do extrato bruto foi o mesmo do item 3.9.

Para as análises no infravermelho as frações da fase orgânica e básica foram dissolvidas em 3 mL de clorofórmio e levadas ao banho de ultrassom por 1 minuto. Em seguida a fração orgânica foi diluída na proporção de 1:40 (0,2 mL de amostra em 8 mL de clorofórmio) e a fração básica na proporção de 1:10 (0,5 mL de amostra em 5 mL de clorofórmio). As pastilhas foram preparadas com 0,1500 g de KBr e 0,5 mL de amostra diluída em clorofórmio. Os espectros no infravermelho foram registrados na região de $4000-400\text{ cm}^{-1}$, com resolução de $1,93\text{ cm}^{-1}$ e média de 80 leituras.



Capítulo IV

Resultados

e

Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados os extratos brutos e as frações obtidas das folhas da *Annona muricata* L., utilizando-se planejamento de misturas de cinco componentes. Para desenvolver o trabalho, realizou-se primeiramente a otimização do rendimento da extração dos 31 extratos brutos (Tabela 3).

Tabela 3 - Rendimento do extrato bruto usando planejamento de misturas de cinco componentes.

Amostra	Solventes Extratores/mL					Extratos/g Bruto
	Etanol	Acetato de etila	Diclorometano	Acetona	Clorofórmio	
01	150	0	0	0	0	1,3813
02	0	150	0	0	0	1,8393
03	0	0	150	0	0	2,0714
04	0	0	0	150	0	1,7082
05	0	0	0	0	150	2,1632
06	75	75	0	0	0	2,5805
07	75	0	75	0	0	2,9288
08	75	0	0	75	0	2,0152
09	75	0	0	0	75	2,9096
10	0	75	75	0	0	2,5071
11	0	75	0	75	0	1,8816
12	0	75	0	0	75	2,2254
13	0	0	75	75	0	2,3347
14	0	0	0	75	75	2,2412
15	0	0	75	0	75	2,3423
16	50	50	50	0	0	2,8183
17	50	0	0	50	50	2,6099
18	50	50	0	0	50	2,5833
19	50	0	50	0	50	3,0247
20	50	50	0	50	0	2,4471
21	0	0	50	50	50	1,9034
22	0	50	0	50	50	2,3948
23	0	50	50	0	50	2,2291
24	0	50	50	50	0	2,2019
25	50	0	50	50	0	2,6929
26	37,5	37,5	37,5	37,5	0	2,7215
27	0	37,5	37,5	37,5	37,5	2,5438
28	37,5	0	37,5	37,5	37,5	2,5223
29	37,5	37,5	0	37,5	37,5	2,4845
30	37,5	37,5	37,5	0	37,5	2,7624
31	30	30	30	30	30	2,7237
32	30	30	30	30	30	2,8392
33	30	30	30	30	30	2,7531

Para a análise dos rendimentos dos extratos brutos utilizaram-se modelos de misturas, que permitem explorar os efeitos dos solventes simultaneamente no processo de extração. Os modelos linear e quadrático foram ajustados para os dados, mas apresentaram falta de ajuste. O modelo cúbico especial não mostrou falta de ajuste, no nível de 95% de confiança, e a equação matemática simplificada deste modelo é dada por:

$$\hat{y} = \mathbf{1,38}_{(\pm 0,15)}et + \mathbf{1,85}_{(\pm 0,15)}ae + \mathbf{2,08}_{(\pm 0,15)}di + \mathbf{1,71}_{(\pm 0,15)}ac + \mathbf{2,17}_{(\pm 0,15)}cl + \mathbf{3,80}_{(\pm 0,74)}etae + \mathbf{4,71}_{(\pm 0,74)}etdi + \mathbf{1,85}_{(\pm 0,74)}etac + \mathbf{4,53}_{(\pm 0,74)}etcl + \mathbf{1,94}_{(\pm 0,74)}aedi \quad (19)$$

onde \hat{y} é o rendimento previsto pelo modelo, *et*= etanol, *ae*=acetato de etila, *di*=diclorometano, *ac*=acetona e *cl*=clorofórmio e os valores entre parênteses representam os erros padrão de cada coeficiente.

Analisando os coeficientes dos solventes puros observa-se que o etanol tem menor poder de extração (1,38). A acetona e o acetato de etila também apresentaram baixo poder de extração, 1,71 e 1,85 respectivamente. De acordo com a equação matemática, os coeficientes de maior peso são das misturas binárias (1/2:1/2) (v/v) etanol:diclorometano (4,71) e etanol:clorofórmio (4,53), o que indica um maior rendimento do extrato bruto quando essas duas misturas binárias são utilizadas como solvente extrator, em relação aos componentes puros.

A Figura 10 mostra o gráfico dos resíduos *versus* rendimentos previstos, no qual observa a distribuição aleatória dos resíduos, indicando que as amostras não revelam tendências.

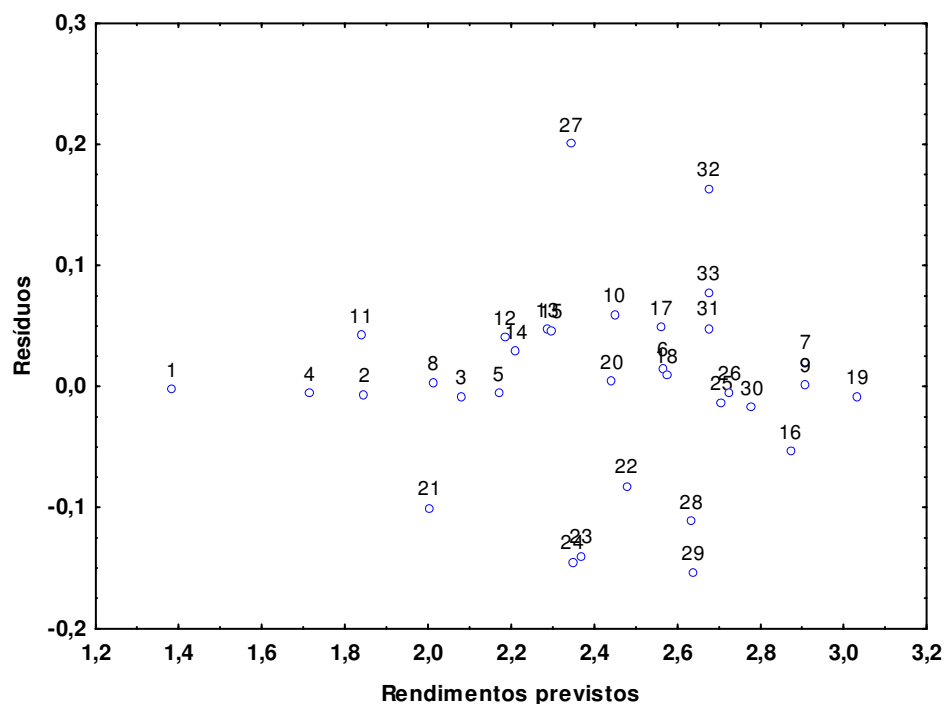


Figura 10. Resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial no estudo do rendimento do extrato bruto da *Annona muricata* L.

A Figura 11 mostra o gráfico dos rendimentos previstos *versus* rendimentos observados experimentalmente. Esta Figura mostra a linearidade dos pontos ao longo da reta indicando que o modelo cúbico especial está bem ajustado para os dados.

As curvas de nível ajustadas aos dados estão apresentadas na Figura 12. As proporções de acetato de etila e acetona na equação 19 são iguais a zero.

A Figura 12 mostra que a mistura ternária etanol:diclorometano:clorofórmio (1/3:1/3:1/3) (v/v/v), região central do triângulo e as misturas binárias etanol:diclorometano (1/2:1/2) (v/v) e etanol:clorofórmio (1/2:1/2) (v/v) apresentaram os maiores rendimentos de extrato bruto, em torno de 3,0 g.

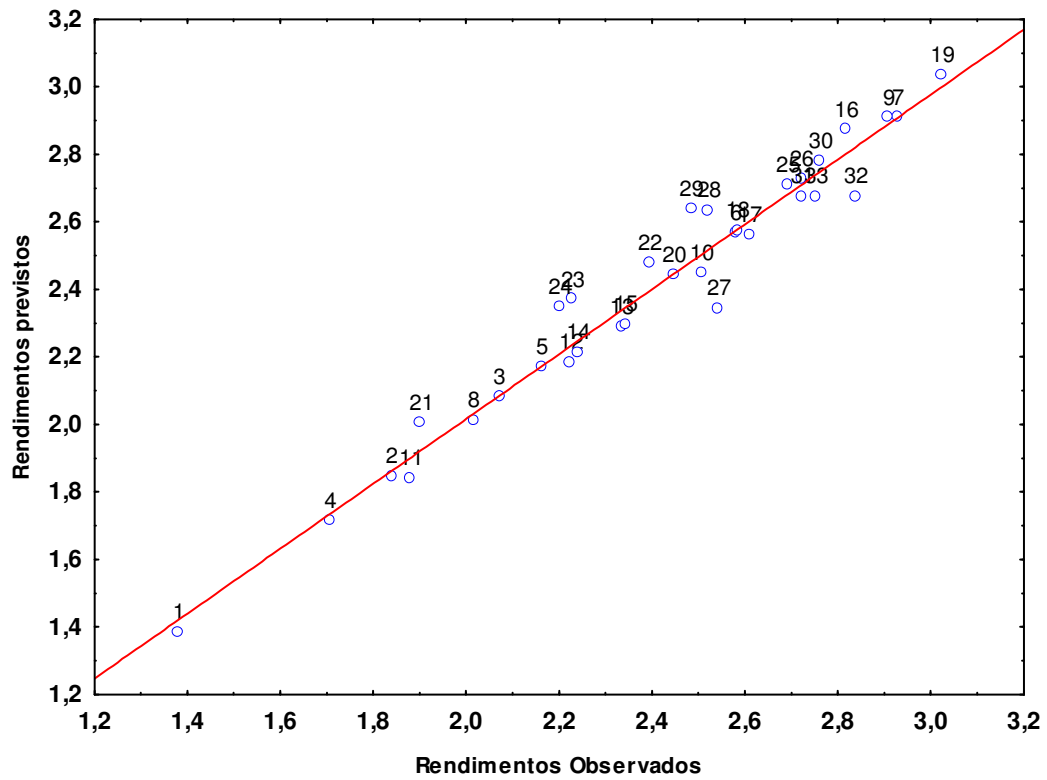


Figura 11. Rendimentos previstos pelo modelo cúbico especial no estudo do rendimento do extrato bruto da *Annona muricata* L.

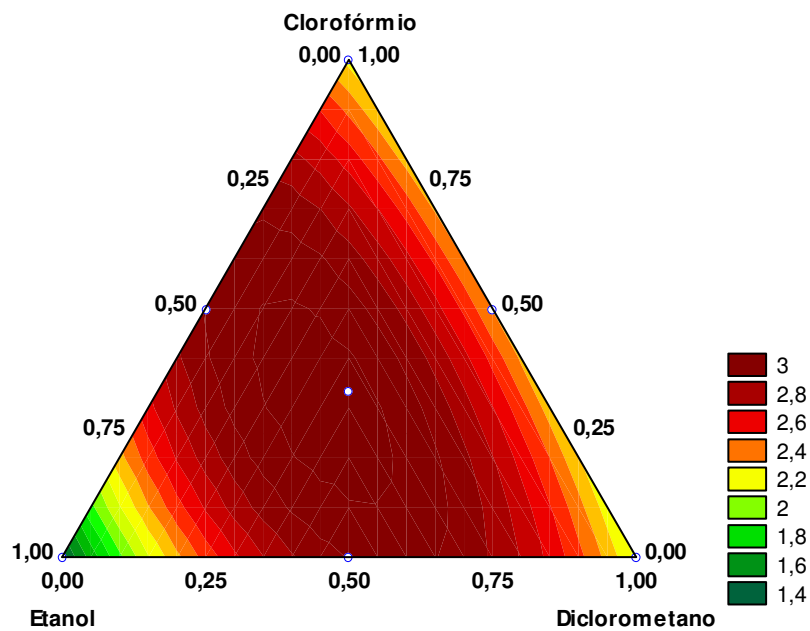


Figura 12. Curvas de nível ajustadas ao rendimento do extrato bruto obtido no planejamento de misturas de cinco componentes.

Cabe ressaltar que o maior rendimento encontrado na tabela é de 3,0247 g referente a interação etanol:diclorometano:clorofórmio (1/3:1/3:1/3) (v/v/v). No entanto, a equação matemática que representa o modelo cúbico especial não considerou esta interação significativa no nível de 95% de confiança.

Em seguida foi analisado o efeito dos solventes extratores sobre os rendimentos das frações neutras. Os modelos linear, quadrático e cúbico especial apresentaram falta de ajuste no nível de 95% de confiança e por isso não são indicados para otimizar o rendimento. Isso pode ter acontecido devido à falta de graus de liberdade para testar os modelos cúbico, quaternário e quinário completos. Desse modo os rendimentos das frações neutras foram avaliados através do gráfico representado na Figura 13. Esta figura mostra que todos os extratos obtidos com os solventes puros, exceto o diclorometano, apresentaram rendimentos abaixo de 1,8 g. O etanol apresentou o menor poder de extração em relação aos demais solventes puros, porém quando foi utilizado com os outros solventes simultaneamente no processo de extração, o rendimento da fração neutra aumentou significativamente. Este aumento indica um efeito sinérgico entre o etanol e os outros solventes do planejamento experimental.

As frações neutras obtidas com as misturas binárias (1/2:1/2) (v/v) também apresentaram rendimentos abaixo de 1,8 g. Entre essas misturas, o extrato de menor rendimento foi obtido com acetato de etila: acetona (1,3679 g), enquanto que as frações binárias de maiores rendimentos foram obtidas com a mistura diclorometano:clorofórmio (1,7865 g) e etanol:acetato de etila (1,7810 g). Este baixo rendimento mostra que não existe efeito sinérgico entre solventes extratores do mesmo grupo. Já as frações neutras obtidas através das misturas ternárias (1/3:1/3:1/3) (v/v/v) 60% delas mostraram uma massa acima de 1,8 g, sendo que o maior rendimento foi obtido com a mistura etanol:acetato de etila:diclorometano (1,9767 g). As frações

que não alcançaram rendimentos maiores que 1,8 g foram obtidas com as misturas diclorometano:acetona:clorofórmio (1,3627 g), acetato de etila:diclorometano:clorofórmio (1,7017 g), acetato de etila:diclorometano:acetona (1,5106 g) e etanol:diclorometano:acetona (1,2921 g). Estes resultados evidenciam um efeito antagônico no rendimento, quando o sistema extrator é composto principalmente de diclorometano:acetato de etila ou diclorometano:acetona ou estas misturas na presença de clorofórmio. Utilizando-se as misturas quaternárias (1/4:1/4:1/4:1/4) (v/v/v/v) alcançaram-se rendimentos maiores que 1,8 g, salvo para a mistura acetato de etila:diclorometano:acetona:clorofórmio. A mistura quinquária etanol:acetato de etila:diclorometano:acetona:clorofórmio (1/5:1/5:1/5:1/5:1/5) (v:v:v:v:v) também apresentou rendimento acima de 1,8 g, como pode ser visto na Figura 13.

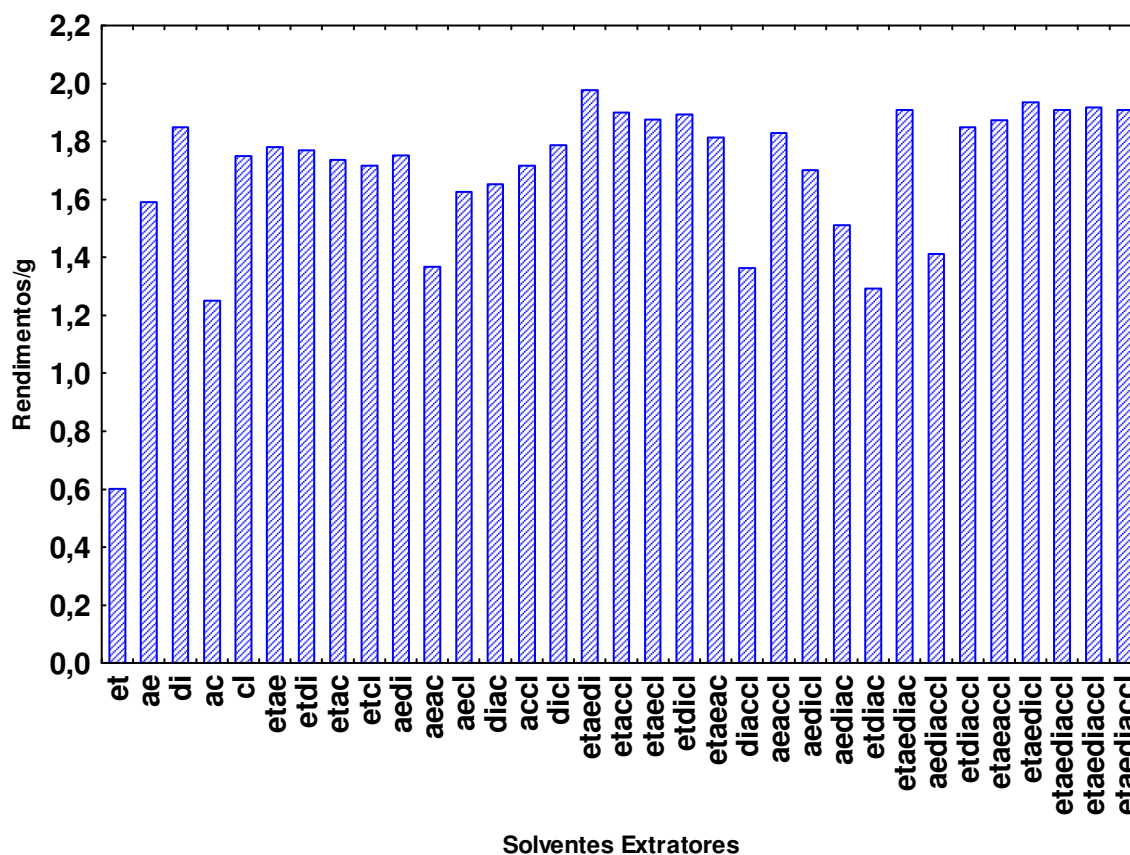


Figura 13. Gráfico do rendimento da fração neutra obtida pelo planejamento de misturas de cinco componentes (et: etanol; ae: acetato de etila; di: diclorometano; ac: acetona e cl: clorofórmio).

Os resultados mostraram que o etanol puro extrai a menor quantidade de gorduras e graxas ou metabólitos de polaridade neutra, como por exemplo, alcalóides de caráter neutro⁴⁴ das folhas da *Annona muricata* L. Se o objetivo for maximizar o rendimento desta fração o etanol seria o pior solvente extrator.

Embora o modelo cúbico especial não possa ser usado para prever os rendimentos da fração neutra devido à falta de ajuste, ele pode ser utilizado para mostrar os efeitos dos solventes nos resultados encontrados experimentalmente.

A Tabela 4 apresenta os valores dos coeficientes da regressão, o erro padrão dos coeficientes e o valor de t de *student* com 8 graus de liberdade.

Tabela 4. Coeficientes de regressão para o modelo cúbico especial no estudo da fração neutra da *Annona muricata* L.

Fator	Coeficiente	Erro padrão	t(8)
Etanol (et)	0,60818	0,147526	4,12251
Acetato de etila (ae)	1,59420	0,147526	10,80628
Diclorometano (di)	1,85611	0,147526	12,58161
Acetona (ac)	1,25709	0,147526	8,52117
Clorofórmio (cl)	1,75268	0,147526	11,88051
et:ae	2,62326	0,713775	3,67519
et:di	1,91887	0,713775	2,68833
et:ac	3,01788	0,713775	4,22805
et:cl	2,04107	0,713775	2,85953
et:ae:di	5,32676	4,417987	1,20570
et:ae:ac	3,22483	4,417987	0,72993
et:di:cl	4,23446	4,417987	0,95846
et:ac:cl	2,96262	4,417987	0,67058
ae:ac:cl	5,00813	4,417987	1,13358

Os termos significativos no nível de 95% de confiança do modelo estão em negrito. A análise da Tabela 4 mostra que as interações ternárias (1/3:1/3:1/3) (v/v/v) não são significativas no nível de 95%, mas se observa que os maiores rendimentos foram obtidos em misturas ternárias

de etanol:acetato de etila:diclorometano, etanol:acetato de etila:acetona, etanol:diclorometano:clorofórmio, etanol:acetona:clorofórmio e acetato de etila:acetona:clorofórmio. Isto significa que a combinação desses solventes extratores é importante para aumentar o rendimento da fração neutra, em relação aos solventes puros, o que pode ser confirmado na Figura 13.

Os rendimentos das frações da fase orgânica (fração de polaridade intermediária) também foram analisados usando os modelos de misturas, mas nenhum deles se ajustou aos rendimentos dessas frações, no nível de 95% de confiança. O gráfico para os rendimentos das frações da fase orgânica está representado pela Figura 14.

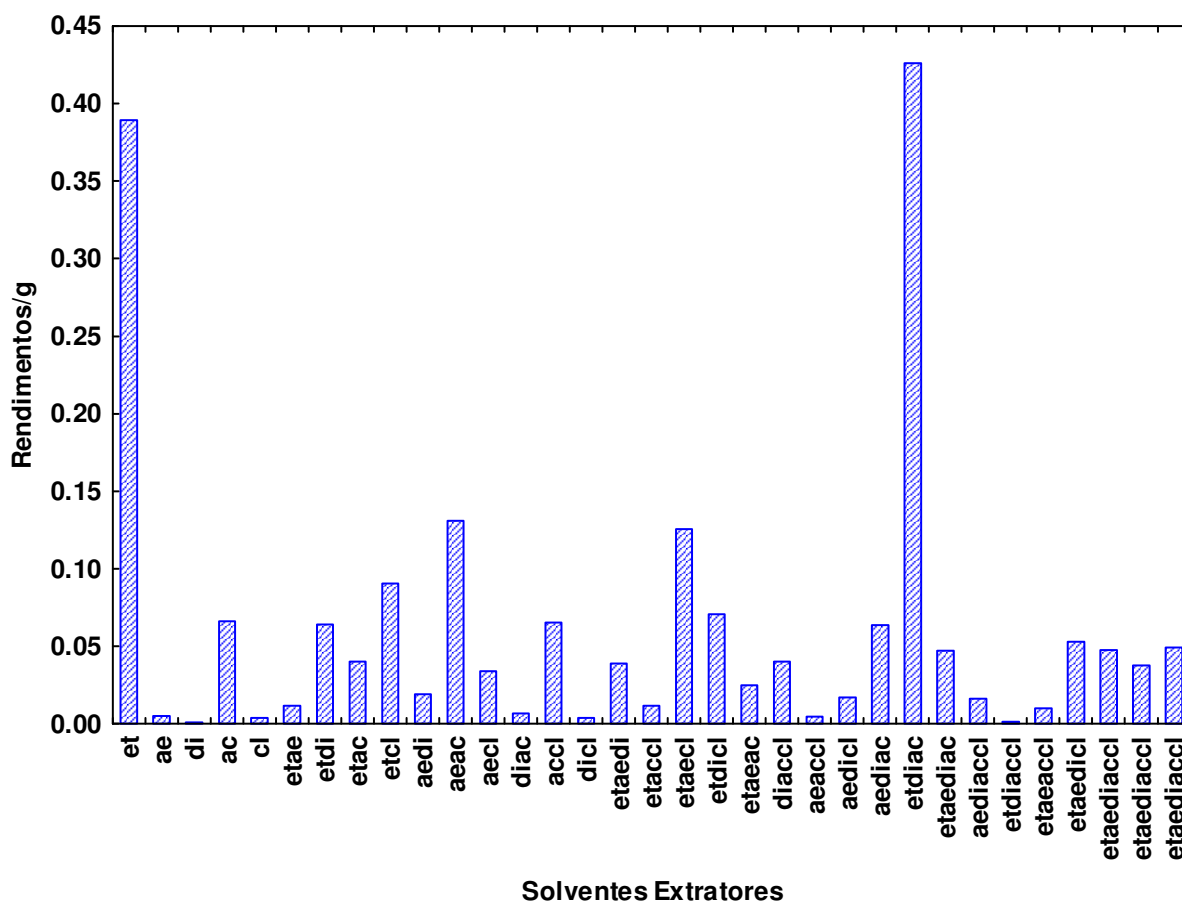


Figura 14. Gráfico do rendimento da fração da fase orgânica obtido pelo planejamento de misturas de cinco componentes (et: etanol; ae: acetato de etila; di: diclorometano; ac: acetona e cl: clorofórmio).

As massas obtidas usando diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e acetona foram muito baixas, enquanto que para o etanol foi bastante elevada (0,3894 g), indicando que o etanol tem um forte poder de extração em relação aos demais solventes puros.

Um alto rendimento (0,4259 g) também é observado quando utiliza etanol:diclorometano:acetona (1/3:1/3:1/3) (v/v/v). Isto mostra o grande efeito sinérgico que ocorre entre os três solventes.

Os rendimentos observados no gráfico mostraram que a fração rica em compostos fenólicos e terpenóides é extraída em maior quantidade das folhas da *Annona muricata*, quando se utiliza o etanol ou a mistura etanol:diclorometano:acetona.

Considerando que o etanol extrai grande quantidade de compostos fenólicos, este resultado mostra que a *Annona muricata* L. é rica em compostos fenólicos e terpenóides. A Tabela 5 apresenta os valores dos coeficientes da regressão, o erro padrão dos coeficientes e o valor de t.

Os termos significativos previstos pelo modelo são os valores em negrito. Nota-se que os termos significativos são referentes ao solvente etanol e a mistura ternária etanol:diclorometano:acetona (1/3:1/3:1/3) (v/v/v), solventes responsáveis por um grande aumento dos rendimentos da fração da fase orgânica em relação aos demais solventes extratores, Figura 14.

Os rendimentos das frações básicas foram investigados com o auxílio dos modelos linear, quadrático e cúbico especial e todos apresentaram falta de ajuste no nível de 95% de confiança. A Figura 15 mostra o gráfico dos rendimentos para as frações básicas.

O gráfico dos rendimentos (Figura 15) mostra que os extratos obtidos através dos solventes puros apresentaram um baixo rendimento, exceto para o clorofórmio. As misturas binárias (1/2:1/2) (v/v) e ternárias (1/3:1/3:1/3) (v/v/v) não aumentaram o rendimento

significativamente, o que indica que essas proporções de solventes não possuem efeito sinérgico. Por outro lado, a combinação de quatro solventes acetato de etila:diclorometano:acetona:clorofórmio, etanol:acetato de etila:acetona:clorofórmio e etanol:acetato de etila:diclorometano:clorofórmio levaram ao aumento dos rendimentos nas frações. Nota-se que em todas essas misturas estão presentes acetato de etila e clorofórmio. Os rendimentos das frações básicas obtidas através da mistura quinária também foram elevados.

Os resultados mostraram que para obter altos rendimentos da fração rica em alcalóides é necessário utilizar a mistura quaternária etanol:acetato de etila:diclorometano:clorofórmio ou a mistura dos cinco solventes, como pode ser visto na Figura 15.

Tabela 5. Coeficientes de regressão para o modelo cúbico especial no estudo da fração da fase orgânica da *Annona muricata* L

Fator	Coefficiente	Erro padrão	t(8)
Etanol (et)	0,38638	0,065350	5,91252
Acetato de etila (ae)	0,00394	0,065350	0,06022
Diclorometano (di)	-0,00187	0,065350	-0,02854
Acetona (ac)	0,06344	0,065350	0,97078
Clorofórmio (cl)	0,00220	0,065350	0,03370
et:ae	-0,69424	0,316182	-2,19570
et:di	-0,41583	0,316182	-1,31517
et:ac	-0,64581	0,316182	-2,04252
et:cl	-0,36172	0,316182	-1,14403
ae:di	0,10694	0,316182	0,33824
ae:ac	0,42017	0,316182	1,32888
ae:cl	0,11426	0,316182	0,36136
di:ac	-0,00742	0,316182	-0,02348
di:cl	0,06387	0,316182	0,20199
ac:cl	0,17549	0,316182	0,55502
et:ae:di	-0,35228	1,957045	-0,18001
et:ae:ac	-1,49109	1,957045	-0,76191
et:ae:cl	2,76451	1,957045	1,41259
et:di:ac	8,52325	1,957045	4,35517
et:di:cl	-0,65665	1,957045	-0,33553
et:ac:cl	-2,41375	1,957045	-1,23337
ae:di:ac	-1,15081	1,957045	-0,58803
ae:di:cl	-0,23661	1,957045	-0,12090
ae:ac:cl	-2,35431	1,957045	-1,20299
di:ac:cl	-1,23287	1,957045	-0,62997

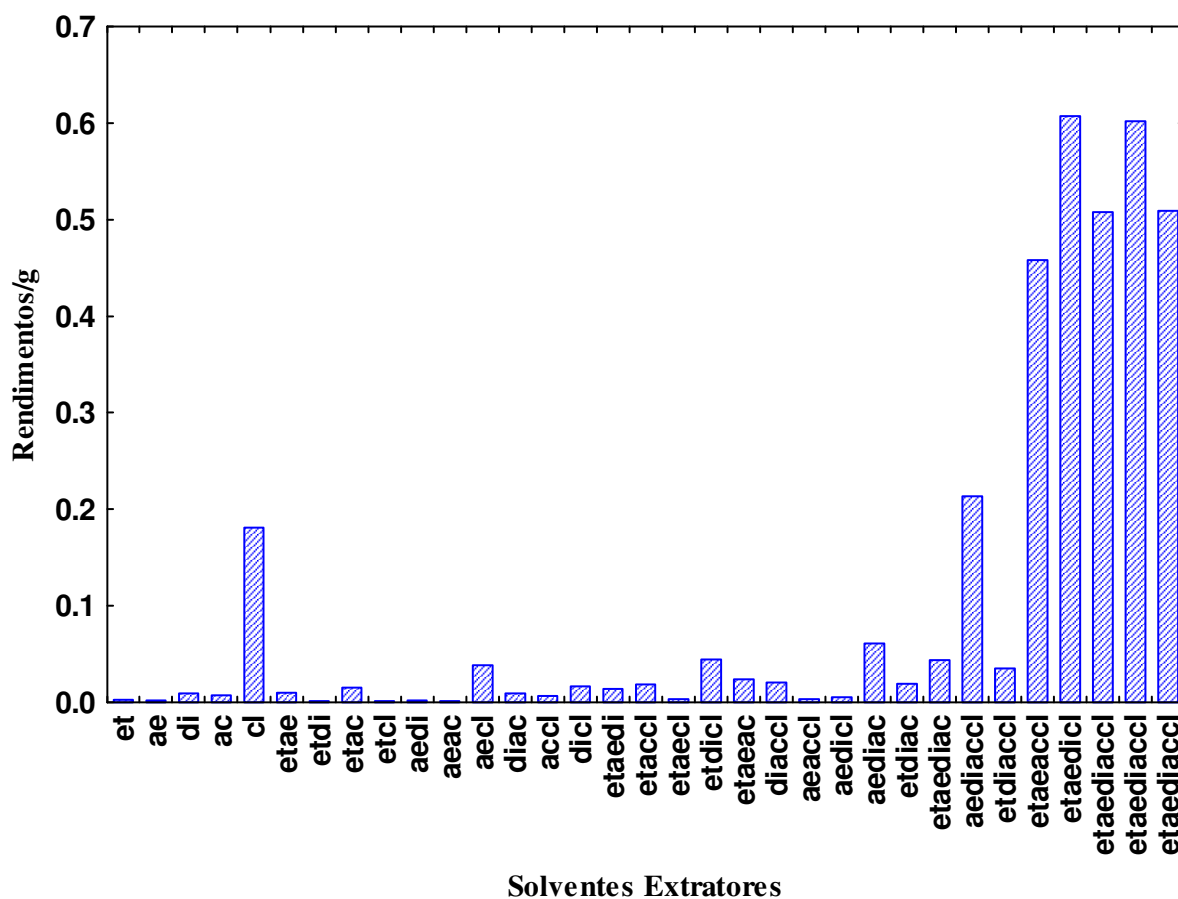


Figura 15. Gráfico do rendimento da fração básica obtido pelo planejamento de misturas de cinco componentes (et: etanol; ae: acetato de etila; di: diclorometano; ac: acetona e cl: clorofórmio).

Os rendimentos obtidos para as fibras estão apresentados na Figura 16. Na Figura observa-se que as fibras obtidas utilizando os solventes puros apresentaram rendimentos abaixo de 0,22 g. O etanol foi o que mostrou menor poder de extração, porém quando misturado com outros solventes o rendimento aumentou significativamente. Entre as misturas binárias (1/2:1/2) (v/v) as interações que apresentaram menor poder de extração foram etanol:acetona (0,1371 g) e acetato de etila:acetona (0,1506 g). A mistura binária acetato de etila:diclorometano apresentou um grande efeito sinérgico com rendimento de 0,5585 g. É importante salientar que a mistura ternária (1/3:1/3:1/3) (v/v/v) com menor poder de extração foi etanol:acetato de etila:acetona (0,0923 g). As misturas de quatro solventes (1/4:1/4:1/4:1/4) (v/v/v/v) que apresentaram maior

poder de extração foram etanol:acetato de etila:diclorometano:acetona e acetato de etila:diclorometano:acetona:clorofórmio.

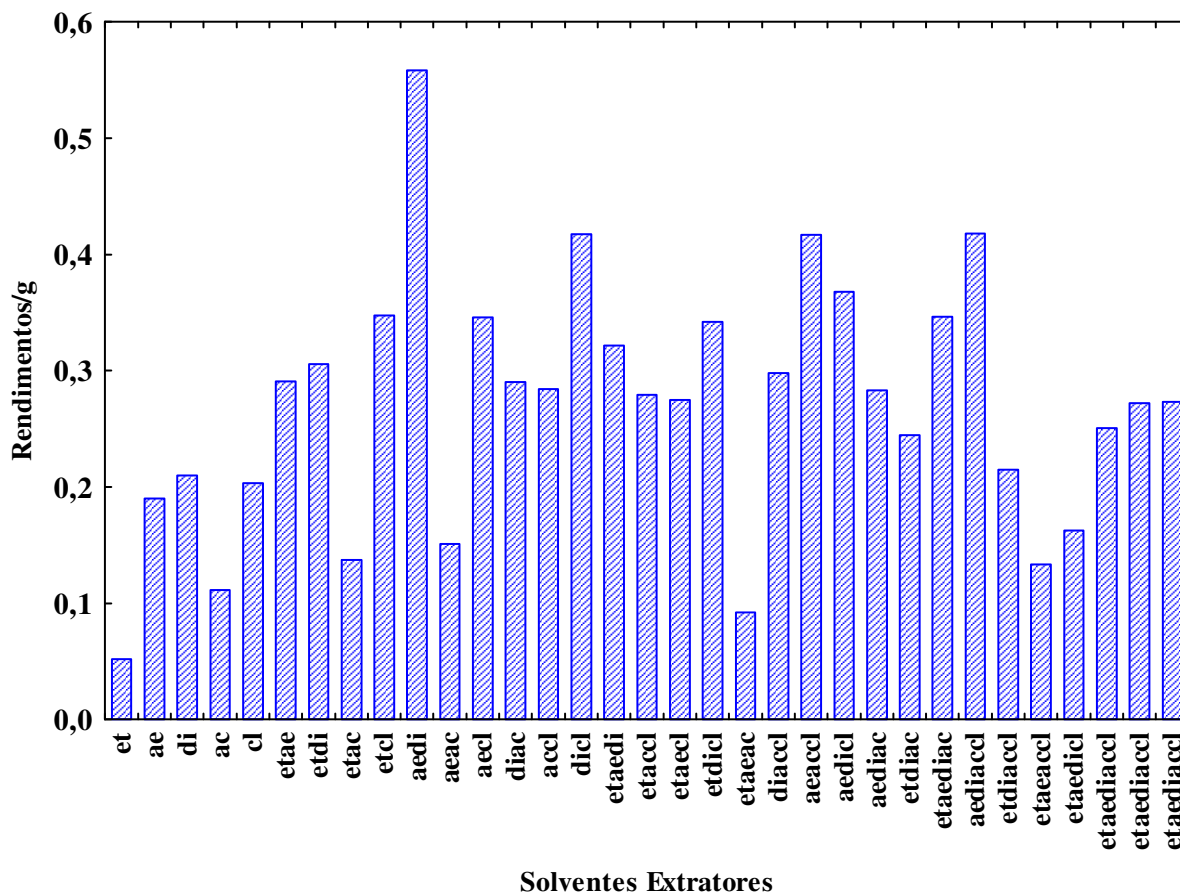


Figura 16. Gráfico do rendimento da fibra obtida pelo planejamento de misturas de cinco componentes (et: etanol; ae: acetato de etila; di: diclorometano; ac: acetona e cl: clorofórmio).

A Tabela 6 mostra os valores dos coeficientes da regressão, o erro padrão dos coeficientes e os valores de t.

Os termos significativos previstos pelo modelo são os valores em negrito. Entretanto incluindo apenas estes termos na equação de previsão o modelo mostra falta de ajuste. Os coeficientes estatisticamente significativos dos solventes puros referem-se àqueles de maior poder de extração como pode ser visto na Figura 16. A Tabela de coeficientes mostra que as misturas binárias (1/2:1/2) (v/v) significativas são etanol:clorofórmio, acetato de

etila:diclorometano e diclorometano:clorofórmio. Entre elas, a interação que apresenta maior efeito sinérgico é a mistura acetato de etila:diclorometano como confirmado na Figura 16.

Tabela 6. Coeficientes de regressão para o modelo cúbico especial no estudo da fibra da *Annona muricata* L.

Fator	Coefficiente	Erro padrão	t(8)
Etanol (et)	0,05106	0,073542	0,69430
Acetato de etila (ae)	0,19083	0,073542	2,59481
Diclorometano (di)	0,21149	0,073542	2,87584
Acetona (ac)	0,11266	0,073542	1,53192
Clorofórmio (cl)	0,20196	0,073542	2,74622
et:ae	0,68893	0,355819	1,93618
et:di	0,68544	0,355819	1,92636
et:ac	0,21460	0,355819	0,60313
et:cl	0,96433	0,355819	2,71016
ae:di	1,37175	0,355819	3,85520
ae:ac	-0,05788	0,355819	-0,16266
ae:cl	0,63144	0,355819	1,77462
di:ac	0,43823	0,355819	1,23160
di:cl	0,85315	0,355819	2,39771
ac:cl	0,52312	0,355819	1,47018
et:ae:di	-3,16750	2,202380	-1,43822
et:ae:ac	-2,86834	2,202380	-1,30238
et:ae:cl	-5,02295	2,202380	-2,28069
et:di:ac	0,05842	2,202380	0,02653
et:di:cl	-3,56798	2,202380	-1,62006
et:ac:cl	-2,06673	2,202380	-0,93841
ae:di:ac	-0,32383	2,202380	-0,14703
ae:di:cl	-4,12003	2,202380	-1,87072
ae:ac:cl	3,27083	2,202380	1,48513
di:ac:cl	-1,79771	2,202380	-0,81626

Considerando que o rendimento não é o único parâmetro para mostrar a eficiência do método de extração, as frações da fase orgânica e básica foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A eficiência na extração foi avaliada pelo número de picos no cromatograma. O efeito da composição da fase móvel na separação dos extratos foi investigado utilizando duas diferentes fases, a fase móvel E, cuja composição química foi 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v) e a fase móvel R constituída por 35% de acetonitrila, 35% de metanol e 30% de água (v/v/v). Para a análise exploratória a fase móvel E foi

escolhida, porque os cromatogramas apresentaram maior número de picos em relação aos cromatogramas obtidos com a fase móvel R.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores dos rendimentos, o número de picos, com área superior a 0,5%, presentes nos cromatogramas e os solventes extratores utilizados para cada extrato.

Tabela 7. Valores dos rendimentos e número de picos da fração da fase orgânica obtida das folhas da *Annona muricata* L.

Extrato	Solvente Extrator	Rendimento/g	Nº picos
1	Etanol (et)	0,3894	19
2	Acetato de etila (ae)	0,0050	28
3	Diclorometano (di)	0,0010	22
4	Acetona (ac)	0,0662	27
5	Clorofórmio (cl)	0,0037	23
6	et:ae	0,0117	16
7	et:di	0,0640	29
8	et:ac	0,0400	21
9	et:cl	0,0905	29
10	ae:di	0,0191	23
11	ae:ac	0,1309	28
12	ae:cl	0,0339	24
13	di:ac	0,0067	27
14	ac:cl	0,0654	24
15	di:cl	0,0040	23
16	et:ae:di	0,0389	23
17	et:ac:cl	0,0116	21
18	et:ae:cl	0,1256	22
19	et:di:cl	0,0709	29
20	et:ae:ac	0,0249	19
21	di:ac:cl	0,0400	24
22	ae:ac:cl	0,0049	24
23	ae:di:cl	0,0172	23
24	ae:di:ac	0,0639	24
25	et:di:ac	0,4259	28
26	et:ae:di:ac	0,0472	26
27	ae:di:ac:cl	0,0162	26
28	et:di:ac:cl	0,0014	22
29	et:ae:ac:cl	0,0100	25
30	et:ae:di:cl	0,0531	23
31	et:ae:di:ac:cl	0,0476	26
32	et:ae:di:ac:cl	0,0377	22
33	et:ae:di:ac:cl	0,0492	22

De acordo com a Tabela 7, entre os solventes puros, o etanol extraiu a maior quantidade em massa da fração da fase orgânica. Porém foi o solvente que retirou a menor diversidade de compostos em relação aos demais solventes puros (Figura 17). A maior quantidade de picos encontrados foi para os extratos 2 e 4 que tiveram rendimentos baixos comparado com o extrato 1, considerando os extratos puros. Isto sugere que um alto rendimento da fração não garante uma grande diversidade de compostos químicos extraídos das folhas da *Annona muricata*, como pode ser visto na Figura 18.

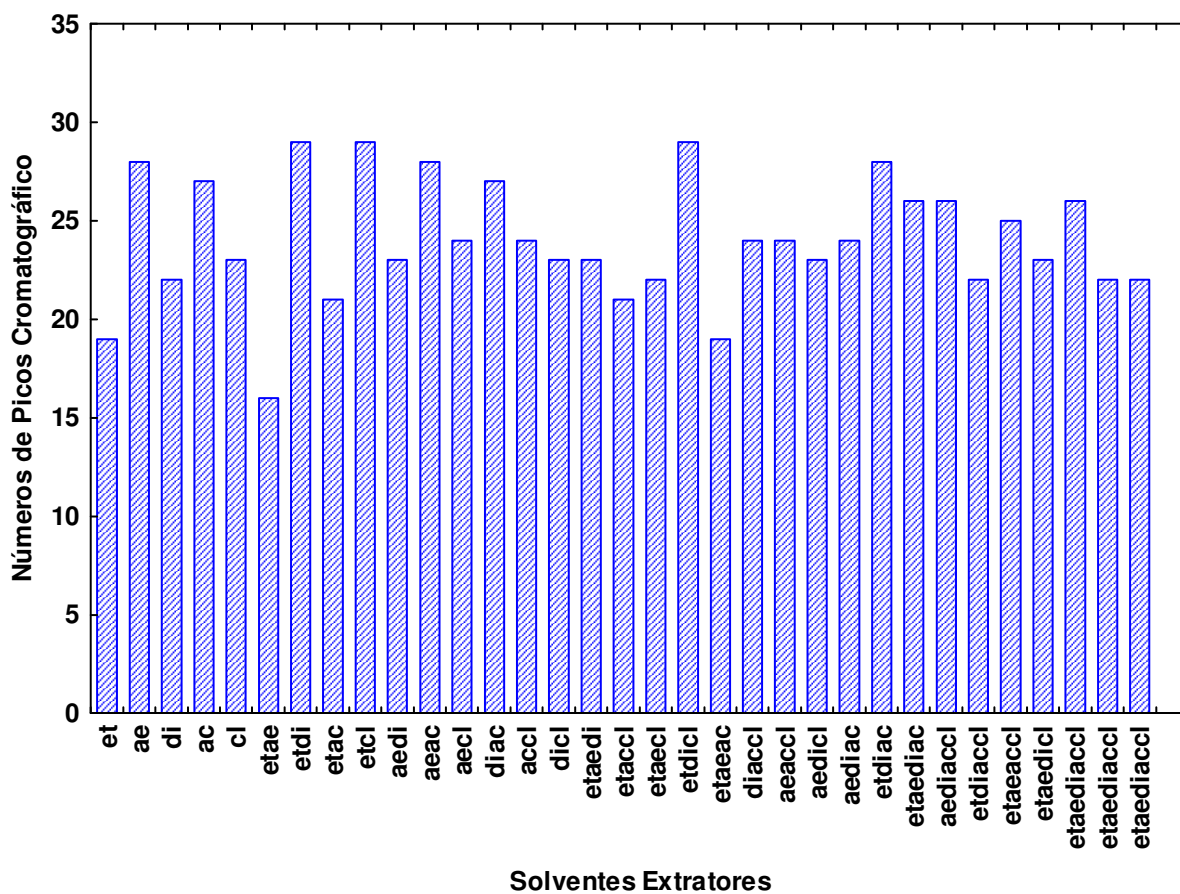


Figura 17. Número de picos cromatográficos da fração da fase orgânica das folhas da *Annona muricata* L.

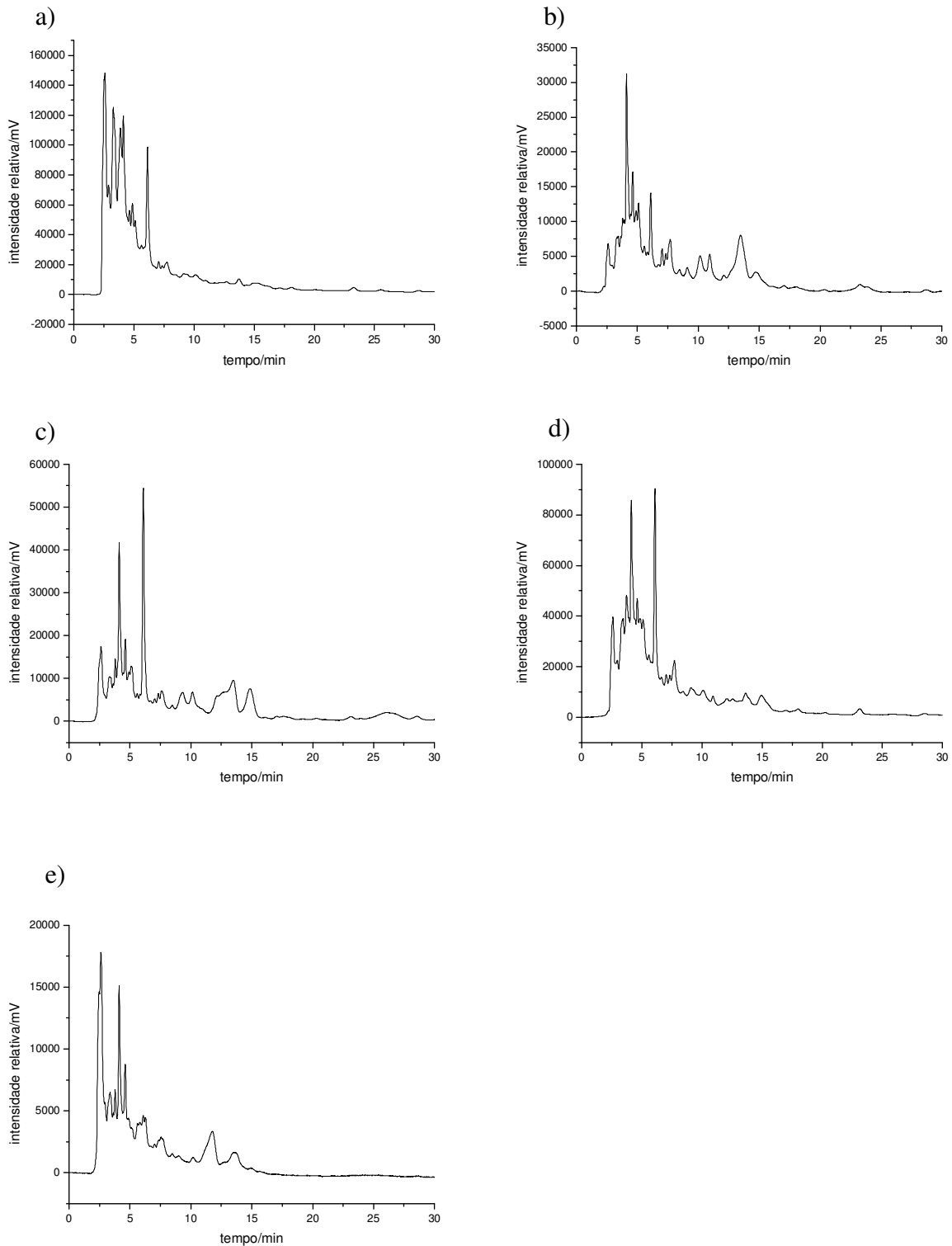


Figura 18. Cromatogramas das separações das frações da fase orgânicas (a) etanol 100%, (b) acetato de etila 100%, (c) diclorometano 100%, (d) acetona 100% e (e) clorofórmio 100%. Injeção: 20 μ L; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

O maior rendimento obtido para a fração da fase orgânica foi 0,4259 g utilizando a mistura ternária etanol:diclorometano:acetona (1/3:1/3:1/3) (v/v/v) como solvente extrator, Tabela 7. Esta mistura além de apresentar um forte poder de extração, também mostra propriedades adequadas para extrair grande diversidade de compostos das folhas da *Annona muricata*, como mostra o cromatograma desta fração com 28 picos, Figura 19.

A Figura 20 mostra o cromatograma da fração da fase orgânica de menor rendimento (0,0010 g) obtida com o diclorometano. Pelo cromatograma nota-se que apesar do baixo rendimento, a diversidade de compostos extraídos é maior quando comparado com o cromatograma do extrato 1 (etanol puro).

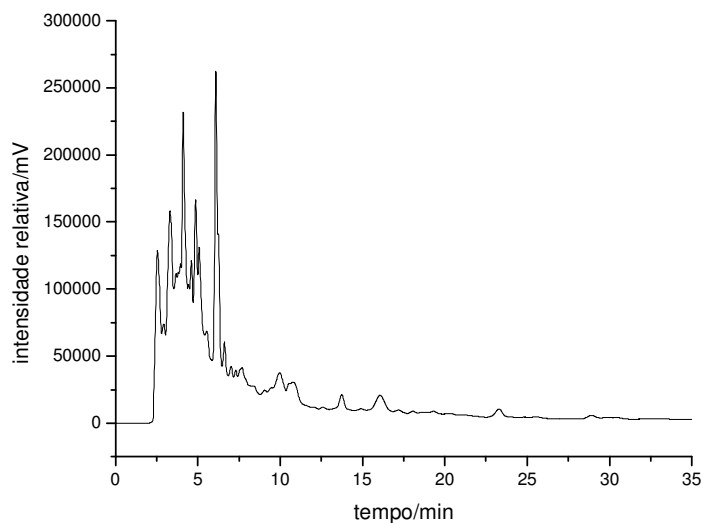


Figura 19. Cromatograma da separação da fração da fase orgânica obtida com a mistura ternária etanol:diclorometano:acetona (1/3:1/3:1/3) (v:v:v). Injeção: 20 μ L; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

De acordo com os números de picos presentes em cada cromatograma (Tabela 7) foi possível observar que a melhor impressão digital cromatográfica para a *Annona muricata* é obtida quando utiliza a mistura binária etanol:diclorometano (1/2:1/2) (v/v) ou a mistura

etanol:clorofórmio (1/2:1/2) (v/v). Também pode-se obter a impressão digital com o maior número de picos utilizando etanol:diclorometano:clorofórmio (1/3:1/3:1/3) (v/v/v).

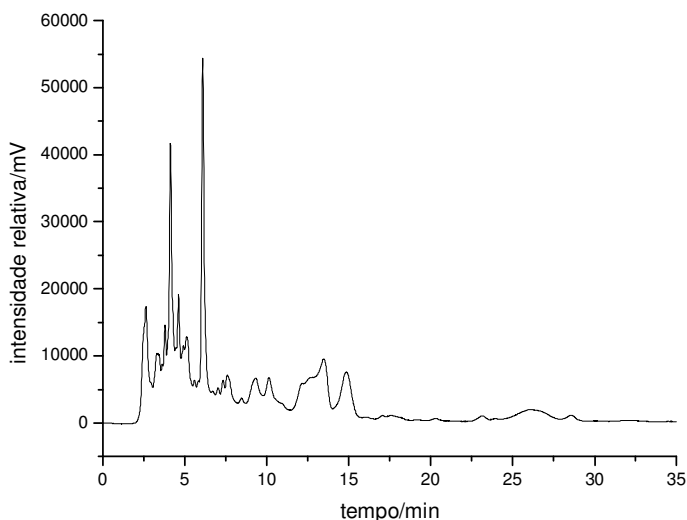


Figura 20. Cromatograma da separação da fração da fase orgânica obtida com 100% de diclorometano. Injeção: 20 μ L; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

Nos cromatogramas também observam-se dois picos para as folhas da *Annona muricata*, um com tempo de retenção 4,12 minutos e outro em 6,12 minutos. Estes picos estão sempre presentes nos cromatogramas independente do sistema extrator. Dessa forma, a presença destes dois picos na fração da fase orgânica pode contribuir na identificação da *Annona muricata*.

Na Tabela 8 estão os valores dos rendimentos das frações básicas, o número de picos encontrados nos cromatogramas, bem como os solventes extratores utilizados para cada extrato.

Pela Tabela 8 e Figuras 21 e 22 observa-se que o acetato de etila, entre os solventes puros, apresentou o maior número de picos e também um dos menores rendimentos. O clorofórmio apesar de aumentar o rendimento da fração básica, apresentou a menor diversidade de compostos químicos, observado pelo número de picos. Isto mostra que o solvente com um forte poder de

extração não assegura a maior diversidade de compostos químicos extraídos das folhas da *Annona muricata*, Figura 21.

Tabela 8. Valores dos rendimentos e número de picos da fração básica obtida das folhas da *Annona muricata* L.

Amostra	Solvente Extrator	Rendimento/g	Nº de picos
1	Etanol (et)	0,0026	12
2	Acetato de etila (ae)	0,0021	16
3	Diclorometano (di)	0,0094	14
4	Acetona (ac)	0,0071	15
5	Clorofórmio (cl)	0,1807	11
6	et:ae	0,0100	15
7	et:di	0,0010	09
8	et:ac	0,0152	16
9	et:cl	0,0012	11
10	ae:di	0,0016	14
11	ae:ac	0,0014	14
12	ae:cl	0,0381	15
13	di:ac	0,0092	12
14	ac:cl	0,0063	06
15	di:cl	0,0163	14
16	et:ae:di	0,0140	13
17	et:ac:cl	0,0187	14
18	et:ae:cl	0,0032	15
19	et:di:cl	0,0443	12
20	et:ae:ac	0,0240	19
21	di:ac:cl	0,0207	18
22	ae:ac:cl	0,0030	12
23	ae:di:cl	0,0049	12
24	ae:di:ac	0,0609	14
25	et:di:ac	0,0189	10
26	et:ae:di:ac	0,0437	17
27	ae:di:ac:cl	0,2135	13
28	et:di:ac:cl	0,0348	16
29	et:ae:ac:cl	0,4579	15
30	et:ae:di:cl	0,6070	12
31	et:ae:di:ac:cl	0,5080	14
32	et:ae:di:ac:cl	0,6020	16
33	et:ae:di:ac:cl	0,5093	16

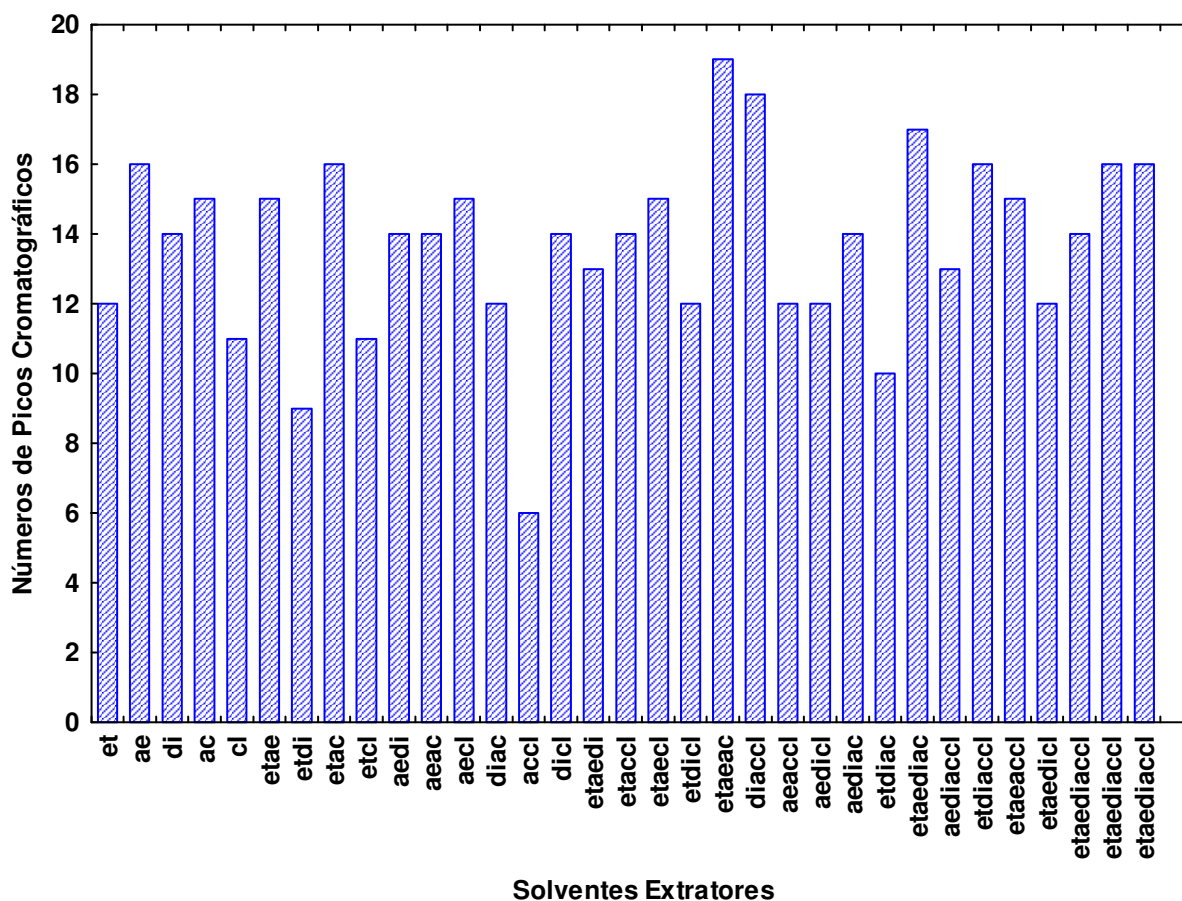


Figura 21. Número de picos cromatográficos da fração básica das folhas da *Annona muricata* L.

A fração básica de menor rendimento foi obtida com a mistura binária etanol:diclorometano (1/2:1/2) (v/v). Este extrato também apresentou pouca diversidade de compostos químicos, Figura 23 quando comparado com o extrato 20 (etanol:acetato de etila:acetona).

A análise dos diferentes número de picos encontrados em cada cromatograma também mostra que para obter a impressão digital da *Annona muricata* é preciso utilizar a mistura ternária etanol:acetato de etila:acetona (1/3:1/3:1/3) (v/v/v), Figura 24.

Em todos os cromatogramas das frações básicas nota-se um pico no tempo de retenção 6,30 minutos. Esta informação pode ser usada na identificação da *Annona muricata*.

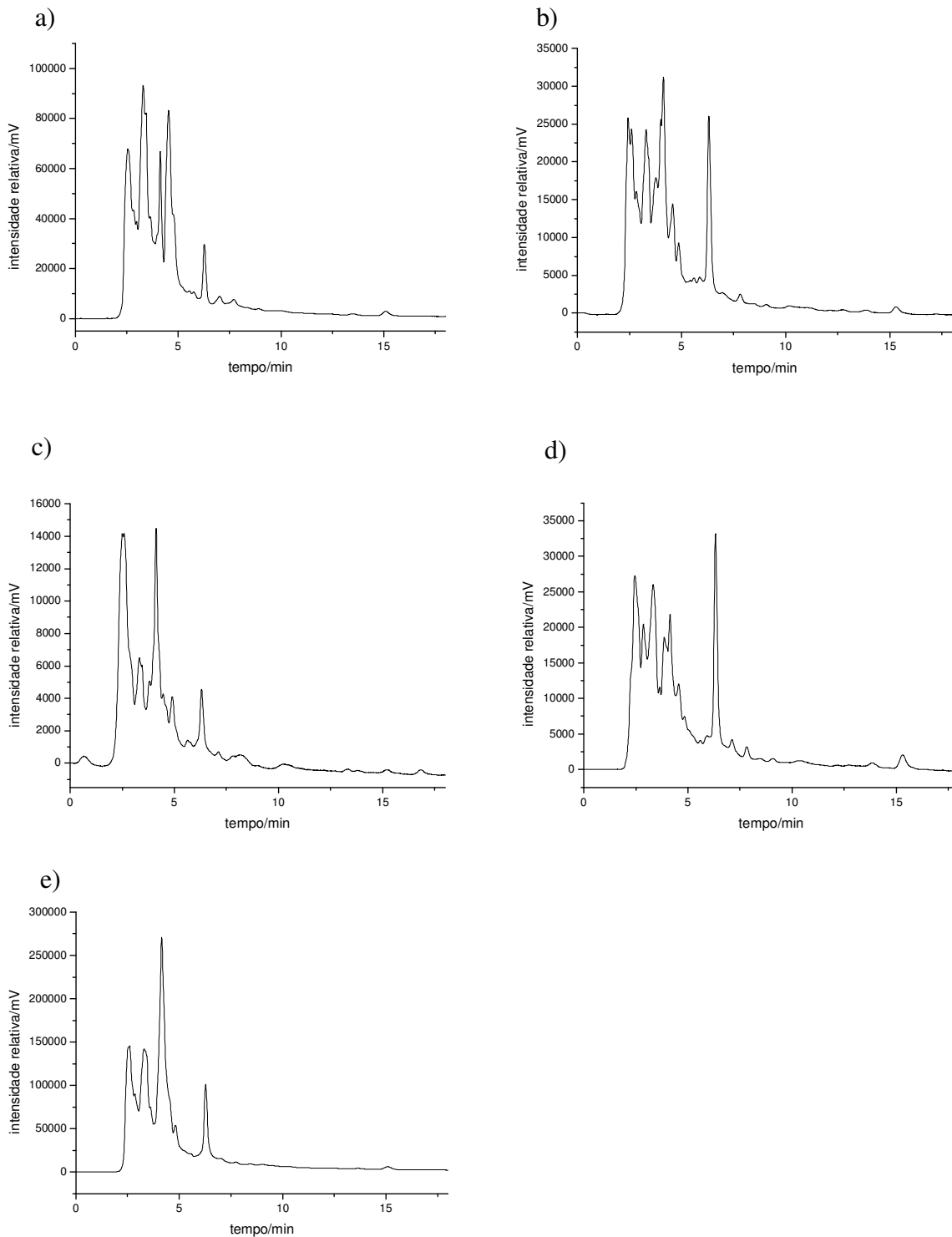


Figura 22. Cromatogramas das separações das frações básicas (a) etanol 100%, (b) acetato de etila 100%, (c) diclorometano 100%, (d) acetona 100% e (e) clorofórmio 100%. Injeção: 20 μ L; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

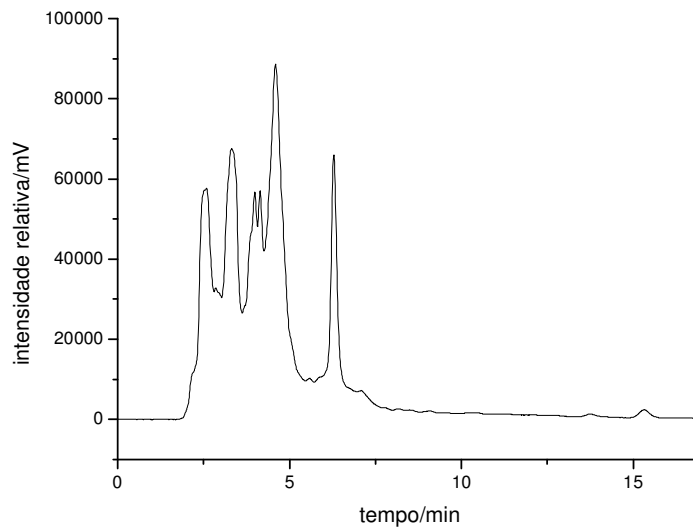


Figura 23. Cromatograma da separação da fração básica obtida com a mistura binária etanol:diclorometano (1/2:1/2) (v/v). Injeção: 20 μ L; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

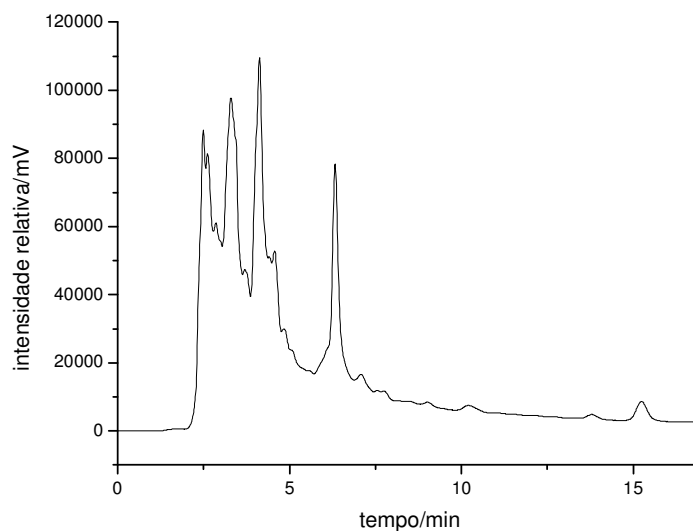


Figura 24. Cromatograma da separação da fração básica obtida com a mistura ternária etanol:acetato de etila:acetona (1/3:1/3:1/3) (v/v/v). Injeção: 20 μ L; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

As 31 frações da fase orgânica foram analisadas por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e os espectros foram analisados por métodos quimiométricos.

Os dados dos espectros foram colocados numa matriz 31x1866 (31 extratos e 1866 valores de absorvâncias nos diferentes números de onda, cm^{-1}). Os dados da matriz foram normalizados e submetidos a análise de componentes principais com rotação varimax e análise hierárquica. 88% da variância total dos dados são explicados por 3 componentes principais ou fatores. O gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 é mostrado na Figura 25. Observa-se nesta figura seis grupos distintos, indicando que os extratos apresentam composições química diferentes com relação ao solvente extrator.

O fator 2 discrimina os grupos I e II, localizados na parte mais positiva, dos demais grupos localizados na parte menos positiva. O fator 3 separa o grupo III localizado na parte mais positiva dos outros grupos. A análise hierárquica foi aplicada aos dados dos espectros das 31 frações, e o dendrograma obtido está apresentado na Figura 26. O valor de conexão 50 mostra seis grupos diferentes o que confirma os resultados obtidos no gráfico dos fatores.

Os loadings dos fatores 2 e 3 estão apresentados na Figura 27. Este gráfico mostra quais são os números de onda que explicam a distinção entre os seis grupos mostrados no gráfico dos escores.

No gráfico dos loadings existem cinco regiões discriminatórias. Os grupos I e II da Figura 25 que estão localizados na parte mais positiva do fator 2 sofrem maior influência das variáveis que apresentam valores de loadings positivos no fator 2, enquanto que os grupos III, IV, V e VI sofrem menor influência desses valores de loadings. As regiões espectrais que caracterizam esses grupos apresentam os números de onda 1037, 1087, 1125, 1750, 2850, 2925 e 3380 cm^{-1} . Estas regiões são características dos grupos funcionais presentes nas acetogeninas de Annonacea. Para

exemplificar esta discriminação será usado como exemplo um espectro do grupo I (15) e outro do grupo VI (31), Figura 28.

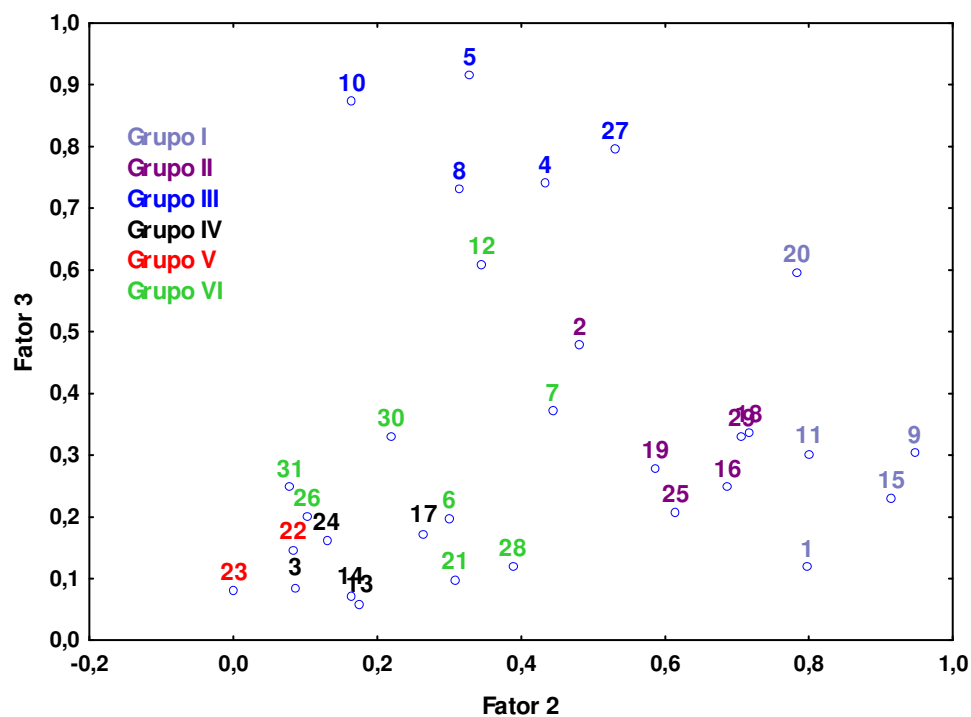


Figura 25. Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos dados espectrais das 31 frações da fase orgânica das folhas da *Annona muricata* L.

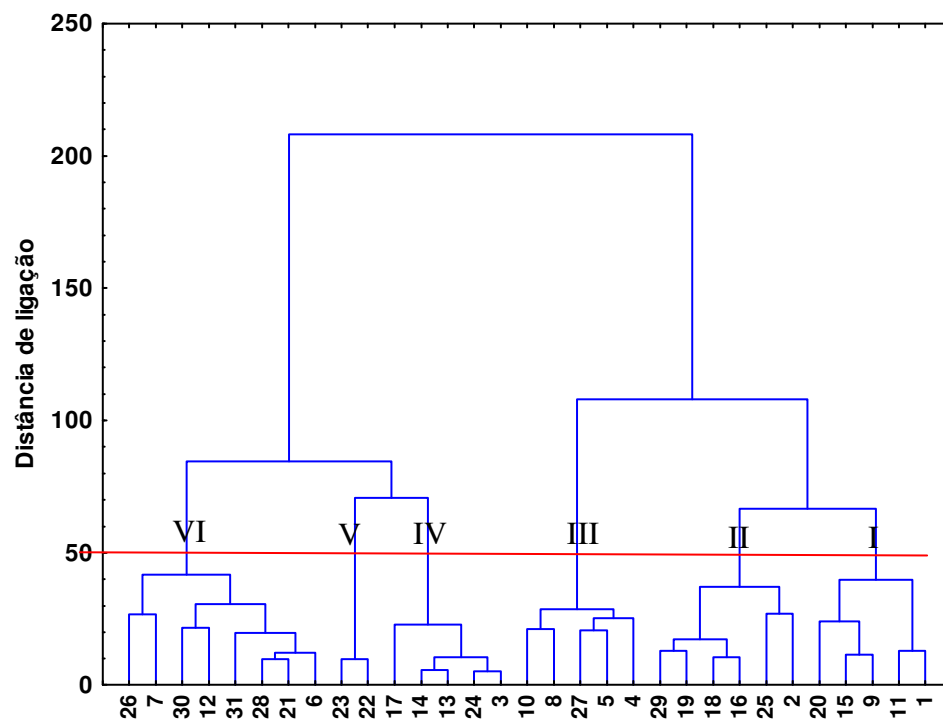


Figura 26. Dendrograma dos espectros IVTF dos extratos das 31 frações da fase orgânica obtidas das folhas da *Annona muricata* L.

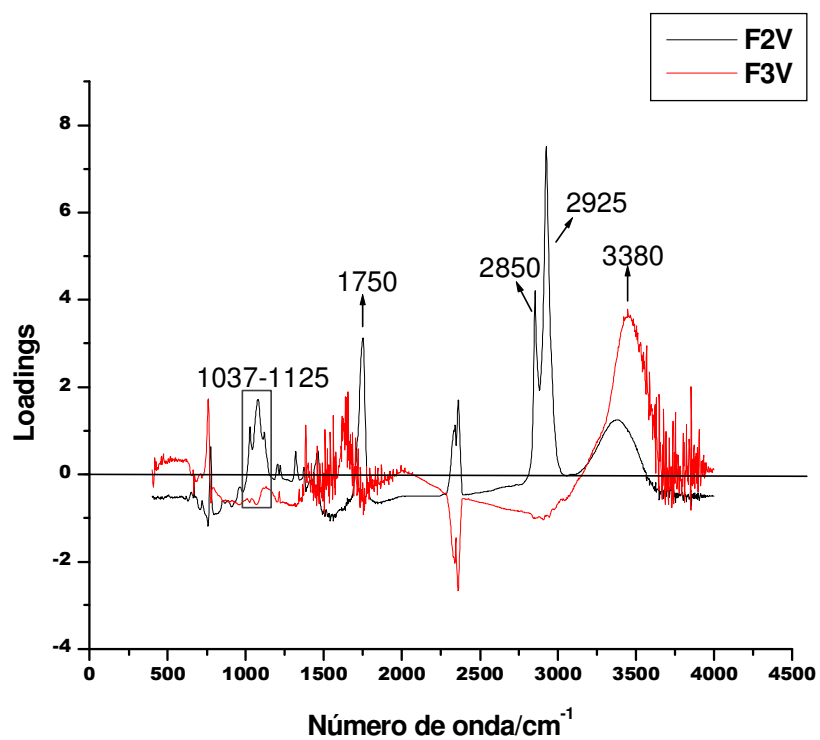


Figura 27. Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 31 frações da fase orgânica no FTIR.

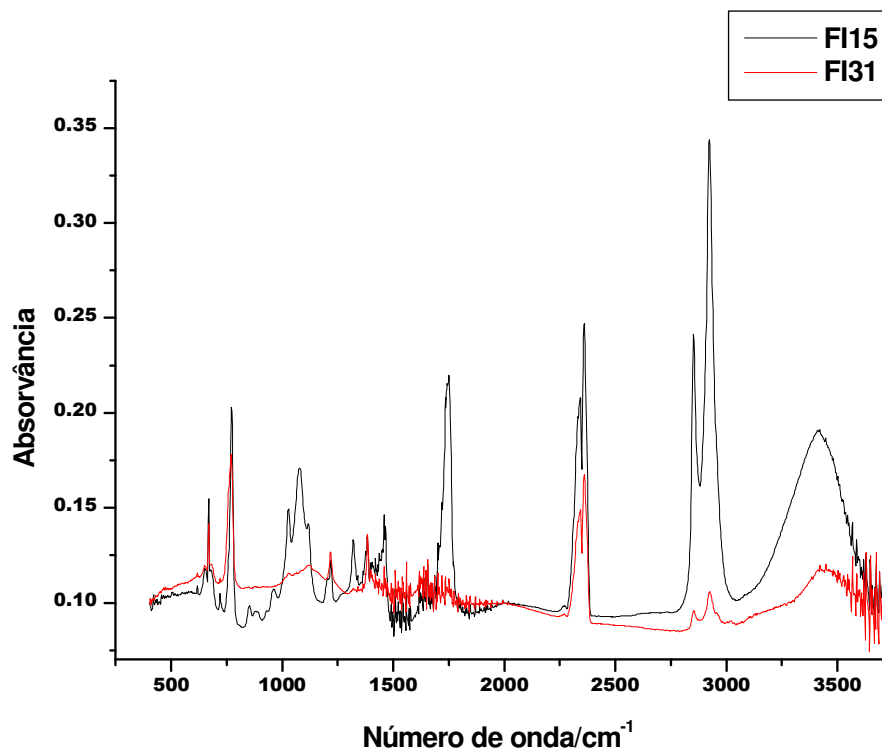


Figura 28. Espectros de absorção no infravermelho das frações da fase orgânica 15 e 31 obtidas das folhas da *Annona muricata* L.

Pelos espectros nota-se que o extrato 15 apresentou maior quantidade dos grupos funcionais que absorvem nas regiões 1037, 1087, 1125, 1750, 2850, 2925 e 3380 cm^{-1} em relação ao extrato 31.

O grupo III localizado na parte mais positiva do fator 3 sofre maior influência das variáveis que apresentam valores de loadings positivos do fator 3, enquanto que os grupos I, II, IV, V e VI são menos influenciados por esses valores. O número de onda que discrimina esses grupos é 3380 cm^{-1} . Para exemplificar este resultado, os espectros dos extratos 5 e 21 estão apresentados na Figura 29.

Pelos espectros nota-se que o extrato 5 apresentou maior quantidade de compostos com grupos funcionais característicos da região de 3380 cm^{-1} que o extrato 21.

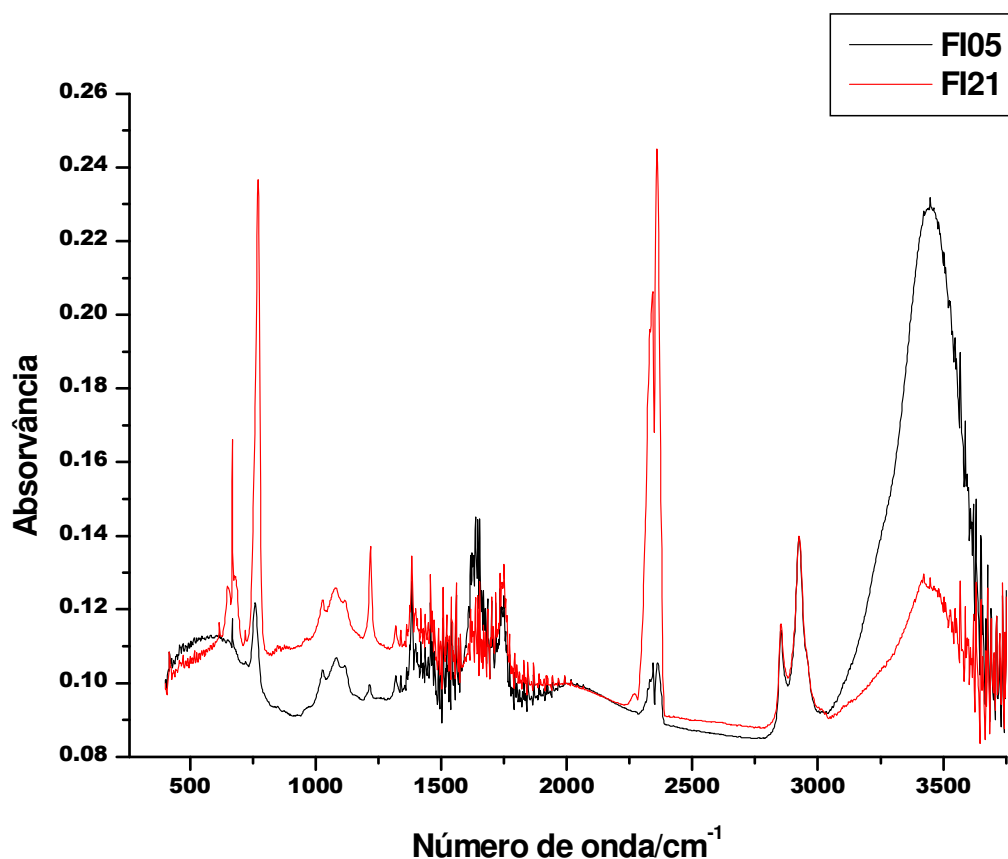


Figura 29. Espectros de absorção no infravermelho das frações da fase orgânica 5 e 21 obtidas das folhas da *Annona muricata* L.

A região em torno de 3380 cm^{-1} é característica da deformação axial da ligação OH de álcoois e fenóis ($3650\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$) podendo ter contribuição de absorções de deformação axial de N-H de amidas ($3500\text{-}3070\text{ cm}^{-1}$) e aminas ($3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$) sobrepostas.

As bandas de 2925 e 2850 cm^{-1} são absorções correspondentes à vibrações de deformações axiais simétricas e assimétricas da ligação C-H de alcanos ($3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$). A banda de absorção de 1750 é característica de deformação axial da ligação C=O que pode ser de ésteres ($1750\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$), cetonas ($1770\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$), ácidos carboxílicos ($1760\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$), δ -lactonas ($1760\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$), γ -lactamas ($1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) e β -lactamas ($1760\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$). As bandas 1037 cm^{-1} , 1087 cm^{-1} e 1125 cm^{-1} são características de deformação axial de C-O de álcoois ($1150\text{-}1017\text{ cm}^{-1}$).

As 31 frações básicas obtidas das folhas da *Annona muricata* também foram analisadas por IVTF e os dados dos espectros foram analisados por métodos quimiométricos. Para tal análise foi necessário colocar os dados dos 31 espectros numa matriz 31×1866 (31 extratos e 1866 valores de absorvâncias nos diferentes números de onda, cm^{-1}). Os dados da matriz foram normalizados e sujeitos a análise de componentes principais (fatores) e análise hierárquica. O gráfico da projeção dos escores dos fatores 2 e 3, que juntos explicam 7,4% da variância contida nos dados, está apresentado na Figura 30. Pelo gráfico nota-se cinco grupos distintos.

O fator 2 discrimina os grupos I, II e III, localizados na parte menos positiva dos grupos IV e V, localizados na parte mais positiva do mesmo eixo. O fator 3 discrimina o grupo II, localizado na parte mais positiva, dos grupos I, III e V, localizados na parte menos positiva, enquanto que o grupo IV é um grupo intermediário.

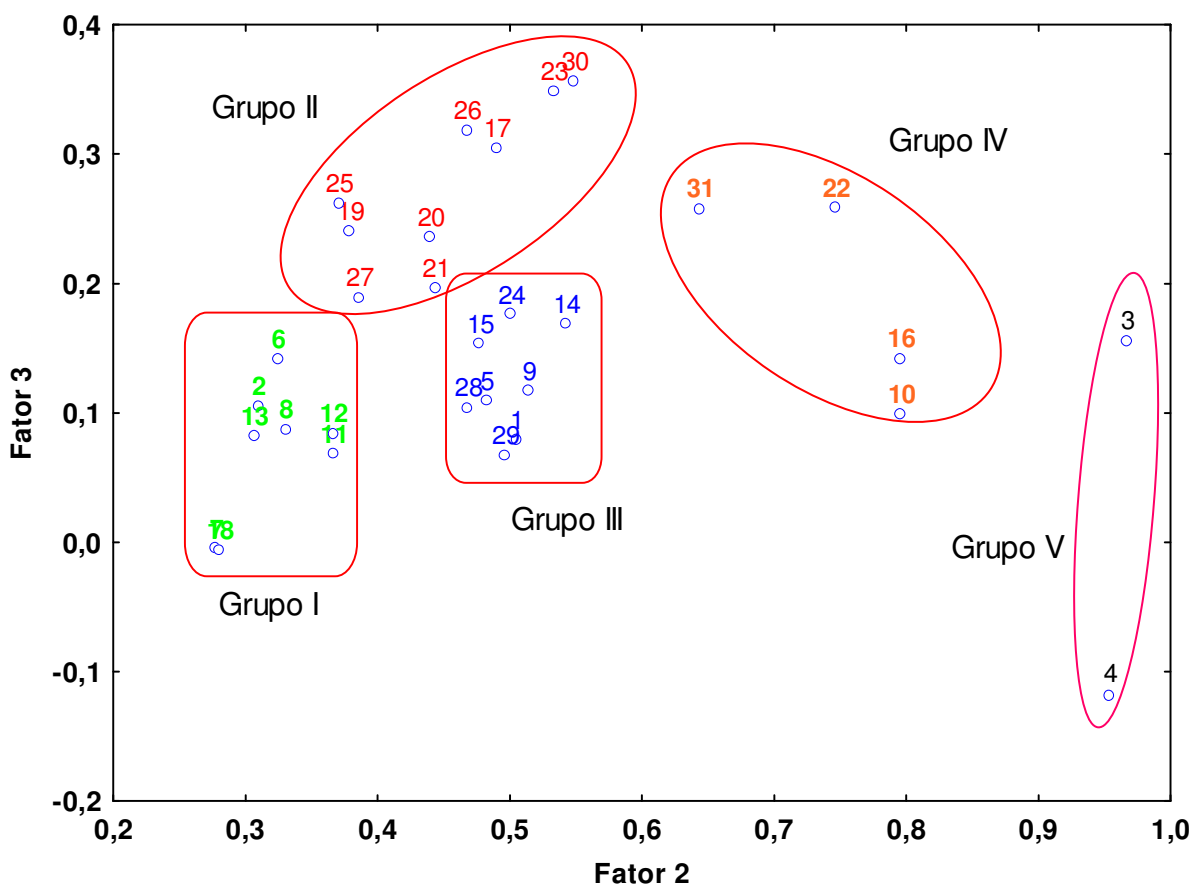


Figura 30. Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos dados espectrais das 31 frações básica das folhas da *Annona muricata* L.

A Figura 31 mostra o gráfico do dendrograma obtido pela análise hierárquica. No valor de conexão 0,7 observam-se cinco grupos confirmando o resultado obtido na Figura 30.

O gráfico dos valores dos loadings dos fatores 2 e 3 está apresentado na Figura 32. Esta figura mostra quais são os números de onda que explicam a distinção entre os cinco grupos formados no gráfico dos escores.

No gráfico dos loadings existem três bandas discriminatórias, Figura 32. Os grupos IV e V que estão localizados na parte mais positiva do fator 2 sofrem maior influência das variáveis que apresentam valores de loadings positivos no fator 2, enquanto que os grupos I, II e III são menos influenciados por esses valores de loadings. As regiões dos espectros que caracterizam os

extratos desses grupos são os números de onda 756, 1209 e 3000 cm^{-1} . Para exemplificar este resultado os espectros dos extratos 3 e 6 estão mostrados na Figura 33.

Nesta Figura observa-se que o extrato 3 apresentou maior quantidade dos grupos funcionais característicos das regiões com números de onda 756, 1209 e 3000 cm^{-1} em relação ao extrato 6.

A região entre 3535-3302 cm^{-1} caracteriza vibrações de deformação axil da ligação O-H de álcoois e fenóis (3650-3200 cm^{-1}), pode indicar também absorções provenientes de deformação axial da ligação de N-H de aminas (3600-3200 cm^{-1}) sobrepostas. A banda de 3000 cm^{-1} é proveniente de deformação axial da ligação C-H de alcanos (3000-2840 cm^{-1}).

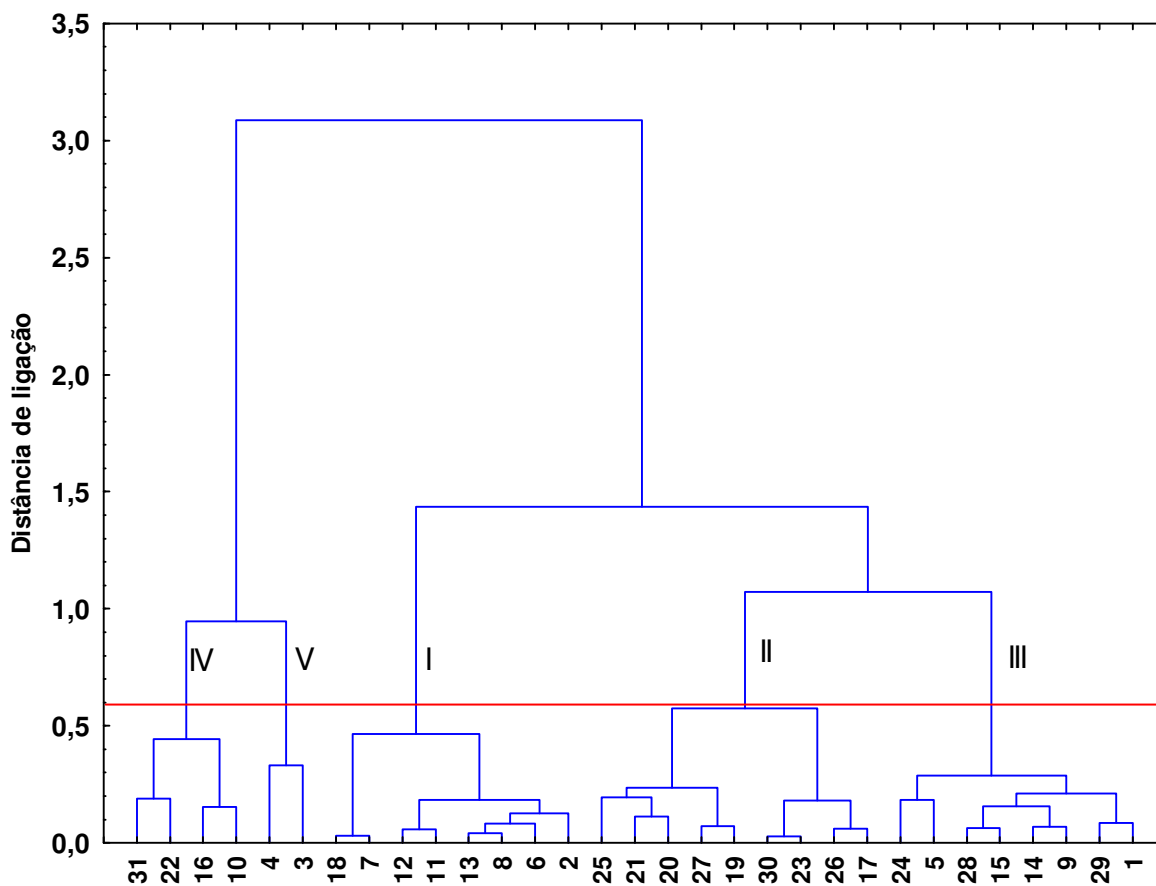


Figura 31. Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR das 31 frações básicas obtidas das folhas da *Annona muricata* L.

A banda 1209 cm^{-1} pode indicar a presença de C-O de álcoois e fenóis ($1260\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$).

A banda de 756 cm^{-1} pode indicar deformação axial da ligação N-O ($850\text{-}750\text{ cm}^{-1}$).

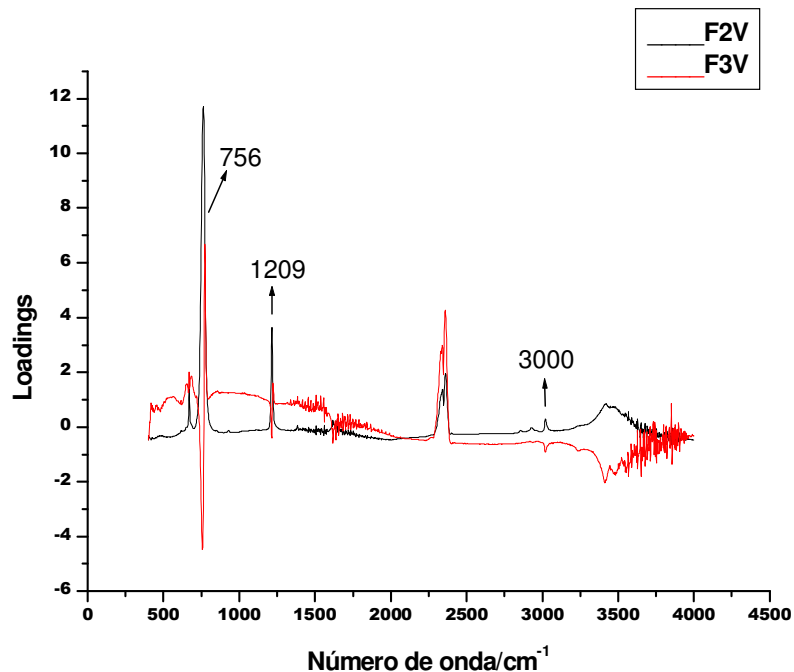


Figura 32. Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 31 frações básica no FTIR.

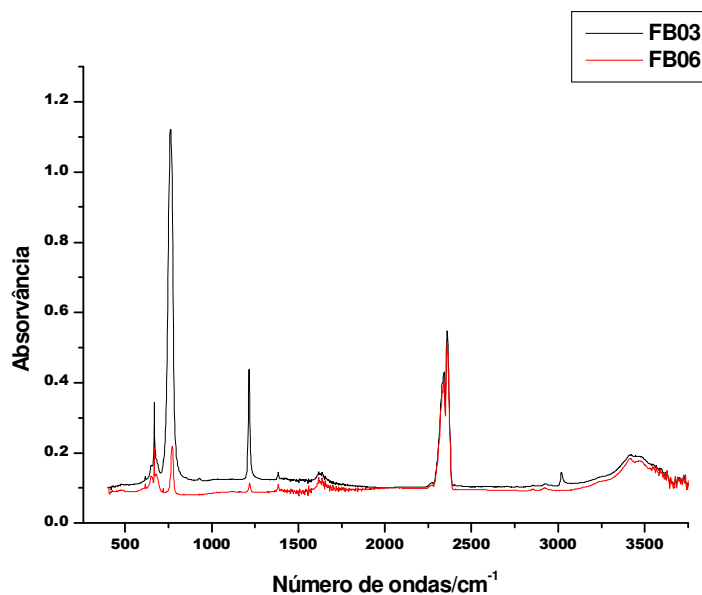


Figura 33. Espectros de absorção no infravermelho das frações básica 3 e 6 obtidas das folhas da *Annona muricata* L.

Os 33 extratos da fase orgânica foram analisadas por CLAE, para investigar possíveis discriminações nas composições química dos diferentes extratos. Para realizar esta investigação foi necessário colocar as alturas dos picos cromatográficos das 33 frações na forma de uma matriz 33x2814 (33 extratos e 2814 valores de altura dos picos nos diferentes tempos de retenção, min). Os dados da matriz original foram normalizados e sujeitos a análise das componentes principais (fatores) e análise hierárquica.

A Figura 34 mostra a projeção dos escores dos fatores 1 e 2, que juntos explicam 92% da variância contida nos dados.

A análise desse gráfico mostra que os extratos são separados em quatro grupos, sugerindo que as amostras apresentaram composições químicas diferentes. O fator 1 discrimina o grupo IV, localizado na parte menos positiva, do grupo I que está localizado na parte mais positiva, enquanto que os grupos II e III são intermediários. O fator 2 discrimina o grupo IV, localizado na parte mais positiva dos demais grupos, localizados na parte menos positiva.

Os agrupamentos da análise dos fatores foram confirmados pela análise hierárquica. O dendrograma obtido por esta análise está representado na Figura 35. O valor de conexão 40 mostra quatro grupos diferentes, o que confirma os resultados obtidos no gráfico dos escores.

Os loadings dos fatores 1 e 2 estão mostrados na Figura 36. O gráfico dos loadings mostra quais são os picos cromatográficos que discriminam os 33 extratos em quatro grupos.

O grupo I, localizado na parte mais positiva, sofre maior influência dos valores de loadings positivos no fator 1, enquanto que o grupo IV é menos influenciado por esses valores. Isto significa que os extratos do grupo I estão deslocados mais para a direita por apresentarem maiores sinais nos tempos de retenção de 3,1-5,0 minutos e em 6,0 minutos em relação aos extratos do grupo IV. A maioria dos extratos do grupo I contém acetona na sua composição.

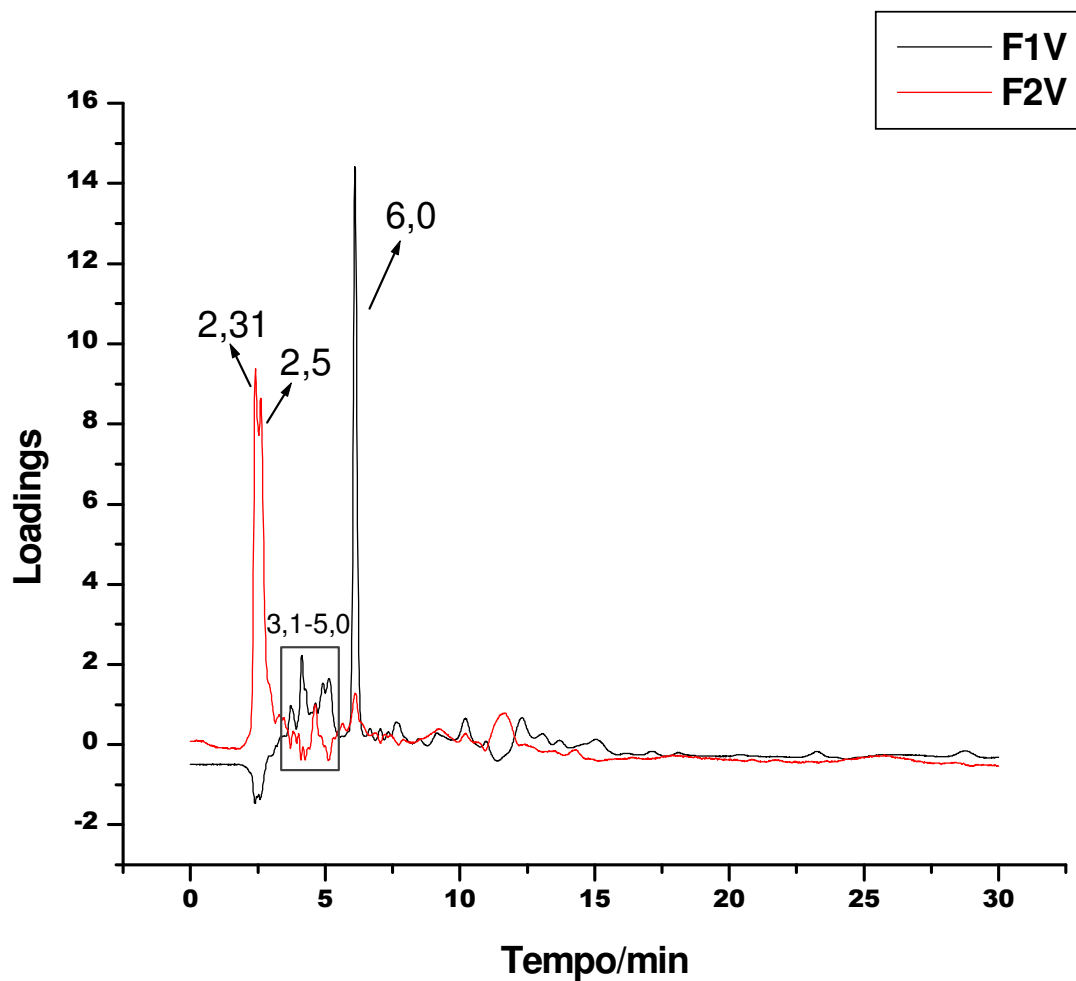


Figura 36. Gráfico dos loadings dos fatores 1 e 2 para os dados cromatográficos das 33 frações da fase orgânica obtidas das folhas da *Annona muricata* L.

O grupo IV, localizado na parte mais positiva é mais influenciado pelos valores de loadings positivos no fator 2, ou seja, os extratos do grupo IV apresentaram maiores concentrações das substâncias com tempos de retenção de 2,31 e 2,5 minutos em relação aos demais grupos. Para mostrar o resultado obtido com as análises dos fatores e loadings escolheu-se o cromatograma do extrato 24 (grupo I) e o cromatograma do extrato 5 (grupo IV), Figura 37.

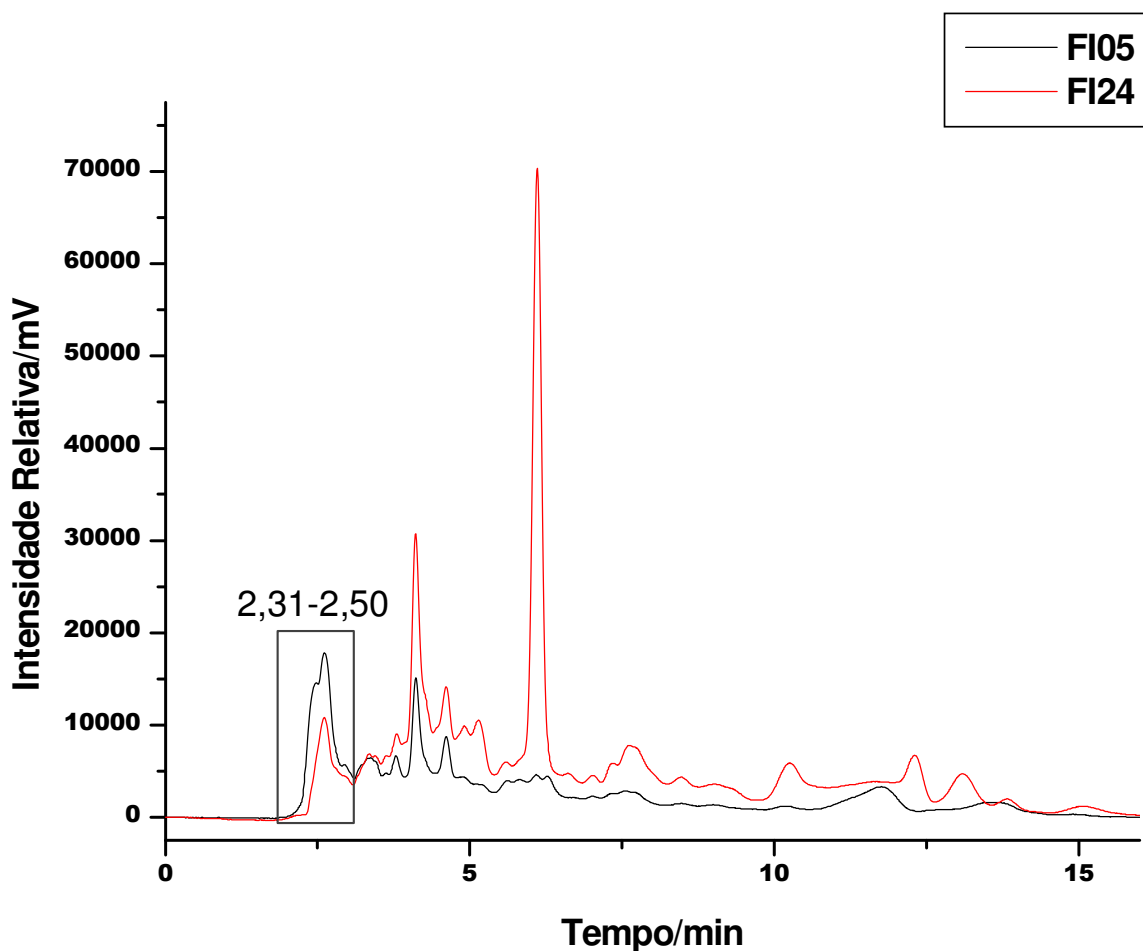


Figura 37. Cromatogramas obtidos por CLAE das separações das frações da fase orgânica 5 e 24 obtidas das folhas da *Annona muricata* L. Injeção: 20 μ L; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

As 33 frações básicas foram analisadas por CLAE. Os estudos comparativos dos cromatogramas também foram realizados para investigar possíveis diferenças na composição química de cada extrato. Para desenvolver o estudo comparativo as alturas dos picos cromatográficos foram colocados na forma de uma matriz 33x1876 (33extratos e 1876 valores de

alturas de picos) que posteriormente foi normalizada e submetida a análise de componentes principais (fatores) e análise hierárquica.

O gráfico da projeção dos escores dos fatores 1 e 3, que juntos explicam 89,18% da variância total dos dados está representado na Figura 38.

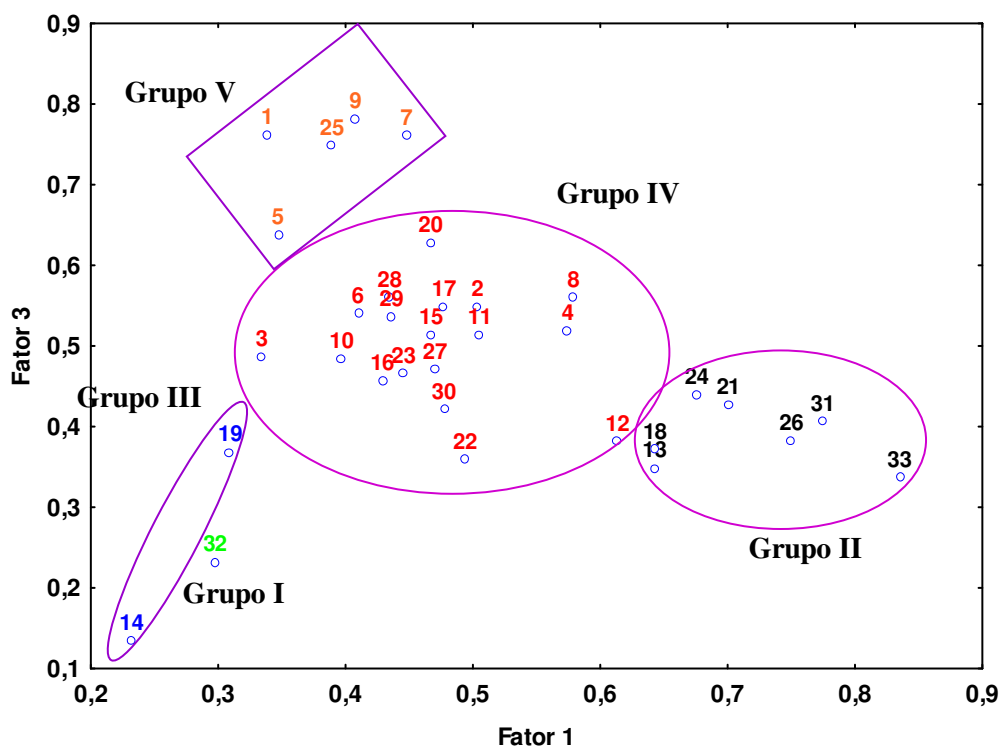


Figura 38. Gráfico dos escores dos fatores 1 e 3 dos dados cromatográficos das 33 frações básicas obtidas das folhas da *Annona muricata* L.

Neste gráfico notam-se cinco grupos distintos. O fator 1 separa o grupo II, que está localizado na parte mais positiva dos demais grupos que estão na parte menos positiva. O fator 3 discrimina o grupo V, localizado na parte mais positiva dos grupos I, II e III que estão na parte menos positiva. Já o grupo IV é um grupo intermediário.

A análise hierárquica foi feita para confirmar os resultados encontrados no gráfico dos escores e o dendrograma obtido para esta análise está representado na Figura 39. O valor de conexão 0,8 mostra a formação de cinco grupos como foi visto no gráfico dos escores.

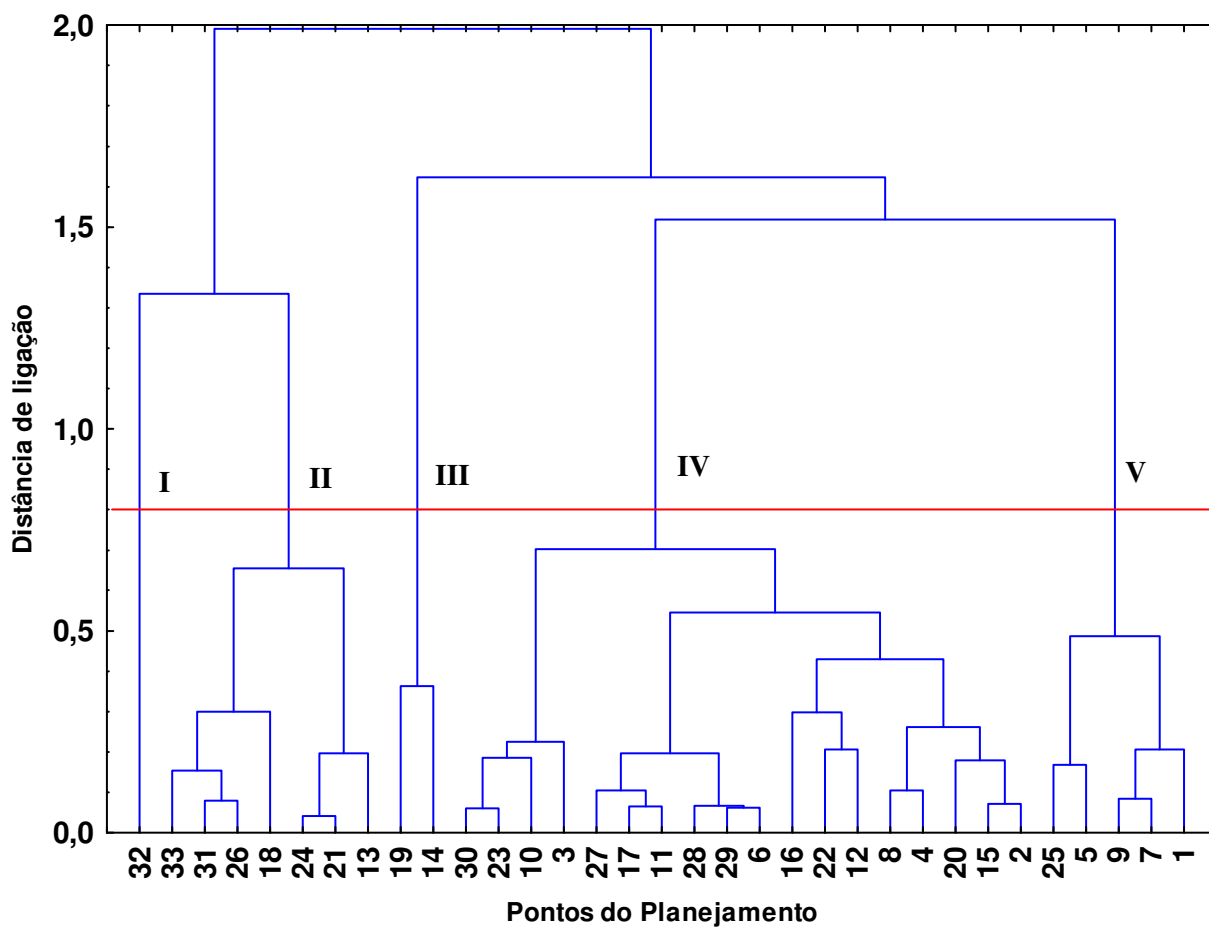


Figura 39. Dendrograma obtido baseado nos dados cromatográficos das 33 frações básicas obtidas das folhas da *Annona muricata* L.

Na Figura 40 está o gráfico dos loadings dos fatores 1 e 3. Este gráfico permite observar quais são os picos cromatográficos que discriminam os cinco grupos.

Os valores de loadings do fator 1 são todos positivos, indicando que o grupo II, localizado na parte mais positiva é mais influenciado por esses valores, ou seja, os extratos desse grupo

apresentaram maiores concentrações das substâncias ou grupo de substâncias com tempos de retenção de 2,4-4,0; 6,3;7,1;7,7 e 15,1 minutos em relação aos grupos I, III, IV e V. Os cromatogramas dos extratos 3 e 33 ilustram esse resultados, Figura 41.

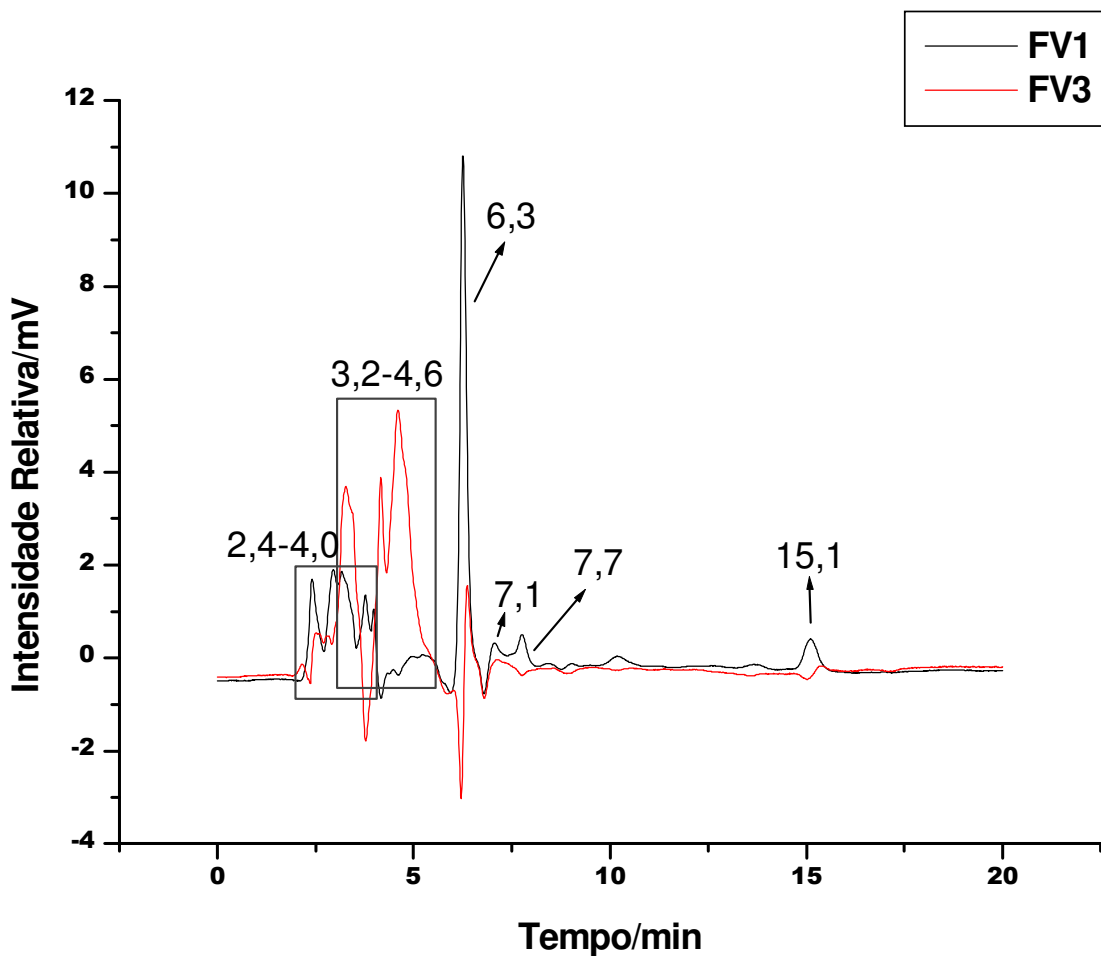


Figura 40. Gráfico dos loadings dos fatores 1 e 3 para os dados cromatográficos das 33 frações básica obtidas das folhas da *Annona muricata* L.

O fator 3 discrimina o grupo V, localizado na parte mais positiva dos grupos I, II e III. Os picos cromatográficos que discriminam esses grupos são de 3,2-4,6 e 6,3 minutos. Os cromatogramas das frações 9 e 22 mostram este resultado, Figura 42

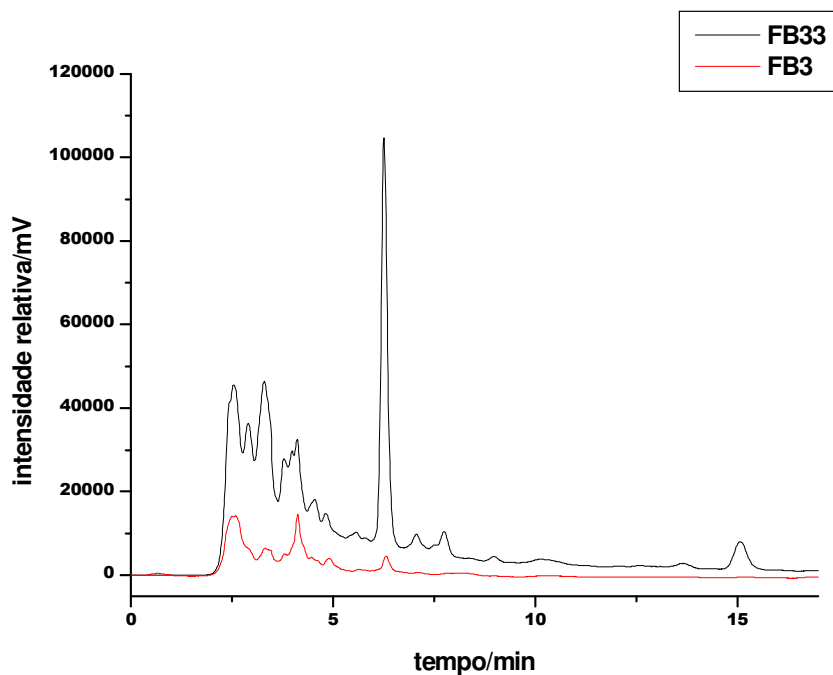


Figura 41. Cromatograma obtido por CLAE das separações das frações básica 3 e 33 obtidas das folhas da *Annona muricata* L. Injeção: 20 μ L; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

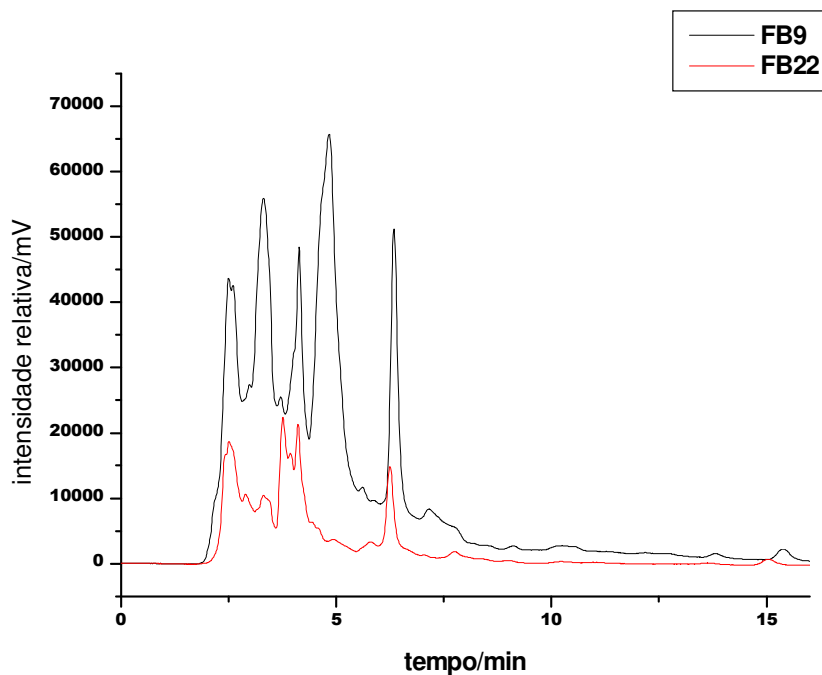


Figura 42. Cromatograma obtido por CLAE das separações por frações básica 9 e 22 obtidas das folhas da *Annona muricata* L. Injeção: 20 μ L; Coluna cromatográfica C18, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 μ m; Fase móvel: 26% de acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v); Vazão: 1 mL/min; comprimento de onda: 254 nm.

Para encontrar a relação entre os parâmetros de seletividade, polaridade (P) e a constante dielétrica (E) e os rendimentos das frações, foi utilizada a projeção das variáveis no plano dos fatores 1×2 da análise de componentes principais. O gráfico desta projeção está ilustrado na Figura 43. Nesta figura, observa-se que os rendimentos das frações resíduos (fração não solúvel no fracionamento) e a fração da fase orgânica, encontram-se entre os valores de α e β , enquanto que as frações neutras, fibras e os rendimentos brutos estão localizados entre os valores de α e π . O rendimento da fração básica está localizado mais ou menos no centro dos parâmetros de seletividade. Observa-se na Figura 15 que os maiores rendimentos foram obtidos com extratos contendo no mínimo um dos solventes, etanol, acetato de etila, clorofórmio e acetona. Acetato de etila e acetona possuem α igual a zero. O acetato de etila tem o maior valor de β . O clorofórmio apresenta maior valor de α e zero de β , enquanto que o etanol tem valores de α aproximadamente igual a β . As misturas que apresentaram maiores rendimentos estão localizadas mais ou menos entre os valores de α e β do acetato de etila e/ou acetona com o clorofórmio. O maior rendimento da fração da fase orgânica 0,426 g foi obtido com etanol:diclorometano e acetona. O diclorometano tem β igual a zero, enquanto que a acetona tem α igual a zero. Na fração básica, observa-se que os maiores rendimentos foram encontrados nos extratos que apresentam caráter ácido ou básico.

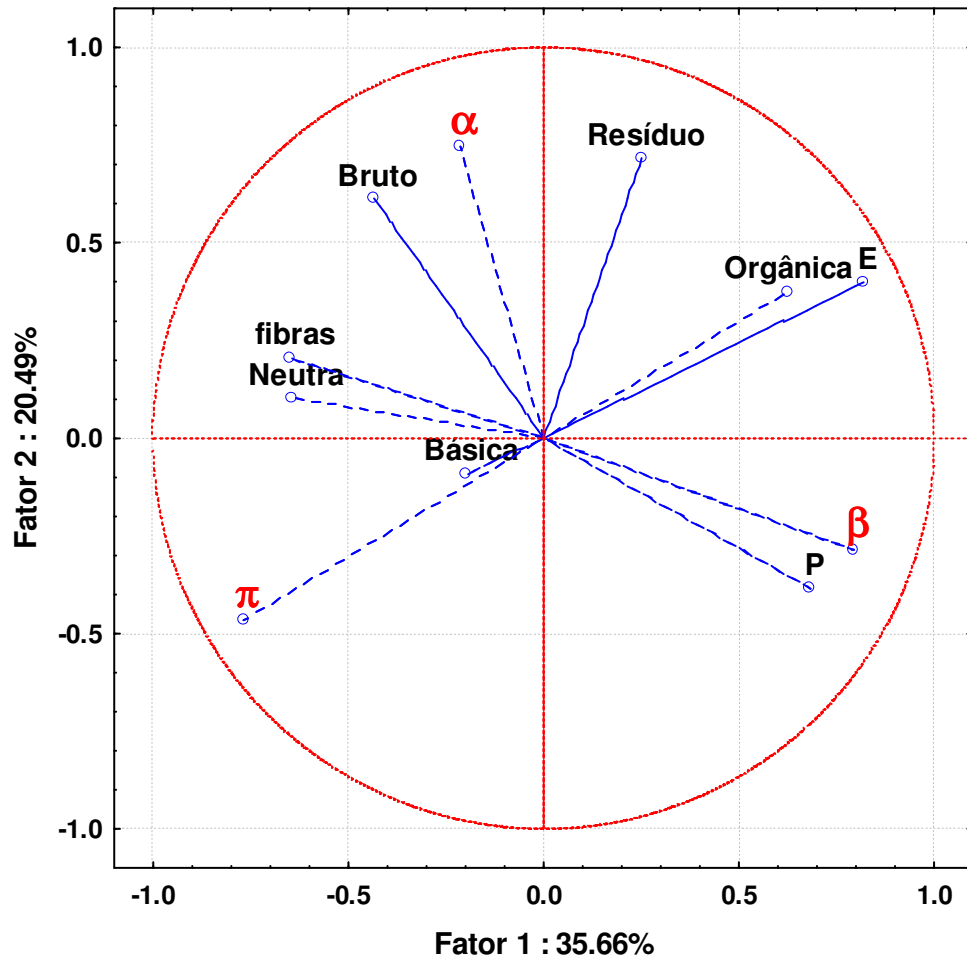


Figura 43. Projeção das variáveis no plano dos fatores 1×2



Capítulo V

Conclusão

5. CONCLUSÃO

Na avaliação dos efeitos dos solventes extratores no rendimento do extrato bruto, das frações neutra, orgânica, básica e das fibras das folhas da *Annona muricata* L., conclui-se que:

- ✓ O rendimento máximo previsto para o extrato bruto pelo modelo cúbico especial foi de 3,0 g. Para produzir esse rendimento a mistura deve conter em torno de 35% de etanol, 35% de diclorometano e 30% de clorofórmio. Os rendimentos experimentais máximos alcançados foram preparados em misturas binárias (1/2:1/2) (v/v) etanol:diclorometano (2,9288 g) e etanol:clorofórmio (2,9096 g) e com a mistura ternária etanol:diclorometano:clorofórmio (3,0247 g). Se o objetivo do trabalho for alcançar maiores rendimentos com o menor custo recomenda-se a mistura binária etanol:diclorometano, embora os espectros de absorção na região do infravermelho tenham mostrado que os extratos apresentam composições químicas diferentes.

- ✓ A fração neutra de menor rendimento (0,6009 g) também foi obtida com o etanol. Considerando que geralmente não há interesse dos metabólitos extraídos nesta fração, o etanol seria uma boa alternativa como solvente extrator. Por outro lado, os alcalóides de caráter neutro podem estar presentes nesta fração o que a torna interessante. Neste caso recomenda-se a mistura ternária etanol:acetato de etila:diclorometano (1/3:1/3:1/3) (v/v/v).

- ✓ Os rendimentos elevados da fração da fase orgânica foram obtidos com o etanol (0,3894 g) e com a mistura ternária etanol:diclorometano:acetona (1/3/1/3/1/3) (v/v/v) (0,4259 g). Considerando o custo dos solventes e que esses valores são próximos, recomenda-se o etanol como solvente extrator.
- ✓ As frações básicas obtidas com os solventes puros, misturas binárias e ternárias apresentaram rendimentos muito baixos. Quando utilizou as misturas quaternárias (1/4:1/4:1/4:1/4) (v/v/v/v) etanol:acetato de etila:acetona:clorofórmio e etanol:acetato de etila:diclorometano:clorofórmio e a mistura quinária etanol:acetato de etila:diclorometano:acetona:clorofórmio (1/5:1/5:1/5:1/5:1/5) (v/v/v/v/v) notou-se um grande aumento nos valores de massa.. Isto mostra que para obter a fração rica em alcalóides a mistura quaternária etanol:acetato de etila:diclorometano:clorofórmio e a mistura quinária devem ser utilizadas como solventes extratores.
- ✓ A fibra de menor rendimento (0,0517 g) foi obtida a partir do etanol e o maior rendimento (0,5585 g) foi obtido com a mistura binária acetato de etila:diclorometano (1/2:1/2) (v/v). Em um estudo em que se deseja extrair pouca quantidade de fibras deve utilizar o etanol como solvente extrator. Porém se o objetivo for retirar grandes quantidades de fibras recomenda-se a mistura acetato de etila:diclorometano.

Neste trabalho a eficiência do método de extração também foi avaliada através da diversidade de compostos químicos extraídos das folhas da *Annona muricata* L. Esta

avaliação foi realizada através dos números de picos obtidos nos cromatogramas das frações da fase orgânica e básica e concluiu-se que:

✓ A melhor fase móvel para produzir impressão digital informativa foi 26% acetonitrila, 27% de metanol e 47% de água (v/v/v).

✓ O número de picos obtidos nos 66 cromatogramas não está relacionado com o rendimento do extrato.

✓ Entre os solventes puros, o etanol extraiu a maior quantidade em massa da fração da fase orgânica (0,3894 g), porém foi o solvente que retirou a menor diversidade de compostos (19 picos cromatográficos). Isto mostra que um alto rendimento da fração não garante uma grande diversidade de compostos químicos extraídos. Já a mistura ternária etanol:diclorometano:acetona (1/3:1/3:1/3) (v:v:v) extraiu grande quantidade em massa (0,4259 g) da fração da fase orgânica e também grande diversidade de compostos químicos (28 picos cromatográfico). Quando o objetivo for obter alto rendimento e maior diversidade de compostos fenólicos e terpenóides recomenda-se a mistura ternária etanol:diclorometano:acetona.

✓ O extrato da fração da fase orgânica obtido com a mistura binária etanol:acetato de etila (1/2:1/2) (v/v) apresentou a menor diversidade de compostos químicos extraídos (16 picos). Dessa forma, se o objetivo do trabalho for isolar um composto presente nas 31 frações da fase orgânica, a mistura binária etanol:acetato de etila é a melhor opção para ser utilizada como solvente extrator.

- √ Os extratos da fase orgânica que apresentaram maior diversidade de compostos (29 picos) foram obtidos com as misturas binárias (1/2:1/2) (v/v) etanol:diclorometano e etanol:clorofórmio, e também com a mistura ternária etanol:diclorometano:clorofórmio (1/3:1/3:1/3) (v/v/v). Considerando os custos dos solventes e que os três extratos mostraram o mesmo número de picos, a mistura binária etanol:diclorometano seria uma das melhores alternativas para obter a impressão digital das folhas da planta em estudo.
- √ Neste trabalho concluiu-se também que os picos com tempo de retenção de 4,12 e 6,12 minutos, presentes nos 33 cromatogramas das frações da fase orgânica, poderão contribuir na identificação da *Annona muricata* L.
- √ A mistura binária de acetato de etila:clorofórmio (1/2:1/2 v/v) foi o solvente que extraiu a menor diversidade de compostos (6 picos cromatográfico) da fração básica, enquanto que a mistura ternária etanol:acetato de etila:acetona (1/3:1/3:1/3) (v:v:v) extraiu a maior diversidade de compostos (19 picos). Se o objetivo for obter a impressão digital com o maior número de picos a mistura ternária é o solvente extrator mais indicado.
- √ O pico cromatográfico com tempo de retenção 6,30 minutos, presentes nos 33 cromatogramas da fração básica, pode contribuir na identificação da *Annona muricata* L.

Com a aplicação dos métodos quimiométricos associados à análise por absorção no FTIR foi possível:

- ✓ Traçar o perfil das frações da fase orgânica e das frações básicas e identificar quantitativamente os grupos de composições quimicamente diferentes em cada fração.
- ✓ Determinar as regiões discriminatórias de grupos funcionais para discriminar os extratos de acordo com a composição química apresentada por cada um.
- ✓ As frações da fase orgânica dos grupos I e II apresentaram maiores quantidades de compostos com grupos funcionais que absorvem na região 1037, 1087, 1125, 1750, 2850, 2925 e 3380 cm^{-1} , enquanto que os grupos III, IV, V e VI apresentaram as menores quantidades de compostos com estes grupos funcionais presentes nas estruturas das acetogeninas de Annonaceae.
- ✓ As frações da fase orgânica do grupo III foi discriminado dos demais grupos pelo fator 3 por apresentar maiores quantidades de hidroxilas de álcoois e fenóis.
- ✓ As frações básicas que pertencem aos grupos IV e V apresentaram maiores quantidades de compostos com grupos funcionais característicos das regiões 756, 1209 e 3000 cm^{-1} em relação aos grupos I, II e III.

- ✓ A discriminação dos grupos pode estar relacionada com os parâmetros de seletividade dos solventes ou misturas de solventes.

Com a aplicação dos métodos quimiométricos aos dados obtidos pela cromatografia líquida de alta eficiência conclui-se que:

- ✓ As frações da fase orgânica apresentaram diferenças quantitativas nas composições químicas.
- ✓ As frações da fase orgânica do grupo I foram discriminadas do grupo IV por apresentarem maiores concentrações de compostos ou grupos de compostos nos tempos de retenção 3,1-5,0 e 6,0 minutos, enquanto que as frações do grupo IV apresentaram maiores concentrações das substâncias com tempos de retenção de 2,31 e 2,5 minutos.
- ✓ As frações básicas também apresentaram diferenças quantitativas nas composições químicas dos extratos.
- ✓ As frações básicas do grupo II apresentaram maiores concentrações das substâncias com tempos de retenção 2,4-4,0; 6,3; 7,1; 7,7 e 15,1 minutos em relação aos grupos I, III, IV e V. Já o grupo V é discriminado dos demais grupos por apresentar maiores sinais em 3,2-4,6 e 6,3 minutos.



Referências

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em 10 jul. 2008.
2. PATHIRANA, C. L.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**. v. 93,n. 1, p. 47-56, 2005.
3. 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. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 1090, 2004.
4. GOBBO, L. N.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
5. ALMELA, L.; MUÑOZ, B. S.; LÓPEZ, J. A. F.; ROCAA, M. J. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography A**. v. 1120, n.1-2, p. 221-229, 2006.
6. TABART, J.; KEVERS, C.; SIPEL, A.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O. DOMMES, J. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. **Food Chemistry**. v. 105, n. 3, p. 1268-1275, 2007.

7. CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**. v. 55, n. 2, p. 217-225, 2007.
8. GARCIA, M. S. D.; VALENTÃO, P.; GUERRA, L.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M. Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white “Vinho Verde” grapes. **Analytica Chimica Acta**. v. 583, n. 1, p. 15-22, 2007.
9. SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**. v. 55, n. 3, p. 381-387, 2007.
10. WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**. v. 106, n. 2, p. 804-810, 2008.
11. HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.
12. MARTINO, E.; RAMAIOLA, I.; URBANO, M.; BRACCO, F.; COLLINA, S. Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**. v. 1125, n. 2, p. 147-151, 2006.

13. DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolic: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.
14. BORDIGNON, S. A. L.; MONTANHA, J. A.; SCHENKEL, E. P. Flavones and flavanones from South American *Cunila* species (Lamiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p.785–788, 2003.
15. JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 799, n. 1-2, p. 101-110, 1998.
16. GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Determination of molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp) seed extracts: Correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**. v. 89, p. 1-9, 2005.
17. CHRISTOV, R.; BANKOVA, V. Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents from propolis using na electron-capture detector. **Journal of Chromatography A**. v. 623, n. 1, p. 182-185, 1992.
18. SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 910, n. 2, p. 265-273, 2001.

19. PAULO, A.; HOUGHTON, P. J. Chemotaxonomic analysis of the genus *Cryptolepis*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, n. 2, p. 155-166, 2003.
20. ZHANG, J.; YU, Y.; LIU, D.; LIU, Z. Extraction and composition of three naturally occurring anti-cancer alkaloids in *Camptotheca acuminata* seed and leaf extracts. **Phytomedicine**. v. 14, n. 1, p. 50-56, 2007.
21. GATTI, R.; GIOIA, M. G.; CAVRINE, V. Determination of *Cinchona* alkaloids and vitamin B₆ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**. v. 512, p. 85-91, 2005.
22. THEUNIS, M. H. B. L.; FOUBERT, K.; POLLIER, J.; GUZMAN, M. G.; GOOSSENS, A.; VLIETINCK, A. J.; PIETERS, L. A. C.; APERS, S. Determination of saponins in *Maesa lanceolata* by LC-UV: Development and validation. **Phytochemistry**. v. 68, n. 22-24, p. 2825-2830, 2007.
23. GONG, F.; LIANG, Y.; XIE P.; CHAU, F. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n 1-2, p. 25-40, 2003.
24. SANTOS, A. F.; SANT'A, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 115-120, 2001.

25. GALVIS, L. B.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA J. Antitumor and antiviral activity of colombian medicinal plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, n. 4, p. 531-535, 1999.
26. YU, J. G.; GUI, H. Q.; LUO, X. Z.; SUN, L. Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 6, p. 1689-1692, 1998.
27. KONNO, H.; OKUNO, Y.; MAKABE, H.; NOSAKA, K.; ONISHI, A.; ABE, Y.; SUGIMOTO, A.; AKAJI, K. Total synthesis of *cis*-solamin A, a mono-tetrahydrofuran acetogenin isolated from *Annona muricata*. **Tetrahedron Letters**. v. 49, p. 782-785, 2008.
28. LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; CHEN, S. L.; WU, C. C.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 4767-4776, 2005.
29. BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; POLO, M. C. Z.; BARRACHINA, I. ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**. v. 22, p. 269-303, 2005.
30. ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: Recent progresso. **Journal of Natural Products**. v. 62, p. 504-540, 1999.

31. CASTRO, A. DE C.; MAIA, G.A.; HOLANDA, L.F.F.; GUEDES, Z.B.L.; FÉ, J. DE A.M. Características físicas e químicas da graviola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 3, n.19, p. 361-365, 1984.
32. PINTO, A.C. DE Q.; SILVA, E.M. DA. **Graviola para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA/SPI, p. 41, 1994.
33. GLEYE, C.; LAURENS, A.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; HOCQUEMILLER, R. Isolation and structure elucidation of sabadelin, an acetogenin from roots of *Annona muricata*. **Phytochemistry**. v. 52, n. , p. 1403-1408, 1999.
34. 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.
35. VIÉGAS, I. J. M.; FRAZÃO, D. A. C. Graviola: Nutrição, calagem e adubação. **Circular Técnica**. Belém: Embrapa, v. 36, 2004.
36. 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.
37. BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2º ed. Campinas: UNICAMP, p. 313-319, 2001.

38. LONNI, A. A. S. G. Caracterização e identificação química das carquejas do gênero *Baccharis* por métodos quimiométricos. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.
39. JORESKOG, K. G.; KLOVAN, J. E.; REYMENT, R. A. Geological factor Analysis. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v. 43, n. 3, p.450, 1976.
40. SILVA, L. M. C. Estudo exploratório de extratos de carquejas por FTIR, CLAE e métodos quimiométricos. Dissertação de mestrado – Universidade estadual de Londrina, Londrina, 2005.
41. BARROS, B. N.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 3ª ed. Campinas: UNICAMP, 2007.
42. SNYDER, L. R.; CAR, P. W.; RUTAN, S.C. **Solvatochromically based solvent-selectivity triangle**. *Journal of Chromatography A*, v. 656, n. 1-2, p. 537-547, 1993.
43. DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora Unesp, 1996.
44. Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. Editora American Society of Plant Physiologists. v. 24, p. 1250-1318, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)