

Alan Cesar Pilon

Estudo de *Jatropha gossypifolia* e *J. multifida* (Euphorbiaceae) aplicando métodos analíticos *in silico* e de desreplicação, visando a detecção e elucidação *in situ* dos constituintes micromoleculares com atividades acetilcolinesterásicas e antioxidantes.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Nasser Lopes

Araraquara

2011

## SÚMULA CURRICULAR

### Dados Pessoais

Nome: Alan Cesar Pilon

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica. Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE).

Rua professor Francisco Degni s/n. jd. Quitandinha, CEP 14.800-900.

Telefone: (16) 3214-5860

E-mail: leaoacp@yahoo.com.br

## FORMAÇÃO ACADÊMICA

### Graduação

Licenciatura em Química

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP.

Local: Araraquara, São Paulo.

Período: 2004-2008.

## DISCIPLINAS CURSADAS DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO

1. Métodos espectrométricos I (12 créditos), **conceito A**
2. Tópicos especiais: Química medicinal aplicada a produtos naturais (12 créditos), **conceito A**
3. Química orgânica avançada (12 créditos), **conceito B**
4. Espectrometria de massas de produtos naturais (06 créditos), **conceito B**
5. Tópicos especiais: Atribuição de configuração absoluta em compostos orgânicos por RMN e CD (02 créditos), **conceito A**
6. Tópicos especiais: Alcaloides (02 créditos), **conceito A**
7. Tópicos especiais: Metabolômica como ferramenta para pesquisa em produtos naturais (02 créditos), **conceito A**
8. Estágio Docência na disciplina de Química Orgânica III ministrada para o curso de licenciatura em química da UNESP - Araraquara, supervisionada pelo Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa (04 créditos), **conceito A**.

### ARTIGOS

1. CASTRO-GAMBOA, I, BURGOS, R., CARDOSO, P., CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., NASSER LOPES, M, SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S. Dereplication of Brazilian plants from Cerrado and Atlantic Forest using NMR virtual design and hyphenated techniques. **Planta Medica**, v.76, p. SL-44, 2010.
2. PILON, A.C., LEME, G. M. LOPES, M.N., SILVA, D.H.S., BOLZANI, V.S., CASTRO-GAMBOA, I. Development and optimization of fingerprints from leave extracts of *J. gossypifolia* using high-performed liquid chromatography. **Journal Separation Sciences**, Submetido em 2010.
3. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Secondary metabolites from Vochysiaceae: a review. **Phytochemistry Reviews**. Submetido em 05/2010.

### CONGRESSOS

1. Biota FAPESP International Workshop on Metabolomics in The Context of System Biology: A Rational Approach to Search for Lead Molecules from Nature, 2010.
2. Participação 33ª Encontro da SBQ realizado em 05/2010.
3. I Escola de Inverno de Separações, realizado no IQ-UNICAMP, 2010.
4. IV Workshop do NuBBE, realizado no IQ-UNESP, 2009.
5. Workshop 2009 dos Programas de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia - IQ - UNESP, 15 anos do PPG em Biotecnologia, 2009.
6. I Escola de Produtos Naturais: Alcaloides, realizado no IQ-UNESP, 2009.
7. Participação no 17º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti realizado em 10/2009.  
*Participação da Comissão Organizadora do 17º Encontro da SBQ – Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti realizado em 2009.*
8. Participação no 2nd Brazilian Conference on Natural Products (2nd BCNP) e XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXVIII RESEM) realizado em 2009.

### TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

1. CASTRO-GAMBOA, I., BOLZANI, V. S., SILVA, D. H. S., Burgos, R. C. R., CARDOSO, P., CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., EDISON, A. S. Dereplication of brazilian plants from cerrado and atlantic Forest using NMR virtual design and hyphenated techniques In: 51st Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy and the Phytochemical Society of North America, 2010, Saint Petersburg Beach. **Natural Solutions to 21st Century Problems – from Discovery to Commercialization**. Saint Petersburg Beach, 2010.
2. PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., QUEIROZ, M. M. F., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Desrepliação das espécies *Jatropha multifida* e *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) In: 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.
3. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., QUEIROZ, M. M. F., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Constituintes majoritários das espécies *Qualea grandiflora* e *Qualea cordata* (Vochysiaceae) In: 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.
4. CARNEVALE NETO, F., PILON, A. C., PAULETTI, P. M., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Avaliação biológica *in vitro* de espécies de *Qualea* (Vochysiaceae) In: 17º Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, 2009, Araraquara.
5. PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Avaliação *in vitro* da Atividade Antioxidante e Inibição da Polimerização da  $\beta$ -hematina de *Jatropha multifida* e *J. gossypifolia* (Euphorbiaceae) In: 17º Encontro da SBQ - Regional Interior Waldemar Saffioti, 2009, Araraquara.
6. PILON, A. C., CARNEVALE NETO, F., LOPES, M. N., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., CASTRO-GAMBOA, I. Detection of Major Micromolecular Constituents From *Jatropha multifida* and *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products, 2009, São Pedro.

7. MAGDALENA, A. G., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., CARVALHO, T. M., PILON, A. C. Effect of Al and Ag concentrations on the thermal behavior of the Cu-10wt.%Al and Cu-11wt%Al Alloys In: 14th internacional Congress on Thermal Analysis and Calorimetry and VI Brazilian Congress on Thermal Analysis and Calorimetry, 2008, São Pedro.

8. MAGDALENA, A. G., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., PILON, A. C. Envelhecimento da fase martensítica na liga Cu-9%Al-X%Ag (X=2, 6 e12) In: 31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia.

9. PILON, A. C., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G. Estudo da cinética de decomposição da fase martensítica na liga Cu-10%Al-8%Ag In: 31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia.

10. PILON, A. C., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., CARVALHO, T. M., MAGDALENA, A. G. Cinética de estabilização da fase martensítica na liga Cu-10%Al-4%Ag. In: 30º reunião Anual da Sociedade Brasileira Química, 2007, Águas de Lindóia.

11. REGO, T. S., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., CARVALHO, T. M., MAGDALENA, A. G., PILON, A. C. Efeito das Adições de 8 e 12%Ag na Microdureza da liga Cu-4%Al In: XIX Congresso Iniciação Científica da Unesp, 2007, Presidente Prudente.

12. PILON, A. C., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., CARVALHO, T. M., MAGDALENA, A. G., REGO, T. S. Estudo da cinética de envelhecimento da fase martensítica na liga Cu-11%Al In: XV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2007, São Carlos.

13. CARVALHO, T. M., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., MAGDALENA, A. G., PILON, A. C. Estudo da reação de precipitação na liga Cu-6%Ag com adições de Ag In: 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

14. MAGDALENA, A. G., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., CARVALHO, T. M., PILON, A. C. Reação de decomposição da fase martensítica em ligas de Cu-9%Al com adições de Ag In: 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia.

15. MAGDALENA, A. G., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., CARVALHO, T. M., PILON, A. C., REGO, T. S. Reação de decomposição euteóide nas Ligas Cu-9%Al e Cu-9%Al-2%Ag In: XV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2007, São Carlos.
16. PILON, A. C., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., CARVALHO, T. M., MAGDALENA, A. G., REGO, T. S. Reação de decomposição eutetóide na liga Cu-11%Al. In: XIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2007, Presidente Prudente.
17. SILVA, R. A. G., ADORNO, A. T., MAGDALENA, A. G., PILON, A. C. Cinética de envelhecimento da liga Cu-10%Al-10%Ag. In: 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia.
18. MAGDALENA, A. G., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., PILON, A. C. Cinética de precipitação de Ag na liga Cu-6%Al com adições de Ag In: 29º Reunião anual da sociedade brasileira de química, 2006, Águas de Lindóia.
19. ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., PILON, A. C. Cinética isotérmica de envelhecimento das ligas Cu-9%Al, Cu-10%Al e Cu-11%Al In: XXIX Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 2006, São Lourenço.
20. MAGDALENA, A. G., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., PILON, A. C. Decomposição da fase martensítica na liga Cu-9%Al-6%Ag In: XIV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar, 2006, São Carlos.
21. MAGDALENA, A. G., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., PILON, A. C. Estudo das transformações de fase nas ligas Cu-9%Al-2%Ag e Cu-9%Al-12%Ag In: XVIII Congresso de iniciação científica da unesp, 2006, Bauru.
22. PILON, A. C., ADORNO, A. T., MAGDALENA, A. G., SILVA, R. A. G. Estudo das transformações de fases nas ligas Cu-10%Al e Cu-11%Al. In: Congresso de iniciação científica da UFSCar, 2006, São Carlos.

23. PILON, A. C., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., MAGDALENA, A. G. Estudo do comportamento térmico das ligas Cu-10%Al e Cu-11%Al In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2006, Bauru.
  
24. PILON, A. C., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G., MAGDALENA, A. G. Estudo das transformações de fase na liga Cu-11%Al. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2005, Araraquara.
  
25. MAGDALENA, A. G., PILON, A. C., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G. Reação de precipitação de Ag na liga Cu-8%Al-6%Ag. In: XVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2005, Araraquara.
  
26. PILON, A. C., ADORNO, A. T., SILVA, R. A. G. Efeito de adição de 10% Ag na microdureza da liga Cu-4%Al In: XVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2004, Ilha Solteira.

*Dedico este trabalho ao Ian, Mônica e toda a minha Família pelo apoio e confiança depositadas em todas as minhas escolhas.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente à UNESP pelas oportunidades oferecidas ao longo desta jornada, e ainda, por apresentar o ambiente mágico da ciência e da educação. Foi num destes lugares, em meio à notas de saída e sintéticos de jasmim que conheci e escolhi a pessoa que me orientaria nesta nova etapa.

Agradeço ao Ian Castro-Gamboa, meu orientador, pelo exemplo humano de dignidade, sabedoria, comprometimento e principalmente pela nossa amizade.

Agradeço ainda a todos os professores do NuBBE pelos preciosos ensinamentos seja nos corredores ou nas salas de aula. Agradeço ao professor Wagner Vilegas (IQ-UNESP-Ar), pelos conselhos, ao professor João Olimpio Tognolli pela ajuda nos estudos quimiométricos, e por todos aqueles que acreditaram em mim e em meu potencial para realizar esse trabalho.

Agradeço a todos os Funcionários do IQ, em especial, Nivaldo nosso “Papai Noel”, Albertinho, à todos da seção da pós-graduação e as “meninas da biblioteca”, que participaram efetivamente na construção desta dissertação.

Agradeço a toda a “galera do laboratório”, Carol e Vinicius pela amizade ao longo destes 7 anos, Vânia pelo acolhimento na minha chegada, Fer com anos 80, Lidiane pelos conselhos, Luis Otávio, idéias e reflexões, Aline, pelas risadas, Paulo, me ajudando no CG, Gabriel por ter compartilhado esse tal de simplex centróide e aqueles que contribuíram de alguma forma para que completasse esse trabalho.

Agradeço com muito carinho a quatro pessoas que tive o prazer de conhecer e que sempre levarei comigo, independente do tempo e da distância. Figuras importantes nos momentos cruciais, nos momentos alegres, e acima de tudo, amigos: Marçal, Freira, Cristiano e Amarelo.

Quero deixar aqui meu agradecimento em especial ao meu “irmão de lab”, Fausto, pelas inúmeras contribuições, pelo companheirismo, amizade, pelas corridas de rua, e por compartilhar os momentos de reflexão.

Agradeço a FAPESP pelo financiamento deste projeto, pela seriedade e excelente trabalho de apoio à pesquisa no estado, um exemplo para todos os seguimentos da nação.

Agradeço por fim, os mais valiosos nessa jornada, minha Família, sobre tudo, pela compreensão, incentivo, luta e união. São eles os responsáveis por todas as conquistas, todo aprendizado e por todo crescimento pessoal.

Agradeço especialmente à Mônica, pelo carinho, amor, apoio e dedicação.  
Sem você tudo ficaria mais difícil!

**“A dúvida é o princípio da sabedoria”**

**ARISTÓTELES**

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>ESQUEMA 1.</b> (a) Níveis de energia eletrônicas; (b) Principais transições.....	39
<b>ESQUEMA 2.</b> Mecanismo de reação do ensaio de inibição da AChE.....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Constituintes químicos da espécie <i>Jatropha gossypifolia</i> .....	31
<b>TABELA 2.</b> Constituintes químicos da espécie <i>Jatropha multifida</i> L.....	34
<b>TABELA 3.</b> Cromóforos e as suas principais transições. ....	41
<b>TABELA 4.</b> Design fatorial $2^3$ para três fatores.....	46
<b>TABELA 5.</b> Tabela de análise de variâncias para o ajustem pelo método dos mínimos quadrados, de um dado modelo linear de parâmetros. $n_i$ = número de repetições no nível $i$ ; $m$ = número de níveis distintos da variável independente; $n$ = somatória de $n_i$ = número total de observações; $p$ = número de parâmetros do modelo.....	52
<b>TABELA 6.</b> Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo quártico especial, aplicado ao processo extrativo de metabólitos da planta <i>Jatropha gossypifolia</i> .....	79
<b>TABELA 7.</b> Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo quártico especial aplicado a processo extrativo dos metabólitos da planta <i>Jatropha multifida</i> . ....	83
<b>TABELA 8.</b> Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo cúbico aplicado otimização da condição cromatográfica para espécie <i>Jatropha multifida</i> . ....	94

## 12LISTA DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS

**TABELA 9.** Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo cúbico aplicado a otimização do processo cromatográfico para espécie *Jatropha gossypifolia* ..... 94

**TABELA 10.** Valores de  $m/z$  obtidos para *J. gossypifolia*, valores do dicionário de produtos naturais (DNP), erros em ppm, nome dos compostos detectados e a fonte. .... 109

**TABELA 11.** Valores de  $m/z$  obtidos para *J. multifida* comparados com o dicionário de produtos naturais (DNP), erros em ppm, nome dos compostos detectados e a fonte. .... 121

## RESUMO

No presente trabalho foram detectados e analisados os metabólitos secundários majoritários das espécies *Jatropha multifida* L. e *J. gossypifolia* L., fazendo uso de ferramentas quimiométricas de vanguarda, visando a otimização do processo de extração para, posteriormente, obter cromatogramas de *fingerprint* através da técnica acoplada CLAE-UV/DAD. Para a espécie *J. gossypifolia* L. a mistura 1 : 1 clorofórmio : isopropanol apresentou a melhor condição de extração enquanto para *J. multifida* L. a composição 2/3 : 1/6 : 1/6 de etanol : acetona : 1,4-dioxano foi a que obteve a melhor resposta. Os cromatogramas de *fingerprint* foram realizados fazendo uso de uma coluna monolítica C-18 (5  $\mu$ m), como fase estacionária, enquanto a fase móvel para análise da espécie *J. gossypifolia* L. foi composta por água e uma mistura de solventes orgânicos, MeOH : ACN, na proporção (68 : 32), em gradiente exploratório de 5-100% de fase orgânica. Para a espécie *J. gossypifolia* L., as condições otimizadas foram: temperatura de coluna de 30 °C, fluxo em 2,0 mL·min<sup>-1</sup> e o volume de injeção de 30  $\mu$ L. Para *J. multifida* L. a fase móvel foi composta por água e uma mistura MeOH : ACN 1 : 1 em gradiente exploratório 5-100% de fase orgânica. A temperatura de coluna de 40 °C, o fluxo de 2,5 mL·min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 30  $\mu$ L. Foram realizados bioensaios *in vitro*, tais como a redução do reagente DPPH (ação antioxidante), inibição da polimerização da hematina bovina (ação antimalárica), inibição enzimática de acetilcolinesterase (doença de Alzheimer) e o ensaio da inibição do crescimento de fungos fitopatógenos. Nenhum dos extratos brutos avaliados, apresentou atividade significativa quando comparados com os padrões. Quanto à detecção dos metabólitos, a aplicação de métodos de desreplicação aos extratos permitiram a identificação de algumas classes de substâncias típicas para o gênero *Jatropha* como terpenos e flavonoides. A estratégia desenvolvida na desreplicação utilizou a abordagem *in silico* através da comparação e análise dos dados espectrométricos e espectroscópicos obtidos dos experimentos CLAE-EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> e <sup>1</sup>H RMN, com bases de dados, juntamente com técnicas do estado da arte em RMN. Uma série de flavonoides pertencentes à classe das flavonas C-glicosiladas foram detectadas assim como alguns diterpenos. Para a *J. gossypifolia* foram detectados oito compostos sendo três diterpenos: (4Z)-jatrogrossidentadiona/(4E)-15-*epi*-jatrogrossidentadiona, 2-hidroxisojatrogrossidiona / 2-*epi*-hidroxiisojatrogrossidiona e

3 $\beta$ , 14a-hidroxipimara-7,9(11),15-triene-12-ona, três flavonoides, vitexina/isovitexina, orientina/homorientina e o flavonoide glicosídeo I, assim como o (*E*)-Ferulato de tetradecila. Para *Jatropha multifida* L. foram detectados 4 compostos; sendo três flavonoides: vitexina/isovitexina, orientina/homorientina, schaftosídeo, e o (*E*)-ferulato de tetradecila. Durante o estudo, foi observada a presença de um afídeo (*Orthezia praelonga*) nas folhas da espécie *Jatropha multifida* L. Este inseto foi analisado quanto aos seus metabólitos através da técnica acoplada CLAE-EMAR fornecendo informações relevantes preliminares no que diz respeito às interações inseto-planta.

**ABSTRACT**

The main goal of this research was to detect and analyze major secondary metabolites from *Jatropha multifida* L. and *J. gossypifolia* L. species, using state of art techniques in chemometrics aiming the optimization of the extraction process prior to the acquisition of the fingerprint chromatogram using HPLC-UV/DAD. The optimized extraction condition for *Jatropha gossypifolia* was the binary mixture 1:1 chloroform:isopropanol, while to *Jatropha multifida* L. the mixture was ternary consisting of 2/3:1/6:1/6 ethanol:acetone:1,4-dioxane. The fingerprint chromatograms were run using an exploratory gradient consisting of 5-100% of organic solvent, using a C-18 (5  $\mu\text{m}$ ) column, as stationary phase, and then the mobile phase was optimized, through the use of chemometrics for each species. In the case of *Jatropha gossypifolia* L. the phase consisted in a mixture of 68:32 MeOH:ACN, under a column temperature of 30 °C, injection volume of 30  $\mu\text{L}$  and a flow of 2.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . For *Jatropha multifida* L. was 1:1 MeOH:ACN, under column temperature of 40 °C, flow of 2,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and an injection volume of 30  $\mu\text{L}$ . Some *in vitro* bioassays were performed, such as, reduction of the reagent DPPH (antioxidant action), inhibition of polymerization of the haematin bovine (antimalarial), enzymatic inhibition of the acetylcholinesterase (Alzheimer's disease) and the assay of inhibition of the growth of phytopatogenic fungi. None of the crude extracts showed significant activities when compared to the used standards. The application of dereplication methods allowed the identification of some classes of compounds, already reported for *Jatropha*, such as terpenoids and flavonoids. The strategy developed to performed the dereplication, used an *in silico* approach through the matching and analysis of the spectrometric and spectroscopic data sets obtained using NMR and HPLC-HRMS(ESI)-MS<sup>2</sup> with databases of high resolution mass and simulated <sup>1</sup>H spectra. A series of C-glicosides flavones were detected, as well as, some diterpenes. Eight metabolites were detected in *J. gossypifolia*: (4Z)-jatrogrossidentadione/(4E)-15-*epi*-jatrogrossidentadione, 2-hidroxyisojatrogrossidione/2-*epi*-hidroxyisojatrogrossidione and 3 $\beta$ ,4 $\alpha$ -hidroxipimara-7,9(11),15-triene-12-one, three flavonoids, vitexin/isovitexin, orientin/homorientin and flavonoid glicoside I, as well as, (E)-tetradecyl ferulate. The compounds detected in *Jatropha multifida* were: vitexin/isovitexin, orientin/homorientin e schaftoside/isochaftoside and (E)-tetradecyl ferulate. During the course of this research, we observed the presence of a small insect that fed from

## 16ABSTRACT

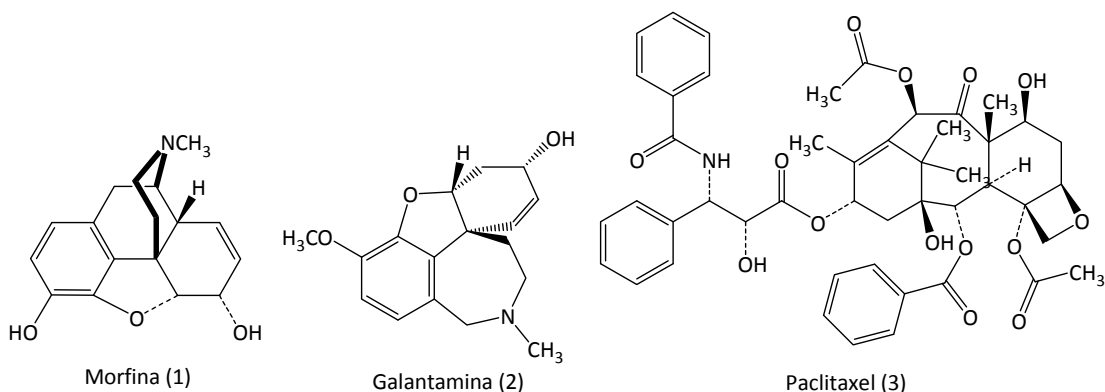
leaves of *J. multifida* L. called *Orthezia praelonga*. We attempted the dereplication of the crude extract from this insect in order to provide relevant information of any chemical-ecological relationship between the host plant and *O. praelonga*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A Química de produtos naturais no século XXI

O uso de plantas para a melhoria da qualidade de vida é tão antigo quanto o surgimento da civilização humana. A ciência terapêutica moderna é exemplo da importância dos produtos naturais. A utilização de plantas no tratamento de diversas enfermidades surgiu nos primórdios da humanidade, uso tal, justificado pela diversidade química gerada durante a pressão evolutiva ao longo de milhares de anos (WOLFENDER, 2009).

Dentre os inúmeros fármacos, provenientes de fontes naturais, podemos citar alguns, como a morfina, 1, um hipnoanalgésico encontrado em *Papaver somniferum*, sendo o primeiro produto natural isolado de planta e, recentemente, os fármacos, galantamina, 2, alcaloide utilizado contra a doença de Alzheimer encontrado na espécie *Galanthus nivalis* e, o diterpeno paclitaxel, 3, de *Taxus brevifolia*, utilizado no tratamento de tumores sólidos (Taxol®) (BOLZANI, et al., 2009).



Um estudo realizado por Newman e Cragg, (2007), mostra que de todas as entidades químicas novas (EQN's) encontradas desde 1/1981 até 06/2006, apenas 30% são de origem exclusivamente sintética e, entre os fármacos para o tratamento de câncer, 47% deles são de origem natural.

Contudo, nas duas últimas décadas observou-se um declínio na descoberta de fármacos provenientes de produtos naturais. Isto pode ser justificado por alguns fatores, como a introdução de ensaios acelerados (*High-Throughput Screening*) contra alvos moleculares definidos, substituindo à análise em bibliotecas de produtos naturais por aquelas exclusivamente sintéticas; a quebra de patentes, pressionando as indústrias responsáveis por alvos moleculares com preços mais competitivos e, principalmente, a visão

## 20INTRODUÇÃO

reducionista inserida na cultura ocidental, que estimula a pesquisa por mecanismos químicos e farmacológicos unimoleculares, em detrimento de questões multifatoriais associadas às misturas complexas como, por exemplo, o sinergismo dos compostos, entre outros. (VERPOORTE et al., 2005; LI et al., 2009; KOEHN et al., 2005).

Entretanto, estudos recentes têm mostrado que a diversidade estrutural e química dos produtos naturais remete à importância dessas fontes como protótipos de fármacos, como a presença de um número maior de centros quirais, complexidade estérica, número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, rigidez molecular e, número de átomos de oxigênio, quando comparados às bibliotecas de produtos sintéticos. Isso mostra que o potencial dos produtos naturais é ainda pouco explorado, estimulando a geração de novas técnicas analíticas de vanguarda (KOEHN et al., 2005).

Dentro dessa perspectiva, a química de produtos naturais tem buscado alternativas por moléculas bioativas e, fundamentalmente, quatro novas abordagens vêm sendo implementadas nessa nova visão para a compreensão da complexidade em matrizes naturais: a biologia sistêmica (*Systems Biology*), que considera as patologias e os mecanismos terapêuticos como processos multifatoriais; a metabolômica, que busca no perfil metabólico total (metabólitos primários e secundários), informações quanto à correlação entre o doente e o agente terapêutico; a quimiometria, que permite o planejamento e análise desses experimentos multifatoriais e, finalmente, a desreplicação, que simplifica o processo analítico de identificação estrutural de agentes bioativos, através da detecção *in silico* de moléculas previamente conhecidas (ULRICH-MERZENICH et al., 2007; NICHOLSON et al., 2008; LANG et al., 2008; LI et al., 2009).

### 1.2 Desreplicação

A definição de desreplicação (do inglês, *dereplication*) foi introduzida na literatura científico-acadêmica no início dos anos 90, definindo-a como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos, afim de evitar o re-isolamento e determinação estrutural de substâncias já isoladas (NG, et al., 2009).

As técnicas de desreplicação, recentemente utilizadas, são aquelas atreladas a plataformas analíticas acopladas, sendo compostas por um método de separação, associado a uma ferramenta espectroscópica (KONISHI, et al., 2007). Dentre as técnicas de separação mais comuns, podemos destacar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), enquanto que para as técnicas espectroscópicas podemos destacar o arranjo de diodos (DAD), a espectrometria de massas (EM) e, recentemente, a ressonância magnética nuclear (RMN).

No entanto, a técnica cromatográfica CLAE acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) fazendo uso de ionização por eletrospray junto com analisadores tipo *time of flight* (ISE-ToF) e experimentos *tandem* (EM<sup>n</sup>) fornece, atualmente, a melhor relação custo-benefício, pois é uma técnica extremamente sensível, podendo utilizar uma menor quantidade de amostra, menor tempo de análise, menor custo instrumental quando comparado à outras técnicas acopladas como, CLAE-RMN (WOLFENDER, 2009).

Sendo assim, técnicas de desreplicação estão atualmente muito bem estabelecidas no âmbito da pesquisa em produtos naturais, devido a sua versatilidade, rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade na análise de extratos brutos, de maneira a prover uma rápida priorização de extratos e substâncias a serem isoladas, evitando-se o re-isolamento de substâncias já conhecidas (LANG et al., 2008; WOLFENDER, 2009).

### 1.3 Quimiometria

A quimiometria é uma área multidisciplinar que fornece uma série de ferramentas de planejamento, otimização e análise de experimentos, possibilitando a extração do máximo de informações pertencentes a um conjunto de dados, baseando-se em métodos matemáticos e de estatística multivariada e assim, formando uma interface de análise entre os dados químicos gerados durante experimentos, junto a plataformas matemáticas de análise (TAVALHINI, 2003; FERNANDES, 2006).

Na área de produtos naturais a quimiometria permite o desenvolvimento de metodologias analíticas para processos extrativos como a seleção de solventes e otimização de condições cromatográficas de separação, como por exemplo, obtenção de “impressões digitais” ou *fingerprints*, estudo de correlações intra e inter espécies, quimiosistemática, controle de qualidade de processos, entre outros (ALMEIDA et al., 2007; BORGES et al., 2007; YIZENG et al., 2008).

O conceito de *fingerprint* foi adotado pela World Health Organization (WHO) como estratégia para identificar e avaliar qualitativamente, uma erva medicinal especialmente entre aquelas que não possuem padrões autênticos para a identificação dos compostos ativos (BORGES et al., 2007).

#### **1.4 A importância dos produtos naturais como agentes antioxidantes, cicatrizantes e acetilcolinesterásicos**

O estado redox, balanço entre agentes oxidantes e antioxidantes, exerce um papel fundamental na manutenção das funções vitais e bioquímicas das células tais como, transcrição do fator *NF-κB*, associado a processos de ativação de determinados genes, vasodilatador e modulador de respostas imunes e inflamatórias da pele. Qualquer alteração deste balanço acarreta em prejuízo às células e ao organismo. Deste modo, o excesso de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERO e ERN) pode resultar em alterações nos eventos metabólicos, sinais de tradução e mudanças patológicas em células e conseqüentemente em tecidos. (PORTUGAL et al., 2007).

Além disso, uma série de estudos tem mostrado que espécies oxidativas reativas (EOR) possuem um importante papel nos processos de cicatrização, em particular, grandes quantidades (EOR) são produzidas em tecidos feridos ou inflamados pelo NADPH oxidase, uma enzima complexa, que é expressa em altos níveis por células inflamatórias. Sob ativação do NADPH oxidase, as células produzem o ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ) altamente reativo, que rapidamente é convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e água, processos importantes contra agentes patológicos externos. Entretanto, a produção excessiva do superóxido ou desintoxicação parcial leva a formação do peróxido de hidrogênio que por meio da reação de Fenton, em que o ferro passa do estado de oxidação +2 para +3, leva à formação de radicais hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e ao ânion hidroxila ( $OH^-$ ) que causam a peroxidação de ácidos graxos, principalmente o ácido araquidônico, a prostaglandinas. Alguns autores referem que a concentração de prostaglandinas, como o 8-isoprostano, em fluídos de feridas crônicas venosas foi maior quando comparado com feridas humanas agudas (SCHÄFER et al., 2008).

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia decorrente da degeneração neurológica progressiva, que acarreta nos estágios iniciais da doença o comprometimento da memória e a dificuldade no raciocínio, e em estados mais avançados, ocorre a perda das funções psicomotoras e cognitivas, podendo levar a morte em até 10 anos (VIEGAS JUNIOR et al., 2004). Dentre os fatores relacionados à patologia da DA, podemos destacar a redução dos

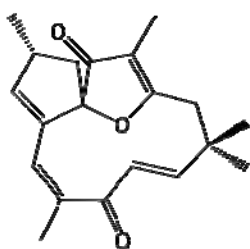
## 24INTRODUÇÃO

níveis de acetilcolina (ACh) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical (TABARRINI et al., 2004).

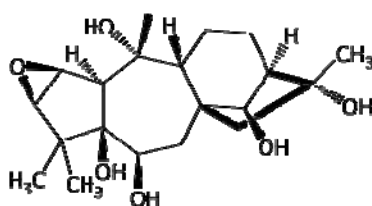
Os produtos naturais, por sua vez, vêm recebendo uma atenção especial, tendo em vista que alguns metabólitos secundários vegetais e de microorganismos vêm sendo identificados como inibidores de AChE (IChEs) (PARIHAR e HEMMANI, 2004). Além da galantamina, a (-)-huperzina A, uma substância isolada da erva chinesa *Huperzia serrata*, e a huperzina P, possuem propriedades IChEs. O alcaloide isolado de *Eucharis grandiflora* (Amaryllidaceae), sanguinina (9-O-desmetilgalantamina) mostrou-se 10 vezes mais potente que a própria galantamina em ensaios *in vitro* (LÓPEZ et al., 2002).

### 1.5 Euphorbiaceae e o Gênero *Jatropha*

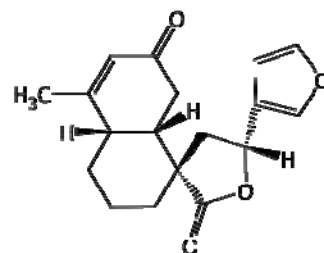
Pertencente à ordem Geraniales, a família Euphorbiaceae, hoje agrupa 307 gêneros e mais de 8.000 espécies. Os principais centros de dispersão das euphorbiáceas são a América e a África. No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies, entre árvores, arbustos, ervas e lianas, todas lactescentes (JOLY et al., 1975; DI STASI et al., 2002). A família Euphorbiaceae é bem estudada quanto à sua constituição química, sendo os diterpenos considerados seus principais quimiomarcadores, 4, 5 e 6.



jatrofona (4)



rodojaponina (5)



cis-desidrocrotonina (6)

O gênero *Jatropha* pertence à subfamília Crotonoideae e congrega cerca de 175 espécies de distribuição pantropical (WEBSTER, 1994). No Brasil, espécies de *Jatropha* são comuns no Nordeste, onde são bem adaptadas ao clima seco (xerofilia). Todas as espécies de *Jatropha* produzem látex e as características anatômicas dos dutos laticíferos têm sido utilizadas para estabelecer relações filogenéticas dentro da família Euphorbiaceae (RUDALL, 1987; RUDALL, 1994).

Muitas espécies de *Jatropha* são vastamente empregadas na medicina popular como purgativa, febrífuga, contra gonorréia, diurética, cicatrizante e hipotensiva (ABREU et al., 2003; AIYELAAGBE, 2000).

### 1.5.1 *Jatropha gossypifolia* L.

A espécie *J. gossypifolia* L., Figura 1, possui seu centro de dispersão localizada na América do Sul, principalmente, na região nordeste e sudoeste do Brasil (AUVIN-GUETTE et al., 1997). Popularmente conhecida como pinhão roxo, esta espécie tem sido amplamente utilizada no tratamento de febres, carbúnculos, eczemas, úlceras e doenças venéreas, enquanto que as sementes são purgativas e usadas contra dores musculares (ODUOLA et al., 2005).

O extrato foliar de *J. gossypifolia* L. possui propriedades anticoagulantes embora o estudo não apresentou correlações entre o metabólitos pertencentes à planta e sua atividade (ODUOLA et al., 2005). De modo análogo, estudos relatam que o extrato etanólico dos órgãos aéreos de *J. gossypifolia* L. apresenta ação hipotensiva e vasorelaxante em ratos conscientes, mas o estudo carece das relações químicas responsáveis pelo efeito (ABREU, et al., 2003).



**Figura . *Jatropha gossypifolia* L. (a) Aspecto do arbusto;(b) Detalhe da inflorescência.**

A constituição fitoquímica da espécie *Jatropha gossypifolia* apresenta em sua maioria os compostos das classes: lignanas, flavonoides, terpenos, alcaloides, coumarinas, forbóis e peptídeos cíclicos, Tabela 1.

Tabela . Constituintes químicos da espécie *Jatropha gossypifolia*.

Classe e nome dos compostos	Referência
<b>Diterpeno</b>	
citlaltiriona (7)	DAS, <i>et al.</i> , 1999
jatrophatriona	MAWARDI, <i>et al.</i> , 1990
jatrophena	RAVINDRANATH, <i>et al.</i> , 2003
jatrophona (4)	CALIXTO, <i>et al.</i> , 1987
<b>Sesquiterpenos e triterpenos</b>	
(2 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,14 $\beta$ ,20S)-2,24,25-trihidroxilanosta-7-en-3-ona (8)	TINTO, <i>et al.</i> , 1992
(13 $\alpha$ ,14 $\beta$ ,20S)-2,24,25-trihidroxilanosta-1,7-dien-3-ona	TINTO, <i>et al.</i> , 1992
<b>Lignanas e Coumarinas</b>	
gadaína (9)	BANERJI <i>et al.</i> , 1984
jatrophano	BANERJI <i>et al.</i> , 1984
propacina	DAS, <i>et al.</i> , 2001
gossipifano	DAS, <i>et al.</i> , 1995
jatrodieno	DAS, <i>et al.</i> , 1996
arilnaftaleno	DAS, <i>et al.</i> , 1988
gossipidieno	DAS, <i>et al.</i> , 1999
cleomiscosina A	DAS, <i>et al.</i> , 2003
2,3-Bis(hidroximetil)-6,7-(metilenodioxo)-1-(3',4'-dimetoxifenil)naftaleno	DAS, <i>et al.</i> , 1988
<b>Flavonóides</b>	
vitexina (10)	SANKARA, <i>et al.</i> , 1971
isovitexina	SANKARA, <i>et al.</i> , 1971
apegenina	SANKARA, <i>et al.</i> , 1971
<b>Alcalóides</b>	
alcalóide A (11)	AHMAD, <i>et al.</i> , 1992
alcalóide B	AHMAD, <i>et al.</i> , 1992
alcalóide C	AHMAD, <i>et al.</i> , 1992
<b>Peptídeos cíclicos</b>	
ciclogossina A (12)	HORSTEN, <i>et al.</i> , 1996
ciclogossina B	AUVIN-GUETTE, <i>et al.</i> , 1997
<b>Miscelânea</b>	
(E)-ferulato de tetradecila	OKUYAMA, <i>et al.</i> , 1996
ácido ferúlico (13)	OKUYAMA, <i>et al.</i> , 1996

As substâncias detectadas para a espécie *Jatropha gossypifolia* numeradas na Tabela 1, são mostradas na Figura 2, exceto a estrutura 4, que pode ser vista na página 29.

Figura . Metabólitos encontrados para espécie *Jatropha gossypifolia* L.

### 1.5.2. *Jatropha multifida* L.

Nativa da América Latina, a *J. multifida* L. é conhecida popularmente pelos nomes, flor de coral, coral, coral dos jardins e flor de sangue, é usada como planta ornamental e também como planta medicinal, Figura 3. O seu látex é utilizado na medicina popular como cicatrizante tanto feridas quanto úlceras, no tratamento da gonorréia, infecções de pele e urinárias e purgativa (AIYELAAGBE, 2000; KOSASI, S.; VAN DER SLUIS, W. G.; LABADIE, R., 1989).



Figura . *Jatropha multifida* L. (a) Aspecto do arbusto; (b) detalhe da inflorescência.

As raízes da *Jatropha multifida* L. foram avaliadas quanto a sua atividade antibacteriana. Todos os extratos foram ativos contra o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* embora, nenhum apresentasse atividade superior aos padrões utilizados (AIYELAAGBE, 2000).

A maioria das espécies de *Jatropha* são tóxicas, principalmente os frutos, quando ingeridos por animais, inclusive o homem. Há relatos da hospitalização de crianças por toxicidade aguda após a ingestão de 10 frutos. O efeito tóxico é devido à toxalbumina ricina, uma das mais venenosas substâncias conhecida pelo homem. É estimado que a dose letal de ingestão dos frutos é igual a 1mg/Kg de massa corpórea (LEVIN et al., 2000).

A constituição fitoquímica da espécie *Jatropha multifida* L. apresenta em seu látex, peptídeos cíclicos, como a labaditina, alguns acilfluoroglucínóis como o multifidol e um ciano-glicosídeo, multifidina, Tabela 2.



### 1.6 Espectrometria de massas (EM)

O princípio da técnica data do final do século XIX, quando J. J. Thompson determinou a razão massa-carga do elétron e Wien, estudando sobre deflecção magnética, constatou que os raios anódicos eram constituídos de cargas positivas. Entretanto, o espectrômetro de massas (EM) atual foi construído somente em 1918, por A. J. Dempster, e apenas nos últimos 50 anos o equipamento tornou-se acessível para as indústrias e para pesquisa em geral (PAVIA et al., 2009).

De forma simplificada, podemos compreender o instrumento de espectrometria de massas, sendo composto por cinco partes, Figura 5. A primeira parte do espectrômetro é a entrada de amostra, na qual, sob condições normais de temperatura e pressão (1atm) a amostra é injetada numa câmara sob baixa pressão (PAVIA et al., 2009).

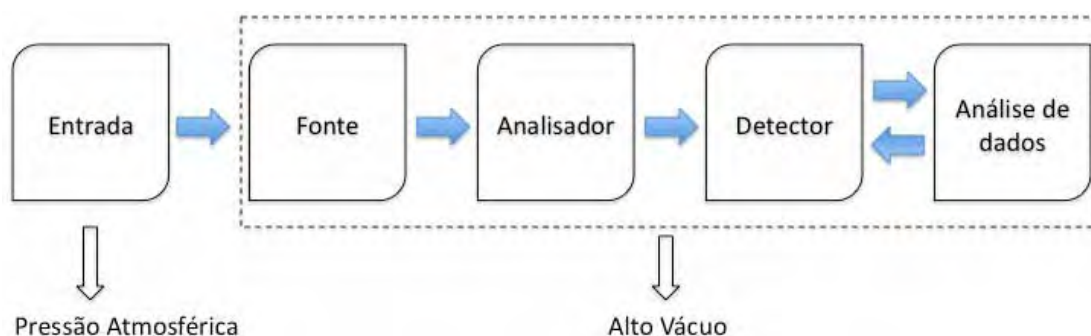


Figura . Os componentes do espectrômetro de massas.

Uma vez que as moléculas são inseridas no espectrômetro de massas, a amostra é convertida em partículas carregadas, pelo segundo componente, a fonte de íons, antes de ser analisada e detectada. Ao longo de vários anos uma variedade de fontes de ionização foram construídas afim de detectar uma extensa gama de metabólitos e nos últimos anos, técnicas no estado da arte em separação e detecção como, CLAE-EM estão sendo amplamente aplicadas (PAVIA et al., 2009).

Dentre os ionizadores de massas, os mais empregados são: a ionização por elétrons (*Eletron Ionization*, EI), ionização química (*Chemical Ionization*, CI), ionização por bombardeamento com acelerador de átomos (*Fast Atom Bombardment*, FAB), ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), fotoionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Photo Ionization*, APPI), ionização por dessorções a laser assistida por uma matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*,

MALDI) e a ionização por *spray* carregado (*Electrospray Ionization, ESI*) (CHEN et al., 2005; TAKÁTS et al., 2005; COTTE-RODRIGUEZ et al., 2005).

Para este estudo, exclusivamente, foi utilizado a ionizador por eletrospray carregado (IES), técnica composta por três etapas. Primeiro, as moléculas da amostra são nebulizadas em gotas carregadas, em seguida, os íons são separados do solvente e por fim, são transportados para dentro da região do analisador. Na figura 6, detalhadamente, pode-se entender que a solução contendo a amostra é nebulizada através de um fino capilar sob ação de campo elétrico, por conta de um contra-eletrodo, causando a separação dos íons positivos e negativos, formando uma dupla camada de íons no menisco do líquido. A atração eletrostática dos íons em direção ao contra-eletrodo, causa uma distorção da sua superfície no formato de cone, chamado de cone de Taylor (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

Em seguida, a tensão superficial do líquido tenta manter a superfície não deformada mas, a partir de uma determinada voltagem, um fino filamento líquido é nebulizado para fora do cone de Taylor, formando gotículas carregadas em direção ao contra-eletrodo. As gotículas carregadas são submetidas a um fluxo contrário de gás secante, (normalmente nitrogênio) que evapora o solvente das moléculas. Assim a densidade de carga de cada gota aumenta até que as forças de repulsão excedem a tensão superficial da gota (conhecida como limite de Rayleigh), e sucessivamente, ocorrem fissões coulômbicas, até que a amostra fique livre do solvente e os íons na fase gasosa possam ser transferidos para o analisador (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

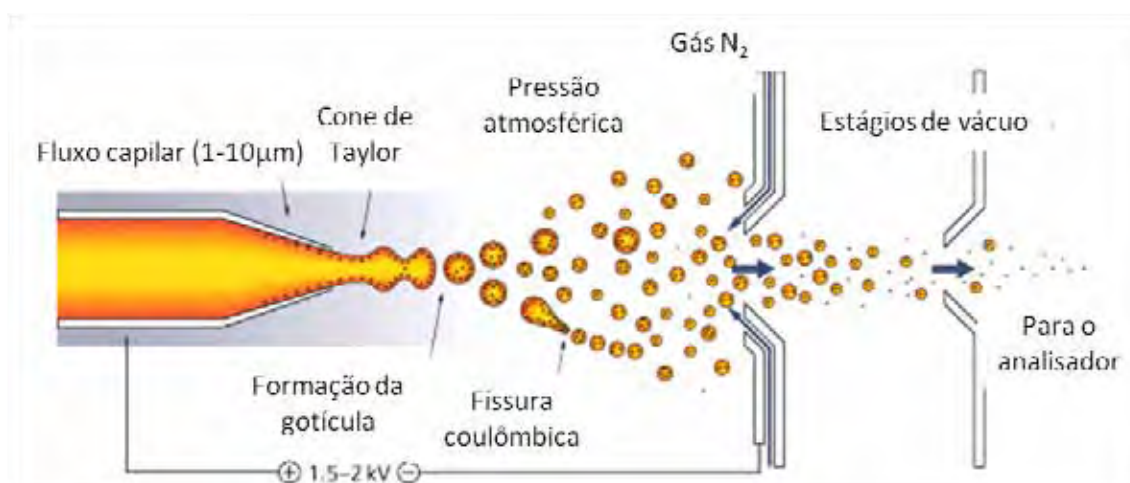


Figura . Mecanismo da ionização por *electrospray*.

A seguir, o feixe de íons é transportado para o terceiro componente do EM, o analisador ou filtro de massas. Esses íons são acelerados através de uma campo elétrico e separados de acordo com a razão massa-carga de cada molécula ( $m/z$ ).

*Uma extensa variedade de analisadores de massas foram desenvolvidos e, a escolha em sua maioria, depende do tipo de aplicação desejada. Dentre os principais analisadores podemos destacar o analisador do tipo quadrupolo (Q), ion trap, analisador por tempo de voo (Time of Flight, ToF), setores do tipo elétrico e magnético, e equipamentos com transformada de Fourier do tipo ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR) e orbitrap (HU et al., 2005; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).*

Neste estudo, o equipamento utilizado possui dois analisadores, o primeiro por tempo de voo, para análise de alta resolução das massas carregadas, seguido por um quadrupolo, para a realização de experimentos EM<sup>n</sup>. Neste tipo de experimento, o íon de interesse é submetido a choques atômicos com um gás inerte para gerar fragmentos induzidos, afim de obter informações quanto à estrutura química dos metabólitos (CHIARADIA, et al., 2008).

O analisador do tipo quadrupolo é composto por um conjunto de 4 hastes arranjadas paralelamente em relação ao feixe de íons. As hastes podem ser cilíndricas ou hiperbólicas. Uma tensão de corrente contínua (CC) e uma radiofrequência (RF) é aplicada nas hastes, gerando um campo eletrostático oscilante na região interna. Dependendo da razão da amplitude RF pela CC, íons adquirem uma oscilação neste campo eletrostático e conforme altera-se o RF e o CC, alguns íons ou por serem muito pequenos ou muitos grandes, nos parâmetros analisados, podem se chocar com alguma das hastes e não atravessar o analisador. No entanto, moléculas com razões de  $m/z$  adequadas para aquele ajuste possuem oscilação constante e assim, atravessam o quadrupolo em direção ao detector, Figura 7 (PAVIA et al., 2009).



Figura . Analisador do tipo quadrupolo.

O analisador por tempo de voo é baseado no princípio de que a velocidade de dois íons gerados, na mesma fonte de ionização, possuem a mesma energia cinética, no qual, as velocidades irão variar dependendo da massa dos íons, Figura 8. Os íons de menor massa irão possuir maior velocidade e conseqüentemente menor tempo de viagem entre a entrada do analisador e o choque no detector (CHIARADIA et al., 2008).

**Figura . Analisador por tempo de voo (ToF) linear.**

Quando um íon atravessa o analisador, ocorre o choque da partícula carregada no detector que simplesmente irá produzir uma corrente elétrica em função do número de íons. A magnitude do sinal elétrico é convertida no espectro de massas onde aparecem os picos para cada íon selecionado na relação  $m/z$  (HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

### **1.7 Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)**

De forma geral, quando uma radiação qualquer passa através de um material transparente, parte dessa radiação pode ser absorvida e, como resultado, átomos ou moléculas, passam de um estado de baixa energia ou estado fundamental, para um estado de alta energia, ou estado excitado. O processo de excitação ocorre de forma quantizada, no qual, a radiação eletromagnética absorvida possui energia exatamente igual à diferença entre o estado fundamental e o excitado (PAVIA et al., 2009)

No caso da espectroscopia de ultravioleta e visível, as transições que ocorrem nesta região do espectro, são referentes aos diferentes níveis energéticos dos elétrons. Quando uma molécula absorve energia, os elétrons são excitado do (HOMO) para o (LUMO) (SILVERSTEIN et al., 1981)

Para muitas moléculas o orbital LUMO são os orbitais s, os quais, geralmente correspondem as ligações  $\sigma$ . Os orbitais p, possuem níveis de energia maiores, assim como, os orbitais que mantêm os pares elétrons não compartilhados, conhecidos como orbital não ligante  $n$ . O esquema 1 mostra progressão típica dos estados de transição dos níveis eletrônicos (PAVIA, et al., 2009; SILVERSTEIN, et al., 1981).

**Esquema . (a) Níveis de energia eletrônicas; (b) Principais transições.**

Para todos os compostos, exceto os alcanos, os elétrons podem sofrer mais de uma transição possível de energia. As mais comuns são mostradas no Esquema 1b. Pode-se

claramente entender que as transições de orbitais diferentes de HOMO para LUMO possuem maior energia, Esquema 1b.

No entanto, nem todas as transições que a primeira vista parecem ser possíveis, podem ocorrer. Algumas restrições, chamadas regras de seleção, devem ser consideradas. Como por exemplo, a restrição às transições em que ocorre a mudança no número do spin quântico. Esta transição é conhecida como transição proibida (SILVERSTEIN et al., 1981).

Quanto maior o número de moléculas capazes de absorver a luz de um dado comprimento de onda, maior é a extensão da luz absorvida. A partir dessa idéia, podemos aplicar a lei de Lambert-Beer para a expressão empírica de um experimento em ultravioleta

$$A = -\log(I/I_0) = \epsilon cl$$

onde  $A$  é a absorvância,  $I$  é a intensidade de luz que atravessa a célula de amostra,  $I_0$  é a intensidade de luz incidente,  $\epsilon$  é a absorvidade molar, que refere-se a transição eletrônica da molécula,  $c$  é a concentração molar do soluto e  $l$  é a largura do caminho óptico na célula.

Embora, a absorção no ultravioleta ocorra pela transição dos elétrons do estado fundamental para o estado excitado, o núcleo no qual os elétrons estão ligados atua de forma importante na absorção do comprimento de onda absorvido. O núcleo determina a força com que o elétron está ligado e através deste parâmetro podemos entender os estados de energia. O grupo de átomos que produzem uma tal absorção é chamado de grupo cromóforo (PAVIA et al., 2009).

Dependendo do tipo de átomo podemos obter diferentes transições e diferentes valores de absorção. Como pode ser observado na Tabela 3, existem diferenças de absorção de acordo com a classe do metabólito, no entanto, a maioria destes simples cromóforos absorvem aproximadamente na mesma faixa de comprimento de onda (160-210nm).

Contudo, a substituição dos hidrogênios por outros grupos na estrutura básica dos cromóforos mudam a posição e intensidade da absorção da radiação ultravioleta. Os substituintes que aumentam a absorção da radiação e possivelmente o comprimento de onda são chamados de auxocromos. Além disso, existem quatro outros efeitos possíveis pela introdução de diferentes substituintes (SILVERSTEIN et al., 1981).

### 35INTRODUÇÃO

O primeiro é o deslocamento batocrômico que consiste na diminuição da energia de absorção pelo cromóforo, ou seja, ele absorve maiores comprimentos de onda. O efeito hipsocrômico, ocorre inversamente ao efeito batocrômico, há o deslocamento da absorção para energias maiores, que corresponde a menores comprimentos de onda. Já o efeito hiperacrômico está relacionado ao aumento da intensidade da absorção pelo cromóforo. E o último efeito é o hipocrômico, que diminui a intensidade da absorção pelo cromóforo (PAVIA et al., 2009).

Tabela . Cromóforos e as suas principais transições.

<i>Classe</i>	<i>Transição</i>	$\lambda_{m\acute{a}x}$
<i>Alcanos</i>		<i>nm</i>
<i>Alcenos e Alcinos</i>		<i>nm</i>
<i>Compostos Carbonílicos</i>		<i>nm</i>
<i>Alcoóis</i>		<i>nm</i>
<i>Éteres</i>		<i>nm</i>
<i>Aminas</i>		<i>nm</i>
<i>Compostos Sulforados</i>		<i>nm</i>

## 1.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

O princípio da técnica espectroscópica da ressonância magnética nuclear (RMN) consiste na absorção de energia, quando uma radiação passa por um conjunto de átomos ou moléculas, elevando o estado fundamental destes átomos e moléculas para um estado excitado. Quando os átomos voltam ao estado fundamental ocorre a liberação desta energia que pode ser medida.

No entanto, na técnica de ressonância magnética nuclear medimos alterações de energia no núcleo atômico ao invés dos elétrons como espectroscopia na região UV e, diferentemente de outras técnicas espectroscópicas, a RMN é induzida através da aplicação de um campo eletromagnético externo. Este campo eletromagnético causa um desdobramento do nível de energia do núcleo no estado fundamental para o estado excitado, permitindo assim, transições de níveis energéticos, através de absorções de energia, chamadas de frequências de ressonância nuclear, Figura 9 (KING e KUCHEL, 1994; NAKANISHI, 1990).

**Figura . (A) Na ausência de campo magnético externo, os estados de spin do núcleo ( $1/2$  e  $-1/2$ ) são degenerados. (B) Na presença de uma campo magnético externo, os estado de spin são separados dentro de dois níveis, os de baixa energia ou estado fundamental ( $\alpha$ ) e de alta energia, ou estado excitado ( $\beta$ ). No estado de equilíbrio térmico existe um pequeno excesso de átomos no estado fundamental; estes spins pode ser levados para o estado excitado através da absorção de energia com uma frequência,  $\nu$ , no qual satisfaz a relação  $h\nu = E_{\beta} - E_{\alpha}$ . O processo de relaxamento,  $T_1$  opera continuamente para restabelecer o equilíbrio térmico.**

De maneira simples, temos quatro características principais atribuídas a um pico, ou ressonância, presentes num espectro de  $^1\text{H}$  RMN.

### 1.8.1 Deslocamento químico

O deslocamento químico é a frequência de absorção normalizada regida pela equação de Larmor

onde  $\omega$  é a frequência angular do movimento de precessão do núcleo,  $B_0$  é o campo magnético externo e  $\gamma$  é chamado de relação magnetogírica, constante fundamental que é invariável para

cada núcleo. Assim, para um dado campo magnético, diferentes núcleos absorvem radiações de radiofrequência distintas (KING e KUCHEL, 1994; NAKANISHI, 1990).

O deslocamento químico, normalmente é expresso em partes por milhão (ppm) e é denotado como  $\delta$ .

### 1.8.2 Área de um pico

A área de um pico é medida em unidades arbitrárias; freqüentemente chamada de integral ou intensidade de ressonância. O valor é convenientemente obtido pela integração computacional sendo proporcional ao número de núcleos que contribuem para a ressonância. No caso de espectros bidimensionais, os picos são relacionados a um volume e não a uma área (KING e KUCHEL, 1994; NAKANISHI, 1990).

### 1.8.3 Multiplicidade

A multiplicidade é o resultado do acoplamento spin-spin de núcleos adjacentes (este efeito é conhecido como acoplamento escalar). A separação (medida em Hertz) entre os componentes de um pico é chamado de constante de acoplamento e é denominado por  $J$ . Este efeito geralmente não é observado mais do que a três ligações. O pico de um spin  $\frac{1}{2}$ , separado de  $n$  adjacentes spin  $\frac{1}{2}$  menor de três ligações, irá fornecer um multipletto de  $n+1$  picos. Assim quando o núcleo adjacente possui dois hidrogênios que interagem com um hidrogênio de ligação adjacente irá fornecer um triplete, (2+1) (KING e KUCHEL, 1994; NAKANISHI, 1990).

### 1.8.4 Fase

Essa característica é dada ao ajuste da equação de onda, pois um sinal, estando no eixo vertical pode apresentar-se de duas formas: na fase negativa ou positiva, ou ainda dispersivo, caso em que existam ambos os sentidos (padrão e invertido) (KING e KUCHEL, 1994; NAKANISHI, 1990).

## 1.9 Planejamento experimental

### 1.9.1 Planejamento Fatorial

A quimiometria, como descrita anteriormente, é uma área multidisciplinar que abrange uma série de técnicas de planejamento e análise de dados. Uma das principais áreas pertencentes à quimiometria é o planejamento de experimentos, no qual, está inserido o *design* fatorial. Neste tipo de *design* as respostas são geradas a partir de variáveis de processo, por exemplo, temperatura, pH, concentração dos reagentes, etc. Neste tipo de variável as alterações dos níveis no processo afetam o resultado experimental através dos seus efeitos principais, ou mesmo pela interação com outras variáveis de processo. Entretanto, os níveis podem ser alterados de forma independente uns dos outros durante o planejamento (BARROSNETO et al., 2006; COX et al., 2000).

Dentre os modelos de *design*, um dos mais utilizados é *design* fatorial  $2^3$  com ponto central, composto oito níveis distintos da variável independente, ou seja, oito diferentes experimentos, e três ensaios sob o ponto central, com o propósito de verificar o ajuste linear do modelo, Tabela 4. Os planejamentos são explicados através de equações de regressão, podendo-se utilizar de modelos lineares, quadráticos, cúbicos, entre outros. A partir da equação de regressão são gerados os gráficos de superfície de contorno ou resposta, fornecendo informações sobre o modelo de regressão. Dependendo do número de repetições podemos estimar os erros aleatórios envolvidos em cada experimento assim como, calcular a falta de ajuste da equação no comportamento experimental (ALMEIDA et al., 2007).

**Tabela . Design fatorial  $2^3$  para três fatores**

-1 e +1 representam os níveis dos fatores.

Um das formas mais comuns de avaliar quais dentre as variáveis são significantes para explicação do comportamento experimental é a análise dos efeitos. Nela, por exemplo, podemos estimar através de gráficos, o efeito principal e as interações de cada variável pertencente ao conjunto experimental. Neste tipo de gráfico o eixo vertical representa uma

parcela da resposta média para uma determinada configuração do fator, enquanto o eixo horizontal representa os níveis dos fatores examinados. Quando um fator muda de uma configuração para outra, isso pode levar a uma mudança significativa na resposta (JI et al., 2005).

### 1.9.2 Planejamento de Misturas

Para o estudo de modelagem de misturas, no entanto, os termos já não mais são independentes, os fatores são chamados variáveis de mistura, pois referem-se a diferentes proporções dos componentes e não às quantidades totais da mistura, como ocorre nos planejamentos em que temos variáveis de processo (BARROSNETO et al., 2006; BREITKREITZ et al., 2009). Por isso, a restrição de cada nível deve ser expressa de acordo com a equação

$$(1)$$

onde  $x_i$  representa a proporção do composto  $i$  na mistura, e  $n$  é o número de componentes. A partir dessa equação, é possível ajustar os modelos experimentais a fim de obter respostas mais adequadas e mais precisas para os parâmetros estudados (BARROS NETO et al., 2006).

A otimização de misturas inevitavelmente, ocorre de forma multivariada, quando utilizamos três ou mais solventes, pois a equação 1 impõe esta condição, ou seja, o modelamento deve consistir de um ajuste matemático polinomial aplicado a uma superfície de resposta (COX et al., 2000). Para uma mistura de três fatores são apresentados as equações rearranjadas para os modelos de mistura para o ajuste linear, quadrático e cúbico especial.

$$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad (2)$$

$$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (3)$$

$$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (4)$$

A equação 2 mostra os termos lineares de análise de mistura, enquanto a equação 3 e 4 referem-se aos termos quadráticos e cúbico especial, respectivamente. Os termos  $b_1, b_2, b_3$  representam os valores lineares dos componentes puros, enquanto os valores de  $b_{12}, b_{13}, b_{23}$  representam os termos de interações quadráticas entre as variáveis. O termo  $b_{123}$  descreve a influência não linear das três componentes presentes na mistura. Para sistemas em mistura

## 41 INTRODUÇÃO

de três solventes quaisquer A, B e C o modelo simplex-centróide é o mais empregado, Figura 10a.

Segundo esse planejamento 10 experimentos são realizados, sendo 7 misturas entre os solventes e 3 experimentos sob componentes puros. Dentre os experimentos em mistura temos 3 experimentos de composição binária (1:1 de A:B, 1:1 de A:C e 1:1 de B:C, correspondente aos pontos médios das arestas) e 4 experimentos de composição ternária ( $1/3:1/3:1/3$  de A:B:C, correspondente ao ponto central do triângulo, e três outros experimentos entre o ponto central e vértice do triângulo de composição  $2/3:1/6:1/6$  de A:B:C,  $1/6:2/3:1/6$  de A:B:C e  $1/6:1/6:2/3$  de A:B:C), como mostrado na Figura 10a (BARROS NETO et al., 2009).

(a)

(b)

**Figura . Modelo de planejamento experimental: (a) *Design* em mistura Simplex-centróide; (b) *Design* fatorial em estrela.**

Quando queremos analisar o comportamento experimental através de superfícies de resposta são necessários um maior de níveis para cada variável. Se utilizamos 5 níveis para duas variáveis num planejamento fatorial, temos  $5^2$  experimentos (25 ensaios) ou seja, um número relativamente alto, sem contarmos, que serão necessários duplicatas para a análise dos erros e ajustes experimentais, isto é, aproximadamente, 50 experimentos (BARROS NETO et al., 2009).

Contudo, outros tipos de planejamento foram construídos para diminuir o número de experimentos sem perder significância na resposta. Um deles é o planejamento em estrela. Este planejamento é constituído de 11 experimentos sendo três deles realizados no ponto central e oito nos vértices da estrela, Figura 10b. A vantagem deste *design* em relação ao fatorial, se considerássemos 5 níveis para cada variável, é que o planejamento em estrela utiliza de 11 experimentos enquanto, o fatorial 25 ensaios (BARROS NETO et al., 2009).

### 1.10 Análise de variância (ANOVA)

Todo modelo aplicado a um conjunto de experimentos é composto por uma equação de regressão, referente as respostas em função da variação nos níveis de cada fator, um resíduo, correspondente ao erro intrínseco aleatório de todo experimento, e a falta de ajuste da equação de regressão, denominada de falta de ajuste (COX et al., 2000).

Portanto, o exame dos resíduos é fundamental para que possamos avaliar a qualidade de qualquer modelo. Primeiramente, os resíduos devem ser pequenos, pois, se num determinado modelo temos o valor alto dos resíduos, significa que provavelmente é um modelo ruim. Entretanto, podemos ter alguma variável ou fatores de manipulação não sendo considerados gerando assim erros aleatórios na análise (BARROS NETO et al., 2009).

Um dos métodos mais utilizados para se avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo é a Análise da Variância (ANOVA) (BARROS NETO et al., 2009). Neste tipo de análise inicialmente decomparamos os desvios das respostas observadas,  $y_i$ , em relação à resposta média global,  $\bar{y}$ , em duas partes como descreve a equação (5)

(5)

A primeira parcela,  $(\hat{y}_i - \bar{y})$ , representa o desvio da previsão feita pelo modelo para o ponto em questão,  $\hat{y}_i$ , em relação à média global,  $\bar{y}$ . A segunda parcela é a diferença entre o valor observado e o valor previsto. Num modelo bem ajustado, essa segunda diferença deve ser pequena. Isso equivale a dizer, em termos da Equação 5, que o desvio  $(y_i - \hat{y}_i)$  deve ser aproximadamente igual ao desvio  $(\hat{y}_i - \bar{y})$  (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

O próximo passo é expressar esta comparação de desvios em termos quantitativos. Para isso, elevamos ao quadrado a Equação 5, pois temos valores positivos e negativos, e em seguida fazemos o somatório sobre todos os pontos:

$$-\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2 + 2\sum(\hat{y}_i - \bar{y})(y_i - \hat{y}_i) + \sum(y_i - \hat{y}_i)^2$$

A partir de alguns arranjos matemáticos chega-se ao somatório dos produtos é igual a zero, e portanto

(6)

As somas dos quadrados dos desvios costumam ser chamadas de somas quadráticas, ou, abreviadamente, SQ. Assim, podemos entender a Equação 6 como

$$[\text{SQ em torno da média}] = [\text{SQ devida à regressão}] + [\text{SQ residual}].$$

A partir dessa afirmação, fica evidente, quanto maior for a fração descrita pela regressão, melhor será o ajuste do modelo, o que podemos quantificar por meio da razão

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y}_i)^2} \quad (7)$$

O  $R^2$  é chamado de coeficiente de determinação do modelo. O valor máximo de  $R^2$  é 1, e só ocorrerá no improvável caso de não haver resíduo nenhum, e portanto, toda a variação em torno da média for explicada pela regressão (BARROS NETO et al., 2009)

A cada soma quadrática está correlacionada ao número de graus de liberdade, que indica quantos valores independentes envolvendo as  $n$  observações de , são necessárias para determiná-la. Para a soma quadrática dos  $n$  desvios em relação à média, o número de graus de liberdade é ao invés de  $n$ , porque a soma dos desvios é nula, neste caso a relação consome um grau de liberdade (COX et al., 2000; BARROS NETO et al., 2009).

No caso geral de um modelo com parâmetros, o número de graus de liberdade da soma quadrática residual é dado pela diferença entre o número de experimentos e o número de parâmetros estimados, isto é, sendo que a letra grega  $\nu$  representa o número de graus de liberdade. Para que permaneçamos tendo , o número de graus de liberdade da soma quadrática devida à regressão tem de ser igual ao número de parâmetros menos um (BARROS NETO et al., 2009). Portanto

(8)

Os resultados foram reunidos na Tabela 5, que é chamada tabela de análise de variância (ou simplesmente ANOVA, um acrônimo de *Analysis of variance*). Dividindo as somas

#### 44INTRODUÇÃO

quadráticas pelos seus respectivos graus de liberdade, obtemos as chamadas médias quadráticas (MQ's), que são mostradas na última coluna da Tabela 5.

Admitindo-se que os erros num dado conjunto experimental seguem uma distribuição normal, podemos usar as médias quadráticas para testar se a equação de regressão é estatisticamente significativa (COX et al., 2000). Se analisarmos a razão entre médias quadráticas  $MQ_R$  e  $MQ_r$  segue uma distribuição  $F$ :

$$(9)$$

Se averiguarmos que  $F > F_{\alpha}$ , então, é satisfatório para acreditar na existência de uma relação entre as variáveis  $x$  e  $y$ , e quanto maior o valor da razão melhor (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

## 45INTRODUÇÃO

**Tabela . Tabela de análise de variâncias para o ajuste pelo método dos mínimos quadrados, de um dado modelo linear de parâmetros.  $n_i$  = número de repetições no nível  $i$ ;  $m$  = número de níveis distintos da variável independente;  $n$  = somatória de  $n_i$  = número total de observações;  $p$  = número de parâmetros do modelo.**

Fonte de Variação	Soma Quadrática	No. de g.l.	Média Quadrática
Regressão (R)			
Resíduos (r)			
Falte de Ajuste (faj)			
Erro Puro (ep)			
<hr/>			
Total (T)			
<hr/>			
% de variação explicada:			
% máxima de variação explicável:			

Para estimar quantitativamente se o modelo é estaticamente satisfatório, pelo resíduo, é preciso dividi-lo em duas partes: uma correspondente aos erros aleatórios, e a outra devida às faltas de ajuste do modelo (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

No caso, os ensaios deverão ser realizados em repetições, pois teremos valores diferentes de  $y$  para um único  $x$ . Independente do modelo escolhido, ele não poderá passar ao mesmo tempo por esses dois valores, logo, haverá resíduos, que poderemos atribuir, pelo menos em parte, os erros aleatórios. Então, para cada valor de  $x$ , tenham sido apontadas  $n_i$  respostas, obtidas em replicatas autênticas. Para identificar as repetições, foi usado um segundo índice,  $j$ , de modo que uma resposta passará a ser representada genericamente por  $y_{ij}$ , significando que a  $j$ -ésima resposta obtida para o  $i$ -ésimo ensaio. O número total de repostas em todo o experimento será igual à soma de todas as repetições:  $\sum n_i$ . Em cada nível  $i$  o modelo deixará resíduos, um para cada resposta repetida (BARROS NETO et al., 2009).

Cada resíduo pode ser decomposto algebricamente na diferença de dois termos:

(10)

onde,  $\bar{y}_i$  é a média das respostas observadas no nível  $i$ . Elevando ao quadrado a Equação 10, e sabendo que a somatória do termo cruzado é nula como já relatado para decomposição da soma quadrática total (BARROS NETO et al., 2009). Podemos escrever:

$$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 + \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 \quad (11)$$

O primeiro termo do lado direito gera uma medida do erro aleatório, chamado de soma quadrática devida ao erro puro. O segundo termo, ao contrário, depende do modelo, e será maior quanto mais as estimativas para um dado nível, se desviarem da resposta média correspondente ao  $i$ . Esse termo fornece uma medida da falta de ajuste do modelo às respostas observadas, sendo chamado de soma quadrática devida à falta de ajuste, (BARROS NETO, et al., 2009). Podemos representar a Equação 11 como:

$$[SQ \text{ residual}] = [SQ \text{ devida ao erro puro}] + [SQ \text{ à falta de ajuste}]$$

Os valores da média quadrática para termo da equação acima pode ser visto na Tabela 2, com os respectivos graus de liberdade. A média quadrática devida ao erro puro não depende do modelo, é uma estimativa da variância experimental,  $s^2$ . A partir destes dados podemos ainda usar um teste  $F$  da razão  $F$  para avaliar se o nosso modelo está ajustado às observações. Valores altos de  $F$  significarão alta falta de ajuste, e quanto menor o valor de  $F$  melhor é o ajuste (BARROS NETO et al., 2009; TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

## 2. OBJETIVOS

O trabalho realizado esteve atrelado ao projeto temático “Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: diversidade química e busca de drogas potenciais”, projeto financiado pela FAPESP (processo número 2003/02176-7) sob coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanderlan da Silva Bolzani, no grupo de pesquisas Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) e teve como objetivos:

- Desenvolver novas estratégias de extração através de ferramentas quimiométricas de planejamentos e análise.
- Aplicar técnicas de vanguarda na busca e triagem de novos produtos, a partir de técnicas acopladas CLAE-EMAR e de desreplicação.
- Avaliar bioatividade dos extratos de *Jatropha gossypifolia* e *J. multifida* através de um abordagem racional do planejamento experimental, seleção, purificação e elucidação estrutural das micromoléculas promissoras.
- Uso da abordagem *in silico* na análise das partes aéreas de *J. gossypifolia* e *J. multifida*, visando a detecção das moléculas majoritárias bioativas.
- Elaborar novas metodologias de desreplicação a partir da técnica espectroscópica de ressonância magnética nuclear (RMN).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

Exsicatas preparadas de ambas as espécies e depositadas no *Herbarium Rio Clareense* (HRCB) do Instituto de Biociências da UNESP/ Campus Rio Claro, foram selecionadas e levadas ao laboratório. O material referente à espécie *Jatropha multifida* L. recebeu o número de tombo HRCB 43.225 e *J. gossypifolia* L., HRCB 43.224. Os espécimes foram identificados por Douglas Gatte Picchi com base em chaves de identificação botânica, pesquisa bibliográfica e comparação com o acervo do HRCB.

#### 3.2 Produtos químicos e materiais

Os solventes ACN, MeOH e EtOH foram todos grau CLAE da marca Tedia<sup>®</sup>. Todos eles foram utilizados para preparar as fases móveis e a preparação das amostras. A água foi purificada por um sistema de osmose reversa da marca Gehaka modelo OS 10L/H acoplada a Milli-Q da casa Millipore. Todos os solventes utilizados para a preparação dos extratos foram de grau analítico: hexano, éter etílico, *n*-butanol, acetato de etila, 1,4 dioxano, acetona, ácido fórmico, ácido acético (Synth<sup>®</sup>), diclorometano e clorofórmio (Quemis<sup>®</sup>), Isopropranol, (Mallinckrodt<sup>®</sup>) e trietilamina (Sigma<sup>®</sup>).

#### 3.3 Preparação dos Extratos

O material vegetal *in fresco* foi triturado com o auxílio de grau e pistilo em meio de nitrogênio líquido, com o propósito de inibir a ação de enzimas e a formação de artefatos (ZSOLNAY et al., 2003).

Na primeira etapa no desenvolvimento do processo de extração utilizou-se um conjunto de quinze condições de extração, todas realizadas em triplicata. Cada extrato foi preparado pesando-se 1,0 ± 0,1 g de material vegetal triturado em nitrogênio líquido 10,0 ± 0,1 mL de solvente. Estes permaneceram durante 5 dias em repouso e sob abrigo da luz.

Em seguida, os extratos foram filtrados em membrana de papel, para separar a solução dos pequenos pedaços de folha, e a solução foi colocada em frascos previamente rotulados e pesados. Estas soluções foram secas em atmosfera de baixa pressão sob a temperatura 40°C utilizando concentrador do tipo speedvac.

Na segunda etapa, foram preparados meios de extração utilizando misturas de três solventes, de acordo com o planejamento desenhado no modelo simplex-centróide, página 45. Nesta etapa, cada extrato foi preparado pesando-se  $1,5 \pm 0,1$  g de material vegetal para cada  $10,0 \pm 0,1$  mL de solvente. As dez condições de extração utilizadas foram preparadas em triplicata.

Para a realização das corridas cromatográficas  $5,0 \pm 0,1$  mg·mL<sup>-1</sup> de cada extrato bruto foi dissolvido numa solução de MeOH : H<sub>2</sub>O (95 : 05) e foram deixados durante trinta minutos sob banho ultrassônico. Desta solução,  $1,5 \pm 0,1$  mL foram filtrados em membrana PVDF de 0,22 µm e inseridos em vials para a realização do experimento.

### 3.4 Instrumentação

Os experimentos de otimização de extração e de separação cromatográfica foram realizados num cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), com detector UV-DAD Shimadzu SPD-M20 A, auto injetor Shimadzu modelo SIL-20A, Desgasificafidor Shimadzu modelo DGU-20A<sub>3</sub>, sistema de controle Shimadzu modelo CBM-20A, forno de coluna da marca Shimadzu modelo CTO-20A, e software LC-Solution, Shimadzu. A coluna utilizada foi uma Onyx<sup>®</sup> monolítica de 2-5 µm C-18, (100 X 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA) e uma pré-coluna: Onyx<sup>®</sup> C-18, (5 X 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA).

Os experimentos hifenados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução foram realizados em modo positivo. Os solventes utilizados foram todos grau HPLC e água deionizada (Milli-Q).

As condições instrumentais utilizadas no espectrômetro, de maneira geral, foram: sonda *electrospray* de 3kV e cone de 25V; Gás N<sub>2</sub> utilizado para nebulização em fluxo de 345 L·h<sup>-1</sup> e 27 L·h<sup>-1</sup>, respectivamente.

As amostras passaram por processo de “clean-up” e dissolvidas em metanol/água (7:3) numa concentração de  $5,0 \pm 0,1$  mg·mL<sup>-1</sup>. Foram injetados 20,0 µL das amostras sob fluxo constante de 3,0 mL·min<sup>-1</sup> em CLAE em modo gradiente de 5-100% H<sub>2</sub>O:MeOH acidificado a 0,1% de CH<sub>3</sub>COOH em 30 minutos. Apenas um splitter de 5,0 µL min<sup>-1</sup> da solução da CLAE foi injetada no espectrômetro de massas. A temperatura do sistema do espectrômetro de massas permaneceu em 80 °C. A célula de colisão foi preenchida com

argônio em pressão de 7 psi e a energia de colisão foi fixada entre 5 e 30eV no caso dos experimentos *tandem* (EMAR-IES-EM<sup>2</sup>).

Para a caracterização dos compostos detectados por CLAE-EMAR, foram selecionados os fragmentos originados de bandas cromatográficas de maior resolução. Em seguida, uma avaliação comparativa de cada espectro de massas obtido foi realizada utilizando a base de dados do *Dictionary of Natural Products* (DNP) ([www.dnp.chemnetbase.com](http://www.dnp.chemnetbase.com)).

O banco de dados do dicionário de produtos naturais (DNP) da Chapman & Hall / CRC Chemical possui informações sobre as substâncias químicas, incluindo, dados numéricos, como massa de alta resolução, índice de refração, ultravioleta, propriedades físico-químicas, como ponto de fusão e ebulição, características biológicas dos compostos assim como os nomes sistemáticos e comuns dos compostos, referências literárias e diagramas de estrutura, também estão relatadas nesta base. O Dicionário *Online* de Produtos Naturais é um subconjunto do banco de dados que inclui todos os compostos contidos no Dicionário de Produtos Naturais ([www.dnp.chemnetbase.com](http://www.dnp.chemnetbase.com)).

Os experimentos de RMN <sup>1</sup>H foram realizados em espectrômetro Varian modelo INOVA 500, de 11.7 T, fazendo uso de uma probe inversa de 5 mm. Os deslocamentos químicos foram descritos em ppm. Tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão interno.

Após a detecção das moléculas por CLAE-EMAR fez-se a simulação das estruturas desses metabólitos através do software de predição fornecendo os espectros de <sup>1</sup>H RMN . Em seguida, os espectros virtuais foram corrigidos através de dados da literatura e comparados ao espectro de <sup>1</sup>H RMN dos extratos em estudo.

A análise *in silico* (simulação e comparação) utilizou os algoritmos contidos no software comercial MestReNova ver. 6.0.2-5475 (Mestrelab research S.L, Santiago da Compostela, ESP). A margem de erro para os deslocamentos químicos gerados pelo algoritmo de predição é inferior a 5%.

### 3.5 Avaliação de atividade biológica

### 3.5.1 Ensaio de atividade Anticolinesterásica - ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada CCD).

Este teste baseia-se na clivagem do 1-acetato de naftila pela enzima acetilcolinesterase, para formar o 1-naftol, o qual reage com o sal FastBlue B, gerando um composto diazônio de coloração púrpura, em um mecanismo de reação semelhante à clivagem fisiológica da acetilcolina nas fendas sinápticas, esquema 2 (MARSTON et al., 2002).

Os extratos de *Jatropha multifida* e *J. gossypifolia* foram dissolvidos em metanol sob concentração de  $20,0 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Foram aplicados  $10,0 \mu\text{L}$  ( $200 \mu\text{g}$ ) de cada extrato em CCD de sílica gel 60 F254 (0,2 mm, Merck). Como controle positivo foi utilizado fisostigmina ( $0,02 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ). Os ensaios foram realizados pelo laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica pela técnica responsável Maura Causari, sob a orientação da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

#### Esquema . Mecanismo de reação do ensaio de inibição da AChE.

Cada extrato foi eluído em placas cromatográficas sob duas condições de fase móvel. Sendo uma mais polar,  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (7:3) e a última mais apolar  $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$  (8:2). Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina, fração V (0,1%). A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos, e em seguida borrifada com uma mistura das soluções: 1-naftilacetato a 0,25% em EtOH e sal FastBlue B a 0,25% em água (MARSTON et al., 2002).

A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Os resultados foram observados e fotografados em câmera fotográfica Epson e os valores de  $R_f$  calculados onde houve inibição da reação. Os cromatogramas obtidos foram observados em 254 nm e 366 nm e no visível.

### 3.5.2 Ensaio *in vitro* de redução do DPPH

Este ensaio baseia-se na transferência de elétrons do composto antioxidante para o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). O DPPH radical apresenta coloração lilás, porém, quando este se reduz, muda sua cor para amarelo. Deste modo é possível determinar a capacidade antioxidante de uma amostra através de um detector na região do visível, Figura 11.

Cerca de 200µL de uma solução 101,4 µM de DPPH foram adicionados as amostras diluídas em MeOH (grau CLAE), nas concentrações de 0,2, 0,1, 0,03, 0,02, 0,01, 0,008 e 0,005mg·mL<sup>-1</sup> e distribuídas em poços de placas Multi-Well 96. As amostras foram preparadas em triplicata, tendo como controle positivo uma solução de rutina (Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 100,0; 80,0; 60,0, 40,0; 20,0; 10,0 e 5,0 µM. Para o controle negativo do ensaio foi utilizado um volume de 200 µL de DPPH e 100 µL de MeOH.

**Figura 11. Ilustração do seqüestro do radical DPPH e a mudança em sua absorvividade a 517 nm.**

Decorridos 30 minutos sob abrigo da luz, mediram-se as absorvâncias (A) dos poços a 517nm, em espectrofotômetro leitor de placas acoplado a computador. Os cálculos do percentual de radical livre foram efetuados a partir da seguinte equação:

$$(12)$$

Onde A=absorvância.

### 3.5.3 Ensaio *in vitro* da inibição de polimerização de β-hematina bovina

Este ensaio mimetiza uma condição patológica envolvendo o ciclo sanguíneo da infecção, na qual o protozoário *Plasmodium* produz polímeros de heme (denominado pigmento malárico) durante a digestão da hemoglobina, devido a sua toxicidade, ou seja, quando ocorre a polimerização dos agrupamentos heme, estes precipitam e não mais são tóxicos ao parasita. Ao concluir seu ciclo de desenvolvimento no interior das hemácias, o

*Plamosdium* rompe-as liberando o pigmento responsável pelos fatores clínicos característicos da infecção. Para tanto, este ensaio tem como objetivo avaliar a capacidade de inibição da polimerização do grupo heme e assim estando em solução causar a toxicidade e conseqüentemente a morte do *Plasmodium*.

Os ensaios da inibição da polimerização de heme foram realizados e aperfeiçoados no NuBBE baseando-se na metodologia de IGNATUSHCHENKO,(1997). Nas análises foram utilizados os extratos brutos de *J. multifida* e *J. gossypifolia*. Iniciou-se o ensaio com o preparo do reagente hematina, pesando-se 14,6 mg em 3,5 mL de NaOH (0,2N) para preparo de solução de 6,4 mM. Em seguida, 22,0 mg de cada um dos extratos secos foram dissolvidos em 1,0 mL de DMSO. De cada um deles foi retirado uma alíquota de 50 µL (1,1mg) e colocado em eppendorf devidamente identificado. Posteriormente, foram adicionados aos extratos 100 µL da solução de hematina previamente preparada, 200 µL de tampão acetato de sódio (0,5M) e 50 µL de ácido acético glacial (17,4M) totalizando 400 µL por eppendorf (0,137mg/mL do extrato na solução).

O padrão utilizado foi a Cloroquinina na concentração de 10 mM. As soluções acima foram todas preparadas em triplicata. Elas foram agitadas para homogeneização, deixadas em estufa a 37°C por 24 horas e sob pH de 3,8. Após 24 horas o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 400µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e deixado em centrífuga durante 10 minutos. Em seguida, o precipitado foi lavado com 400 µL de metanol e novamente deixado em centrífuga por 10 minutos. Para a leitura do ensaio, o precipitado foi dissolvido em 1000 µL de NaOH (0,2N) e aplicado em microplaca de 96 poços sob o comprimento de onda de 405 nm.

### 3.5.4 Ensaio *in vitro* da atividade antifúngica de fitopatógenos

Este ensaio têm como objetivo investigar potenciais substâncias com capacidade antifúngica frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. Amostras correspondentes à concentração de 40 µg·µL<sup>-1</sup> foram aplicadas em placas de sílica-gel, eluídas em duas condições CHCl<sub>3</sub>:MeOH (7:3) e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>:CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (8:2) e nebulizadas a partir de uma suspensão de esporos dos fungos *Cladosporium*

*cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* e incubadas sob câmara úmida a 25 °C, em ausência de luz, por 48 horas.

O teste foi realizado no laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica pela técnica responsável Vanessa Fuentes, sob a orientação da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

### **3.6 *Orthezia praelonga* Douglas.**

Os afídeos presentes nas partes abaxiais das folhas da espécie *Jatropha multifida* foram coletadas no período entre janeiro e março de 2010 sob dia ensolarado e entre 15:30 e 16:30. Esses insetos foram analisados através de comparação bibliográfica e análise microscópica, os quais forneceram subsídios para a confirmação de tal espécie.

#### *3.6.1 Preparação dos extratos de Orthezia praelonga*

Com o auxílio de um pistilo o insetos foram triturados em metanol grau HPLC logo após a coleta. Em seguida foram armazenados num congelador a -5 °C e posteriormente foram destilados em rota-evaporador.

#### *3.6.2 Experimentos CLAE-DAD-EMAR*

O extrato bruto da *Orthezia praelonga* foi analisada pela técnica acoplada CLAE-DAD-EMAR-IES-ToF modelo ultrOTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA, em modo positivo. A condição de eluição aplicada ao experimento CLAE-EMAR foi em gradiente de 5-100% de fase orgânica em (H<sub>2</sub>O:MeOH) acidulada a 0,1 % CH<sub>3</sub>COOH sob o tempo de 30 minutos em gradiente e 10 minutos em 100 de MeOH, totalizando 40 minutos. Para a aquisição de dados foi utilizado a interface do software Bruker Data Analysis, versão 3.2. Para a calibração interna dos experimentos no espectrômetro de massas em modo positivo, foi utilizado uma solução de Na-TFA (10mg.mL<sup>-1</sup>). Foram aplicados 5 mg.mL<sup>-1</sup> do extrato bruto, no sistema cromatográfico. As condições de eluição foram: vazão de 3,0 mL/min, utilizando de uma coluna monolítica de C-18 sob tamanho de partícula de 5 µm da marca, Phenomenex, volume de injeção de 30 µL e temperatura de coluna de 25 °C.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos a química de produtos naturais está à procura de novas metodologias afim de acelerar e racionalizar a busca de metabólitos de interesse. Uma dessas abordagens é a metabolômica que consiste na análise qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos encontrados em organismo vivos. Como pode ser visto, esta tarefa é extremamente complexa e dependente de inúmeros fatores.

Deste modo, o desenvolvimento de metodologias baseadas em protocolos e normas pertencentes a órgãos reguladores como organização mundial da saúde (WHO) e as principais farmacopéias é de extrema importância na elaboração de plataformas universais de aquisição e análise de dados para posteriormente, de forma padronizada, comparar dados entre diferentes amostras (VERPOORTE et al., 2010).

Dentro desse contexto, podemos dimensionar a relevância do processo de amostragem e extração no entendimento da complexidade metabólica num dado organismo. Desta forma, metodologias clássicas que não consideram todos os aspectos que circundam todo o processo extrativo como por exemplo, temperatura, horário de coleta, estação do ano, tempo de secagem, degradação de compostos, solventes, entre outras, podem comprometer a compreensão de um determinado organismo (KIM et al., 2010).

Desta forma, o uso de ferramentas matemáticas e de estatística multivariada, pertencentes a quimiometria, para o planejamento, otimização e análise do processo de extração tornam-se extremamente importantes (BARROS NETO et al., 2006).

#### 4.1 Estudo do Processo de Extração

Na primeira etapa, foi realizado um estudo da influência de diferentes solventes na eficiência do processo de extração das folhas da *Jatropha multifida* L. e *J. gossypifolia* L., considerando o rendimento em massa e o número de bandas cromatográficas encontradas no CLAE-DAD, Figura 12. Os perfis cromatográficos foram realizados em gradiente exploratório entre 5-100% de H<sub>2</sub>O:MeOH, acidificado a 0,1 % de CH<sub>3</sub>COOH em 30min.

O número de bandas foi quantificado através do software LC-Solution, Shimadzu, programado para considerar o limite de detecção como três vezes o sinal do ruído. A escolha do comprimento de onda foi realizada através da avaliação do número de bandas cromatográficas sob diferentes regiões do espectro de ultravioleta: 210, 254, 280, 330 e 366 nm. Dentre estes, o escolhido foi o de 280 nm por apresentar um número maior de bandas cromatográficas quando comparado aos outros.

Para o processo extrativo de ambas as espécies de *Jatropha* foram feitos 14 extratos brutos a partir de distintas condições, atingindo toda a gama de polaridade entre o hexano e a água, com o propósito de encontrar a melhor condição de extração. O número de bandas cromatográficas para cada solvente foi calculado a partir da média aritmética das triplicatas.

Em seguida, foram realizadas 14 corridas cromatográficas de 30 minutos (cada uma) em gradiente exploratório, referente ao extrato bruto seco de cada solvente. Para análise do número de bandas cromatográficas, o cromatograma foi dividido em três partes com o propósito de avaliar quais dentre os solventes possuiria a maior capacidade extrativa para uma determinada região. A primeira parte da divisão consistiu do intervalo entre 0 e 10 minutos, denominada região polar, a segunda parte, entre 10 e 20 minutos, região intermediária e a última entre 20 e 30 minutos, região apolar, Figuras 12a, 12b e 12c respectivamente.

(a)

(b)

(c)

(d)

**Figura 12.** Gráficos do número de bandas cromatográficas (monitoradas à 280nm) em função do solvente de extração, sendo *J. gossypifolia* as colunas azuis e *J. multifida* as colunas vermelhas. (a) Entre 0 e 10 minutos; (b) Entre 10 e 20 minutos; (c) Acima de 20 minutos e (d) Gráfico de rendimento em massa em função do solvente de extração.

De acordo com os dados da Figura 12, o solvente que apresentou a maior capacidade extrativa para região polar para espécie *J. gossypifolia* L., Figura 12a, é o metanol, constituído de 27 bandas cromatográficas.

Para a região intermediária, entre 10 e 20 minutos, Figura 12b, temos o isopropanol, sendo o mais eficiente, e para região apolar, Figura 12c, temos o clorofórmio.

Para a espécie *J. multifida* L., notamos que vários solventes apresentaram o mesmo número de bandas para a região entre 0 e 10 minutos, sendo que maior parte deles, realizam ligações de hidrogênio, como os álcoois e a água. Portanto, para a escolha do solvente que seria utilizado para este intervalo outros 3 critérios foram levados em consideração.

O primeiro e mais importante, foi a capacidade extrativa deste solvente nos outros intervalos analisados. O segundo critério, foi o custo e o impacto ambiental causado pelos solventes, o terceiro e último, foi avaliado a capacidade de evaporação dos solventes na etapa da retirada do solvente do meio extrativo. Analisando individualmente cada um dos álcoois, a acetona e a água chegamos a conclusão que o etanol é o que apresenta a melhor relação em todos os critérios e portanto foi o escolhido.

A análise da região intermediária nos mostra que ainda os compostos que realizam ligações de hidrogênio estão entre aqueles com a maior eficiência de extração. Neste caso, o etanol, a acetona, e o isopropanol, foram os solventes que apresentaram o maior número de metabólitos. Assim como mencionado para a primeira etapa estes solventes foram analisados em outros critérios e a acetona foi escolhida devido principalmente as suas características químicas e moleculares, pois um representante da classe do álcoois já havia sido escolhido.

Na última porção do cromatograma, região apolar, o 1,4-dioxano foi o que apresentou a maior capacidade de extração.

Adicionalmente, o rendimento em massa de cada extrato foi analisado e comparado, Figura 12d. Os solventes escolhidos para *J. gossypifolia* L., apresentaram, em sua maioria, rendimento acima da média, metanol 4,9% em massa, isopropanol 3,3% em massa e o clorofórmio, 0,9% em massa. Dentre os solventes escolhidos, somente o clorofórmio apresentou rendimento abaixo da média (2,9%). No caso para a espécie *J. multifida* L., todos os solventes mostraram rendimento acima da média de 3,6 % demonstrando a eficiência do processo extrativo.

Os perfis cromatográficos dos diferentes solventes de extração para as folhas de *J. multifida* L. e *J. gossypifolia* L. podem ser vistos nos cromatogramas da Figura 13 e 14 respectivamente.

Os perfis cromatográficos de alguns extratos se mostraram relativamente semelhantes, como é o caso dos solventes da classe dos álcoois, que em sua maioria apresentaram bandas no intervalo de 7 a 12 minutos e em torno de 30 minutos. Outro exemplo a ser analisado é o éter etílico, que mesmo sendo um solvente de baixa polaridade, conseguiu extrair uma gama extensa de metabólitos de todas as regiões do cromatograma, mostrando que a polaridade não é o fator principal que determina a solvatação e consequentemente a extração dos metabólitos.

Além disso, o perfil cromatográfico do acetato de etila apresentou algumas bandas cromatográficas muito características em ambas as espécies, no intervalo de 11 a 14 minutos. Para saber se os compostos em questão não eram impurezas ou contaminantes do processo, ensaios utilizando somente o solvente foram realizados, e em todos os casos, nenhuma banda cromatográfica foi encontrada sob aquele intervalo de tempo.

Contudo, o objetivo deste estudo foi a obtenção de um extrato bruto que contemplasse o maior número de metabólitos num único extrato. Neste caso, a escolha do solvente foi governada pelo número de metabólitos, independente da classe e da quantidade encontrada, e desta forma mais uma vez, reforça-se a escolha dos tais solventes.

A partir da escolha dos três solventes, um para cada região do cromatograma, um novo planejamento experimental foi realizado para avaliar as interações de mistura de clorofórmio, isopropanol e o metanol para *J. gossypifolia* L. e etanol, 1,4-dioxano e a acetona, para a *J. multifida* L.

O *design* de mistura aplicado foi o simplex-centróide, Figura 10a. Os valores encontrados para cada ponto do simplex centróide são mostrados na Figura 15.

(a)

(b)

Figura 13. Cromatogramas das folhas da espécie *J. multifida*: (a) Hexano-I; éter etílico-II; diclorometano-III; *n*-butanol-IV; acetato de etila-V; Isopropanol-VI; clorofórmio-VII; (b) 1,4 dioxano-I; etanol-II; acetona-III; metanol-IV; água a pH 7-V; água (1% trietilamina) pH 12-VI; água (1% ácido trifluoracético) pH 2-VII.

(a)

(b)

Figura 14. Cromatogramas das folhas da espécie *J. gossypifolia*: (a) Hexano-I; éter etílico-II; diclorometano-III; *n*-butanol-IV; acetato de etila-V; isopropanol-VI; clorofórmio-VII; (b) 1,4 dioxano-I; etanol-II; acetona-III; metanol-IV; água a pH 7-V; água (1% trietilamina) pH 12-VI; água (1% Ácido trifluoracético) pH 2-VII e acetonitrila-VIII.

(a)

(b)

Figura 15. (a) número de bandas cromatográficas em função de diferentes proporções de solventes de acordo com o modelo simplex-centróide: Azul: *J. gossypifolia*; Vermelho: *J. multifida*; (b) As letras A, B e C mostradas no gráfico correspondem aos pontos destacados no planejamento em simplex centróide (A, B e C para *J. multifida* correspondem aos solventes: etanol, 1,4 dioxano e acetona e para *J. gossypifolia* são: clorofórmio, isopropanol e metanol).

Utilizando do software Minitab<sup>®</sup>, é possível determinar equações matemáticas de regressão de um dado conjunto de experimentos, inclusive, os de planejamentos de mistura como simplex-centróide. Além disso, através da tabela ANOVA, incluída no software, é possível calcular a validade e a significância de tais modelos, assim como, gerar gráficos de contorno e de superfície a partir das equações de regressão.

Assim, com os dados obtidos da Figura 15, para a espécie *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. foram aplicados equações de regressão para os modelos, linear, quadrático,

cúbico especial e quártico especial. Dentre eles o modelo quártico especial foi o que apresentou o melhor ajuste dentro do intervalo de confiança de 95%.

No entanto, alguns dos termos da equação quártica foram retirados, pois o valor do erro padrão calculado foi superior ao valor do termo da equação, o que significa que o termo em questão pode ser 0, ou seja, sem significância. Caso os mantivesse, o número de termos da equação seria tal que o número de graus de liberdade da soma quadrática de resíduo seria igual 1, cometendo um erro comum chamado de super ajuste. Adicionalmente, com o menor número de termos da equação, o número de graus de liberdade da soma quadrática da falta de ajuste aumenta e conseqüentemente o valor da média quadrática diminui, isto significa, que quanto menor o número de termos para explicação de modelo experimental melhor o seu ajuste aos dados reais.

A equação de regressão para o modelo quártico especial que representa o comportamento do processo de extração é descrita abaixo com os seus seguintes coeficientes

(13)

sendo que os termos , representam os solventes clorofórmio, isopropanol e metanol respectivamente.

A partir dos valores dos termos puros , podemos notar que entre os solventes o metanol é aquele que apresenta a melhor condição de extração.

Para verificarmos a significância da aplicação deste modelo no conjunto de dados da Figura 15, um gráfico com os valores ajustados do modelo de previsão em função dos resíduos para os valores observados foi construído, Figura 16. Neste gráfico podemos observar uma distribuição aleatória dos resíduos, o que significa que não há tendências de ajuste quando aplicamos o modelo escolhido, ou seja, o modelo é válido.

**Figura 16. Resíduos deixados pelo modelo quártico especial no estudo do número de bandas cromatográficas do extrato bruto das folhas de *J. gossypifolia*.**

Sabendo que o modelo aplicado é regido pelo teorema do limite central, ou seja, segue uma distribuição normal ou gaussiana, dos valores residuais, Figura 17, podemos

realizar a análise de variância do modelo, conhecido como *ANOVA*, acrônimo proveniente de *Analysis of variance*.

Através dos valores calculados pela *ANOVA* podemos inferir quais os valores significativos dentro de intervalo de confiança de 95%, qual a significância estatística da regressão, e ainda, calcular os termos da falta de ajuste do modelo e o erro puro intrínseco do experimento.

Como já expresso na introdução teórica, a análise de variância, avalia numericamente a qualidade do ajuste de um modelo. A *ANOVA* para equação 13 que ajusta os dados das extrações para a espécie *J. gossypifolia* pode ser vista na Tabela 6.

Inicialmente, podemos notar que soma quadrática total do modelo consiste de (372,80) e que aproximadamente 88% desse valor está contido na soma quadrática de regressão (327,26), o que significa que o modelo explica muito bem o comportamento experimental. Esta relação entre a proporção do termo de regressão e o termo residual é explicada através do coeficiente de determinação, calculado através da equação 7, simbolizado pelo  $R^2$ .

**Figura 17. Histograma dos resíduos deixados pela aplicação do modelo quártico especial para os dados da figura 15, para a espécie *J. gossypifolia*.**

**Tabela . Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo quártico especial, aplicado ao processo extrativo de metabólitos da planta *Jatropha gossypifolia* (GL-graus de liberdade).**

Diante dos dados experimentais anteriormente mostrados, é possível observar que o coeficiente de determinação, para este modelo (0,88), mostra que maior parte da soma quadrática total é composta pelo termo de regressão, Tabela 6.

Através da tabela *ANOVA* podemos ainda observar que a variância determinada para o modelo possui um valor de 87,78% e que variância máxima explicável é de 88,20%, ou seja, a diferença encontrada entre a variância máxima e variância explicada varia em torno de 0,42%, o que corresponde a falta de ajuste. Portanto, podemos concluir que o modelo adotado para o ajuste dos dados empíricos é altamente significativo.

Ainda assim, podemos uma vez mais avaliar se a equação de regressão é significativa através do teste *F* através das médias quadráticas de regressão e de resíduo. Neste caso,

estamos avaliando se termo , ou seja, numa equação de regressão o termo linear é igual a 0 o que significa que não existe relação entre os valores de , resposta, e da equação, as variáveis. Assim como na regressão linear aplicamos esta mesma regra para as regressões quadráticas, cúbicas, etc.

Para o cálculo, dividi-se a média quadrática (MQ) do termo de regressão pelos MQ dos resíduos. Se o valor for igual ou menor que  $F$  tabelado significa que e que não existe relação entre e e portanto, o modelo é inválido. O teste  $F$  tabelado neste caso será composto pelos graus de liberdade da média quadrática devida à regressão e da média quadrática residual, respectivamente.

Portanto, o nosso  $F$  será  $F_{7,12,95\%}$  que é igual a 2,91. Comparando o valor obtido pela razão dos MQ's com o valor de  $F$  tabelado obtemos o resultado 5 vezes o valor de  $F$ , o que confere a significância do modelo.

Podemos ainda verificar a eficiência do modelo através dos seus resíduos. Como já discutido, os resíduos são constituídos por dois termos, um correspondente à falta de ajuste e outro referente ao erro puro do experimento. Quando dividimos a média quadrática da falta de ajuste pelo erro puro, temos a estimativa de quanto o primeiro termo compõe os resíduos e, quanto menor o valor da divisão, melhor é o ajuste.

Podemos comparar o valor da divisão das MQ's da falta de ajuste pelo erro puro com os valores tabelados do teste  $F$  a 95%, e se o valor da razão for menor que o  $F$  significa que a falta de ajuste é pequena e que o modelo é eficiente. O valor de  $F_{1,20,95\%}$  é igual a 4,10 e o valor encontrado na tabela é 0,17 ou seja, cerca de 24 vezes menor, e portanto, o modelo possui pouca falta de ajuste.

Concluindo, o modelo quártico especial aplicado ao conjunto de dados da Figura 15 para a espécie *J. gossypifolia* L. é altamente significativo sendo que todos os termos analisados estão acima dos requisitos de significância.

Para a *J. multifida* o modelo quártico também foi aplicado para o ajuste do comportamento experimental, dentro o intervalo de 95% de confiança. A equação de regressão com os seus seguintes coeficientes é mostrada a seguir:

(14)

os termos , representam os solventes acetona, 1,4 dioxano e etanol respectivamente.

Assim como mencionado anteriormente, valores obtidos da equação de regressão podem ser avaliados através da análise de variância, *ANOVA*, caso o conjunto de dados seguir o teorema do limite central, ou seja, seguir uma distribuição gaussiana dos erros.

A Figura 18 apresenta o gráfico dos resíduos deixados pelo modelo quártico em função dos valores previstos. A avaliação deste gráfico mostra que os resíduos seguem distribuição aleatória, ou seja, não apresentam qualquer tendência não explicada pelo modelo.

**Figura 18.** Resíduos deixados pelo modelo quártico especial no estudo do número de bandas cromatográficas do extrato bruto das folhas de *J. multifida*.

A Figura 19, apresenta os valores dos resíduos deixados pela aplicação da equação de regressão em função da sua frequência. Como podemos notar o erro encontrado para a equação segue uma distribuição normal.

Sabendo que a equação de regressão possui erros aleatórios e que estes seguem uma distribuição normal, estes puderam ser analisados através da análise de variância, Tabela 7.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) calculado para os dados da espécie *J. multifida*, Tabela 7, é aproximadamente de 0,87 mostrando que a maior parte do modelo é justificada pelo termo de regressão e portanto, a porcentagem de variância explicada é de 87%, sendo altamente significativa.

Para avaliar as relações entre  $e$  e  $e$  e portanto, confirmar a validade do modelo, o valor de razão da média quadrática de regressão sob a dos resíduos foi comparada com o  $F$  tabelado para os respectivos graus de liberdade das médias quadráticas,  $F_{7,12,95\%} = 2,91$ .

**Figura 19.** Histograma dos resíduos deixados pela aplicação do modelo quártico especial para os dados da figura 15, para a espécie *J. multifida*.

O resultado revelou que a razão é em torno de 5 vezes o valor de  $F$  mostrando que existe uma alta correlação entre as respostas e as variáveis.

Portanto, a equação de regressão aplicada ao dados experimentas foi satisfatória na resposta do comportamento experimental, isto é, de alta significância.

**Tabela 7. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo quártico especial aplicado a processo extrativo dos metabólitos da planta *Jatropha multifida*.**

A representação destas condições de extração podem ser geradas graficamente através da substituição dos valores de  $x$  em todas as proporções na equação de regressão fornecendo gráficos de contorno e de superfície de resposta.

A partir do gráfico de contorno para *J. gossypifolia*, Figura 20a, podemos verificar que a região que apresenta o maior número de bandas cromatográficas está localizada em torno da mistura binária clorofórmio:isopropanol, confirmado pelo gráfico superfície de resposta, onde mostra uma superfície côncava com a parte inferior representada em torno do ponto central e parte superior, sob a mistura clorofórmio:isopropanol, Figura 20b.

Para a *J. multifida*, o gráfico de contorno, Figura 21a mostra que mistura ternária 2/3:1/6:1/6 etanol:acetona:1,4 dioxano é aquela que apresenta o maior número de bandas cromatográficas, enquanto que a mistura 1:1 acetona:1,4 dioxano é pior região da superfície de contorno. A Figura 21b, revela a complexidade neste *design* e que os extratos possuem uma diversidade alta de metabólitos.

Portanto, a melhor condição de extração obtida da análise do conjunto de dados através da equação de regressão, indicaram que a condição 1:1 clorofórmio:isopropanol para espécie *J. gossypifolia* L. e a mistura 2/3:1/6:1/6 de Etanol:Acetona:1,4 dioxano para a espécie *J. multifida* L., são as regiões ótimas para este processo extrativo.

(a)

**Figura 20.** Gráfico de contorno (a) e gráfico de superfície de resposta (b) para o extrato das folhas de *J. gossypifolia* L.

(b)

(a)

(b)

**Figura 21.** Gráfico de contorno (a) e gráfico de superfície de resposta (b) para o extrato das folhas de *J. multifida*.

A Figura 22, mostra o perfil cromatográfico tridimensional em DAD do extrato foliar para a espécie *J. multifida* L. (2/3 : 1/6 : 1/6 de Etanol : Acetona : 1,4 dioxano) realizado em gradiente exploratório entre 5-100% de MeOH:H<sub>2</sub>O, entre 200 e 600 nm do espectro de UV.

**Figura 22.** Perfil cromatográfico tridimensional em DAD obtido para o extrato bruto otimizado das folhas de *J. multifida* (2/3:1/6:1/6 de Etanol : Acetona : 1,4 dioxano).

O perfil cromatográfico do extrato bruto otimizado (2/3 : 1/6 : 1/6 de etanol : acetona : 1,4 dioxano) sob o comprimento de onda de 280nm, Figura 23, foi analisado e comparado com os extratos brutos dos solventes puros, Figura 24. Através dos resultados obtidos pela análise da superfície de resposta, Figura 20 e pela comparação entre perfis cromatográficos, Figura 23, fica claro que o extrato bruto otimizado, contempla o maior número de metabólitos quando comparados com outros sistemas de extração.

**Figura 23.** Perfil cromatográfico do extrato bruto otimizado das folhas de *J. multifida* L. sob o comprimento de onda de 280 nm.

**Figura 24.** Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas de *J. multifida* L. em diferentes solventes de extração: Etanol; Acetona; 1,4dioxano e exp<sub>10</sub>(2/3:1/6:1/6 de Etanol : Acetona : 1,4 dioxano).

O perfil cromatográfico tridimensional em DAD obtido do extrato bruto otimizado das folhas de *J. gossypifolia* L. (1:1 clorofórmio : isopropanol) realizado em gradiente exploratório 5-100% MeOH:H<sub>2</sub>O, sob intervalo de 200 a 600 nm é mostrado na Figura 25.

**Figura 25.** Perfil cromatográfico tridimensional em DAD obtido para o extrato bruto otimizado das folhas de *J. gossypifolia* L. (1:1 Clorofórmio : Isopropanol).

A Figura 26 apresenta o perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas de *J. gossypifolia* sob o comprimento de onda de 280nm. Assim como realizado para a espécie *J. multifida* os extratos brutos dos solventes que deram origem a extração otimizada foram comparados e analisados afim de avaliar a eficácia do processo extrativo, Figura 27.

**Figura 26.** Perfil cromatográfico do extrato bruto otimizado das folhas de *J. gossypifolia* L. sob o comprimento de onda de 280 nm.

**Figura 27.** Perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas de *J. gossypifolia* L. em diferentes condições de extração: Metanol; Isopropanol; Clorofórmio e exp<sub>4</sub>(1:1 Clorofórmio : Isopropanol)

Através dos perfis cromatográficos podemos afirmar que o extrato otimizado contempla a maioria das substâncias encontradas nos extratos que a deram origem e ainda podemos notar a presença de algumas bandas exclusivamente para este extrato bruto, como por exemplo, a banda localizada sob tempo de retenção de 4,0 minutos. Deste modo, podemos concluir que para a espécie *J. gossypifolia* L. a melhor condição de extração é composta por 1:1 clorofórmio:Isopropanol.

#### 4.2 Otimização da Condição Cromatográfica

Tendo adquirido as condições otimizadas do processo de extração, um segundo conjunto de experimentos foi realizado visando melhorar a resolução cromatográfica dos metabólitos detectados pelo UV/DAD. Para isto, os principais fatores envolvidos na questão de separação foram avaliados, como por exemplo, as fases móvel e estacionária e o tempo.

Os extratos brutos analisados possuem uma elevada complexidade em suas matrizes, o que determinou o uso de fase estacionária composta por colunas monolíticas C-18 (5 $\mu$ m). Estas colunas apresentam elevada robustez, aplicabilidade a uma extensa classe de metabólitos, podendo trabalhar em condições cromatográficas extremas, quando comparadas as colunas empacotadas e, principalmente, a sua reprodutibilidade.

As condições cromatográficas foram preparadas afim de explorar toda a gama de metabólitos presentes num único extrato bruto. Para tanto, o uso de sistemas de eluição em gradiente exploratório tornou-se necessário para a separação dos compostos. Além disso, o modificador, ácido acético, foi adicionado a 0,1 % (v/v) para minimizar os problemas de alargamento de banda por ionização. No entanto, a aplicação destas condições num planejamento experimental que utiliza variáveis de mistura, como o modelo simplex-centróide, torna-se pouco adequado quando se trabalha em gradiente exploratório, pois não existe uma proporção fixa de um determinado solvente, mas sim, todo um gradiente.

Para contornar esse problema de adequação, foi utilizado um *design* fatorial, considerando cada corrida cromatográfica como uma variável independente, ou seja, o experimento foi analisado através do número de bandas cromatográficas e não mais pela variação da proporção do solvente. Dentre as várias formas de *design* fatorial que podemos aplicar, a mais comum para este tipo de análise é o *design* em estrela, Figura 10b. Para cada ponto do *design* foi estipulada uma proporção entre MeOH e ACN sob um intervalo de tempo. A proporção variou entre 100% de MeOH a 100% ACN e o intervalo de tempo foi de 30 a 60 minutos.

O número de bandas cromatográficas observadas nos cromatogramas foi usado como resposta e o comprimento de onda foi monitorado em 280 nm. O número de bandas e as respectivas condições experimentais do *design* são mostradas na Figura 28a e 28b respectivamente.

(a)

(b)

Figura 28. (a) Número de bandas em função das condições experimentais do *design* em estrela. (b) Condições experimentais do *design* em estrela. Azul: *J. gossypifolia* L.; Vermelho: *J. multifida* L.

Como pode ser visto na Figura 28b, o planejamento fatorial em estrela leva em consideração que ambos os fatores, tempo e fase móvel, são variáveis de processo, como todo planejamento fatorial, mas no entanto, se considerarmos cada fator como independente um do outro, poderíamos obter falsos positivos, ou seja, para se representar o comportamento experimental dos dados acima em equações matemáticas, como no processo de extração, é necessário um modelo no qual se leve em conta as interações entre os fatores, isto significa que cada ponto do *design* em estrela pode ser correlacionado entre si. No caso, as equações que poderiam representar tal comportamento, deve possuir termos que consideram interações de primeira ordem, segunda e até mesmo terceira ordem. Portanto, os modelos quadrático e/ou cúbico são os mais apropriados para este planejamento.

De acordo com as respostas obtidas dos pontos experimentais do *design* em estrela, Figura 28, foi aplicado um modelo canônico quadrático com o propósito de avaliar o comportamento de diferentes composições de solvente e tempo de corrida. As equações de regressão sob o intervalo de confiabilidade de 95% para as espécies *J. multifida* L., equação 15 e *J. gossypifolia* L., equação 16 são mostradas abaixo

(15)

(16)

sendo que o termo  $X_1$  representa as diferentes proporções do solvente orgânico e o termo  $X_2$  o tempo de corrida.

A equação de regressão foi avaliada através da análise de variância, ANOVA e os resultados obtidos para a espécie *Jatropha multifida*, podem visualizadas na Tabela 8.

O coeficiente de determinação,  $R^2$ , calculado através da razão entre a somas quadráticas de regressão e total, é de 0,93, o que significa que em torno de 93% da soma quadrática total é composta pelo termo de regressão que é a variância explicada do modelo. A porcentagem de variância máxima explicável para esse conjunto de experimentos é 95,6 %.

Isso mostra que apenas 2,7% dos valores experimentais não puderam ser ajustados pelo modelo.

Podemos afirmar este comportamento através da comparação do valor da divisão das médias quadráticas de regressão pelo resíduo, com o valor tabelado do teste  $F$  sob intervalo de confiança de 95%, Tabela 8.

Concluimos, que o valor calculado é em torno de 7 vezes maior o  $F$  tabelado, o que significa, que o modelo é altamente satisfatório.

Quando analisamos os resíduos vemos claramente, que o principal fator de interferência é devido ao erro puro, pois o valor de  $F$  calculado é em torno de 90 vezes menor que o valor tabelado, mostrando que quase todo o valor dos resíduos se deve ao erro puro.

**Tabela 8. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo cúbico aplicado à otimização da condição cromatográfica para espécie *Jatropha multifida*.**

A avaliação da equação de regressão 16 foi realizada assim como para *J. multifida*, através da análise de variância, para a espécie *J. gossypifolia* L., Tabela 9.

**Tabela 9. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo cúbico aplicado à otimização do processo cromatográfico para espécie *Jatropha gossypifolia*.**

Assim como descrito para a espécie *J. multifida* L., os valores encontrados pela tabela ANOVA, nos mostra que a porcentagem de variância explicada, cerca de 87%, foi alta quando aplicado a um modelo empírico.

Quando analisamos os resíduos, através das médias quadráticas vemos que a maior parte dos resíduos se deve ao erro aleatório. Portanto, podemos afirmar que ambas as espécies apresentaram um ajuste adequado para o modelo quadrático.

Com o auxílio das equações 15 e 16 foi possível construir os gráficos de contorno das espécies *J. gossypifolia* L., Figura 29a e *J. multifida* L., Figura 29b.

(a)

(b)

**Figura 29. Superfície de contorno para o *design* fatorial em estrela: (a) *J. gossypifolia* L.; (b) *J. multifida* L..**

De acordo com os dados da Figura 29, podemos verificar que a região de contorno que apresenta o maior número de bandas cromatográficas é aquela que possui coloração

vermelha. A relação entre o número de bandas cromatográficas e a separação ocorre pelo fato que quanto maior o número de bandas que o software consegue interpretar melhor é a resolução.

Assim, a região com o maior número de bandas ou a região otimizada para espécie *J. gossypifolia* L. se encontra no centro da região de contorno que forneceu a proporção de 62% MeOH : 38% ACN e sob o tempo de 60 minutos, Figura 29a. Para a *J. multifida* L., Figura 29b, a região otimizada se encontra na proporção 1 : 1 ACN : MeOH e 50 minutos de corrida.

Após a primeira etapa de otimização cromatográfica, outros fatores puderam ser analisados na construção de método separação de *fingerprint*. Para este segundo conjunto de experimentos foi utilizado um planejamento fatorial  $2^3$ . Neste *design* foram avaliados os fatores: temperatura de coluna, volume de injeção e fluxo de solvente em dois níveis para cada variável. Os resultados podem ser vistos na Figura 30.

(a)

(b)

**Figura 30.** (a) Níveis de cada fator analisado no planejamento fatorial  $2^3$ ; (b) Número de bandas cromatográficas em função da variação dos fatores; Azul: *J. gossypifolia* L.; Vermelho: *J. multifida* L.

A partir do uso de ferramentas de estatística foi possível calcular a influência de cada variável independente em todos os experimentos. Este tipo de análise é conhecida como análise de efeitos principais. O efeito principal mostra se a variável analisada tem alguma influência significativa no planejamento experimental. Normalmente, este efeito é representado por um gráfico da variação da resposta em função da variação dos níveis da variável analisada.

No nosso caso, a resposta é dada pelo número de bandas cromatográficas, e a variação dos níveis de cada variável poderia ser, como por exemplo, variação da temperatura de 30 a 50 °C, ou pela variação da vazão aplicada à corrida cromatográfica.

A Figura 31, apresenta os gráficos de efeito principal aplicado ao planejamento fatorial  $2^3$ , na avaliação da resposta em função da variação da temperatura, Figura 31a, vazão, Figura 31b e volume de injeção, Figura 31c, para a espécie *J. multifida* L. A mesma seqüência pode ser vista para a espécie *J. gossypifolia* L., nas Figuras 32a, 32b e 32c respectivamente.

(a)

(b)

(c)

**Figura 31.** Gráficos do número de bandas cromatográficas em função da variação dos níveis para cada fator analisado para *J. multifida* L. (a) Efeito da temperatura de coluna; (b) Efeito do volume de injeção e (c) Efeito do Fluxo de eluição da fase móvel.

(a)

(b)

(c)

**Figura 32.** Gráficos do número de bandas cromatográficas em função da variação dos níveis para cada fator analisado para *J. gossypifolia* L. (a) Efeito da temperatura de coluna; (b) Efeito do volume de injeção e (c) Efeito do Fluxo de eluição da fase móvel.

A partir dos gráficos apresentados nas Figuras 31 e 32, podemos afirmar que todas as variáveis possuem influência significativa na resposta analisada.

A temperatura influencia negativamente com o seu aumento para a *J. gossypifolia*, enquanto para a *J. multifida*, podemos verificar um ótimo em torno de 40 °C.

O volume de injeção por sua vez, afeta positivamente para ambas as espécies com aumento da volume injetado. No caso da vazão, podemos notar uma diferença entre as espécies. Para *J. multifida* L., vemos que a vazão 2,5 mL·min<sup>-1</sup> foi a que apresentou a melhor condição de separação cromatográfica enquanto para a *J. gossypifolia* L. observamos que a melhor condição possui vazão de 2,0 mL·min<sup>-1</sup>.

Os resultados deste planejamento mostram que mesmo sendo espécies do mesmo gênero os metabólitos encontrados são bastante distintos, revelando à espécie *J. multifida* ainda pouco explorada, como uma matriz promissora para estudos mais específicos.

Ao fim de todo planejamento experimental foi possível concluir que a condição de extração para a espécie *Jatropha gossypifolia* L. utilizou a mistura binária clorofórmio : isopropanol, 1 : 1, enquanto que para a *Jatropha multifida* L. obteve-se uma mistura ternária de etanol : Acetona : 1,4 dioxano sob as proporções de 2/3 : 1/6 : 1/6.

Concluimos ainda, que o perfil metabólico de *fingerprint* gerado para a espécie *J. gossypifolia*, Figura 33, utilizou como fase estacionária uma coluna monolítica C-18, uma mistura MeOH : ACN (68 : 32) em gradiente exploratório de 5-100% fase orgânica : água, sob vazão de 2,0 mL·min<sup>-1</sup>, temperatura de coluna de 30 °C e volume injeção de 30 µL.

Para a *J. multifida*, Figura 34, foi utilizada uma coluna monolítica C-18 para a fase estacionária e para a fase móvel foi usado uma mistura MeOH : ACN 1 : 1. A temperatura de coluna foi de 40 °C, o volume de injeção foi de 30 µL e a vazão da fase móvel foi de 2,5 mL·min<sup>-1</sup>.

**Figura 33.** Perfil cromatográfico do extrato bruto otimizado das folhas de *J. gossypifolia* L. a 280nm sob as condições: fase estacionária constituída de uma coluna monolítica C-18; Fase móvel composta por uma mistura MeOH : ACN (68 : 32) em gradiente exploratório de 5-100% fase orgânica : água, sob vazão de 2,0 mL·min<sup>-1</sup>, temperatura de coluna de 30 °C e volume injeção de 30 µL.

**Figura 34.** Perfil cromatográfico do extrato bruto otimizado das folhas de *J. multifida* L. 280nm sob as condições: fase estacionária constituída de uma coluna monolítica C-18; Fase móvel composta por uma mistura MeOH : ACN (1 : 1) em gradiente exploratório de 5-100% fase orgânica : água, sob vazão de 2,5 mL·min<sup>-1</sup>, temperatura de coluna de 40 °C e volume injeção de 30 µL.

### 4.3 Avaliação da Atividade Biológica

#### 4.3.1 Ensaio *in vitro* de redução do DPPH

Os resultados obtidos para o extrato bruto das folhas da *Jatropha multifida* foi de 30% de inibição a  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ , demonstrando atividade moderada quando comparada ao padrão rutina, 92% a  $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para os ramos da *Jatropha multifida*, foi observado 24% de inibição do radical DPPH, Figura 35a.

(a)

(b)

Figura 35. Gráfico de porcentagem de seqüestro de DPPH para o extratos: (a) *J. multifida* L.; (b) *J. gossypifolia*.

No caso da espécie *J. gossypifolia*, o extrato bruto das folhas mostrou 20% de inibição e os ramos 10% a  $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Figura 35b, permitindo concluir que nesse ensaio os extratos de ambas as plantas apresentaram baixa atividade.

#### 4.3.2 Ensaio *in vitro* da polimerização de $\beta$ -hematina bovina

As Figuras 36a e 36b apresentam gráficos referentes a porcentagem de inibição da polimerização da  $\beta$ -hematina bovina para os extratos das folhas e ramos das espécies *Jatropha multifida* L. e *J. gossypifolia* L., respectivamente. Para ambas as espécies todos os extratos tanto para as folhas quanto para os ramos tiveram uma baixa porcentagem na inibição da polimerização da  $\beta$ -hematina, quando comparados com o padrão cloroquina, 91% de inibição.

(a)

(b)

Figura 36. Porcentagem de inibição da  $\beta$ -hematina bovina para as folhas e ramos: (a) *J. multifida* L.; (b) *J. gossypifolia* L.

#### 4.3.3 Ensaio de atividade Anticolinesterásica - ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada CCD)

Os ensaios foram realizados em duas condições de eluição, com o propósito de avaliar os compostos polares e também os apolares das espécies *J. multifida* L., amostras 1 e 3 e *J. gossypifolia* L., amostras 2 e 4, Figura 37. As amostras 1 e 2 foram dissolvidas em MeOH (20 mg·mL<sup>-1</sup>) e uma alíquota de 10 µL dessa solução foi aplicada a placa de sílica. A fase móvel foi composta pela mistura (7:3) CHCl<sub>3</sub>:MeOH.

Para as amostras 3 e 4 os extratos dissolvidos foram aplicados à placa de sílica e eluídos com mistura C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (8:2). O padrão utilizado no ensaio foi a fisostigmina sob a concentração de 0,05 µg·mL<sup>-1</sup>.

(a) (b) (c)  
 Figura 37. CCDC dos extratos de *J. multifida* e *J. gossypifolia* para avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase a) λ 366nm, b) λ 254 nm e c) região do visível. Amostras 1 e 2 *J. multifida*; Amostras 3 e 4 *J. gossypifolia* e P representa o padrão utilizado.

O ensaio revelou atividade fraca para a espécie *J. multifida*, como destacado na Figura 37c. Pode-se verificar que a atividade está presente em ambos os sistemas de eluição, mas no entanto, a condição apolar, apresentou dois nódulos, ou seja, o composto responsável pela atividade pertence a região lipofílica do extrato. No caso para *Jatropha gossypifolia*, em ambas as condições cromatográficas não apresentaram nenhuma atividade relevante.

#### 4.3.4 Ensaio *in vitro* da atividade antifúngica de fitopatógenos

O ensaios da atividade antifúngica de fitopatógenos foram realizados sob duas condições de eluição. A primeira constituiu da mistura  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (7:3) aplicada às amostras 1 e 3 enquanto a segunda composta pela mistura  $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$  (8:2). As amostras 1 e 2 pertencem a espécie *J. multifida* L. e 3 e 4 são da *J. gossypifolia* L. Elas foram dissolvidas em DMSO e diluídas numa concentração de  $40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . A amostra N representa o padrão nistatina que foi adicionado sob a concentração de  $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

A Figura 38 apresenta as corridas cromatográficas em CCD nos comprimentos de onda de 366, 254 nm e na região do visível do extrato bruto em DMSO das espécies *J. multifida* L. e *J. gossypifolia* L. sob aplicação posterior de esporos da cepa *C. cladosporioides*, enquanto para a Figura 39 foi aplicado a cepa do fungo *C. sphaerospermum*.

Ambos os extratos brutos avaliados não apresentaram atividade antifúngica frente aos fungos analisados.

(a) (b) (c)

Figura 38. CCDC dos extratos de *J. multifida* e *J. gossypifolia* para avaliação da atividade antifúngica frente a *C. cladosporioides*: a)  $\lambda$  366nm, b)  $\lambda$  254 nm e c) região do visível.

(a) (b) (c)

Figura 39. CCDC dos extratos de *J. multifida* L. e *J. gossypifolia* L. para avaliação da atividade antifúngica frente a *C. sphaerospermum*: a)  $\lambda$  366nm, b)  $\lambda$  254 nm e c) região do visível.

#### 4.4 Análise dos Metabólitos (CLAE-DAD-EMAR)

Os extratos brutos das espécies *J. multifida* L. e *J. gossypifolia* L. foram analisados pela técnica acoplada CLAE-EM-IES-ToF modelo ultrOTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA, todos em modo positivo. A condição de eluição aplicada aos experimentos CLAE-EM foi em gradiente exploratório 5-100% H<sub>2</sub>O:MeOH acidulada com 0,1% CH<sub>3</sub>COOH sob o tempo de 25 minutos em gradiente e 5 minutos em 100% MeOH, totalizando 30 minutos de análise. Para a aquisição de dados foi utilizado a interface do software Bruker Data Analysis, versão 3.2. Para a calibração interna dos experimentos no espectrômetro de massas em modo positivo, foi utilizada uma solução de Na-TFA (10mg·mL<sup>-1</sup>).

Os dados adquiridos pelo CLAE-EMAR foram comparados com o banco de dados do dicionário de produtos naturais de Chapman & Hall com abrangência entre 1942 a 2000 ([www.dnp.chemnetbase.com](http://www.dnp.chemnetbase.com)). Objetivo dessa abordagem é desreplcação de metabólitos já relatados para ambos os espécimes.

A partir dos íons majoritários obtidos nos espectros de massas, foram emulados os possíveis adutos catiônicos, tomando em consideração a fase móvel utilizada, isto é, metanol e água acidulada além de cátions presentes na água como sódio e potássio. Os íons majoritários foram detectados sob as formas [M+H]<sup>+</sup> e/ou [M+Na]<sup>+</sup>.

#### 4.4.1 *Jatropha gossypifolia* -CLAE-DAD-EMAR(IES)-EM2

O perfil cromatográfico do extratos brutos das folhas de *Jatropha gossypifolia* L. foi inicialmente analisado utilizando a técnica CLAE-UV/DAD em gradiente exploratório, Figura 40.

A análise da constituição metabólica secundária do extrato bruto evidenciou uma série de bandas cromatográficas distribuída ao longo do tempo. As bandas majoritárias foram analisadas através do detector de arranjo de diodos fornecendo as principais regiões de absorção, Figura 41. As bandas cromatográficas referentes ao tempo de retenção 13,2, 13,4, 13,9, 14,3 e 15,6 minutos são pertencentes a classe dos flavonoides.

No entanto, as bandas cromatográficas sob o tempo retenção de 13,2 e 13,4 minutos apresentaram os valores para absorção máxima em 268 e 343 nm enquanto que para as bandas cromatográficas em 13,9 e 14,3 minutos os valores foram de 269 e 336 nm (RIJKE, et al., 2006).

**Figura 40.** Perfil cromatográfico em DAD do extrato bruto das folhas de *J. gossypifolia* L.

**Figura 41.** Perfil cromatográfico referente ao intervalo de 12 a 16 minutos com os respectivos espectros de UV para as bandas encontradas no extrato bruto das folhas de *Jatropha gossypifolia*.

Em seguida é mostrado o cromatograma de íons totais para a espécie *Jatropha gossypifolia* L. com os respectivos íons extraídos do experimento, Figura 42.

Os íons majoritários foram analisados com o auxílio do dicionário de produtos naturais, e comparados com os íons calculados a partir da fórmula molecular afim de se calcular o erro experimental. A análise dos íons detectados, tempo de retenção, erro calculado, nome dos compostos e fonte, são mostrados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Valores de *m/z* obtidos para *J. gossypifolia*, valores do dicionário de produtos naturais (DNP), erros em ppm, nome dos compostos detectados e a fonte natural.

\*[M+Na]<sup>+</sup>

**Figura 42.** Cromatogramas de íons totais com os respectivos íons extraídos para *J. gossypifolia*. Íon 449 *m/z* (vermelho escuro); 433 *m/z* (verde); 579 *m/z* (rosa); 333 *m/z* (vinho); 301 *m/z* (preto); 317 *m/z* (vermelho); 345 *m/z* (azul) e 413 *m/z* (bege).

O espectro de massas para o  $m/z$  333,2032 é mostrado com os seus possíveis compostos detectados, (4E)-15-*epi*-jatrogrossidentadiona/(4Z)-jatrogrossidentadiona, na Figura 43. O composto foi encontrado no cromatograma de íons totais sob o tempo de retenção de 20,3 minutos, Figura 42 coloração vinho.

**Figura 43.** Espectro de massas obtido para o  $m/z$  333,2032 com os metabólitos detectados, (4E)-15-*epi*-jatrogrossidentadiona e/ou (4Z)-jatrogrossidentadiona.

A Figura 44 mostra o espectro de massas para o  $m/z$  345,2401 com os prováveis terpenos 2-hidroxiisojatrogrossidiona/2-*epi*-hidroxiisojatrogrossidona detectados sob o tempo de retenção de 23,9 minutos, Figura 42, coloração azul. A Figura 45, apresenta os íons majoritários para o  $m/z$  317,2083 com o respectivo diterpeno, 3 $\beta$ ,14 $\alpha$ -hidroxipimara-7,9(11),15-triene-12-ona sob o tempo de retenção de 22,5 minutos, Figura 42 coloração vermelha.

Para a Figura 46 podemos observar a presença dos íons relacionados aos flavonoides vitexina e/ou isovitexina presente sob o tempo de retenção de 13,9 minutos, Figura 42 coloração verde, com o respectivo espectro de massas do experimento *tandem* EM<sup>2</sup>. Os íons obtidos através da técnica EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> estão de acordo com o padrão de fragmentação para os flavonoides C-glicosilados, no caso, vitexina e/ou isovitexina (WARIDEL et al., 2001; MARCH et al., 2006).

A nomenclatura utilizada para explicar a fragmentação dos glicosídeos mostrados nos flavonoides consiste sendo a letra X correspondendo a glicona e os números superescritos correspondem a localização da quebra das ligações. A letra A corresponde a perda de água. Outras informações sobre a nomenclatura utilizada pode ser vista nos trabalhos Waridel et al., 2001 e March et al., 2006.

A fragmentação do [M+H]<sup>+</sup> sob a energia de colisão de 20 eV, forneceu íons filhos característicos, 313,08  $m/z$ , referente a quebra da glicona na posição <sup>0,2</sup>X, [M+H<sup>+</sup> - 120]<sup>+</sup>, o íon 367,09  $m/z$ , relacionado a fragmentação da glicona na posição <sup>1,2</sup>X, juntamente com a perda de duas águas, representada pela letra "A" [M+H<sup>+</sup> - 30 - 2A]<sup>+</sup> e outros fragmentos que podem ser visto na Figura 46.

Como podemos verificar, a aglicona não foi observada no espectro de massas,  $m/z$  271, isto mostra que a energia de ativação da quebra entre o açúcar e a flavona é maior que

20 eV, justificado pela ligação C-glicosídica entre a flavona e a glicona, pois em ligações O-glicosídicas essa energia é suficiente para romper a ligação tal ligação.

**Figura 44.** Espectro de massas obtido para o  $m/z$  345,2401 com os metabólitos detectados, 2-hidroxisojatrogrossidiona e/ou 2-*epi*-hidroxiisojatrogrossidiona.

**Figura 45.** Espectro de massas obtido para o  $m/z$  317,2083 com os metabólito desreplcado, 3 $\beta$ , 14 $\beta$ -hidroxipimara-7,9(11),15-triene-12-ona.

**Figura 46.** Espectro de massas obtido para o  $m/z$  433,1114 com os metabólitos detectados vitexina e/ou isovitexina, com o respectivo experimento *tandem* EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> sob energia de colisão de 20 eV.

A Figura 47, apresenta os mesmos flavonoides vistos acima, vitexina e/ou isovitexina, no entanto, sob o tempo de retenção de 14,3 minutos, Figura 42 coloração verde. O íon majoritário foi bombardeado sob a energia de colisão de 15 eV, fornecendo os mesmos íons filhos descritos na Figura 46.

**Figura 47.** Espectro de massas obtido para o  $m/z$  433,1115 com os metabólitos detectados vitexina e/ou isovitexina com o respectivo experimento *tandem* em EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> sob energia de colisão de 15 eV.

A Figura 48 nos mostra o espectro de massas para o  $m/z$  579,1705, correspondente a um flavonoide C-glicosilado nas posições 6 e 7 do anel A da flavona. O flavonoide glicosídeo I foi encontrado sob o tempo de retenção de 15,6 minutos, Figura 42 coloração rosa.

**Figura 48.** Cromatograma de íons totais para o  $m/z$  579,1705 referente ao metabólito detectado: Flavonoide glicosídeo I.

As Figuras 49 e 50 correspondem aos espectros de massas obtido para os  $m/z$  449,1060 e 449,1067 respectivamente. Estes íons conferem com os metabólitos orientina e/ou homoorientina citados na literatura como presente em algumas espécies do gênero *Jatropha*.

Estas substâncias foram detectadas sob o tempo de retenção de 13,2 e 13,4 minutos como pode ser visto na Figura 42, coloração vermelho escuro.

Para a íon 449,1067 foi realizado um experimento de fragmentação através da EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> fornecendo íons filhos capazes de auxiliar na determinação estrutural. O perfil de fragmentação se assemelha ao encontrado para a vitexina ou isovitexina, Figura 47,

sendo que a diferença entre as massas encontradas é da ordem de 17  $m/z$  referente a hidroxila que forma o grupo catecol presente no anel B. Todos os íons filhos com as respectivas fragmentações podem ser vistas na Figura 50.

**Figura 49. Espectro de massas obtido para o  $m/z$  449,1060 referente aos metabólitos orientina ou homorientina.**

O espectro de massas referente a massa 413,2684  $m/z$ , Figura 51, corresponde ao composto (*E*)-ferulato de tetradecila já encontrado para a espécie *Jatropha gossypifolia* L. O tal composto foi determinado sob o tempo de retenção de 25,9 minutos, Figura 42 coloração bege.

**Figura 50.** Espectro de massas obtido para o  $m/z$  449,1067 e o perfil de fragmentação da orientina ou homorientina no experimento *tandem* EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> sob energia de colisão de 15 eV.

**Figura 51.** Espectro de massas obtido para  $m/z$  413,2684 referente ao (*E*)-ferulato de tetradecila.

#### 4.4.2 *Jatropha multifida* -CLAE-DAD-EMAR(IES)-EM2

A primeira etapa do experimento CLAE-DAD-EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> consistiu da geração do perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas *Jatropha multifida* L. por CLAE-UV/DAD em gradiente exploratório, Figura 52.

**Figura 52.** Perfil cromatográfico em UV/DAD para o extrato bruto das folhas de *Jatropha multifida* L.

Assim como discutido para a espécie *Jatropha gossypifolia* L. as bandas cromatográficas referentes aos tempos 13,2, 13,5, 13,8 e 14,3 minutos possuem os mesmos espectros de ultravioleta, e portanto, sugerem a presença dos mesmos metabólitos já relatados para a *J. gossypifolia*, Figura 53.

**Figura 53.** Perfil cromatográfico referente ao intervalo de 12 a 16 minutos com os respectivos espectros de UV para o extrato bruto das folhas de *Jatropha gossypifolia* L.

A seguir é mostrado cromatograma de íons totais encontrados para o extrato foliar da espécie *Jatropha multifida* L., com os respectivos íons extraídos do experimento, Figura 54.

**Figura 54.** Cromatogramas de íons totais com os respectivos íons extraídos para *J. multifida* L. Íon 565 *m/z* (verde); 449 *m/z* (vermelho escuro); 433 *m/z* (azul); 301 *m/z* (rosa) e 413 *m/z* (vermelho).

Os íons majoritários de *J. multifida*, Figura 54, foram detectados com o auxílio do dicionário de produtos naturais. Na Tabela 10 são apresentados os íons observados no cromatograma de íons totais, os dados do dicionário de produtos naturais, o erro experimental, o nome dos compostos e a fonte de origem de cada composto.

**Tabela 11.** Valores de *m/z* obtidos para *J. multifida* comparados com o dicionário de produtos naturais (DNP), erros em ppm, nome dos compostos detectados e a fonte natural.

\* [M+Na]<sup>+</sup>

As Figuras 55 e 56 representam os espectros de massas referentes aos *m/z* 433,1103 e 433,1121, os mesmos compostos vitexina e isovitexina encontrados para *Jatropha gossypifolia*. Além disso, esses metabólitos foram detectados sob os mesmo tempos de retenção da *J. gossypifolia* 13,9 e 14,3 minutos, confirmando e justificando as moléculas detectadas, Figura 54 coloração azul.

Adicionalmente, podemos observar que o perfil de fragmentação obtido no experimento *tandem* EMAR(IES)-EM<sup>2</sup>, de ambas as moléculas, correspondem aos mesmo íons filhos encontrados para espécie *J. gossypifolia* permitindo assim detectar e relatar pela primeira vez, esses flavonoides na espécie *J. multifida*.

**Figura 55.** Espectro de massas obtidos para o  $m/z$  433,1114 e o perfil fragmentação da vitexina e/ou isovitexina obtidos através do experimento *tandem* EMAR (IES)-EM<sup>2</sup> sob energia de colisão de 15 eV.

**Figura 56.** Espectro de massas obtido para o  $m/z$  433,1121 e o perfil fragmentação da vitexina e/ou isovitexina através do experimento *tandem* EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> sob energia de colisão de 15 eV.

Os mesmos metabólitos, orientina ou homoorientina, foram também detectados, no extrato das folhas da *Jatropha multifida* L. O espectro de massas pode ser visualizado na Figura 57. O tempo de retenção determinado pelo cromatograma de íons totais para o composto foi de 13,5 minutos, Figura 54 coloração vermelho escuro.

**Figura 57.** Espectro de massas obtido para  $m/z$  449,1042 referente aos metabólitos orientina ou homorientina.

Um outro flavonoide da classe das flavonas C-glicosiladas foi encontrado nas folhas *J. multifida* L., o schaftosídeo  $m/z$  565,1516, como pode ser visto na Figura 58.

Assim como os flavonoides já descritos, vitexina e orientina, o schaftosídeo apresenta algumas fragmentações típicas de quebra de glicona. No entanto, como essa flavona é formada por um dissacarídeo, elas podem fragmentar em diferentes regiões moleculares e assim, produzir um número muito maior de íons com diferentes perdas de massa.

No entanto, inicialmente notamos as perdas subseqüentes de 6 unidades de água  $[M+H -A]^+$  e a quebra da glicona em  $[M+H -^{0,2}X - A]^+$ . Assim como para vitexina ou orientina vemos o mesmo perfil de fragmentação de flavonoides C-glicosilados, justificando a ligação C-glicosídica e permitindo a sua detecção. Este composto foi eluído sob o tempo de 13,2 minutos, Figura 54 coloração verde.

(a)

(b)

Figura 58. Espectro de massas obtidos para  $m/z$  565,1516 referente aos perfis de fragmentação do schaftosídeo ou isoschaftosídeo no experimento *tandem* EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> sob energia de colisão de 15 eV (a) e 20 eV (b).

Assim como para a *Jatropha gossypifolia* a substância (*E*)-ferulato de tetradecila foi detectada para o extrato das folhas da *Jatropha multifida*. A respectiva molécula com  $m/z$  413,2683 foi detectada sob o mesmo tempo de retenção encontrado na *J. gossypifolia* ressaltando, uma vez mais, a presença e compatibilidade dos cromatogramas dos metabólitos encontrados nos extratos brutos. O espectro de massas do (*E*)-ferulato de pode ser visualizado na Figura 59.

Figura 59. Espectro de massas em  $m/z$  413,2683 para o (*E*)-ferulato de tetradecila.

Dentre os metabólitos já isolados para as espécies *J. gossypifolia* e *J. multifida*, Tabelas 10 e 11, foi possível, com o auxílio das técnicas hifenadas, detectar os compostos acima sem a necessidade de um prévio isolamento, e portanto, diminuindo custos ao laboratório, acelerando o processo de detecção, permitindo localizar o alvo molecular com mais facilidade, assim como, reduzir o impacto ambiental causado pelos solventes utilizados nas etapas de isolamento e purificação.

Assim sendo, técnicas de desreplicação são imprescindíveis na inovação e desenvolvimento em estudos na química produtos naturais, pois permitem ao pesquisador explorar, de maneira racional, a complexa rede metabólica em matrizes complexas.

#### 4.4.3 *Orthezia praelonga* Douglas- CLAE-DAD-EMAR(IES)-EM<sup>2</sup>

As cochonilhas são pequenos insetos que vivem nas folhas, ramos e troncos das plantas, sugando a seiva com auxílio de seu aparelho bucal (picador-sugador) Figura 60. A ortézia, *Orthezia praelonga* Douglas, é uma cochonilha, também conhecida como piolho-branco, de origem Neotropical, sem carapaça e de grande importância econômica, prejudicando a planta direta e indiretamente pois, sugando a seiva, além de enfraquecê-la, possibilita o desenvolvimento do fungo *Capnodium* sp. sobre os restos de sua alimentação, causando a fumagina, uma película escura que cobre as folhas impedindo processos fotossintéticos e respiratórios, provocando a queda das folhas e frutos e, por fim tornando a planta fraca e improdutiva (NEVES et al., 2006; MILLER et al., 2005; GUIRADO et al., 2001).

*O. praelonga* apresenta lâminas de cera dispostas no dorso e nas margens do corpo, sendo que as fêmeas, cerca de quatro dias após o acasalamento, desenvolvem uma estrutura no abdome chamada ovissaco, formado por diversos bastonetes de cera branca unidos, onde colocam seus ovos e protegem as ninfas recém-nascidas até a primeira ecdise ou muda (NEVES et al., 2006).

Estas cochonilhas foram encontradas nas partes abaxiais das folhas da espécie *J. multifida*. Afim de avaliar os metabólitos produzidos pela *Orthezia praelonga* foram realizados experimentos hifenados CLAE-DAD-EMAR(IES)-EM<sup>2</sup>, do extrato bruto metanólico do inseto. A Figura 61, mostra o perfil cromatográfico do extrato metanólico do afídeo *Orthezia praelonga* pela técnica CLAE-UV/DAD em gradiente exploratório.



**Figura 60.** (a) Folha *Jatropha multifida* sob presença do inseto *Orthezia praelonga* Douglas sob o caule de *J. multifida*; (c) Foto ampliada do inseto;

*Orthezia praelonga* Douglas e a ninfa do mesmo.

(b) *Orthezia praelonga* após o acasalamento.

A partir do espectro de UV/DAD da amostra analisada em um composto puro, o tempo de retenção de 10,9 minutos apresentou as seguintes bandas de absorção em 254 e 300 nm (Figura 62), sugerindo a estrutura de um flavonoide.

As bandas de absorção máxima dos flavonoides localiza-se entre 235-285 nm referente ao anel A e, entre 300 e 500 nm, (dependendo do padrão de substituição e conjugação) para o anel C (RIJKE, et al., 2006).

**Figura 61.** Perfil cromatográfico de CLAE-UV/DAD sob três comprimentos de onda 254, 280 e 330 nm para o extrato metanólico da espécie *Orthezia praelonga*.

**Figura 62.** Perfil cromatográfico em CLAE-UV/DAD em 280 nm sob intervalo de 6,5 a 15,0 min para a espécie *Orthezia praelonga*.

Em seguida é mostrado o cromatograma de íons totais do extrato bruto da espécie *Orthezia praelonga* coletada a partir das folhas da espécie *Jatropha multifida*, Figura 63. O espectro de massas do composto sob tempo de retenção de 10,9 minutos mostra a presença do íon de massa 573,1344  $m/z$ , Figura 64.

**Figura 63.** Cromatograma de íons totais e linha preta e íon filtrado pelo software de 449  $m/z$  linha vermelha do extrato bruto da espécie *Orthezia praelonga*.

**Figura 64.** Espectro de massas obtido para o íon majoritário detectado sob o tempo de retenção de 10,9 minutos.

Até o momento, a espécie *Orthezia praelonga* nunca foi estudada quanto à sua composição química, dificultando o processo de desreplicação dos principais metabólitos produzido pelo afídeo. No entanto, um experimento tandem foi realizado sob o tempo de 10,9 minutos para obtermos mais informações sobre essa molécula, Figura 65.

A fragmentação obtida sob energia de colisão de 5 eV, forneceu íons correspondentes a 449,10  $m/z$ , mais intenso, e 421,11  $m/z$ . Podemos destacar que o íon 449,10 foi observado para ambas as espécies de *Jatropha*, sendo detectado como um flavonoide da classe das flavonas, mas especificamente, uma luteolina C-glicosilada, conhecida como orientina ou homoorientina dependendo da posição da glicona. Podemos ainda destacar que o perfil do espectro de UV/DAD nos mostra bandas correlacionadas a classe dos flavonoides, reforçando a presença desse metabólito no inseto.

A partir do resultados de UV/DAD e espectrometria de massas de alta resolução, podemos propor que a espécie *Orthezia praelonga* acumula o flavonoide, orientina ou

homorientina e ainda o biotransforma no composto detectado 573,1344  $m/z$  de alta resolução.

**Figura 65. Espectro de massas EM<sup>2</sup> para o  $m/z$  573,1624 sob o tempo de retenção de 10,9 minutos.**

#### 4.5 Detecção de Metabólitos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Novas técnicas do estado da arte em desreplicação estão sendo implementadas no nosso grupo para suprir as deficiências nas metodologias atualmente utilizadas. Dentre elas podemos destacar a detecção de metabólitos em matrizes complexas através da técnica de ressonância magnética nuclear, RMN. No entanto, a complexidade das informações é muito maior, e o auxílio de novas ferramentas computacionais, e de processamento de dado, tornar-se imprescindível para interpretação dos dados gerados.

Um das ferramentas atualmente disponível no mercado, é o software MestReNova ver. 6.0.2-5475 (Mestrelab research S.L, Santiago da Compostela, ESP). Este software é capaz de processar os dados de decaimento de indução livre (FID), assim como, simular espectros virtuais dos principais núcleos atômicos, tais como,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$  com margem de acerto acima dos 95%. Ainda o algoritmo de predição permite a correção dos dados simulados através da substituição com deslocamentos químicos já reportados para um quimiotipo, permitindo a construção de padrões virtuais de alta confiabilidade.

Com isso podemos avaliar os principais deslocamentos químicos a partir da comparação dos espectros virtuais e reais das moléculas previamente isoladas e relatadas para espécie, gênero e até mesmo para a família em que planta de estudo está inserida, complementando os dados de desreplicação obtidos por outras técnicas de desreplicação.

O extrato foliar otimizado de ambas as espécies foi avaliado utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio  $^1\text{H}$  RMN. A princípio, o extrato bruto foi solubilizado em MeOH:H<sub>2</sub>O na proporção 1:1 e submetido a filtragem em cartucho C-18 sob fase móvel de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1). Em seguida, uma segunda condição de eluição, (100% MeOH), foi submetida ao cartucho que continha os metabólitos retidos da primeira etapa. Portanto, dividimos o nosso extrato bruto em duas porções, uma sendo de maior polaridade, contendo provavelmente açúcares e compostos fenólicos e, outra composta principalmente por moléculas lipofílicas.

Após secagem, os extratos obtidos dessa primeira etapa de separação, foram solubilizados em DMSO  $d_6$ . As condições experimentais de cada um dos ensaios foram realizadas sob os mesmos parâmetros afim de compará-los posteriormente.

A metodologia utilizada para a desreplicação através de RMN iniciou-se com a elaboração dos padrões virtuais de  $^1\text{H}$  RMN de cada molécula previamente detectada através do uso do software de predição *Modgraph NMR Predict desktop* (Mestrelab research S.L, Santiago da Compostela, ESP). Essas predições foram realizadas em condições idênticas às análises realizadas com extratos foliares de *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L., na frequência de 11.7 T em DMSO  $d_6$ .

Os espectros virtuais de  $^1\text{H}$  RMN dos flavonoides e do (*E*)-ferulato de tetradecila foram comparados com o espectro real do extrato hidroalcoólico de ambas as espécies. Os deslocamentos químicos obtidos para os flavonoides foram comparados com os dados da literatura e aqueles não reproduzidos pelo algoritmo de predição foram corrigidos através dos dados reais.

Abaixo segue a estrutura básica dos principais compostos simulados, Figura 66. A Figura 67, mostra os espectros  $^1\text{H}$  RMN, para as amostras reais do extrato hidroalcoólico das espécies *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. e os espectros virtuais dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e homorientina assim como o (*E*)-ferulato de tetradecila.

(a)

(b)

**Figura 66.** Moléculas base dos espectro virtuais de  $^1\text{H}$  RMN (a) Flavonoide (coloração vermelha refere-se a glicona na posição C-6 da isovitexina e homorientina, azul, refere-se a glicona na posição C-8 da vitexina e orientina, laranja, refere-se a hidroxila ligada ao carbono C-4' da vitexina e isovitexina, verde e laranja, refere-se ao grupo catecol pertencente a orientina e homorientina); (b) (*E*)-ferulato de tetradecila.

**Figura 67.** Espectro reais de  $^1\text{H}$  RMN dos extratos hidroalcoólicos das espécies *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. e os espectros de  $^1\text{H}$  RMN simulado para as flavonoides detectados por CLAE-DAD-EMAR(IES) e o (*E*)-ferulato de tetradecila.

Para a análise dos espectros de  $^1\text{H}$ , foram selecionadas as regiões com sinais característicos para os metabólitos detectados. A primeira região expandida para análise foi sob o intervalo de 4,21 a 4,43 ppm, Figura 68.

A presença de substituintes hidroxila (OH) provenientes de hexoses, geram sinais com deslocamentos químicos entre 4,20 a 4,40 ppm. A simulação dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN das moléculas propostas proporcionou sinais característicos para as hidroxilas presentes na glicona dos flavonoides na faixa de 4,30 e 4,37 ppm.

A comparação dos sinais simulados com os obtidos pela análise de RMN dos extratos reais das *Jatrophas* permitiu detectar a presença destes substituintes na fração hidroalcoólica do extrato bruto, conforme ilustrado na figura 68.

**Figura 68.** Comparação dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e homorientina e (*E*)-ferulato de tetradecila com os espectros do extratos hidroalcoólicos das folhas de *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. sob o intervalo de 4,20 a 4,43 ppm.

A Figura 69 mostra o espectro expandido sob a região entre 4,45 e 4,80 ppm. A partir dos  $\delta$  obtidos para os flavonoides podemos notar a presença de dubletos entre 4,55 e 4,71 ppm referente a hidrogênios metilênicos do carbono anomérico do açúcar.

Nos espectros para as espécies de *Jatropha* podemos observar dubletos com deslocamentos químicos em torno de 4,59 e 4,69 ppm. No entanto, para a espécie *J. gossypifolia* observamos um multiplicidade distinta em torno de 4,59 ppm sugerindo um duplo dubleto. Entretanto, esta multiplicidade é devido a sobreposição dos hidrogênios ligados ao carbono anomérico dos principais flavonoides.

Os deslocamentos químicos referentes ao hidrogênio da ligação dupla entre os carbonos H-2 e H-3 do anel C referente as flavonas, estão localizados entre 6,20 a 6,80 ppm caracterizados por um singleto.

**Figura 69.** Comparação dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e homorientina e (*E*)-ferulato de tetradecila com os espectros do extratos hidroalcoólicos das folhas de *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. sob o intervalo de 4,45 a 4,80 ppm.

A Figura 70, mostra esta região do espectro de  $^1\text{H}$  RMN entre 6,62 a 6,84 ppm. Podemos observar que no espectro do extrato hidroalcoólico da espécie *J. gossypifolia* temos a sobreposição dos deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios insaturados na posição H-3 entre 6,75 e 6,77 ppm. Para espécie *J. multifida*, os mesmos sinais de hidrogênio estão localizados entre 6,72 e 6,74 ppm.

Para espectro virtual do (*E*)-ferulato de tetradecila observamos sinais de dubletos nesta região de 6,62 a 6,84 ppm. O primeiro sob o  $\delta$  de 6,66 ppm com constante de acoplamento *J*-7,52 Hz referente ao acoplamento *orto* do hidrogênio do carbono H-3 com o

H-4. O segundo dubleto em 6,71 ppm está associado ao acoplamento *meta*,  $J$ -1,55 Hz, do hidrogênio H-6 com H-4, Figura 70.

Ao observar o espectro para *J. gossypifolia* podemos concluir a presença de tais sinais do (*E*)-ferulato de tetradecila sob os deslocamentos químicos: 6,72 ppm para o acoplamento *meta* e 6,68 ppm para o acoplamento *orto*, Figura 70.

**Figura 70.** Comparação dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e homorientina e (*E*)-ferulato de tetradecila com os espectros do extratos hidroalcoólicos das folhas de *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. sob o intervalo de 6,62 a 6,84 ppm.

A figura 71 mostra os mesmos sinais referentes ao hidrogênio da flavona em H-3 para homorientina a  $\delta$  de 6,59 ppm. Estes sinais podem ser observamos para as ambas as espécies de *Jatropha*. Para o (*E*)-ferulato de tetradecila, a presença de um dubleto em torno de 6,50 ppm refere-se ao acoplamento em *E* (*entgegen*, que significa em alemão, oposto) ou *trans*, com constante de acoplamento de  $J$  – 15,29 Hz, do hidrogênio do éster  $\alpha$ ,  $\beta$ , insaturado em H-8, H-9 e H-10.

Segundo a Figura 71 verifica-se a presença dos sinais referentes ao acoplamento *E* para a espécie *J. gossypifolia* sob o  $\delta$  de 6,52 ppm e  $J$ -14,52 Hz.

A Figura 72 mostra o espectro de  $^1\text{H}$  RMN expandido sob o intervalo de 6,80 a 7,04 ppm. Sob este intervalo observamos para os espectros da vitexina e isovitexina, a presença de um dubleto em torno de 6,90 e 6,92 ppm respectivamente, associados ao acoplamento *orto* dos hidrogênios aromáticos nas posições H-3'-H-2' e H-5'-H-6' do anel B. No entanto para a orientina e homorientina temos apenas um destes acoplamentos *orto* pois estes flavonoides apresentam um grupo catecol no anel B. O deslocamento químico deste hidrogênio aromático também se deu um 6,90 ppm.

Estes sinais foram observados para os espectros da ambas as espécies de *Jatropha* referentes ao acoplamento *orto* dos hidrogênios aromáticos do anel B.

**Figura 71.** Comparação dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e homorientina e (*E*)-ferulato de tetradecila com os espectros do extratos hidroalcoólicos das folhas de *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. sob o intervalo de 6,45 a 6,62 ppm.

A Figura 73 mostra o espectro de  $^1\text{H}$  RMN sob a região de 7,35 a 7,54 ppm. Nessa região do espectro, a homorientina e a orientina apresentam um dubleto referente ao acoplamento *meta* entre o hidrogênio aromático H-2' com H-6',  $J=1,57$  Hz em torno de 7,42 ppm no anel B. Um segundo sinal característico para esses flavonoides, é a formação de um duplo dubleto entre 7,45 e 7,50 ppm referente ao acoplamento *orto* ( $J=7,54$  Hz) do hidrogênio aromático do carbono C-6' com o C-5' e o acoplamento *meta* entre H-6' e H-2' ( $J=1,54$  Hz). Estes sinais são observados para ambos os espectros do extrato hidroalcoólico das espécies de *Jatropha*,  $\delta$  em torno de 7,53 ppm para duplo dubleto e aproximadamente 7,47 ppm para o dubleto.

**Figura 72.** Comparação dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e homorientina e (*E*)-ferulato de tetradecila com os espectros do extratos hidroalcoólicos das folhas de *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. sob o intervalo de 6,80 a 7,04 ppm.

**Figura 73.** Comparação dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e homorientina e (*E*)-ferulato de tetradecila com os espectros do extratos hidroalcoólicos das folhas de *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. sob o intervalo de 7,35 a 7,56 ppm.

A Figura 74, mostra os espectros de hidrogênio sob o intervalo de 7,74 a 8,14 ppm. A vitexina e a isovitexina apresentam os sinais referentes ao acoplamento *orto* entre os hidrogênios aromáticos do anel B, H-2' com H-3' e H-6' com H-5', também observados para os espectros reais dos extratos hidroalcoólicos das espécies estudadas.

A Figura 75, mostra os espectros  $^1\text{H}$  RMN reais, (*J. gossypifolia* e *J. multifida*) e virtuais corrigidos (flavonoides e (*E*)-ferulato de tetradecila) sob a região de 13,00 a 13,75 ppm. Tanto para os espectros reais como para os virtuais foram encontrados singletos em 13,15 e 13,55 aproximadamente, exceto para o (*E*)-ferulato de tetradecila, referentes ao hidrogênio quelado da hidroxila OH-5 com a carbonila do carbono C-4.

**Figura 74.** Comparação dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e homorientina e (*E*)-ferulato de tetradecila com os espectros do extratos hidroalcoólicos das folhas de *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. sob o intervalo de 7,74 a 8,14 ppm.

**Figura 75.** Comparação dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos flavonoides vitexina, isovitexina, orientina e homorientina e (*E*)-ferulato de tetradecila com os espectros do extratos hidroalcoólicos das folhas de *J. gossypifolia* L. e *J. multifida* L. sob o intervalo de 13,00 a 13,75 ppm.

Fica evidente o potencial da RMN como ferramenta de desreplicação para os metabólitos descritos, confirmando as propostas obtidas nas demais técnicas, e ainda fornecendo informações mais específicas sobre a estrutura dos compostos, como as posições das hidroxilas, açucares e associações através de pontes de hidrogênio, revelando quimiotipos e relações intramoleculares de interesse para elucidações *in situ*.

## 5. CONCLUSÕES FINAIS

No presente trabalho foram analisados os extratos brutos das espécies *Jatropha multifida* e *J. gossypifolia* fazendo uso de ferramentas quimiométricas de vanguarda que, auxiliaram no processo de otimização de extração do extrato bruto assim como, na obtenção dos *fingerprints* obtidos da técnica acoplada CLAE-UV/DAD.

Para *J. gossypifolia* a mistura 1 : 1 clorofórmio : isopropanol apresentou a melhor condição de extração enquanto para *J. multifida* a composição 2/3 : 1/6 : 1/6 de etanol : acetona : 1,4 dioxano foi a que obteve a melhor resposta. O *fingerprint* cromatográfico para *J. gossypifolia* foi obtido utilizando como fase estacionária uma coluna monolítica C-18. A fase móvel foi composta por água e uma mistura de solventes orgânicos, MeOH : ACN , 68 : 32, em gradiente exploratório de 5-100% fase orgânica. A temperatura da coluna foi mantida em 30 °C, o fluxo em 2,0 mL·min<sup>-1</sup> e o volume de injeção de 30 µL.

Para *J. multifida* foi utilizada como fase estacionária uma coluna C-18. A fase móvel foi composta por água e uma mistura MeOH : ACN 1 : 1 em gradiente exploratório 5-100% fase orgânica. A temperatura de coluna foi de 40 °C, o fluxo foi de 2,5 mL·min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 30 µL.

Os bioensaios *in vitro*, conversão do reagente DPPH (ação antioxidante), inibição da polimerização da hematina bovina (ação antimalárica), inibição enzimática de acetilcolinesterásica (doença de Alzheimer) e o ensaio da inibição do crescimento de fungos fitopatógenos realizados para os extratos brutos otimizados em ambos os espécimes não apresentaram atividades significativas quando comparados com os padrões.

A detecção dos metabólitos e a desreplicação dos extratos permitiram a identificação de algumas classes de substâncias típicas para o gênero *Jatropha* como terpenos e flavonoides. A estratégia desenvolvida na desreplicação dessas matrizes complexas utilizou-se da abordagem *in silico* através da comparação e análise dos dados espectrométricos obtidos dos experimentos CLAE-DAD-EMAR(IES)-EM<sup>2</sup> com bases de dados que compilam dados de massas de alta resolução como por exemplo o Dicionário de Produtos Naturais de Chapman & Hall, juntamente com novas abordagens de desreplicação em RMN, ambas

críticas no que se refere à geração de dados estruturais relevantes com o objetivo de elucidar *in situ* os metabólitos majoritários encontrados.

Uma série de flavonoides pertencentes à classe das flavonas C-glicosiladas foram detectadas através do perfil de fragmentação dos experimentos *tandem*, espectros de UV e pelos experimentos em RMN, assim como alguns diterpenos e o (E)-ferulato de tetradecila.

Para a *J. gossypifolia* foram detectados sete compostos sendo três diterpenos, (4Z)-jatrogrossidentadiona/(4E)-15-epi-jatrogrossidentadiona, 2-hidroxiisojatrogrossidiona /2-epi-hidroxiisojatrogrossidiona e 3 $\beta$ , 14 $\alpha$ -hidroxipimara-7,9(11),15-triene-12-ona, três flavonoides, vitexina/isovitexina, orientina/homorientina e o Flavonoide glicosídeo I e o (E)-Ferulato de tetradecila. Na *Jatropha multifida* foram detectados 4 compostos. Sendo três flavonoides, vitexina/isovitexina, orientina/homorientina e o schaftosídeo/isoschaftosídeo, e o (E)-ferulato de tetradecila.

Ainda, visando o entendimento de relações quimio-ecológicas dessas espécies junto ao inseto *Orthezia praelonga* foram detectadas bandas no espectro de UV referentes a transições eletrônicas típicas de flavonoides da classe das flavonas e a partir do perfil de fragmentação do espectro de massas de alta resolução foi possível sugerir a biotransformação do flavonoide orientina/homorientina. Para podermos elucidar a estrutura detectada, experimentos bidimensionais em RMN assim como novos estudos de fragmentação *tandem* deverão ser realizados. Esta abordagem em estudos de ecologia química abre uma série de possibilidades de pesquisa dentro de nosso grupo visando a exploração racional de relações tróficas mais complexas entre plantas e insetos.

Neste trabalho, o desenvolvimento de técnicas de desreplicação pela espectroscopia de RMN foi um desafio inovador na busca por informações estruturais em matrizes complexas. Na etapa inicial foram elaborados os padrões virtuais de  $^1\text{H}$  RMN já detectados pelas técnicas anteriormente descritas.

Em seguida, com auxílio de softwares de última geração foi possível comparar os espectros de  $^1\text{H}$  RMN reais pertencentes aos extratos foliares de *J. gossypifolia* e *J. multifida* com aqueles gerados virtualmente e, corrigidos com o auxílio dos dados experimentais reportados na literatura.

A aplicação desta abordagem forneceu informações específicas quanto à estrutura dos metabólitos não reportadas pela espectrometria de massas (EM) e ultravioleta.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam a importância da aplicação de novas metodologias de análise para o processo extrativo e para os sistemas de separação, assim como, o desenvolvimento de técnicas de desreplicação inovadoras aplicadas ao estudo de espécies vegetais, como as espécies de *Jatropha*, permitindo o entendimento da matriz complexa como um todo e, fornecendo subsídios para elucidações *in situ* das moléculas majoritárias.

## REFERÊNCIAS

ABREU, I.; MARINHO, A. S. S.; PAES, A. M. A.; FREIRE, S. M. F.; OLEA, R. S. G.; BORGES, M. O. R. Hypotensive and vasorelaxant effects of ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia* L. in rats. **Fitoterapia**, v. 74, p. 650-657, 2003.

AHMAD, M. U.; ISLAM, M. R.; MIRZA, A. H.; CHOWDHURY, B. H.; NURUM, N. Alkaloids from *Jatropha gossypifolia*. **Indian Journal Chemistry Section B**, v. 31, p. 67-69, 1992.

AIYELAAGBE, O. O. Antibacterial activity of *Jatropha multifida* roots. **Fitoterapia**, v. 72, p. 544-546, 2000.

ALMEIDA, A. A.; SCARMÍNIO, I. S. Statistical mixture *design* optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea. **Journal Separation Science**, v. 30, p. 414-420, 2007.

AUVIN-GUETTE, C.; BARAGUEY, C.; BLOND, A.; POUSET, J. L.; BOBO, B. Cyclogossine B, a cyclic octapeptide from *Jatropha gossypifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 1155-1157, 1997.

BANERJI, J.; DAS, B.; CHATTERJEE, A.; SCHOOLERY, J. N. Gadain, a lignan from *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2323-2327, 1984.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Statistical design chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, 2006.

BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BORGES, C. N.; BRUNS, R. E.; ALMEIDA, A. A.; SCARMÍNIO, I. S. Mixture – mixture design for the fingerprint optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for *Camellia sinensis*. **Analytical Chimica Acta**, v. 595, p. 28-37, 2007.

BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column – mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1439-1449, 2009.

CALIXTO, J. B.; SANT'ANA, A. E. G. Pharmacological analysis of the inhibitory effect of jatrophone, a diterpene isolated from *Jatropha elliptica*, on smooth and cardiac muscles. **Phytotherapy Research**, v. 1, p. 122-126, 1987.

CHEN, H.; TALATY, N. N.; TAKÁTS, Z.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 6915-6927, 2005.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

COTTE-RODRIGUEZ, I.; TAKÁTS, Z.; TALATY, N.; CHEN, H.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 6755-6764, 2005.

COX, D. R.; REID, N. **The theory of the design of experiments**. London: Chapman & Hall, 2000.

DAS, B.; BANERJI, J. Arylnaphthalene lignan from *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3684-3686, 1988.

DAS, B.; DAS, R. Gossypifan, a lignan from *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 931-932, 1995.

DAS, B.; ANJANI, G. Gossypidien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 115-117, 1999.

DAS, B.; VENKATAIAH, B. A rare diterpene from *Jatropha gossypifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 759-760, 1999.

DAS, B.; DAS, R.; VENKATAIAH, B. A minor coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 213-214, 2001.

DAS, B.; RAO, S. P.; SRINIVAS, K. V. N. S.; DAS, R. Jatrodien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 985-987, 1996.

DAS, B.; KASHINATHAM, A.; VENKATAIAH, B.; SRINIVAS, K. V. N. S.; MAHENDER, G.; REDDY, M. R. Cleomiscosin A, a coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1189-1191, 2003.

DI STASI, L. C.; HIMURA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002. p. 604.

FERNANDES, A. P. **Emprego de estratégias quimiométricas para a diferenciação de alimentos de acordo com as formas de produção**. 2007. 205 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

HORSTEN, S. F. A. J.; VAN DEN BERG, A. J. J.; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J. Cyclogossine A: a novel cyclic heptapeptide Isolated from the látex of *Jatropha gossypifolia*. **Planta Medica**, v. 62, p. 46-50, 1996.

HU, Q.; NOLL, R. J.; LI, H.; MAKAROV, A.; HARDMAN, M.; COOKS, R. G. The orbitrap: a new mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 430- 443, 2005.

IGNATUSHCHENKO, M. V.; WINTER, R. W.; BÄCHINGER, H. P.; HINRICHS, D. J.; RISCOE, M. K. Xanthones as antimalarial agents: studies of a possible mode of action. **FEBS Letters**, v. 409, p. 67-73, 1997.

JI, Y-B.; XU, Q-S.; HU, Y-Z.; HEYDEN, Y. V. Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 97-104, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 2. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1983.

KIM, H. K.; VERPOORTE, R. Sample preparation for plants metabolomics. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 4-13, 2010.

KING, G. F.; KUCHEL, P. W. Theoretical and practical aspects of NMR studies of cells. **Immunomethods**, v. 4, p. 85-97, 1994.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KONISHI, Y.; KYOTA, T.; DRAGHICI, C.; GAO, J. M.; YEBOAH, F.; ACOCA, S.; JARUSSOPHON, S.; PURISIMA, E. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to facilitate dereplication of natural products. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 2521-2529, 2002.

KOSASI, S.; VAN DER SLUIS, W. G.; LABADIE, R. Multifidol and multifidol glucoside from the latex of *Jatropha multifida*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2439-2441, 1989.

KOSASI, S.; VAN DER SLUIS, W. G.; BOELEN, R.; 't HART, L. A.; LABADIE, R. P. Labaditin, a novel cyclic decapeptide from the latex of *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae): isolation and sequence determination by means of two-dimensional NMR. **FEBS Letters**, v. 256, p. 91-96, 1989.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

LEVIN, Y.; SHERER, Y.; BIBI, H.; SCHLESINGER, M.; HAY, E. Rare *Jatropha multifida* intoxication in two children. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 19, p. 173-175, 2000.

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, v. 71, p. 2521-2529, 2002.

MARCH, R. E.; LEWARS, E. G.; STADEY, C. J.; MIAO, X.-S.; ZHAO, X.; METCALFE, C. D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry International. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 248, p. 61-85, 2006.

MARSTONS, A.; KISSILING, J.; HOSTETTMANN, K. A. A rapid TLC bioautography method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MAWARDI, R.; HAZARMOHD, I.; TOI, Y. L. Jatrololon A dan Jatrolatrin: DNA diterpenadari *Jatropha gossypifolia*. **Pertanika**, v. 13, p. 405-408, 1990.

NAKANISH, K. **One-dimensional and two-dimensional nmr spectra by modern pulse techniques**. Tokyo: Kodansha, 1990.

NEWMAN, D. J.; GORDON, M. G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; GORDON, M. G.; KENNETH, M. S. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NG, J.; BANDEIRA, N.; LIU, W-T.; GHASSEMIAN, M.; SIMMONS, T. L.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R.; DORRESTEIN, P. C.; PEVZNER, P. A. Dereplication and De Novo sequencing of nonribosomal peptides. **Nature Methods**, v. 6, p. 596-599, 2009.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabolomics. **Nature**, v. 455, p. 1054-1056, 2008.

ODUOLA, T.; AVWIORO, O. G.; AYANNIYL, T. B. Suitability of the leaf extract of *Jatropha gossypifolia* as an anticoagulant for biochemical and haematological analyses. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 679-681, 2005.

OKUYAMA, E.; OKAMOTO, Y.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M. Pharmacologically active components of a Peruvian medicinal plant, Huanarpo (*Jatropha cillata*). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, p. 333-336, 1996.

PARIHAR, M. S.; HEMMANI, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, p. 456-467, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. R.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. 4th ed. Belmont: Brooks/Cole, 2009. p. 408-438.

PORTUGAL, M.; BARAK, V.; GINSBURG, I.; KOHEN, R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 412-422, 2007.

RAVINDRANATH, N.; VENKATAIAH, B.; RAMESH, C.; JAYAPRAKASH, P.; DAS, B. Jatrophenone, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 870-871, 2003.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical separation and detection methods for flavonoides. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31-63, 2006.

RUDALL, P. Laticifers in Euphorbiaceae: a conspectus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 94, p. 143-163, 1987.

RUDALL, P. Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): homology and evolution. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 270-282, 1994.

SANKARA, S. S.; NAGARAJAN, S.; SULOCHNAN, N. Flavonoids of the leaves of *Jatropha gossypifolia*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1690-1695, 1971.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 165-171, 2008.

SILVERSTEINS, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectroscopic identification of organic compounds**. 4th ed. New York: Wiley, 1981.

TABARRINI, O.; CECCHETTI, V.; TEMPERINI, A.; FILIPPONI, E.; LAMPERTI, M. G.; FRAVONILINI, A. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, p. 456-467, 2004.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; COOKS, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry and biology. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 1261-1275, 2005.

TAVALHINI, I. C. N. **Estudo de métodos multivariados na análise e calibração de espectros**. 2003. 156 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

TINTO, W. F.; JOHN, L. M. D.; REYNOLDS, W. F.; McLEAN, S. Triterpenoids of *Jatropha gossypifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 807-809, 1992.

ULRICH-MERZENIC, G.; ZEITLER, H.; JOBST, D.; PANEK, D.; VETTER, H.; WAGNER, H. Application of the “-Omic-” technologies in phytomedicine. **Phytomedicine**, v. 14, p. 70-82, 2007.

VAN DER BERG, A. J. J.; HORSTEN, S. F. A. J.; KETTENES-VAN DER BOSCH, J. J.; KROES, B. H.; LABADIE, R. P. Multifidin — A cyanoglucoside in the latex of *Jatropha multifida*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 597-598, 2000.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 53-56, 2005.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Review**, v. 6, p. 3-14, 2007.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Metabolomics: will it stay? **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 2-3, 2010.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidicflavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, p. 29-41, 2001.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 33-144, 1994.

WOLFENDER, J-L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, p. 719-734, 2009.

YIZENG, L.; LUNZHAO, Y.; QUINGSONG, X. Chemometrics and modernization of traditional Chinese medicine. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 51, p. 718-728, 2008.

ZSOLNAY, Á. Dissolved organic matter: artefacts, definitions and function. **Geoderma**, v. 113, p. 187-209, 2003.