

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara

Avaliação de *Eichhornia crassipes* como fonte de ácido chiquímico

Sthephanie Favalli Cardoso

Araraquara

2013

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara

Avaliação de *Eichhornia crassipes* como fonte de ácido chiquímico

Sthephanie Favalli Cardoso

Orientadora: Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento

Co-orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de
Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista, para a obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Araraquara

2013

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meus avós, Nena e Stalin,
por serem meus exemplos de vida, dedicação, generosidade e amor.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

A Deus pelo dom da vida, e por todas as oportunidades;

Aos meus pais, por acreditarem no meu potencial e terem sempre investido no meu crescimento, tanto pessoal quanto profissional. Agradeço profundamente por todo apoio e suporte, devo tudo que sou a eles;

A minha irmã, por me mostrar essa profissão e estar sempre ao meu lado;

Ao Matheus, pelo apoio, paciência, incentivo e amor;

A Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento pela confiança, paciência, dedicação e pelos ensinamentos que foram essenciais para a minha formação;

Aos colegas de laboratório, Cláudio e Doni, por toda a ajuda;

A Profa. Dra. Lucia Maria Xavier por me receber de braços abertos no laboratório e por toda a colaboração desde o início até a conclusão deste projeto;

A FAPESP pela bolsa de iniciação científica.

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Ácido chiquímico.....	12
1.2. <i>Eichhornia crassipes</i>	16
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	20
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
4.1. Coleta do material vegetal	21
4.2. Isolamento e purificação do ácido chiquímico	22
4.3. Preparação dos extratos	22
4.4. Análise dos extratos por CCDC.....	24
4.5. Análise dos extratos por RMN de ¹ H.....	25
4.6. Construção da curva analítica	25
4.7. Análise dos extratos por CLAE	25
4.8. Análise estatística dos dados.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

5.1.	Identificação e avaliação da pureza de AC	27
5.2.	Preparação dos extratos	32
5.3.	Análise dos extratos por CCDC e RMN DE ^1H	37
5.4.	Análise dos extratos por CLAE-DAD	39
6.	CONCLUSÕES.....	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
8.	ANEXOS.....	59

RESUMO

Ácido chiquímico, um importante intermediário na biossíntese de substâncias aromáticas em plantas e microorganismos, é o material de partida na síntese comercial do antiviral fosfato de oseltamivir (Tamiflu®), utilizado no tratamento de influências, como as do tipo A H1N1, tipo A H5N1 e do tipo B. Segundo a Roche, o maior obstáculo na produção do Tamiflu® é a disponibilidade de ácido chiquímico, que é atualmente isolado do anis estrelado chinês ou obtido por meio de fermentação. Devido à necessidade de se encontrar novas fontes alternativas de ácido chiquímico, o presente trabalho dedicou-se ao estudo da planta aquática *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae). Essa espécie de macrófita, conhecida popularmente como aguapé, é considerada a planta invasora que mais causa problemas em ecossistemas de água doce, devido ao seu rápido desenvolvimento e alta produção de biomassa. Foram realizadas extrações das partes aéreas e das raízes de *E. crassipes* com metanol ou água, por meio de cinco diferentes processos extrativos: Soxhlet, maceração com auxílio de ultrassom a temperatura ambiente e a 45 °C, e maceração com auxílio de agitação magnética a temperatura ambiente e a 45 °C. Os extratos foram analisados por CCDC, RMN de ¹H e CLAE-DAD. Os resultados indicaram que: (i) as partes aéreas de *E. crassipes* acumulam maior concentração de ácido chiquímico (0,1-2,7%) do que as raízes (0,1-0,9%); (ii) metanol é o melhor solvente extrator de ácido chiquímico, independente da metodologia utilizada; (iii) a extração por aparelho Soxhlet demonstrou ser o método mais efetivo na extração de ácido chiquímico do material vegetal.

Palavras-chaves: *Eichhornia crassipes*; Pontederiaceae; aguapé; ácido chiquímico; fosfato de oseltamivir.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas do ácido chiquímico e do fosfato de oseltamivir	12
Figura 2. Cultivo da espécie <i>E. crassipes</i> no Instituto de Química de Araraquara.	17
Figura 3. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) de AC isolado de <i>E. crassipes</i>	29
Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 126 MHz) de AC isolado de <i>E. crassipes</i>	30
Figura 5. Espectro de IV de AC isolado de <i>E. crassipes</i>	31
Figura 6. CCDC dos extratos das raízes de <i>E. crassipes</i>	37
Figura 7. CCDC dos extratos das partes aéreas de <i>E. crassipes</i>	38
Figura 8. Banda cromatográfica referente ao ácido chiquímico.....	40
Figura 9. Curva analítica para análise de ácido chiquímico por CLAE.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Códigos dos extratos obtidos de <i>E. crassipes</i>	23
Tabela 2. Gradiente utilizado em CLAE para análise dos extratos. Solvente A: ACN. Solvente B: 0,1% H ₃ PO ₄ em água.....	26
Tabela 3. Dados de RMN de ¹ H de AC (D ₂ O, J = Hz).	27
Tabela 4. Extratos metanólicos e aquosos das raízes de <i>E. crassipes</i>	33
Tabela 5. Extratos metanólicos e aquosos das partes aéreas de <i>E. crassipes</i>	35
Tabela 6. Resultados das análises por CLAE-DAD dos extratos metanólicos e aquosos das raízes de <i>E. crassipes</i>	44
Tabela 7. Resultados das análises por CLAE-DAD dos extratos metanólicos e aquosos das partes aéreas de <i>E. crassipes</i>	46
Tabela 8. Análise estatística para avaliar o efeito do solvente na extração de AC.	49
Tabela 9. Análise estatística para avaliar o efeito da temperatura na extração de AC.	49
Tabela 10. Análise estatística para avaliar o efeito do tipo de agitação na extração de AC. ...	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC	Ácido Chiquímico
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
ANOVA	Análise de Variância
ASE	Extração Acelerada com Solvente
BAW	n-Butanol:Ácido acético:Água
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Ultravioleta
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
IV	Infravermelho
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MWAE	Extração assistido por micro-ondas
OMS	Organização Mundial da Saúde

p_f	Ponto de Fusão
R_f	Fator de Retenção
R_t	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
α_D	Rotação óptica
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda de máxima absorção
r^2	Coeficiente de correlação
δ	Deslocamento químico
dd	Duplo duplete
ddd	Duplo duplo duplete
dl	Duplete largo
dt	Duplo tripleto
ddt	Duplo duplo tripleto
sl	Singleto largo

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ácido chiquímico

Ácido chiquímico (ácido (3*R*,4*S*,5*R*)-3,4,5-tri-hidroxiciclo-hex-1-eno-carboxílico, **1**, Figura 1), mais conhecido pela sua forma aniônica chiquimato, é um importante intermediário do metabolismo secundário de plantas e microorganismos, sendo o principal precursor na biossíntese de substâncias aromáticas, como os aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, e outros compostos como alcaloides e fenilpropanoides.

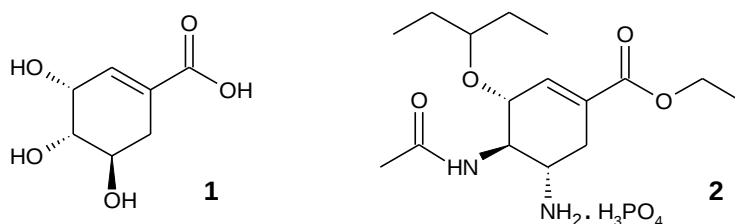


Figura 1. Estruturas do ácido chiquímico (**1**) e do fosfato de oseltamivir (**2**).

Ácido chiquímico possui um alto valor agregado por ser utilizado como material de partida na produção de cosméticos e de medicamentos, como o fosfato de oseltamivir (Tamiflu®, **2**, Figura 1). A pró-droga oseltamivir é um inibidor potente e seletivo das enzimas neuraminidases, impedindo tanto a liberação de vírus infecciosos de células infectadas quanto à entrada do vírus em células não infectadas (Tamiflu, 2010). O antiviral oral Tamiflu® é utilizado no tratamento de influenzas, como a do tipo A H5N1 (conhecida como gripe aviária), tipo A H1N1 (conhecida como gripe suína) e do tipo B.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as epidemias de gripe acometem mundialmente de 3 a 5 milhões de pessoas a cada ano, gerando cerca de 250.000 a 500.000 mortes. Ainda segundo a OMS, uma pandemia de gripe ocorre quando uma nova estirpe do vírus influenza A aparece, contra o qual a população humana não tem imunidade, resultando em morbidade e mortalidade generalizada. As pandemias de gripe ocorreram em torno de três vezes em cada século (Influenza, 2010).

O Programa de Controle da Influenza A (H1N1) de 2009 da OMS aconselhou o uso de oseltamivir (Tamiflu®) ou de zanamivir (Relenza®) nos casos de contaminação ou suspeita de contaminação, além dos programas de vacinação para prevenção e contenção da doença (World Health Organization, 2010).

Segundo a Roche, empresa que desenvolveu e comercializa o Tamiflu®, o maior obstáculo na produção de fosfato de oseltamivir é a disponibilidade de ácido chiquímico, que não é sintetizado comercialmente (Li et al., 2007a).

Existem duas fontes comerciais principais para a obtenção do ácido chiquímico utilizado na produção de fosfato de oseltamivir: o processo de fermentação e o processo de extração. No processo de fermentação, bactérias *Escherichia coli* geneticamente modificadas são superalimentadas com uma fonte de carbono, como a glicose, o que faz com que elas produzam ácido chiquímico. Recentemente, as vias biossintéticas em *Escherichia coli* foram aprimoradas, permitindo que o organismo acumule material suficiente para ser comercialmente viável (Kramer et al., 2003; Escalante et al., 2010).

No processo de extração, ácido chiquímico é extraído das vagens do anis estrelado chinês (*Illicium verum*). *I. verum* cresce quase que exclusivamente em quatro províncias montanhosas no sudoeste da China, e suas vagens são colhidas somente entre março e maio, proporcionando 3,3% de ácido chiquímico. As árvores não produzem frutos antes de oito a

dez anos de idade. Aproximadamente 90% da safra são prontamente utilizadas pela Roche na produção do Tamiflu® (Factsheet Tamiflu, 2010).

Atualmente, estima-se que um terço da exigência de ácido chiquímico pelo mercado é obtido a partir de *E. coli* geneticamente modificada, e o restante a partir da extração das vagens do anis estrelado chinês (*Illicium verum*) (Scientific Correspondence, 2009). As limitações do uso de anis estrelado como fonte de ácido chiquímico foram uma das principais razões pela escassez mundial de Tamiflu® em 2005 (Avula et al., 2009). Nesta época, em resposta à epidemia de H5N1 (gripe aviária) no Sudeste Asiático, vários governos – incluindo os do Reino Unido, Canadá, Israel, Estados Unidos e Austrália – armazenaram grandes quantidades de oseltamivir em preparação para uma possível pandemia.

Devido à necessidade de se encontrar novas fontes alternativas de ácido chiquímico, pesquisadores têm estudado outras espécies de plantas e de bactérias, utilizando várias metodologias.

Outras fontes potenciais de ácido chiquímico incluem as sementes de *Liquidambar styraciflua* (2,4-3,7%) (Enrich et al., 2008), *Pinus sylvestris* (0,8-1,6%) (Sui, 2008), *Pinus elliottii* (1,5%) (Xie et al., 2010). Avula e colaboradores realizaram um amplo estudo envolvendo as frutas de nove espécies de *Illicium* e 173 outras espécies. Os resultados mostraram que as frutas da espécie *I. religiosum* continham a maior concentração de ácido chiquímico, e que 77 e 82 extratos metanólicos de plantas apresentaram resultado positivo para ácido chiquímico nas análises por CLAE-UV e CLAE-EM, respectivamente (Avula et al., 2009).

De maneira geral, os autores relatam que o ácido chiquímico pode ser extraído utilizando tanto um solvente orgânico polar (p. ex. metanol) como água. Dentre as vantagens em se utilizar o solvente orgânico, destacam-se a menor concentração de taninos extraídos, facilitando a posterior purificação, e a possibilidade de regeneração do solvente. No entanto,

em termos de preocupações ambientais e econômicas, utilizar grandes quantidades de metanol ou outro solvente orgânico não é desejável, tornando a extração com água mais atraente.

Ácido chiquímico tem uma solubilidade em água de 204 g/1000 mL H₂O a 25 °C, e é praticamente insolúvel em clorofórmio ou éter de petróleo (Ohira et al., 2009). Considerando essas propriedades, Ohira e colaboradores propuseram uma metodologia utilizando água quente na extração do ácido chiquímico do anis estrelado chinês. Após avaliarem variáveis como temperatura, pressão e tamanho de partículas, concluíram que a temperatura de 150 °C levou a separações mais rápidas (~5 min), com maior recuperação e com menor quantidade de água. A pressão não pareceu ter um papel importante na recuperação da extração (Ohira et al., 2009).

Em 2008, Sui determinou a quantidade de ácido chiquímico em agulhas de pinheiro utilizando extração Soxhlet com metanol. No entanto, para a extração em grande quantidade, o pesquisador utilizou água em temperaturas entre 45-75 °C, seguido de filtração em resina de troca iônica e recristalização, obtendo bons resultados (Sui, 2008).

Matallo e colaboradores, com o objetivo de determinar o nível de ácido chiquímico em diversas espécies de *Brachiaria*, cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e soja (*Glycine max*) após o tratamento com o herbicida glifosato, desenvolveram um método de extração assistido por micro-ondas (MWAE) e com água acidificada como solvente. Os resultados mostraram que a metodologia utilizando MWAE, seguida de CLAE-DAD para a separação e quantificação do ácido chiquímico, se mostrou sensível, rápida e confiável (Matallo et al., 2009).

Li e colaboradores publicaram duas patentes descrevendo os resultados obtidos em seus estudos com várias espécies de *Liquidambar*, avaliando as diferentes partes da planta, diferentes solventes e métodos de extração e purificação (Li et al., 2007a e 2007b). Alguns dos resultados mostraram que, para essas matrizes vegetais:

- A extração acelerada com solvente (ASE) foi mais rápida e efetiva em comparação a extração por maceração e por Soxhlet. A ASE extraiu aproximadamente 21% e 46% mais ácido chiquímico do que por Soxhlet e por maceração, respectivamente;
- Por ASE, a água extraiu aproximadamente 22% e 43% mais ácido chiquímico do que metanol e etanol, respectivamente. Os solventes orgânicos extraíram também terpenoides (detectados a 203 nm por CLAE), dificultando a etapa de purificação do ácido chiquímico;
- Nas extrações utilizando água como solvente, a temperatura e o tempo de extração não influenciaram significativamente a quantidade de ácido chiquímico extraída. Porém, quanto maior a temperatura, mais substâncias adicionais podem ser extraídas, dificultando o processo de purificação;
- A agitação da solução melhorou a eficiência de extração em mais de 50%.

1.2. *Eichhornia crassipes*

A espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms é conhecida popularmente como aguapé, aguapé-de-flor-roxa, camalote, murerê ou jacinto d'água (Figura 2). De acordo com a sua classificação botânica, a planta de *Eichhornia crassipes* pertence ao Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Liliopsida, Ordem Commelinales e Família Pontederiaceae (Cook, 1974).

Suas folhas estão dispostas em rosetas, sendo normalmente elípticas ou reniformes. São folhas inteiras, ovaladas, arredondadas, circulares ou amplamente elípticas com 15 cm de largura; densas, verde lustroso, impermeáveis; lados encurvados delicadamente e frequentemente ondulados. Os pecíolos são esponjosos, e dependendo da circunstância, inflados, o que auxilia na flutuação da planta. Essa estrutura também é denominada pulvino.

Os frutos são do tipo cápsula tricoca com inúmeras sementes. Um único aguapé produz por volta de cinco mil sementes (Gopal e Sharma, 1981).



Figura 2. Cultivo da espécie *E. crassipes* no Instituto de Química de Araraquara.

A inflorescência possui forma de espiga com 8 a 15 flores com 6 pétalas onde predomina a cor lilás com centro azul e amarelo. As raízes azuis escuras a negras são submersas, dispostas imediatamente abaixo ao ponto principal de inserção das folhas flutuantes. O eixo floral se inverte na frutificação, liberando a semente na água, que a carrega. A semente pode ainda afundar, e tem capacidade para sobreviver submersa por 15 anos, germinando após a seca do local (Kissmann e Groth, 1992).

E. crassipes pode reproduzir-se de duas maneiras, a primeira e mais comum, ocorre vegetativamente por meio da emissão de novos estalões e com a formação de rebentos em suas extremidades, ou então, sexualmente por meio de sementes (Penfound e Earle, 1948).

Essa espécie é nativa da América do Sul tropical e foi introduzida na maior parte das regiões quentes e tropicais dos continentes no final do século XIX com fins ornamentais, causando sérios problemas ambientais nessas regiões. É considerada a planta invasora que mais causa problemas em ecossistemas dulcícolas em todo o mundo (Barreto, 2009), uma vez

que dobra sua área a cada 6-7 dias, quando em condições ótimas de crescimento, chegando a produzir 480 toneladas de massa verde/ha/ano (Moura et al., 2009).

No entanto, ela serve como um filtro natural, apresentando a capacidade de incorporar em seus tecidos uma grande quantidade de nutrientes e metais pesados, além de servir como abrigo natural a micro-organismos, moluscos, insetos, peixes, anfíbios, répteis e até aves (Malik, 2007).

A proliferação extremamente rápida de *E. crassipes* geralmente ocasiona redução da porcentagem de oxigênio dissolvido, altera a química da água, afeta a fauna e a flora e aumenta a perda de água por evaporação, sendo atualmente considerada um grande problema para a biodiversidade (Sotolu, 2010).

A eutrofização de corpos hídricos no Brasil é geralmente causada pelo lançamento de dejetos dos grandes centros urbanos ou pelo carreamento de fertilizantes utilizados na agricultura. Esse processo fornece condições nutricionais favoráveis para que ocorra desenvolvimento desordenado das espécies de plantas aquáticas presentes no ambiente. Muitos são os danos gerados nessas situações extremas (Cardoso et al., 2002).

Do ponto de vista ambiental, algumas espécies de crescimento rápido podem suprimir outras menos agressivas, desejáveis para manutenção da diversidade, ou modificar negativamente algumas características físicas da água. Dentre os relevantes impactos sociais pode-se citar o acúmulo de lixo, que serve de habitat para insetos vetores de doenças humanas, além de imprimir prejuízos às atividades de navegação, pesca e geração de energia elétrica (Cardoso et al., 2002).

Das plantas emergentes flutuantes livres, o aguapé (*E. crassipes*) é considerado uma das espécies mais importantes como planta daninha, devido à sua capacidade de reprodução e crescimento. Verdadeiras ilhas de plantas de aguapé chegam até as grades de captação de

água de usinas hidrelétricas, rompendo-as e interrompendo o funcionamento das turbinas. Os possíveis danos a essa atividade e àquelas ligadas ao bem-estar social, traduzem a necessidade de estudos que esclareçam questões relacionadas ao manejo das plantas daninhas aquáticas (Cardoso et al., 2002).

O levantamento bibliográfico sobre as substâncias isoladas de *E. crassipes* revela a presença de esteroides (Goswami et al., 1983; Greca et al., 1991b), poliaminas (Hamana et al., 1994) e compostos aromáticos derivados do fenaleno e naftaleno (Dellagreca et al., 2008; Greca et al., 1991a, 1992, 1993; Hölscher e Schneider, 2005) nas raízes e partes aéreas, e de antocianinas aciladas nas flores (Toki et al., 1994, 2004).

O estudo fitoquímico preliminar de *E. crassipes* realizado em nosso laboratório proporcionou, até o momento, o isolamento e/ou a identificação estrutural de esteroides (stigmasterol, sitosterol, campesterol), além do ácido protocatecuico, ácido cafeico, etil- β -xilopiranosídeo, do nucleosídeo uridina e sais de oxalato, nitrato, sódio e potássio.

Esse estudo evidenciou também a presença de ácido chiquímico na fração orgânica obtida da partição do extrato etanólico entre água e acetato de etila. Cálculos preliminares indicaram que a quantidade de ácido chiquímico corresponde a aproximadamente 0,2% em massa da planta inteira seca, e aproximadamente 3,6% em massa do extrato etanólico. Até o momento não há relatos na literatura sobre o isolamento ou identificação de ácido chiquímico em *E. crassipes*.

O rendimento preliminar obtido de ácido chiquímico em aguapé (~0,2%) pode ser considerado apreciável se comparado com o obtido das vagens de anis estrelado (3,3%), considerando que foi utilizada a planta inteira no caso de *E. crassipes* e apenas um órgão vegetal ou parte da planta no caso de *I. verum*. Além disso, a metodologia empregada em

nossos estudos anteriores não foi específica para a extração de ácido chiquímico, o que sugere que o rendimento obtido poderá ser melhorado.

A possibilidade de utilização de *E. crassipes* como fonte de ácido chiquímico é bem vista, considerando o seu rápido e fácil desenvolvimento, sua alta produção de biomassa, além de ser uma alternativa de manejo e destinação do aguapé.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal estudar a espécie *Eichhornia crassipes* como fonte de ácido chiquímico.

Para a concretização desse objetivo, esse projeto tem como objetivos específicos:

- Testar as metodologias descritas na literatura para o isolamento e identificação de ácido chiquímico a partir de *E. crassipes*;
- Determinar em quais órgãos do vegetal é acumulado o ácido chiquímico produzido pela planta.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos utilizados foram:

- Balança analítica Denver Instrument APX-200;
- Banho ultrassônico Unique USC750;
- Moinho de Facas Tecnal;
- Chapa de aquecimento e agitador magnético Tecnal Te-085;
- Bomba de vácuo Buchi B-169;
- Centrífuga Fanen Baby I (Mod. 206);

- Polarímetro Perkin Elmer 341-LC;
- Espectrômetro de RMN Varian INOVA-500 (11,7 T), operando a 500 MHz e 126 MHz, para o núcleo de hidrogênio e de carbono, respectivamente. Solventes deuterados: óxido de deutério (D₂O) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories;
- Espectrômetro Perkin-Elmer 1600 FT-IR, utilizando pastilhas de KBr;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Jasco (controlador LC-Net II/ADC, bomba PU-2086 Plus, detector MD-2018 Plus), equipado com coluna Varian Chrompack OSD column (250 × 4.6 mm, 5 µm);
- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC): Fase estacionária: sílica gel 60 G; fase móvel: n-BuOH:HOAc:H₂O 4:1:5 (BAW). As revelações foram efetuadas com solução de anisaldeído e radiações UV em 254 e 365 nm;
- Filtro PVDF 0,45 µm Hexis;
- Solventes: Metanol (CH₃OH) 99,9% J.T. Baker Analyzed HPLC reagent; ácido acético glacial 99,9% J.T. Baker Analyzed HPLC reagent; acetonitrila 99,9% Tedia HPLC reagent; ácido fosfórico 85,3% Sigma ACS reagent e água deionizada em Sistema Purificador de Água Millipore Synergy UV.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Coleta do material vegetal

As plantas foram coletadas no Clube Náutico de Araraquara (Rodovia Antonio Machado de Sant'anna Km 63, Américo Brasiliense, SP, Brasil), em novembro de 2010, no período da manhã, e identificadas como *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms pela Dra. Maria

do Carmo E. Amaral. Uma exsicata (UEC 164949) foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brasil.

4.2. Isolamento e purificação do ácido chiquímico

O isolamento, purificação e identificação do ácido chiquímico (AC) a partir de *E. crassipes* foram realizados previamente pelo nosso grupo de pesquisa. Plantas inteiras (1756,2 g) foram secas, trituradas e seus constituintes extraídos a temperatura ambiente com etanol. A seguir, a solução foi concentrada sob pressão reduzida, obtendo-se 95,9 g de extrato. Uma porção desse extrato (85,8 g) foi resuspendida em MeOH-H₂O (4:1) e fracionada com hexano, DCM e AcOEt, sucessivamente. A porção solúvel em AcOEt (2,23 g) foi submetida a Cromatografia em Coluna de Sephadex LH-20 e eluída com MeOH para a obtenção do ácido chiquímico (AC, 564,2 mg).

Posteriormente, o AC foi purificado por recristalização em MeOH e AcOEt. Foi realizada a lavagem do AC com esses solventes, sob aquecimento, seguido de lento resfriamento a temperatura ambiente. A fração insolúvel foi analisada por RMN de ¹H e de ¹³C, UV e IV, a fim de ser utilizado com padrão no presente estudo.

4.3. Preparação dos extratos

O material vegetal foi seco primeiramente a temperatura ambiente e, após separação das raízes e partes aéreas, em estufa com temperatura de 50 °C durante uma semana.

Posteriormente, as partes vegetais foram separadamente moídas em moinho de facas e extraídas com metanol ou água por diferentes metodologias: (1) maceração a temperatura ambiente com auxílio de ultrassom, (2) maceração com aquecimento (45-50 °C) e ultrassom, (3) extração por aparelho Soxhlet, (4) maceração a temperatura ambiente com auxílio de

agitação magnética e (5) maceração com aquecimento (45-50 °C) e agitação magnética. Foram atribuídos códigos aos extratos, a fim de facilitar a identificação, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Códigos dos extratos obtidos de *E. crassipes*.

Código	Descrição do extrato
01R e 01PA	Extratos obtidos por maceração aquosa a temperatura ambiente e com auxílio de ultrassom das raízes e partes aéreas, respectivamente
02R e 02PA	Extratos obtidos por maceração metanólica a temperatura ambiente e com auxílio de ultrassom das raízes e partes aéreas, respectivamente
03R e 03PA	Extratos obtidos por maceração metanólica a 45-50 °C e com auxílio de ultrassom das raízes e partes aéreas, respectivamente
04R e 04PA	Extratos aquosos obtidos com aparelho de Soxhlet das raízes e partes aéreas, respectivamente
05R e 05PA	Extratos aquosos obtidos com aparelho de Soxhlet das raízes e partes aéreas, respectivamente
06R e 06PA	Extratos metanólicos obtidos com aparelho de Soxhlet das raízes e partes aéreas, respectivamente
07R e 07PA	Extratos obtidos por maceração aquosa a 45-50 °C e com auxílio de agitação magnética das raízes e partes aéreas, respectivamente
08R e 08PA	Extratos obtidos por maceração metanólica a 45-50 °C e com auxílio de agitação magnética das raízes e partes aéreas, respectivamente
09R e 09PA	Extratos obtidos por maceração aquosa a temperatura ambiente e com auxílio de agitação magnética das raízes e partes aéreas, respectivamente
10R e 10PA	Extratos obtidos por maceração metanólica a temperatura ambiente e com auxílio de agitação magnética das raízes e partes aéreas, respectivamente

Com exceção do experimento utilizando o aparelho Soxhlet, o seguinte procedimento foi adotado: aproximadamente 1,0 g do material vegetal foi submetido a duas extrações de 20 minutos cada, com 25 mL de solvente, seguido de filtração a vácuo e união das soluções. Separou-se uma alíquota de 5 mL para os estudos de quantificação e o restante da solução obtida foi seca em capela e posteriormente analisada por RMN de ^1H e CCDC.

Na extração com aparelho Soxhlet utilizou-se 150 mL de solvente e aproximadamente 2,0 g de material, devido a maior necessidade de solvente neste tipo de sistema.

Os extratos foram preparados em triplicata, a fim de confirmar os resultados obtidos e minimizar os erros que podem ocorrer durante o processo.

4.4. Análise dos extratos por CCDC

Os extratos foram secos em capela até massa constante. Para verificação da presença de ácido chiquímico, procedeu-se a análise por CCDC. Para tal, foram preparadas soluções de mesma concentração das amostras e do padrão de AC previamente isolado em nosso laboratório.

Como fase móvel empregou-se a mistura de solventes conhecida como BAW: álcool n-butílico, ácido acético e água (4:1:5). Como fase estacionária foram utilizadas placas de Sílica gel, com base de alumínio.

Após a eluição, as placas cromatográficas foram reveladas com uma solução de anisaldeído. No preparo de 200 mL dessa solução, foram necessários 1 mL de anisaldeído, 20 mL de ácido acético, 170 mL de metanol e 10 mL de ácido sulfúrico, os quais foram adicionados nesta sequência e em banho de gelo. Após borrifar a solução de anisaldeído sobre as placas cromatográficas, estas foram colocadas em estufa até o aparecimento das manchas.

4.5. Análise dos extratos por RMN de ^1H

Todos os extratos foram submetidos à análise por RMN de ^1H , utilizando água deuterada como solvente, devido a solubilidade do ácido chiquímico e porque tanto os extratos metanólicos quanto os aquosos eram solúveis neste solvente.

4.6. Construção da curva analítica

A solução estoque foi preparada na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ de AC e, por diluição desta, foram preparadas soluções padrões nas concentrações de 10, 30, 50, 80, 110, 140, 170, 200 e 230 $\mu\text{g/mL}$. A IUPAC sugere que se utilizem no mínimo seis valores de concentrações do padrão para a construção da curva analítica (Thompson et al., 2002).

As condições de análise por CLAE foram: fase estacionária: Varian Chrompack OSD (250 x 4,6 mm, 5 μm); fase móvel: sistema isocrático 0,1% H_3PO_4 em água (v/v) e ACN na proporção 4:1 (pH 2,17); vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 20 μL ; temperatura de análise de 35 $^\circ\text{C}$; detecção a 213 nm. As injeções foram feitas em quintuplicata.

Para a construção da curva analítica foi utilizado o programa Origin 6.0 Microcal Software, Inc.

4.7. Análise dos extratos por CLAE

Como descrito anteriormente, de cada extrato foi separada uma alíquota de 5 mL para os estudos de quantificação e estas foram secas em capela até massa constante, com exceção das triplicatas. Em seguida, foi feita a ressuspensão desse material em 5 mL de MeOH nos extratos das partes aéreas e em 3 mL de MeOH nos extratos das raízes. Foi utilizado um

volume menor nos extratos das raízes devido à baixa concentração de AC estimada para este órgão vegetal. Todos os extratos aquosos foram deixados por no mínimo 4 horas em contato com o metanol.

A seguir, os extratos foram submetidos a 20 minutos de centrifugação, e do sobrenadante foi retirado 1 mL, sendo este acondicionado em vial após filtração em filtro de 0,45 µm.

As soluções das alíquotas referentes às triplicatas não foram secas em capela. Ao invés disso, foram diretamente acondicionadas nos vials, após filtração. Esta alteração no procedimento foi feita para verificar se seria possível agilizar o processo de análise dos extratos, sem interferir nos resultados encontrados.

As condições de análise dos extratos por CLAE foram: vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção: 20 µL; temperatura de análise de 35 °C; detecção a 213 nm; fase estacionária: Varian Chrompack OSD (250 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: sistema gradiente ACN (Solvente A) e 0,1% H₃PO₄ em água (v/v, Solvente B) (Tabela 2). As injeções de cada um dos extratos foram feitas em triplicata.

Tabela 2. Gradiente utilizado em CLAE para análise dos extratos. Solvente A: ACN. Solvente B: 0,1% H₃PO₄ em água.

Tempo (min)	%A	%B
4	20	80
6	100	0
11	100	0
13	20	80
20	20	80

4.8. Análise estatística dos dados

Os resultados foram analisados pelo teste Análise de Variância (ANOVA), por meio do programa Microsoft Office Excel 2007.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação e avaliação da pureza de AC

A pureza do padrão de AC foi determinada por RMN de ^1H e por CLAE. O espectro de RMN de ^1H de AC (Figura 3) apresenta um singleto largo em δ 6,68, referente ao hidrogênio olefínico H-2, que, por ser um hidrogênio β de um ácido carboxílico α,β -insaturado, está desblindado por ressonância. Os hidrogênios hidroximetínicos H-3, H-4 e H-5 apresentam deslocamentos químicos em δ 4,32, 3,64 e 3,90, respectivamente. Os hidrogênios da posição 6, por não serem magneticamente equivalentes, se apresentam como duplos dupletos em δ 2,61 e 2,09 (Tabela 3). Os dados obtidos no espectro de RMN de ^1H foram comparados com os da literatura para a confirmação inequívoca da substância (Bochkov et al., 2012).

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H de AC (D_2O , $J = \text{Hz}$).

Posição	AC (500 MHz)	Ácido chiquímico (300 MHz, Bochkov et al., 2012)
2	6,68 <i>sl</i>	6,70 <i>m</i>
3	4,32 <i>sl</i>	4,30 <i>m</i>
4	3,64 <i>m</i>	3,67 <i>dd</i> (8,4 e 4,5)
5	3,90 <i>dl</i> (6,5)	3,93 <i>m</i>
6a	2,61 <i>dd</i> (18,1 e 4,5)	2,64 <i>dd</i> (18,0, 4,8)
6b	2,09 <i>dd</i> (18,1 e 6,5)	2,12 <i>dd</i> (18,0, 6,3)

Os dados obtidos de RMN de ^{13}C , pf, $[\alpha]_D^{25}$ e IV do padrão de AC também estão de acordo com os descritos na literatura:

- pf: 193.1-194.3 °C (lit. 190-191 °C) (Bochkov et al., 2012);
- $[\alpha]_D^{25}$: -100 (c 0,42, CH_3OH) (lit. -140, c 1,00, CH_3OH) (Capasso et al., 1998);
- RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 , 126 MHz) (Figura 4): δ 30,1 (C-6), 65,6 (C-3), 66,9 (C-4), 70,5 (C-5), 128,6 (C-1), 138,8 (C-2), 168,2 (COOH) (Bochkov et al., 2012);
- IV (KBr) (Figura 5): λ_{max} 3483, 3385, 3222, 1683, 1647, 1456, 1386, 1294, 1277, 1249, 1131 e 1071 cm^{-1} .

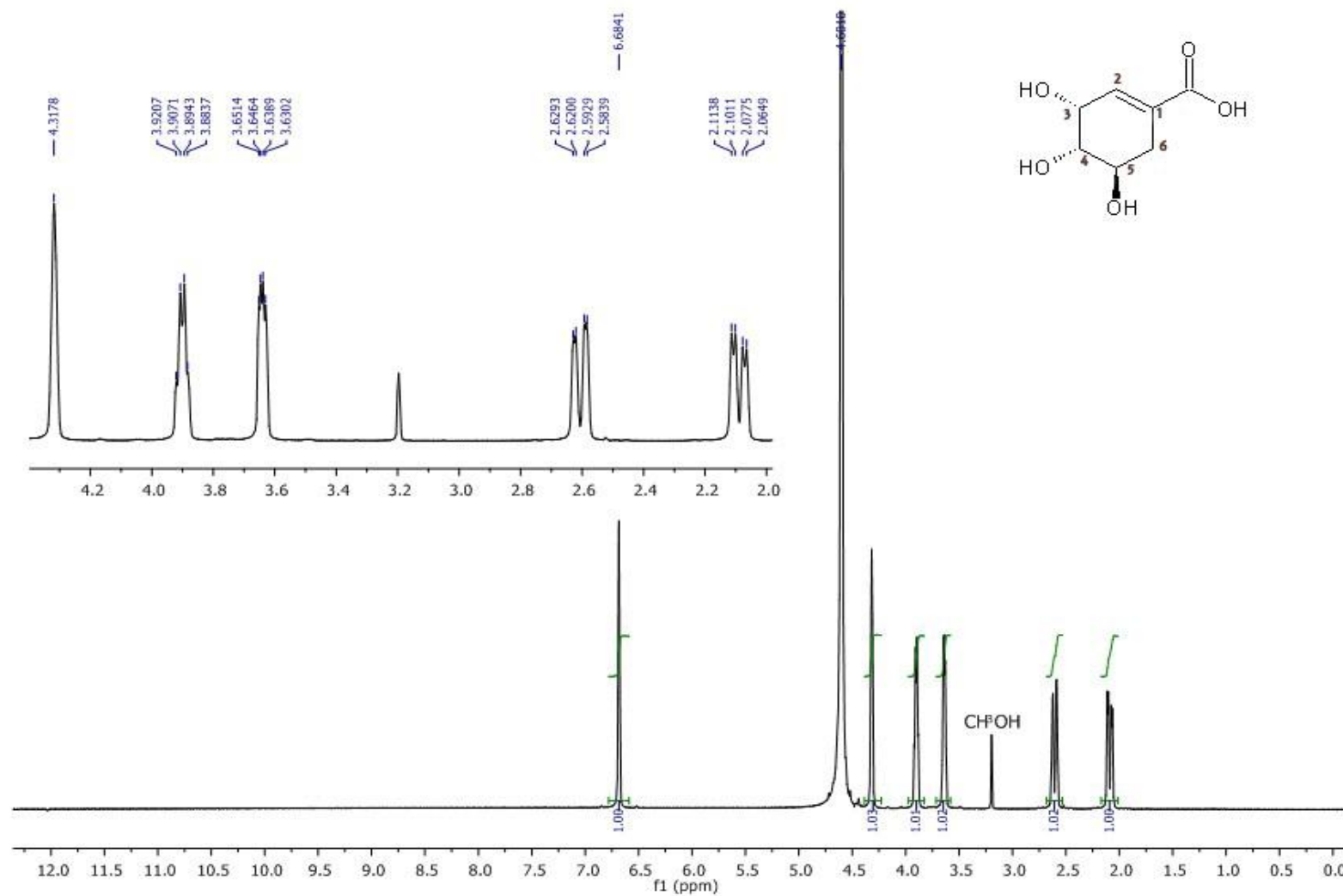


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) de AC aislado de *E. crassipes*.

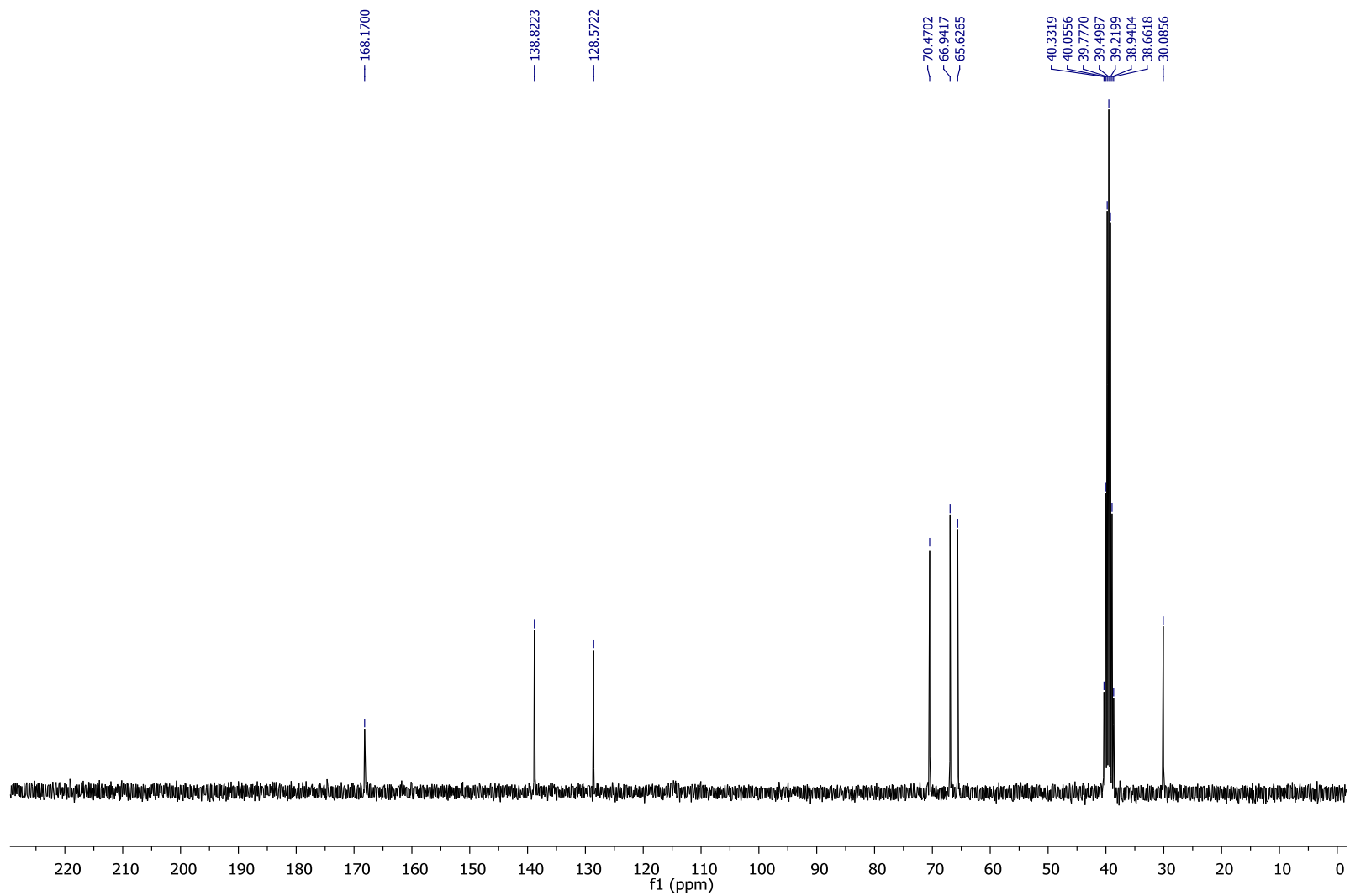


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 126 MHz) de AC isolado de *E. crassipes*.

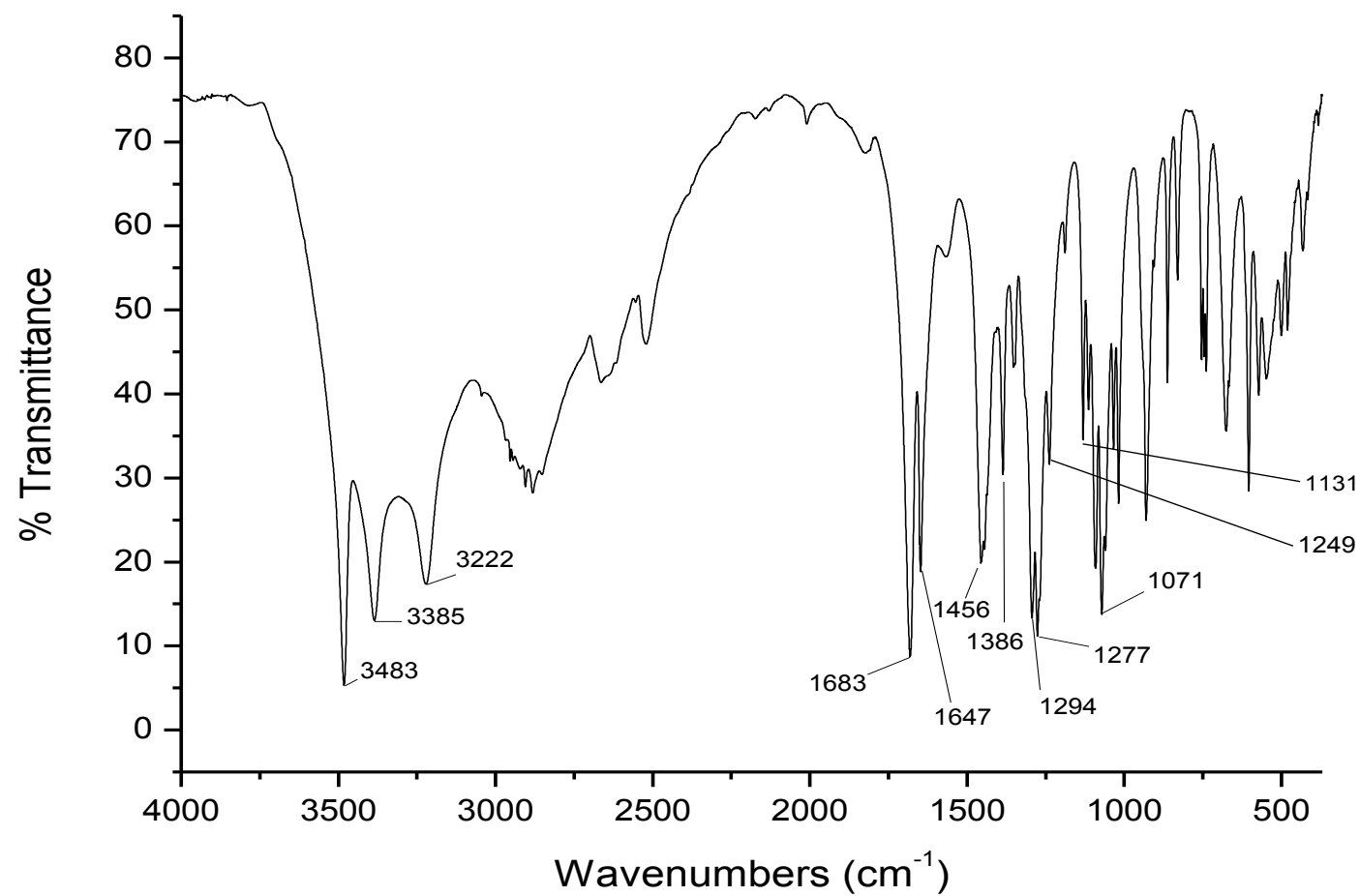


Figura 5. Espectro de IV de AC isolado de *E. crassipes*.

5.2. Preparação dos extratos

Neste trabalho foram realizadas diferentes técnicas de extração, tanto para as raízes como para as partes aéreas, de acordo com as descritas na literatura. Como os processos de extração dependem de fenômenos de difusão, a agitação visou diminuir o tempo necessário nesta etapa, pois a constante renovação do solvente em contato com o material vegetal tende a aumentar a velocidade de difusão. O aumento da temperatura, de forma controlada, também é recomendado, pois se aumenta a solubilidade das substâncias de interesse, facilitando a extração (Simões et al., 2003).

Considerando que em estudos preliminares, realizados em nosso laboratório, obtivemos um rendimento de AC em aguapé de 0,18%, e que a solubilidade do ácido chiquímico em água é de 204 g/1000 g de água (Ohira et al., 2009), conclui-se que a cada 1 g de planta seriam necessários 8,8 mL de água para a solubilização da substância em questão, como demonstrado nos cálculos a seguir:

1 g de planta -----100%	204 mg AC ---- 1000 mL H ₂ O
x -----0,18%	1,8 mg AC ----- V
x= 1,8 mg de AC	V= 8,8 mL

Assim a utilização da proporção de 1:20 (massa:volume), ou seja, 1 g de planta/20 mL do solvente extrator, visaria garantir a extração do AC. Contudo, devido a propriedade da amostra de absorver água, foram necessários 50 mL de solvente (25 mL+ 25 mL) para promover o contato homogêneo com a massa da planta.

As massas obtidas nas triplicatas em cada tipo de extração das raízes e das partes aéreas, respectivamente, encontram-se descritas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Extratos metanólicos e aquosos das raízes de *E. crassipes*.

Código	Tipo de extração	Solvente extrator (Volume)	Massa material vegetal (g)	Massa da alíquota de 5 mL (mg)	Massa do extrato (mg)
01R	Ultrassom, temperatura ambiente	Água deionizada	1,0000	14,0	68,0
		(2 x 25 mL)	1,0018	4,0	67,2
			1,0001	-	74,1
02R	Ultrassom, temperatura ambiente	Metanol	1,0043	8,5	29,4
		(2 x 25 mL)	1,0022	5,4	31,3
			1,0005	-	35,2
03R	Ultrassom, aquecimento	Metanol	0,9997	5,3	28,3
		(2 x 25 mL)	1,0003	4,2	32,6
			1,0006	-	41,9
04R	Ultrassom, aquecimento	Água deionizada	1,0023	7,6	53,2
		(2 x 25 mL)	0,9996	4,0	61,2
			1,0002	-	59,3
05R	Soxhlet	Água deionizada	2,0062	8,1	185,0
		(150 mL)	2,0011	9,3	185,9
			2,0002	-	132,5

Código	Tipo de extração	Solvente extrator (Volume)	Massa material vegetal (g)	Massa da alíquota de 5 mL (mg)	Massa do extrato (mg)
06R	Soxhlet	Metanol	2,0094	8,3	40,3
		(150 mL)	2,0035	6,7	103,1
			2,0004	-	92,8
07R	Agitação magnética, aquecimento	Água deionizada	1,0007	0,8	63,7
		(2 x 25 mL)	1,0010	5,0	54,5
			1,0000	-	45,4
08R	Agitação magnética, aquecimento	Metanol	1,0071	11,1	32,7
		(2 x 25 mL)	1,0007	5,8	32,4
			1,0002	-	32,1
09R	Agitação magnética, temperatura ambiente	Água deionizada	1,0027	5,8	46,4
		(2 x 25 mL)	1,0006	12,4	51,2
			1,0004	-	66,5
10R	Agitação magnética, temperatura ambiente	Metanol	1,0066	3,6	27,6
		(2 x 25 mL)	1,0023	5,3	32,6
			1,0005	-	40,4

Tabela 5. Extratos metanólicos e aquosos das partes aéreas de *E. crassipes*.

Código	Tipo de extração	Solvente extrator (Volume)	Massa material vegetal (g)	Massa da alíquota de 5 mL (mg)	Massa do extrato (mg)
01PA	Ultrassom, temperatura ambiente	Água deionizada	1,0008	13,6	92,1
		(2 x 25 mL)	1,0010	15,2	136,1
			1,0003	-	116,8
02PA	Ultrassom, temperatura ambiente	Metanol	1,0000	20,4	174,0
		(2 x 25 mL)	1,0011	13,3	87,53
			1,0007	-	70,4
03PA	Ultrassom, aquecimento	Metanol	1,0005	15,7	272,7
		(2 x 25 mL)	1,0010	15,4	97,4
			1,0006	-	79,3
04PA	Ultrassom, aquecimento	Água deionizada	1,0001	15,1	5,4
		(2 x 25 mL)	1,0001	18,5	113,5
			1,0000	-	85,4
05PA	Soxhlet	Água deionizada	2,0022	15,4	284,9
		(150 mL)	2,0079	18,7	207,3
			2,0001	-	124,4

Código	Tipo de extração	Solvente extrator (Volume)	Massa material vegetal (g)	Massa da alíquota de 5 mL (mg)	Massa do extrato (mg)
06PA	Soxhlet	Metanol	2,0005	22,2	266,4
		(150 mL)	2,0005	12,3	254,1
			2,0003	-	260,4
07PA	Agitação magnética, aquecimento	Água deionizada	1,0003	15,6	111,9
		(2 x 25 mL)	1,0001	14,2	119,3
			1,0005	-	100,8
08PA	Agitação magnética, aquecimento	Metanol	1,0046	18,4	83,9
		(2 x 25 mL)	1,0004	20,5	98,1
			1,0024	-	52,2
09PA	Agitação magnética, temperatura ambiente	Água deionizada	1,0030	14,5	85,8
		(2 x 25 mL)	1,0010	22,7	113,2
			1,0003	-	125,1
10PA	Agitação magnética, temperatura ambiente	Metanol	1,0002	17,1	90,7
		(2 x 25 mL)	1,0004	14,5	74,9
			1,0005	-	69,1

5.3. Análise dos extratos por CCDC e RMN DE ^1H

Os extratos obtidos foram analisados por CCDC (Figuras 6 e 7). A escolha da mistura de solventes BAW como fase móvel justifica-se pela boa resolução da mancha correspondente ao ácido chiquímico nessas condições.

O padrão de ácido chiquímico apresentou valor de R_f igual a 0,59. Analisando as cromatoplacas obtidas, é visível que apenas os extratos 02PA, 03PA, 06PA, 08PA e 10PA apresentam manchas com valores de R_f semelhantes ao da amostra padrão, isto é, somente nos extratos metanólicos das partes aéreas foi detectada a presença de ácido chiquímico.

Por CCDC não foi possível verificar a presença de AC nas raízes, levantando as seguintes hipóteses: que este órgão não armazena tal substância, ou a possui em baixíssima concentração, a ponto desta não ser detectada pela CCDC.

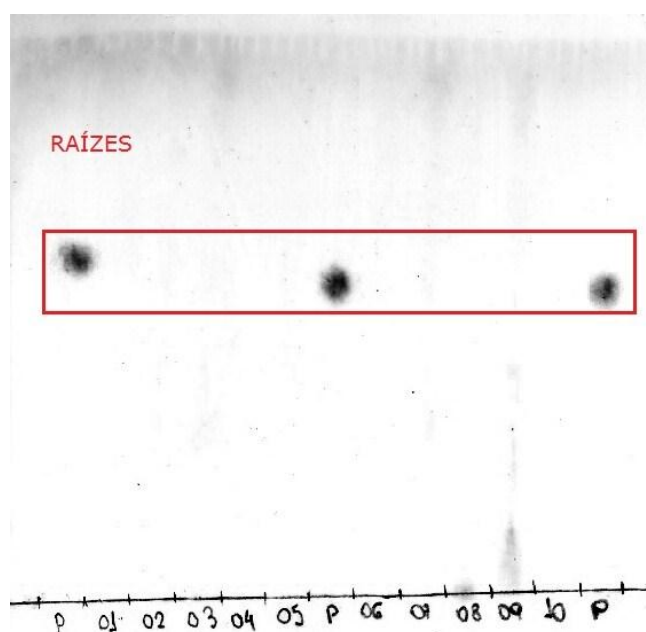


Figura 6. CCDC dos extratos das raízes de *E. crassipes*. Da esquerda para a direita: padrão de AC, extratos 01R a 05R, padrão de AC, extratos 06R a 10R, e padrão de AC.

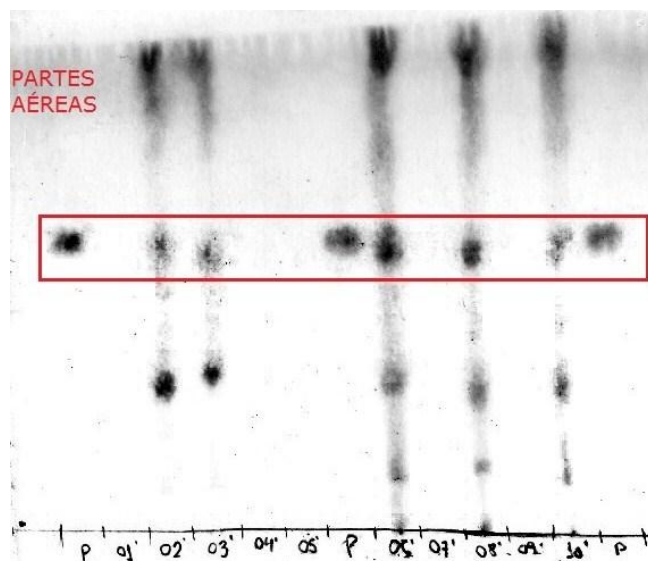


Figura 7. CCDC dos extratos das partes aéreas de *E. crassipes*. Da esquerda para a direita: padrão de AC, extratos 01PA a 05PA, padrão de AC, extratos 06PA a 10PA, e padrão de AC.

Para esclarecer tal questão, os extratos foram submetidos à análise por RMN de ^1H . Esta técnica é importante em estudos fitoquímicos, visto que oferece informações cruciais para a elucidação estrutural de substâncias. Neste caso, ela foi empregada para verificar a presença de AC nos extratos, pois este apresenta sinais característicos em seus espectros de RMN de ^1H , possibilitando a sua identificação mesmo em uma mistura de substâncias. Os espectros obtidos dos extratos foram comparados ao espectro do padrão de ácido chiquímico (Figura 3).

Por meio da análise dos espectros de RMN de ^1H dos extratos (Anexos 1-20) é possível verificar a presença de AC apenas nos extratos metanólicos, independente da metodologia aplicada. Além disso, foi possível observar que a substância de interesse está em uma concentração muito mais elevada nas partes aéreas do que nas raízes.

5.4. Análise dos extratos por CLAE-DAD

Para avaliar qual metodologia foi mais efetiva na extração do ácido chiquímico de *E. crassipes*, optou-se pela quantificação dessa substância nos extratos por CLAE.

A IUPAC aconselha que, para a construção de uma curva analítica, os pontos da curva devam ser uniformemente espaçados sobre a faixa de concentração de interesse, sendo que esta faixa compreenda 0-150% ou 50-150% do valor esperado (Thompson et al., 2002).

Deste modo, com base em estudos preliminares, determinou-se que 1 g de planta inteira seca produz aproximadamente 1,8 mg de AC, que seria solubilizado em 8,8 mL de água. Ao usarmos a relação de proporção 1:20 (m/v), teremos uma concentração de AC de aproximadamente 1,8 mg/20 mL de água, que corresponde a 90 µg/mL. Assim, foram preparadas soluções padrões nas concentrações de 10, 30, 80, 110, 140, 170, 200 e 230 µg/mL, de modo a cobrir a faixa de 50-150% da concentração esperada, conforme recomendação da IUPAC (Thompson et al., 2002).

Foram testadas diversas condições cromatográficas para a análise de AC por CLAE, por exemplo, fase estacionária Microsorb 100 - 5 Phenyl (250 x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel gradiente de MeOH e solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH = 3, como também gradiente de MeOH e solução 0,5% de ácido acético. Porém, nessas condições o cromatograma apresentou baixa resolução, o que interferiria na integração da área sob a banda cromatográfica referente ao AC e, conseqüentemente, na confiabilidade na construção da curva analítica.

Para a construção da curva analítica e análise dos extratos por CLAE foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: fase estacionária Varian Chrompack OSD (250 x 4,6 mm, 5 µm), e fase móvel gradiente de ACN/ H_2O com 0,1% de H_3PO_4 (pH 2,17). Essa mistura de solventes é adequada para análise porque a acetonitrila possui máximo de absorbância em 190 nm, não interferindo na absorção do AC em 213 nm (comprimento de onda utilizado na

análise), e o baixo pH favorece que o analito ($pK_a \sim 4,75$) permaneça na sua forma não ionizada.

A análise cromatográfica foi de 10 minutos, e nessas condições, a banda cromatográfica referente ao AC teve tempo de retenção igual a 2,5 minutos (Figura 8).

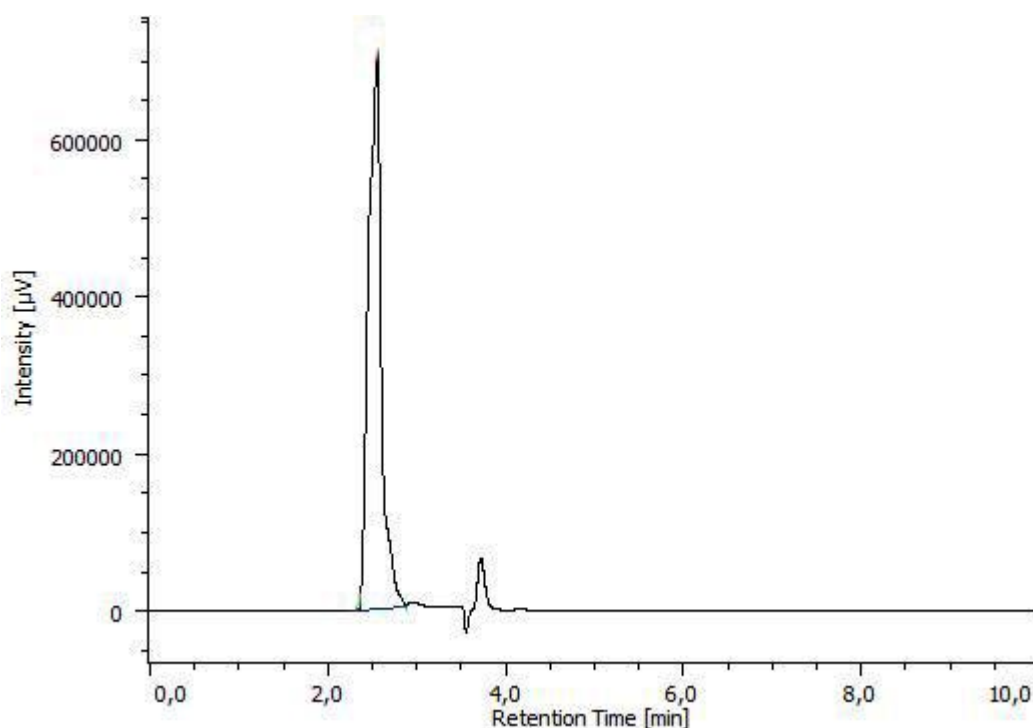


Figura 8. Banda cromatográfica referente ao ácido chiquímico ($170 \mu\text{g/mL}$, $R_t = 2,5 \text{ min}$).

Os dados obtidos nas análises das diferentes concentrações foram plotados, obtendo-se a curva analítica apresentada na Figura 9. A equação da curva obtida foi $y = 33940,47 + 42252,12 C$, onde y corresponde à área da banda cromatográfica e C à concentração de AC ($\mu\text{g/mL}$), apresentando índice de correlação linear (r^2) 0,99844. O limite de detecção (LD $2,65 \mu\text{g/mL}$) e o limite de quantificação (LQ $8,03 \mu\text{g/mL}$) foram estimados a partir da curva analítica (Aragão et al., 2009).

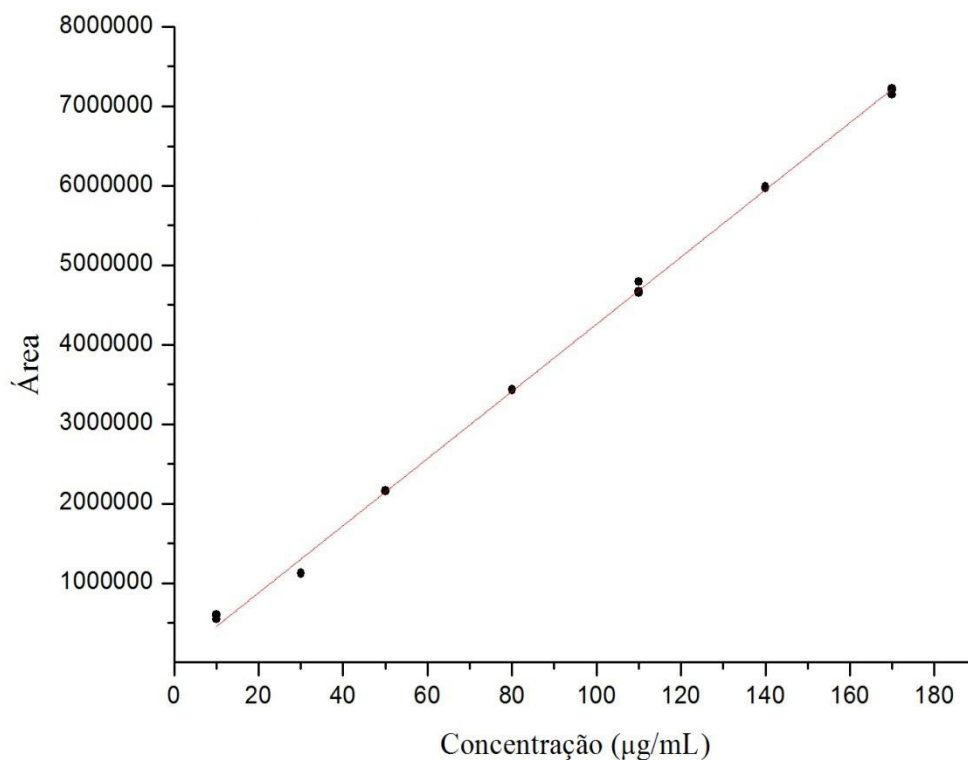


Figura 9. Curva analítica para análise de ácido chiquímico por CLAE.

Após a construção da curva analítica, procedeu-se a análise por CLAE dos extratos das raízes e das partes aéreas de *E. crassipes*. Os cromatogramas obtidos estão apresentados nos Anexos 21-40.

Após a integração da área sob as bandas cromatográficas referentes ao AC, e utilizando a equação da reta da curva analítica, foi possível estabelecer a concentração dessa substância nas diferentes soluções extratoras e a proporção em massa de AC por massa de raiz/parte aérea. Para se obter essa relação, foi considerada a quantidade de AC presente no volume total utilizado para extração (150 mL para os extratos obtidos por Soxhlet e 50 mL para os demais) e a massa de planta pesada.

Exemplo de cálculo: Para o extrato metanólico das partes aéreas obtido por aparelho Soxhlet (06 PA), a média das concentrações de AC do primeiro extrato e da duplicata (Tabela 7) foi de 301,90 µg/mL. Considerando que foram utilizados 150 mL de solvente na extração (Tabela 4), a massa de AC extraída corresponde a 45285,01 µg. Considerando ainda a massa de partes aéreas utilizada, 2,0005 g (Tabela 4), pôde-se calcular a proporção de AC no material vegetal da seguinte maneira:

2,0005 g de parte área-----100%

0,04528501 g de AC ----- x%

$$x = 2,26\%$$

Os dados da área sob a banda cromatográfica correspondente ao AC, as concentrações e as proporções de AC no material vegetal estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

As triplicatas dos extratos não foram consideradas para os cálculos das concentrações devido à alteração no procedimento experimental realizado. De um modo geral, e principalmente nas raízes, não secar o material antes da análise por CLAE interferiu consideravelmente nos valores encontrados, aumentando-os (Tabelas 6 e 7).

Tal fato pode ter ocorrido porque, conforme descrito na literatura, é possível que substâncias adicionais possam ser extraídas e que interfiram na absorção do ácido chiquímico. Por exemplo, os solventes orgânicos podem extrair também terpenóides (detectados a 203 nm), dificultando a etapa de purificação e quantificação do ácido chiquímico (Li et al., 2007a e 2007b).

Deste modo, provavelmente durante a secagem, esses interferentes cristalizam-se e ficam retidos no recipiente após a ressuspensão. Enquanto que o AC, por ser uma molécula pequena e polar, e que apresenta uma boa solubilidade em água e metanol, é ressolubilizado e consequentemente detectado por UV. Assim, supõe-se que quando a secagem não é feita,

esses interferentes continuam solúveis e assim suas absorções podem se sobrepor a banda cromatográfica referente ao AC, aumentando falsamente o valor da concentração deste. Mais estudos são necessários para avaliar a influência da secagem dos extratos na determinação de AC de *E. crassipes*.

Analisando os dados obtidos, é possível verificar que a quantidade de AC presente nas partes aéreas (0,06-2,26%) é cerca de três vezes maior do que a existente nas raízes (0,04-0,71%).

Para identificar se os resultados obtidos apresentam diferenças estatisticamente significativas, foi realizado o teste ANOVA considerando apenas as concentrações de AC obtidas na primeira extração e da duplicata.

Geralmente a análise estatística nos fornece o valor p , que representa um índice da confiabilidade de um resultado, isto é, a probabilidade de erro em aceitar o resultado observado como válido. Deste modo, ao se comparar dois resultados para verificar se eles são diferentes, um valor p de 0,10 é equivalente a dizer que há 90% de chance deles serem realmente diferentes; um valor p de 0,05 é equivalente a dizer que a probabilidade deles serem diferentes é de 95%. É comum, quando se analisa dados químicos, considerar que os resultados encontrados são estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$, (BURKE, 2011).

A análise dos resultados obtidos visou verificar o efeito da temperatura, do tipo de agitação e do solvente na extração de AC de *E. crassipes*. Os valores p obtidos estão apresentados nas Tabelas 8-10.

Tabela 6. Resultados das análises por CLAE-DAD dos extratos metanólicos e aquosos das raízes de *E. crassipes*.

Código	Tipo de extração	Solvente	Área	Concentração de AC (µg/mL)	Massa de AC por massa de raízes (%)
01R	Ultrassom, temperatura ambiente	Água	624220	14,0	0,07
			895258,3	20,4	0,10
			5596896	131,7	0,66
02R	Ultrassom, temperatura ambiente	Metanol	3000706	70,2	0,35
			3071925	71,9	0,36
			4318048	101,39	0,50
03R	Ultrassom, aquecimento	Metanol	3068937	71,9	0,36
			3525326	82,6	0,41
			4102598	100,5	0,48
04R	Ultrassom, aquecimento	Água	244486,7	5,1	0,03
			561614,7	12,5	0,06
			5159762,0	121,3	0,61
05R	Soxhlet	Água	640676,0	14,4	0,11
			1960806,0	45,6	0,34

Código	Tipo de extração	Solvente	Área	Concentração de AC (µg/mL)	Massa de AC por massa de raízes (%)
			1236409,0	28,5	0,21
06R	Soxhlet	Metanol	2932935,0	68,6	0,51
			5096973,0	119,8	0,90
			2824965,0	66,1	0,49
07R	Agitação magnética, aquecimento	Água	760267,3	17,2	0,09
			575178,3	12,8	0,06
			5750990,0	135,31	0,68
08R	Agitação magnética, aquecimento	Metanol	3671162,0	86,1	0,43
			3316969,0	77,7	0,39
			4461267,3	104,8	0,52
09R	Agitação magnética, temperatura ambiente	Água	878464,0	20,0	0,10
			483344,3	10,6	0,05
			6419230,0	151,1	0,76
10R	Agitação magnética, temperatura ambiente	Metanol	2993583,0	70,1	0,35
			3042009,0	71,2	0,36
			4801878,0	112,8	0,56

Tabela 7. Resultados das análises por CLAE-DAD dos extratos metanólicos e aquosos das partes aéreas de *E. crassipes*.

Código	Tipo de extração	Solvente	Área	Concentração de AC (µg/mL)	Massa de AC por massa de partes aéreas (%)
01PA	Ultrassom, temperatura ambiente	Água	595084,0	13,3	0,07
			1316752,0	30,4	0,15
			10587728,3	249,8	1,25
02PA	Ultrassom, temperatura ambiente	Metanol	12273205,0	289,7	1,45
			7907984,3	186,4	0,94
			2862464,0	66,94	0,67
03PA	Ultrassom, aquecimento	Metanol	9425605,0	222,3	1,12
			11039978,0	260,5	1,30
			3382106,0	79,24	0,79
04PA	Ultrassom, aquecimento	Água	631265,7	14,14	0,07
			999169,0	22,80	0,11
			11057867,7	260,91	1,30

Código	Tipo de extração	Solvente	Área	Concentração de AC (µg/mL)	Massa de AC por massa de partes aéreas (%)
05PA	Soxhlet	Água	891492,7	20,30	0,15
			10484036,0	247,33	1,85
			4185764,3	98,26	0,74
06PA	Soxhlet	Metanol	15230598,0	359,70	2,70
			10349114,0	244,10	1,83
			2337781,0	54,53	0,82
07PA	Agitação magnética, aquecimento	Água	628018,0	14,1	0,07
			716077,0	16,2	0,08
			11658914,7	275,13	1,38
08PA	Agitação magnética, aquecimento	Metanol	11069079,7	261,20	1,30
			4844207,0	113,8	0,57
			3498920,0	82,01	0,82
09PA	Agitação magnética, temperatura ambiente	Água	304727,3	6,5	0,03
			695724,7	15,7	0,08
			10879311,0	256,68	1,29

Código	Tipo de extração	Solvente	Área	Concentração de AC (µg/mL)	Massa de AC por massa de partes aéreas (%)
10PA	Agitação magnética, temperatura ambiente	Metanol	7405780,7	174,5	0,87
			7679134,3	180,9	0,90
			3519372,3	82,50	0,82

Tabela 8. Análise estatística para avaliar o efeito do solvente na extração de AC.

Extratos comparados	Valor p
01 R e 02 R	$2,2287 \times 10^{-7}$
03 R e 04 R	$6,1529 \times 10^{-11}$
05 R e 06 R	$2,8236 \times 10^{-13}$
07 R e 08 R	$1,4501 \times 10^{-10}$
09 R e 10 R	$4,7445 \times 10^{-7}$
01 PA e 02 PA	$1,2280 \times 10^{-10}$
03 PA e 04 PA	$6,9398 \times 10^{-6}$
05 PA e 06 PA	$2,3980 \times 10^{-9}$
07 PA e 08 PA	$2,4103 \times 10^{-16}$
09 PA e 10 PA	$4,7445 \times 10^{-7}$

Tabela 9. Análise estatística para avaliar o efeito da temperatura na extração de AC.

Extratos comparados	Valor p
01 R e 04 R	$3,9342 \times 10^{-13}$
02 R e 03 R	$4,0706 \times 10^{-8}$
07 R e 09 R	$1,0372 \times 10^{-11}$
08 R e 10 R	$2,9625 \times 10^{-14}$
01 PA e 04 PA	$2,5845 \times 10^{-10}$
02 PA e 03 PA	$1,4505 \times 10^{-6}$
07 PA e 09 PA	$1,8833 \times 10^{-11}$
08 PA e 10 PA	$2,9625 \times 10^{-14}$

Tabela 10. Análise estatística para avaliar o efeito do tipo de agitação na extração de AC.

Extratos comparados	Valor p
01 R e 09 R	$4,3282 \times 10^{-8}$
02 R e 10 R	$2,0013 \times 10^{-3}$
03 R e 08 R	$1,4883 \times 10^{-4}$
04 R e 07 R	$1,5550 \times 10^{-6}$
01 PA e 09PA	$1,8203 \times 10^{-10}$
02 PA e 10 PA	$3,5314 \times 10^{-10}$
03 PA e 08 PA	$1,1347 \times 10^{-8}$
04 PA e 07 PA	$2,3798 \times 10^{-11}$

Em relação ao solvente, tanto na extração de AC das partes aéreas como das raízes, o metanol foi muito mais eficiente do que a água. Independente do método, a concentração de AC encontrada nas soluções extrativas metanólicas é sempre maior que nas aquosas, e comparando-se todos os métodos que houve apenas a mudança do solvente, o valor p sempre é menor que 0,05 (Tabela 8).

O efeito da temperatura mostrou-se dependente do órgão vegetal e do solvente utilizados. No caso das partes áreas, o aumento de temperatura favoreceu a extração quando se usa água ou metanol como solvente. Isto é visível ao se comparar os métodos em que apenas a temperatura foi alterada, como, por exemplo, os extratos 04PA (0,09% de AC) e 01PA (0,07 % de AC) e também os extratos 08PA (0,93% de AC) e 10PA (0,89% de AC). A concentração de AC encontrada nas soluções extrativas em que houve aquecimento é maior do que naquelas que foram realizadas a temperatura ambiente, e o valor p é sempre menor que 0,05 (Tabela 9), confirmando os resultados encontrados.

Por outro lado, na extração do AC das raízes usando água como solvente, o aumento da temperatura não favoreceu a extração. Comparando os resultados encontrados, por exemplo, para os extratos 01R (0,09% de AC) e 04R (0,04% de AC), pode-se perceber que o aquecimento não foi um fator relevante na extração.

Porém, utilizando metanol como solvente, o aumento da temperatura favoreceu o processo extrativo. Entre os extratos metanólicos das raízes, em que apenas a temperatura foi modificada, foram encontradas concentrações maiores de AC naquelas que foram submetidas a aquecimento, e pela análise estatística, os valores *p* são sempre menores que 0,05 (Tabela 9). Por exemplo: 03R (0,39% de AC) e 02R (0,35% de AC), e 08R (0,41% de AC) e 10R (0,35% de AC).

Em relação aos métodos de extração, tanto para as partes aéreas como para as raízes, a utilização do aparelho Soxhlet demonstrou ser o método mais efetivo, seguido da extração com auxílio de ultrassom e de agitação magnética. A extração com ultrassom apresentou, em relação à agitação magnética, um pequeno aumento na quantidade de AC extraída. Isto é visível ao se comparar os extratos em que única diferença é o tipo de agitação (Tabela 10), como, por exemplo, os extratos 03PA (1,21% de AC) e 08PA (0,93% de AC) e 01R (0,09% de AC) e 09R (0,08% de AC).

Em relação aos métodos de análise, a identificação e a quantificação de AC por CLAE-DAD mostrou-se muito mais eficiente do que as técnicas de CCDC e RMN de ^1H . Como descrito anteriormente, estas últimas técnicas indicavam apenas a presença de ácido chiquímico nos extratos metanólicos das partes aéreas.

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos com o desenvolvimento desse trabalho permite concluir que:

- *E. crassipes* acumula o ácido chiquímico que produz principalmente nas partes aéreas, visto que a sua concentração é aproximadamente três vezes maior nesse órgão do que nas raízes;
- Metanol é o melhor solvente para extrair o ácido chiquímico de *E. crassipes*, independente da metodologia utilizada;
- A extração por aparelho Soxhlet demonstrou ser o método mais eficiente para extrair o ácido chiquímico do material vegetal;
- A análise por CLAE-DAD é mais sensível para detectar a quantidade de ácido chiquímico extraído do que CCDC e RMN de ^1H .

E. crassipes pode ser considerada uma fonte promissora de ácido chiquímico. Apesar das vagens de *Illicium verum* renderem 3,3% de ácido chiquímico e das partes aéreas de *E. crassipes* renderem 2,26% (extrato metanólico obtido por Soxhlet e sem otimização), esta última possui a vantagem de ter rápido desenvolvimento e alta produção de biomassa, enquanto que *I. verum* cresce quase que exclusivamente em quatro províncias montanhosas no sudoeste da China, e suas vagens são colhidas somente entre no período de março a maio (Factsheet Tamiflu, 2010). *E. crassipes* dobra sua área a cada 6-7 dias, quando em condições ótimas de crescimento, chegando a produzir 480 toneladas de massa verde/ha/ano (Moura et al., 2009).

Deste modo é possível calcular o valor agregado a este trabalho. Considerando que o rendimento de massa seca é de 10% em relação à massa verde, que a massa de partes aéreas corresponde a aproximadamente 35% da massa seca, e que o rendimento de AC é de 2,26%

na extração em aparelho Soxhlet, partindo-se de 480 toneladas de massa verde de *E. crassipes* obteríamos aproximadamente 380 Kg de ácido chiquímico.

Conclui-se que *E. crassipes* é uma fonte de ácido chiquímico economicamente muito viável, podendo contribuir de modo significativo para o aumento da disponibilidade dessa molécula, que apresenta alto valor agregado. Além disso, o manejo de *E. crassipes* para a extração de ácido chiquímico poderia solucionar os problemas ambientais e econômicos causados por essa macrófita.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGAO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v.32, p. 2476-2481, 2009.

AVULA, B.; WANG, Y.-H.; SMILLIE, T. J.; KHAN, I. A. Determination of shikimic acid in fruits of *Illicium* species and various other plant samples by LC–UV and LC–ESI–MS. **Chromatographia**, v. 69, p. 307-314, 2009.

BARRETO, R. W. Controle biológico de plantas daninhas com fitopatógenos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 7. p. 101-128.

BOCHKOV, D. V.; SYSOLYATIN, S. V.; KALASHNIKOV, A. I.; SURMACHEVA, I. A. **Journal of Chemical Biology**, v. 5, p. 5-17, 2012.

BURKE, S. **Understanding the Structure of Scientific Data**. LC·GC Europe Online Supplement. Disponível em:

<https://www.webdepot.umontreal.ca/Usagers/sauves/MonDepotPublic/CHM%203103/LCGC%20Eur%20Burke%202001%20-%201%20de%204.pdf>. Acesso em: 26 set. 2013.

CAPASSO, A.; BALDERRAMA, L.; SIVILA, S. C.; TOMMASI, N. D.; SORRENTINO, L.; Pizza, C. **Planta Med.** 1998, 64, 348

CARDOSO, L. R.; MARTINS, D.; KURAMAE, E. E.; TANAKA, R. H.; MORI, E. S. Variabilidade genética de acessos de aguapé coletados no Estado de São Paulo. **Planta Daninha**, v. 20, p.1-5, 2002.

COOK, C. D. K. **Water Plants of the World: A Manual for the Identification of the Genera of Freshwater Macrophytes**. Publishers, The Hague, 1974. 561 p.

DELLAGRECA, M.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Revised structures of phenylphenalene derivatives from *Eichhornia crassipes*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 3268-3272. 2008.

ENRICH, L. B.; SCHEUERMANN, M. L.; MOHADJER, A.; MATTHIAS, K. R.; ELLER, C. F.; NEWMAN, M. S.; FUJINAKA, M.; POON, T. *Liquidambar styraciflua*: a renewable source of shikimic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 2503–2505, 2008.

ESCALANTE, A.; CALDERÓN, R.; VALDIVIA, A.; DE ANDA, R.; HERNÁNDEZ, G.; RAMÍREZ, O. T.; GOSSET, G.; BOLÍVAR, F. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 21-32, 2010.

Factsheet Tamiflu. Disponível em: http://www.roche.com/tamiflu_factsheet.pdf. Acesso em 10 agosto.2010.

GOPAL, B.; SHARMA, K.P. **Water-Hyacinth (*Eichhornia crassipes*): Most Troublesome Weed of the World**. Delhi: Hindasia Publishers. 1981, 219 p.

GOSWAMI, P. C.; NAG, B.; SHARMA, A. K.; BORTHAKUR, A.; SINGH, H. D.; BARUAH, J. N. Water hyacinth as a prospective source of stigmasterol. **Current Science**, v. 52, p. 806-808. 1983.

GRECA, M. D.; LANZETTA, R.; MANGONI, L.; MONACO, P.; PREVITERA, L. A bioactive benzoindenone from *Eichhornia crassipes* Solms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, p. 599-600. 1991a.

GRECA, M. D.; LANZETTA, R.; MOLINARO, A.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Phenalene metabolites from *Eichhornia crassipes*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, p. 311-314. 1992a.

GRECA, M. D.; MOLINARO, A.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Dimeric phenalene metabolites from *Eichhornia crassipes*. **Tetrahedron**, v. 48, p. 3971-3976. 1992b.

GRECA, M. D.; MOLINARO, A.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Degraded phenalene metabolites in *Eichhornia crassipes*. **Natural Product Letters**, v. 1, p. 233-238. 1993.

GRECA, M. D.; MONACO, P.; PREVITERA, L. New oxygenated sterols from the weed *Eichhornia crassipes* Solms. **Tetrahedron**, v. 47, p. 7129-7134. 1991b.

HAMANA, K.; MATSUZAKI, S.; NIITSU, M.; SAMEJIMA, K. Distribution of unusual polyamines in aquatic plants and gramineous seeds. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, p. 1114-1120. 1994.

HÖLSCHER, D.; SCHNEIDER, B. The biosynthesis of 8-phenylphenalenones from *Eichhornia crassipes* involves a putative aryl migration step. **Phytochemistry**, v. 66, p. 59-64. 2005.

Influenza. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/topics/influenza/en/>. Acesso em 10 agosto 2010.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1992. 798p.

KRÄMER, M.; BONGAERTS, J.; BOVENBERG, R.; KREMER, S.; MÜLLER, U.; ORF, S.; WUBBOLTS, M.; RAEVEN, L. Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. **Metabolic Engineering**, v. 5, p. 277–283, 2003.

LI; S.; YUAN; W.; WANG; P.; ZHANG; Z.; ZHANG; W.; OWNBY; S. **Method for the extraction and purification of shikimic acid**. US 2007/0149805A1, 23 Dez. 2005, 28 Jun. 2007a.

LI; S.; YUAN; W.; WANG; P.; ZHANG; Z.; ZHANG; W.; OWNBY; S. **Processes for the extraction and purification of shikimic acid and the products of such processes**. US 2007/0161818A1, 06 Jan. 2006, 12 Jul. 2007b.

MALIK, A. Environmental challenge *vis a vis* opportunity: The case of water hyacinth. **Environmental International**, v. 33, p. 122-138. 2007.

MATALLO, M. B.; ALMEIDA, S. D. B.; CERDEIRA, A. L.; FRANCO, D. A.; BLANCO, F. M. G.; MENEZES, P. T. C.; LUCHINI, L. C.; MOURA, M. A. M.; DUKE, S. O. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **Planta Daninha**, v. 27, p. 987-994, 2009.

MOURA, M. A. M.; FRANCO, D. A. S.; MATALLO, M. B. Manejo integrado de macrófitas aquáticas. **Biológico**, v. 71, p. 77-82, 2009.

OHIRA, H.; TORII, N.; AIDA, T. M.; WATANABE, M.; SMITH Jr., R. L. Rapid separation of shikimic acid from Chinese star anise (*Illicium verum* Hook. f.) with hot water extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 69, p. 102–108, 2009.

PENFOUND, W. T.; EARLE, T. T. The biology of the water hyacinth. **Ecol. Monogr.** v. 18, p 499-72, 1948.

Scientific Correspondence. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of Tamiflu, a bird-flu drug. **Current Science**, v. 96, p. 771, 2009.

Shikimic acid. **Sigma-Aldrich®**. Disponível em:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s5375?lang=pt®ion=BR>.
 Acesso em: 26 set.2103

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; de MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, 2000. 821 p.

SOTOLU, A. O. Digestibility value and nutrient utilization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) meal as plant supplement in the diet of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Juveniles. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 9, p. 539-544, 2010.

SUI, R. Separation of shikimic acid from pine needles. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, p. 469–473, 2008.

Tamiflu®. Fosfato de oseltamivir. Roche. Disponível em: http://www.dialogoroche.com.br/content/dam/dialogo/pt_br/Bulas/T/TamifluC%C3%A1psulas/Bula-Tamiflu-Profissional.pdf. Acesso em 09 out. 2013.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single validation of methods of analysis. IUPAC Technical Report. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835–855, 2002.

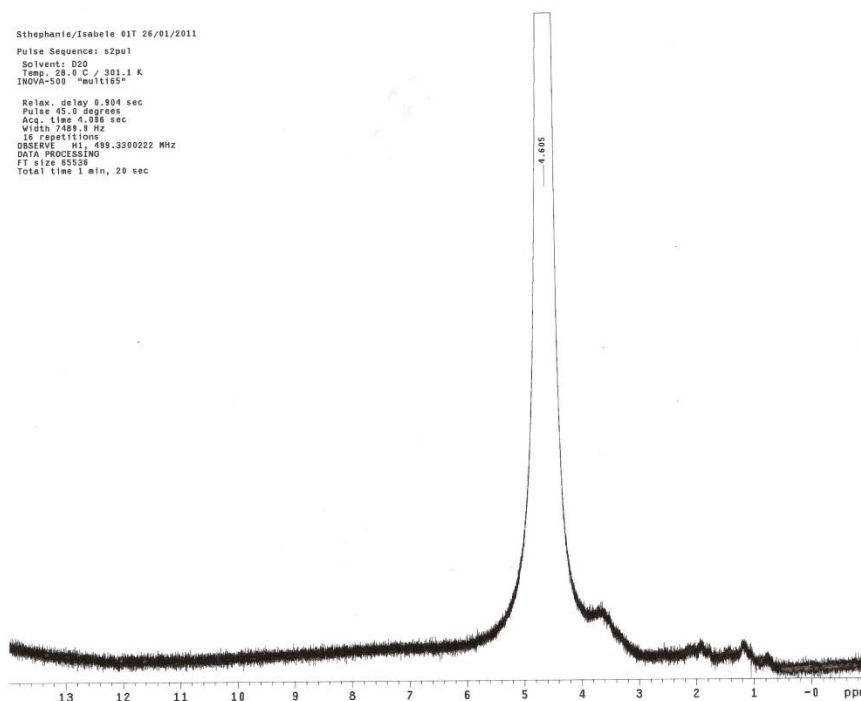
TOKI, K.; SAITO, N.; IIMURA, K.; SUZUKI, T.; HONDA, T. (Delphinidin 3-gentiobiosyl) (apigenin 7-glucosyl) malonate from the flowers of *Eichhornia crassipes*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1181-1183. 1994.

TOKI, K.; SAITO, N.; TSUTSUMI, S.; TAMURA, C.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T. (Delphinidin 3-Gentiobiosyl) (Luteorin 7-Glucosyl) Malonate from the flowers of *Eichhornia crassipes*. **Heterocycles**, v. 63, p. 899-902. 2004

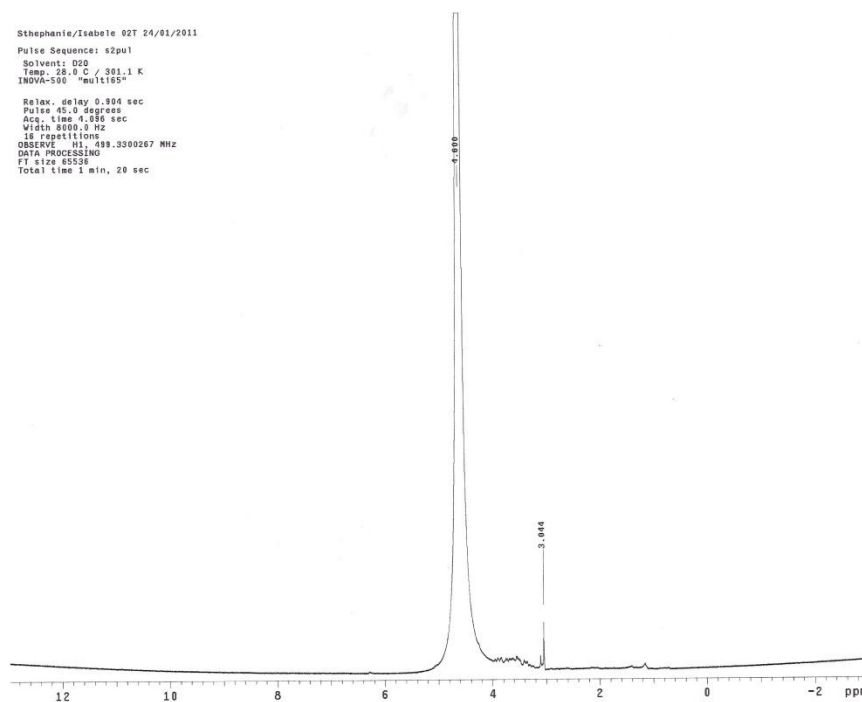
Xie, J.-Y.; Chen, X.-P.; Li, Z.-R.; Chen, F.; Su, B.-C. Extraction and content determination of shikimic acid in *Pinus elliottii* Engelm. **Agricultural Science & Technology**, v. 11, p. 177-181, 2010.

ZHANG, Y.; DeWITT, D. L.; MURUGESN, S.; NAIR, M. G. Novel Lipids-Peroxidation- and Cyclooxygenase- Inhibitory Tannins from *Picrorhiza kurroa* Sedds. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, p. 426- 441. 2004.

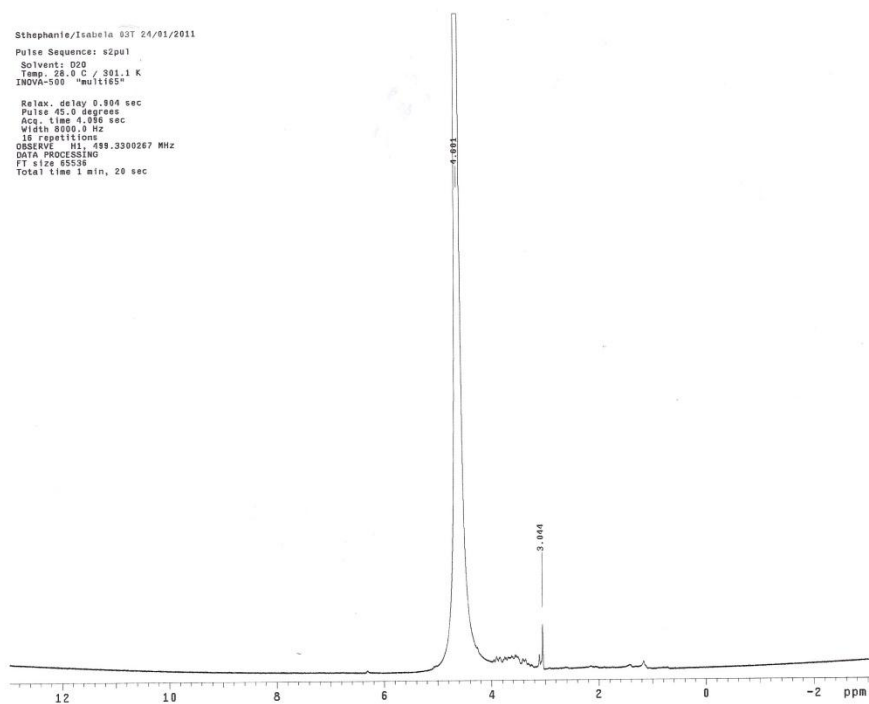
8. ANEXOS



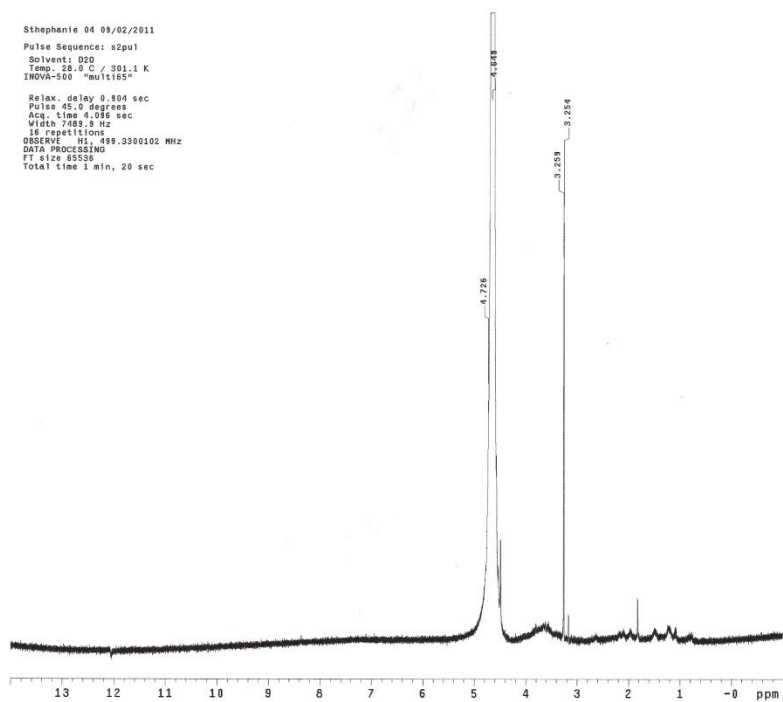
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 01R.



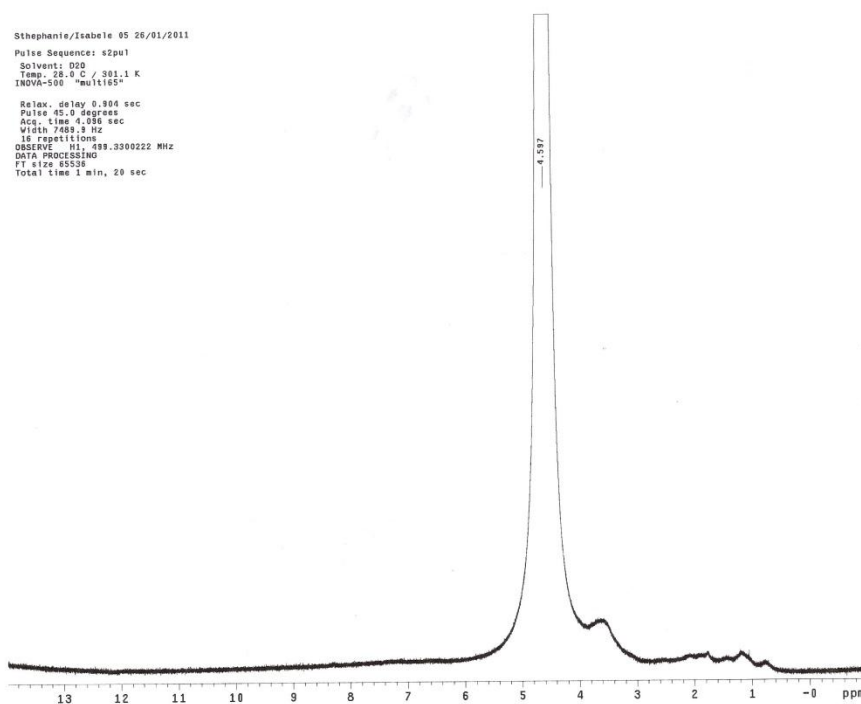
Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 02R.



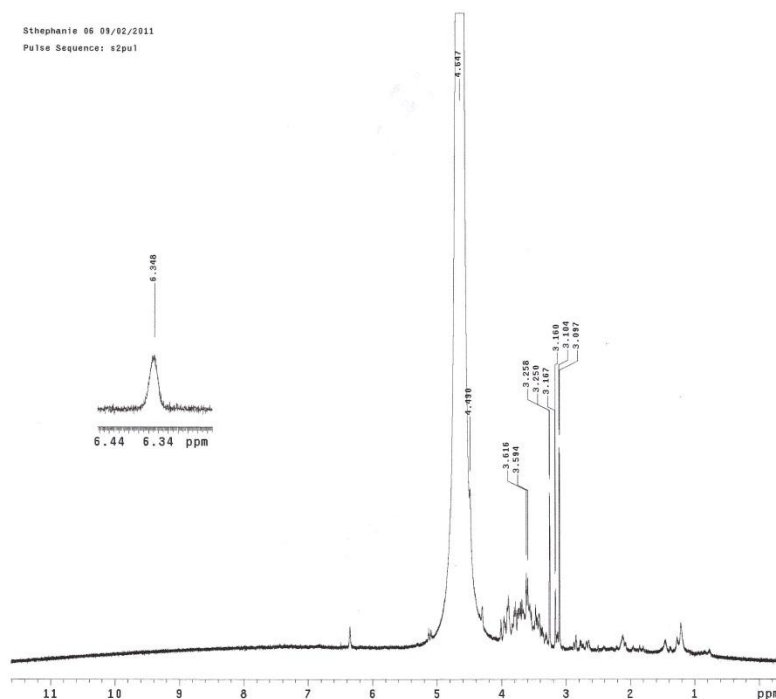
Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 03R.



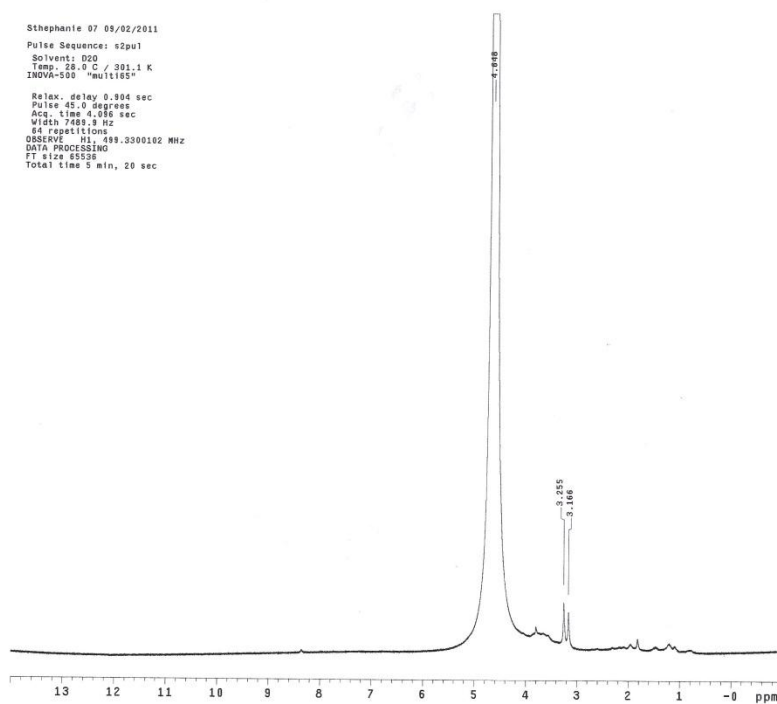
Anexo 4. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 04R.



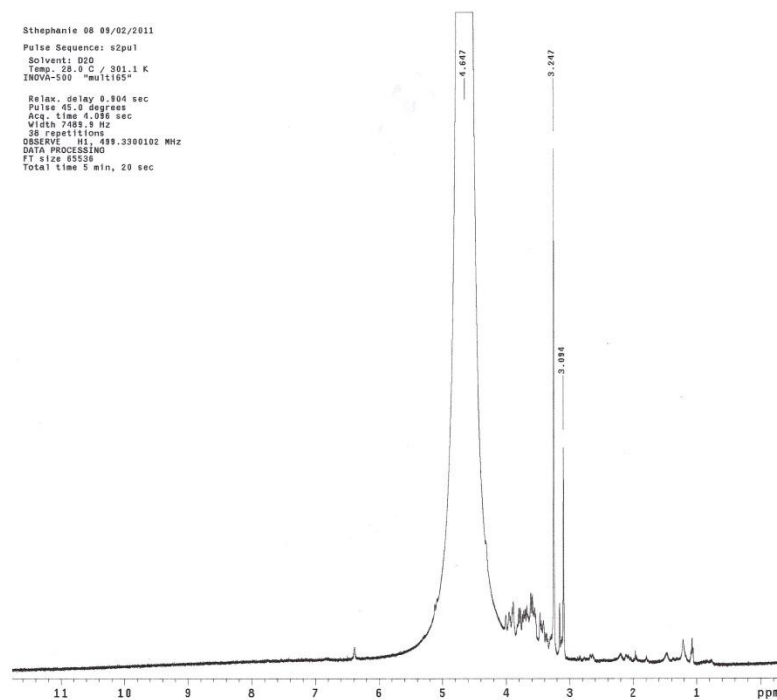
Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 05R.



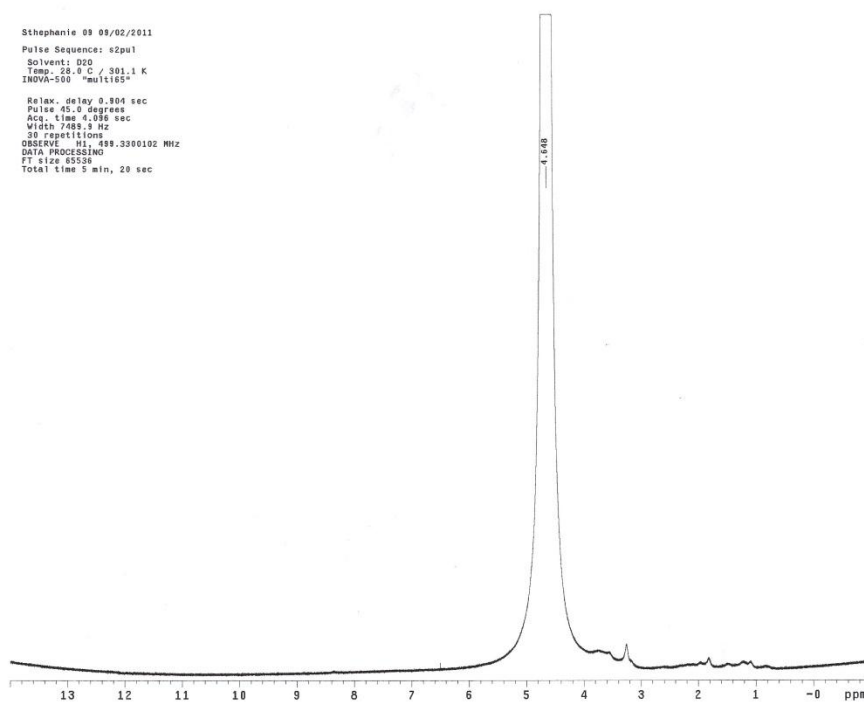
Anexo 6. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 06R.



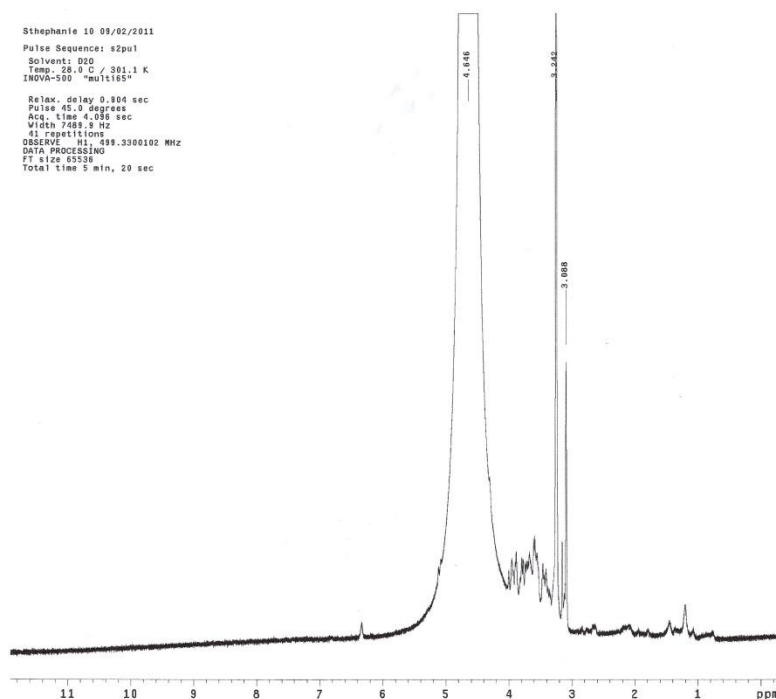
Anexo 7. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 07R.



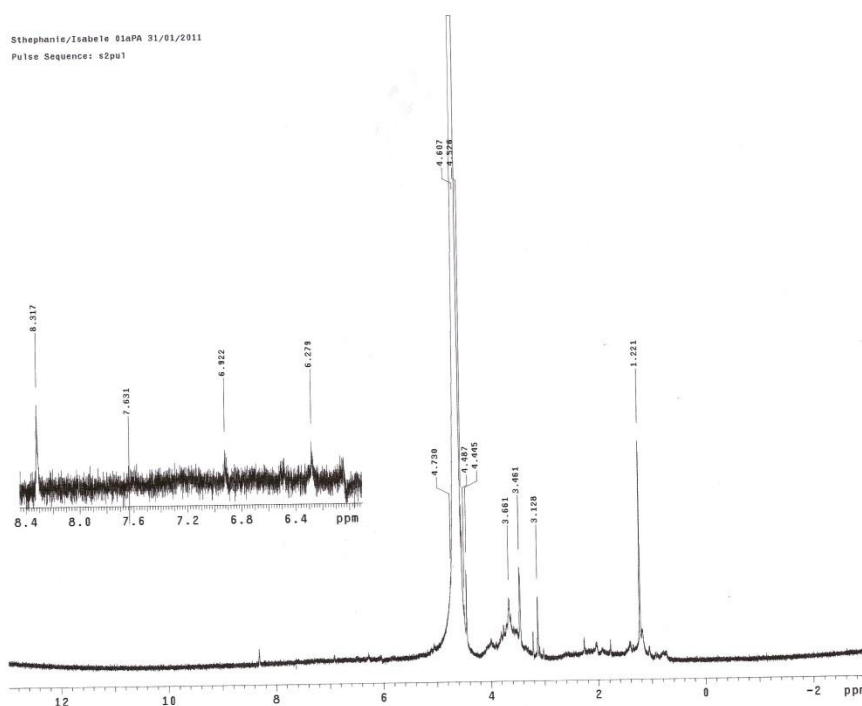
Anexo 8. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 08R.



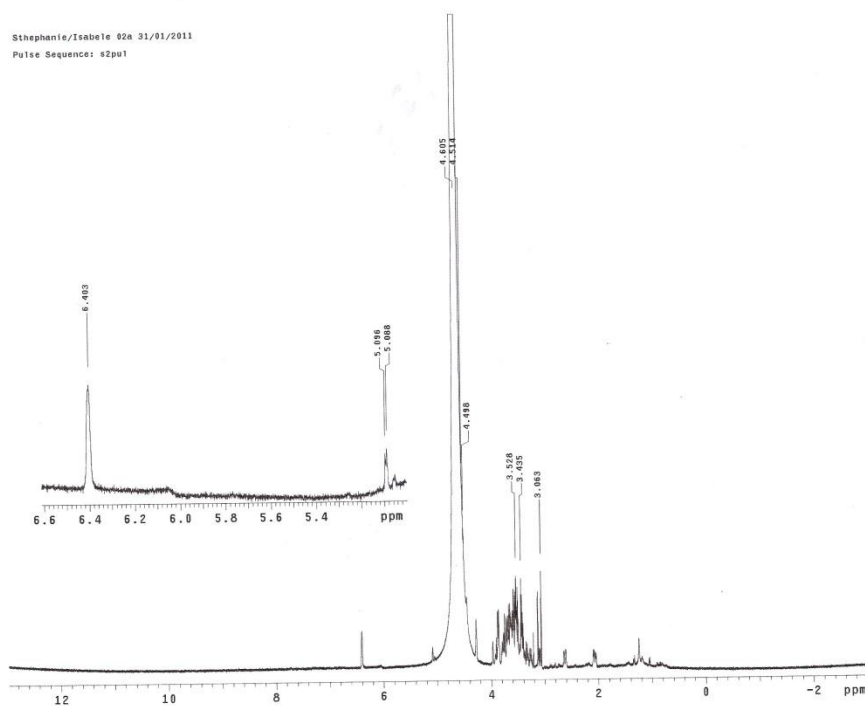
Anexo 9. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 09R.



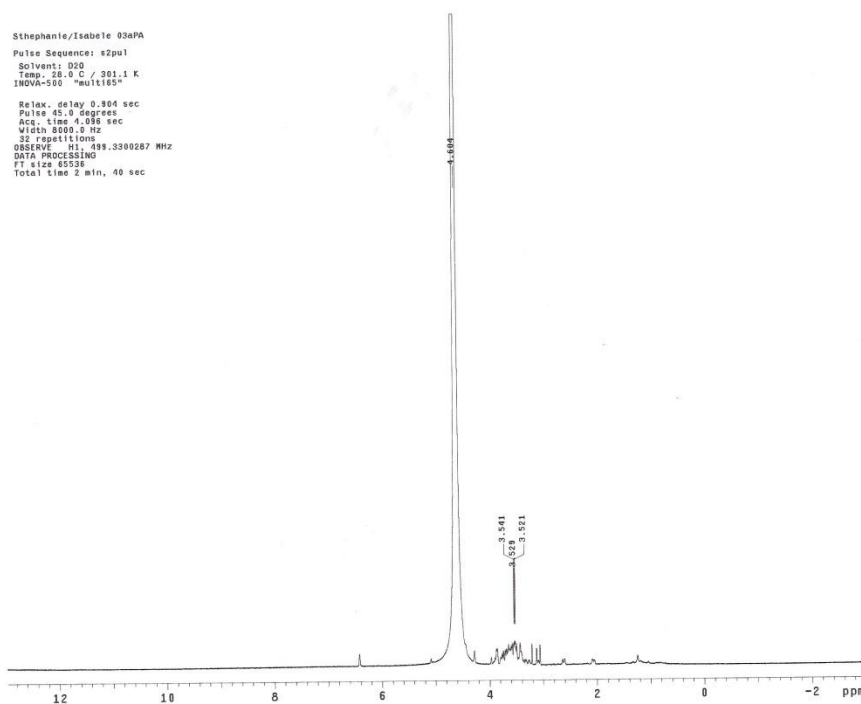
Anexo 10. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 10R.



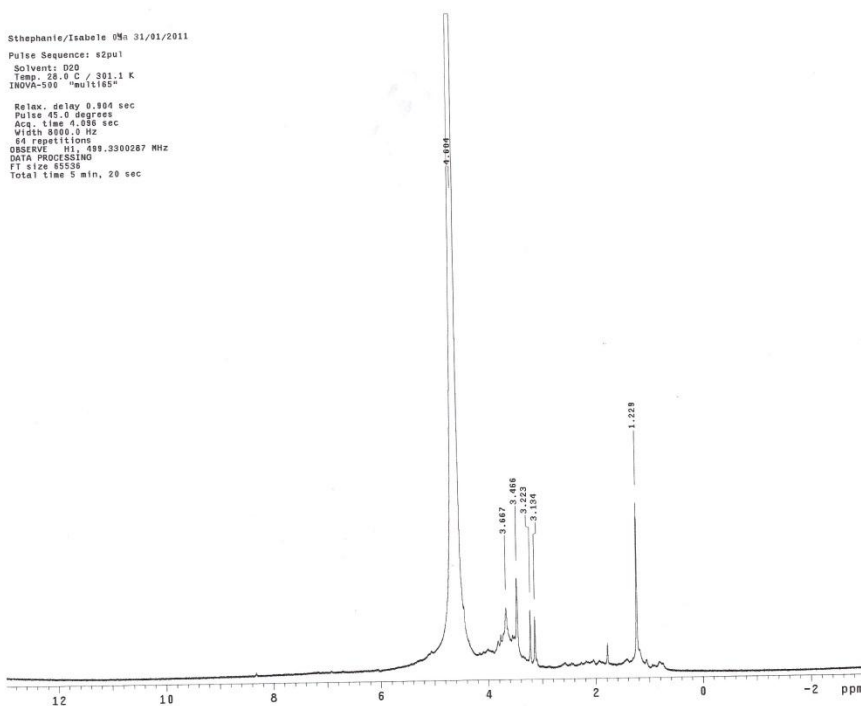
Anexo 11. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 01PA.



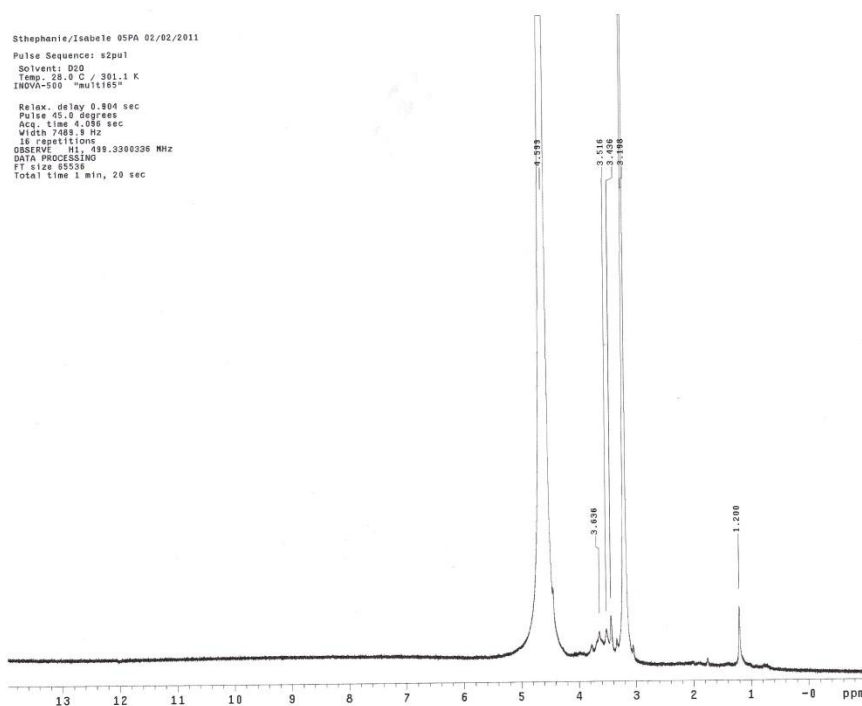
Anexo 12. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 02PA.



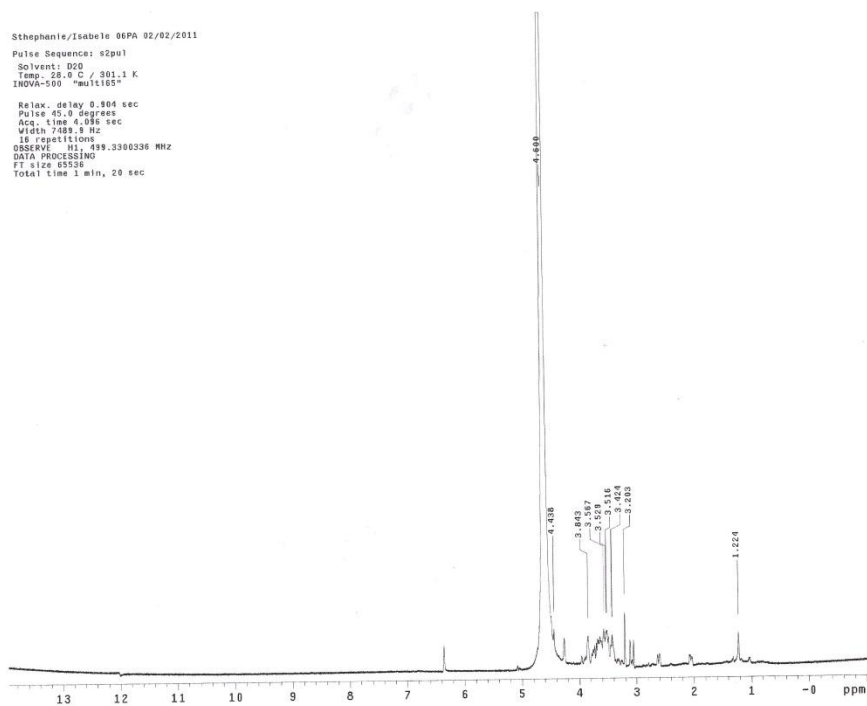
Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 03PA.



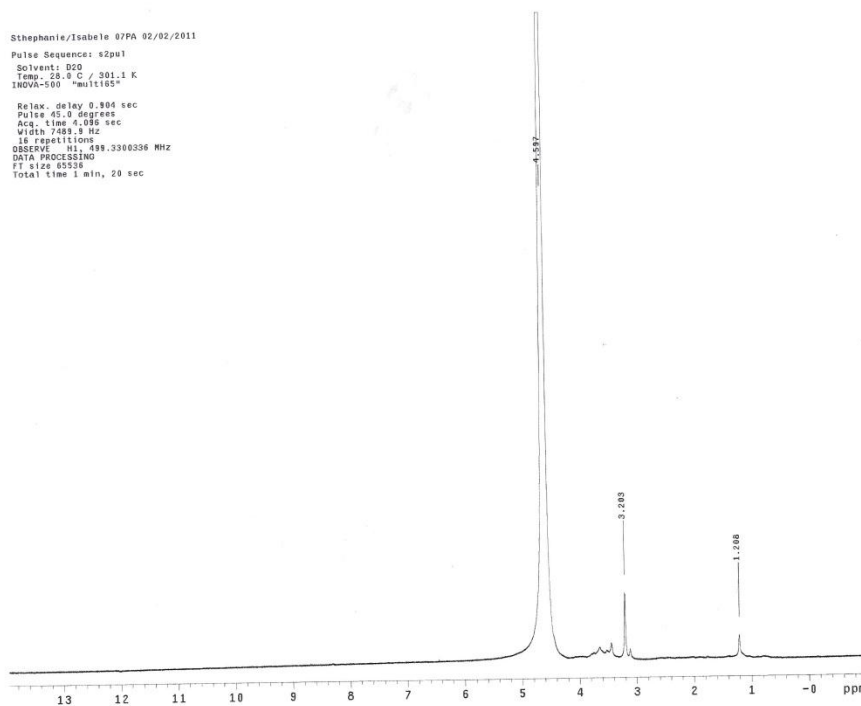
Anexo 14. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 04PA.



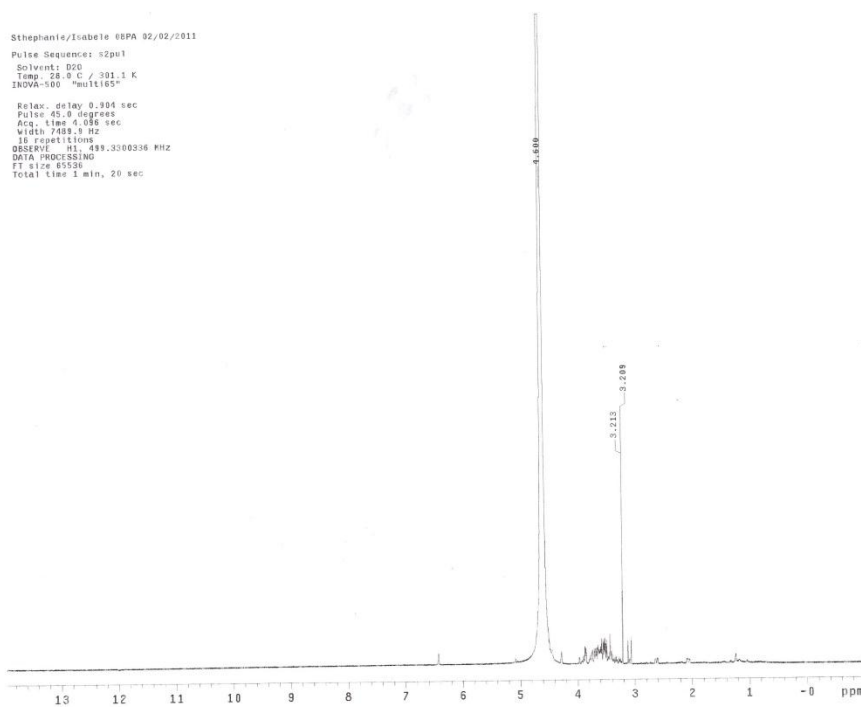
Anexo 15. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 05PA.



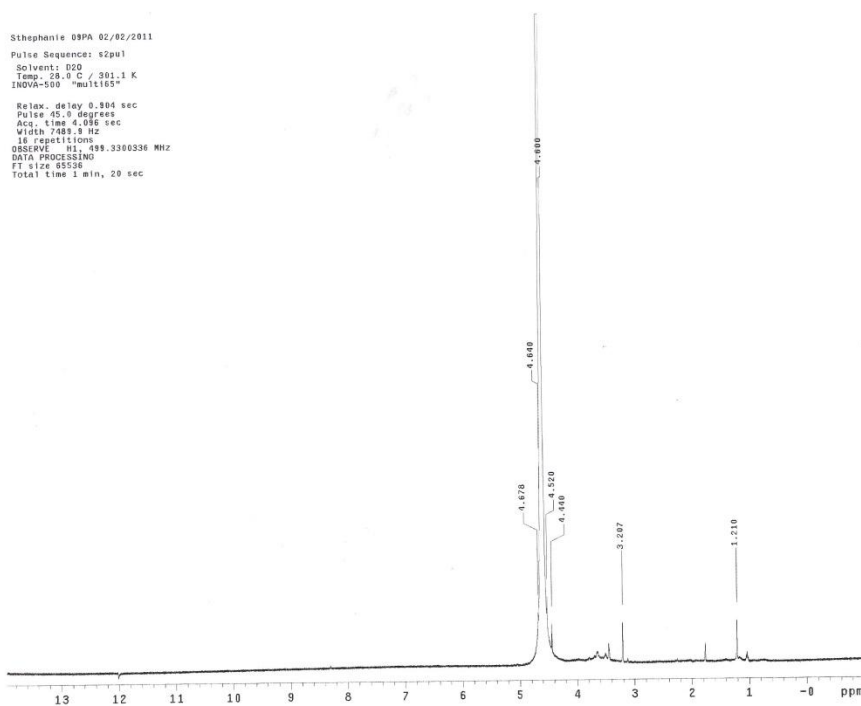
Anexo 16. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 06PA.



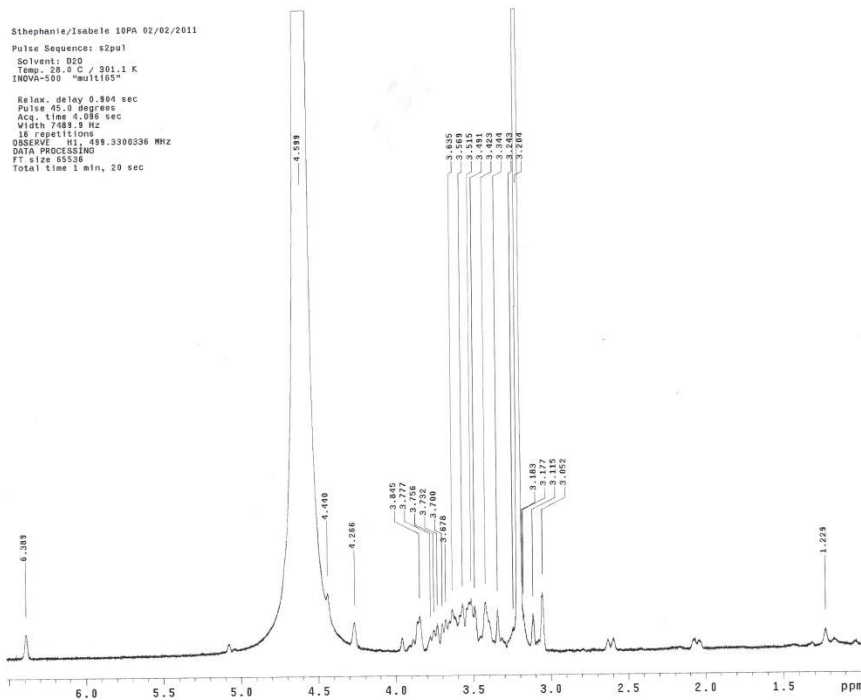
Anexo 17. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 07PA.



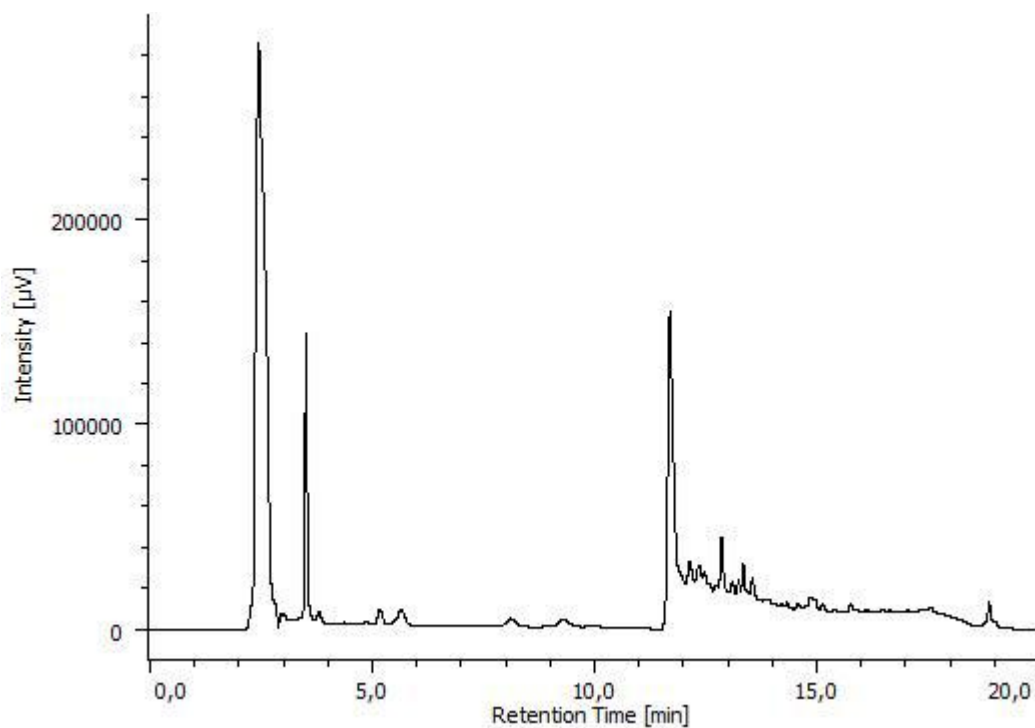
Anexo 18. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 08PA.



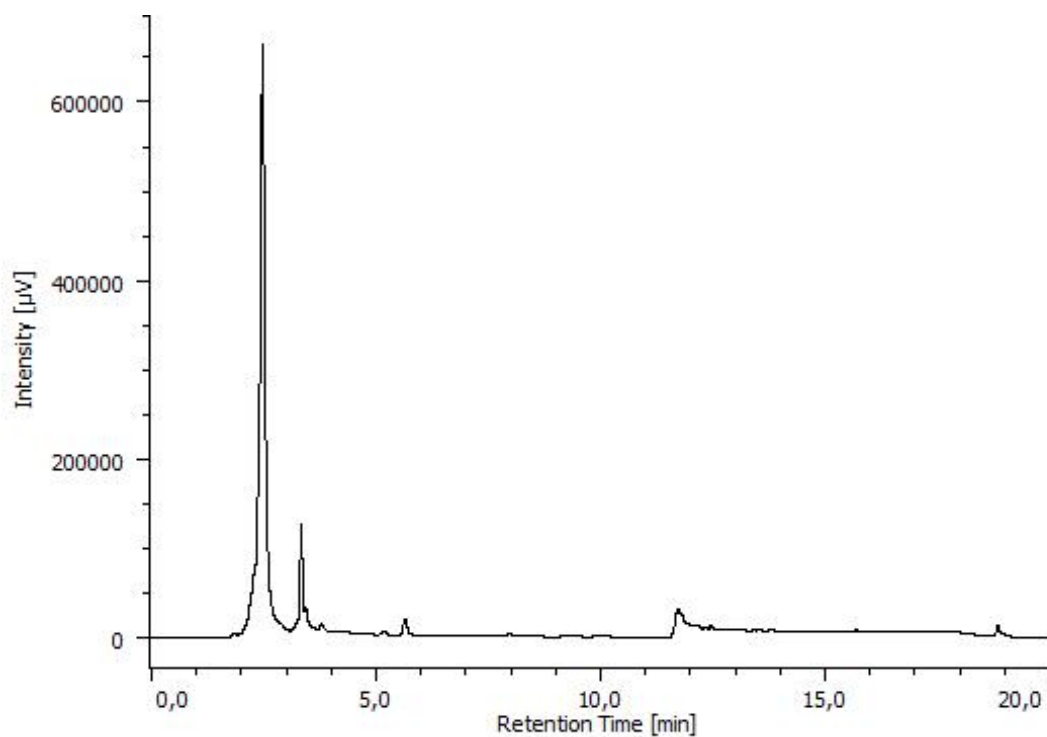
Anexo 19. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 09PA.



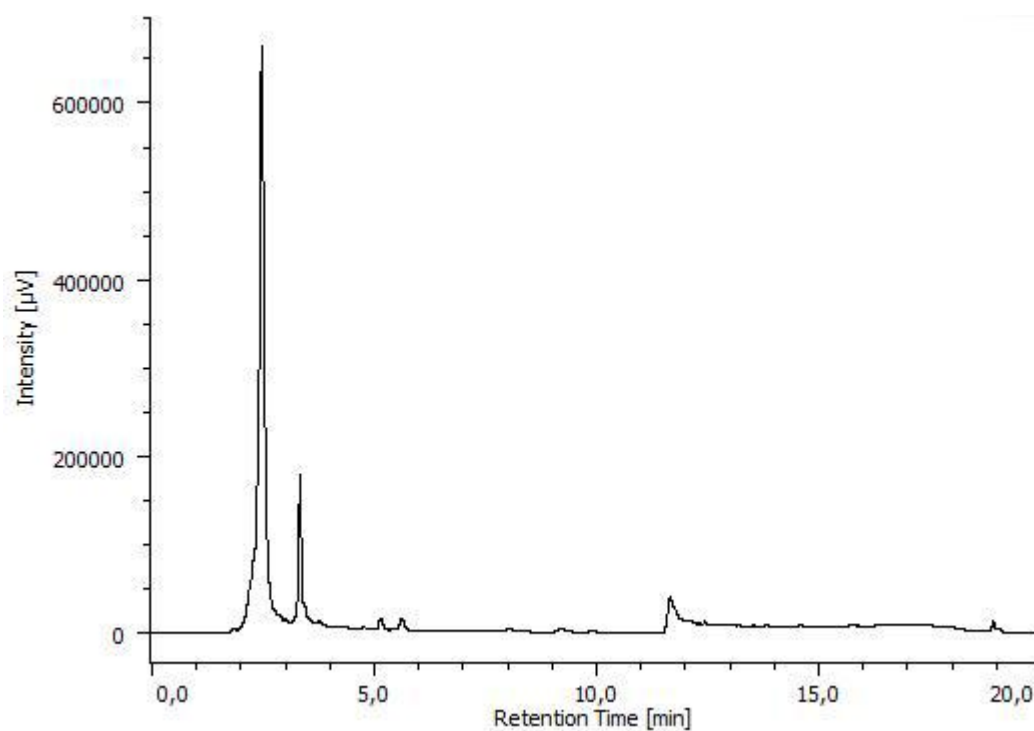
Anexo 20. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) do extrato 10PA.



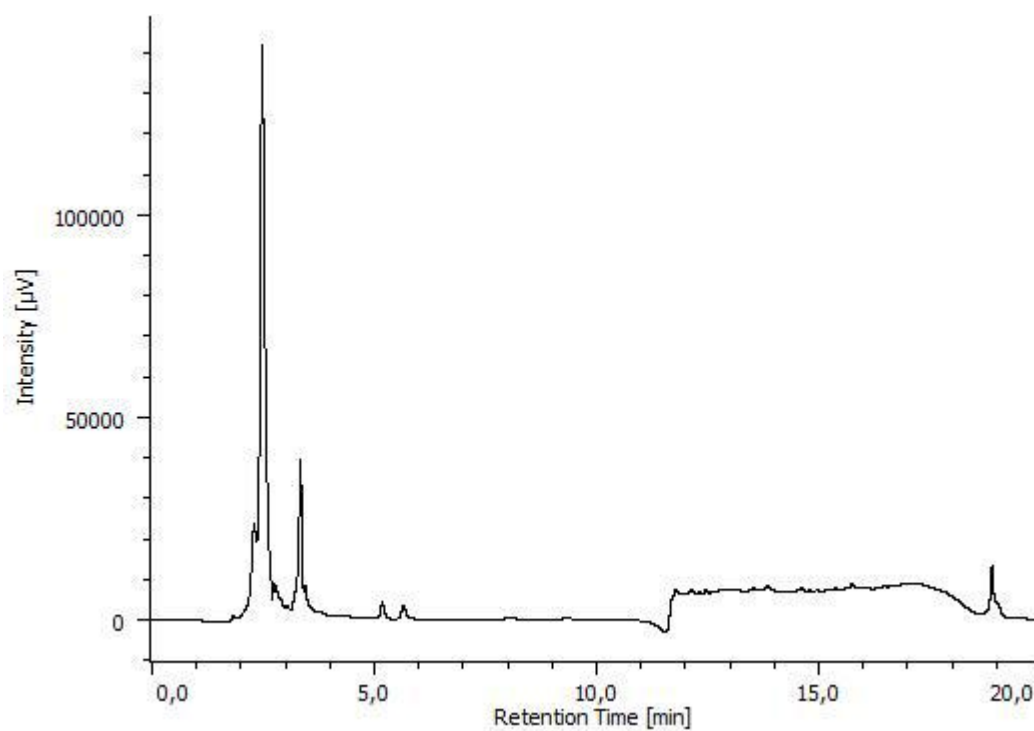
Anexo 21. Cromatograma (213nm) do extrato 01R.



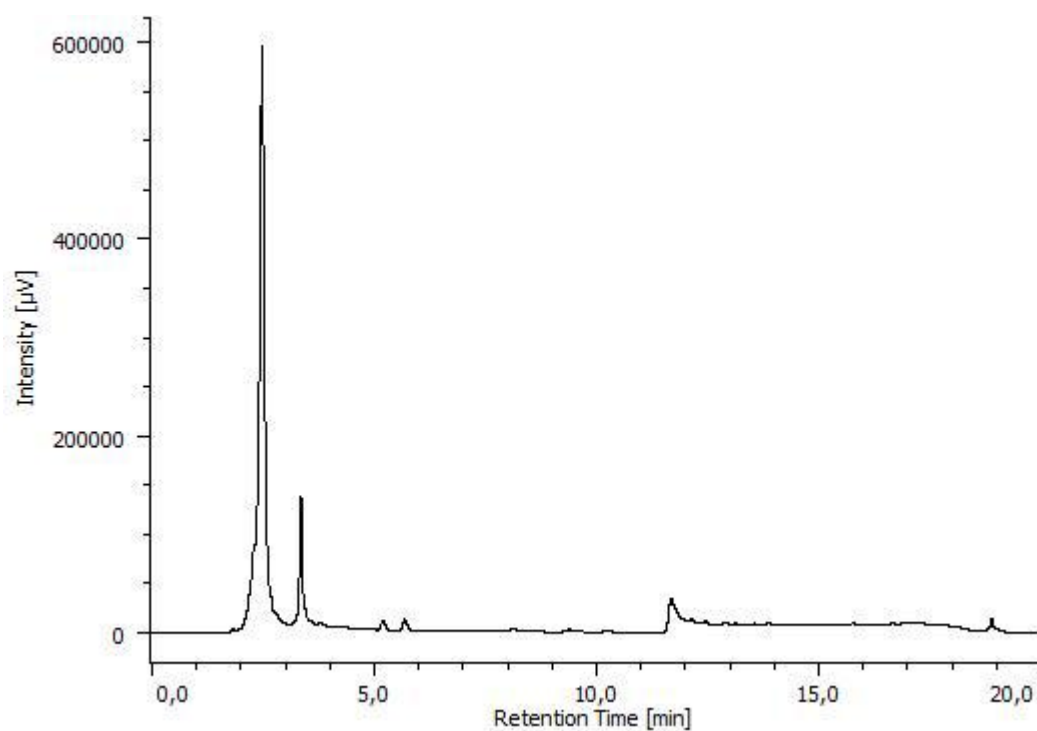
Anexo 22. Cromatograma (213nm) do extrato 02R.



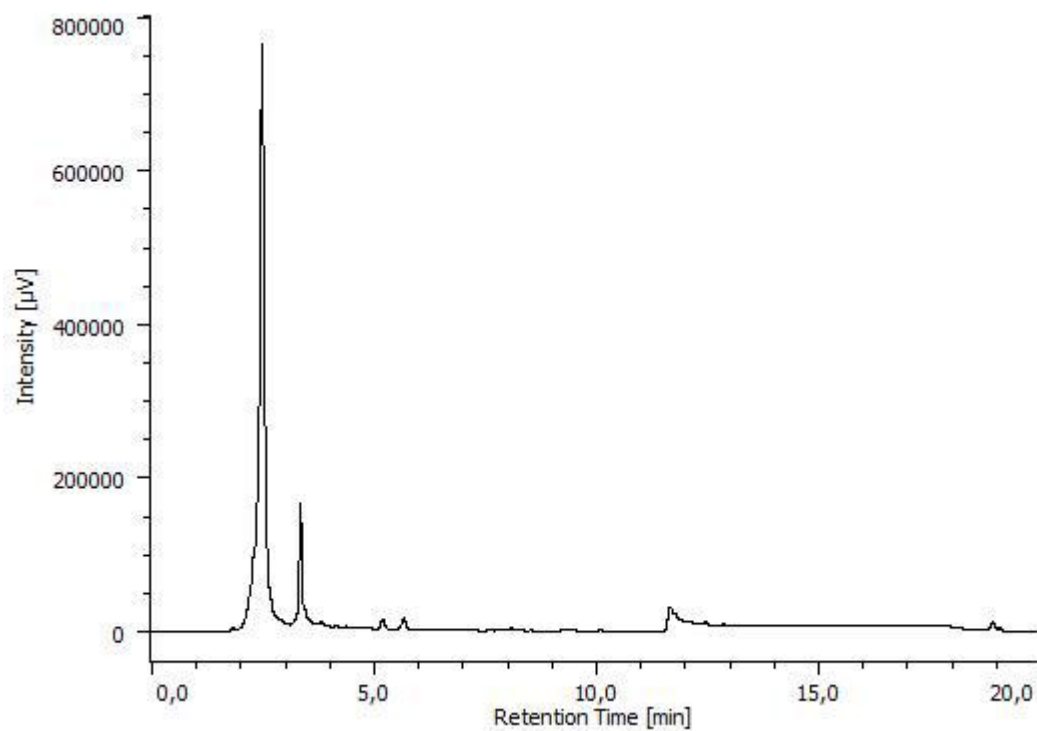
Anexo 23. Cromatograma (213nm) do extrato 03R.



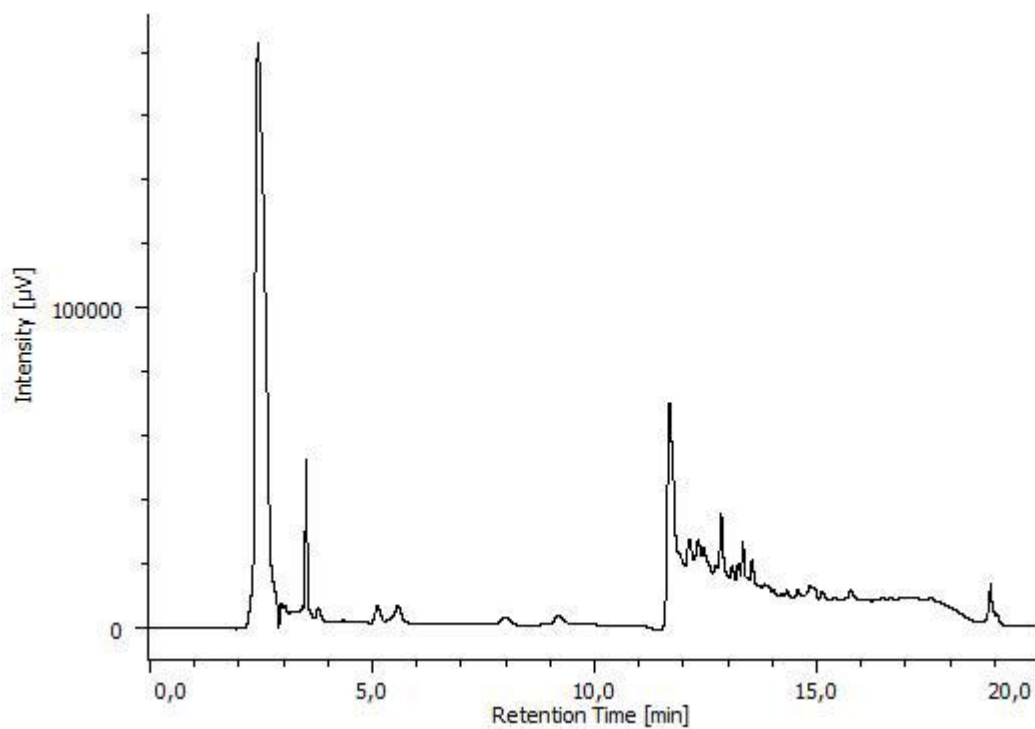
Anexo 24. Cromatograma (213nm) do extrato 04R.



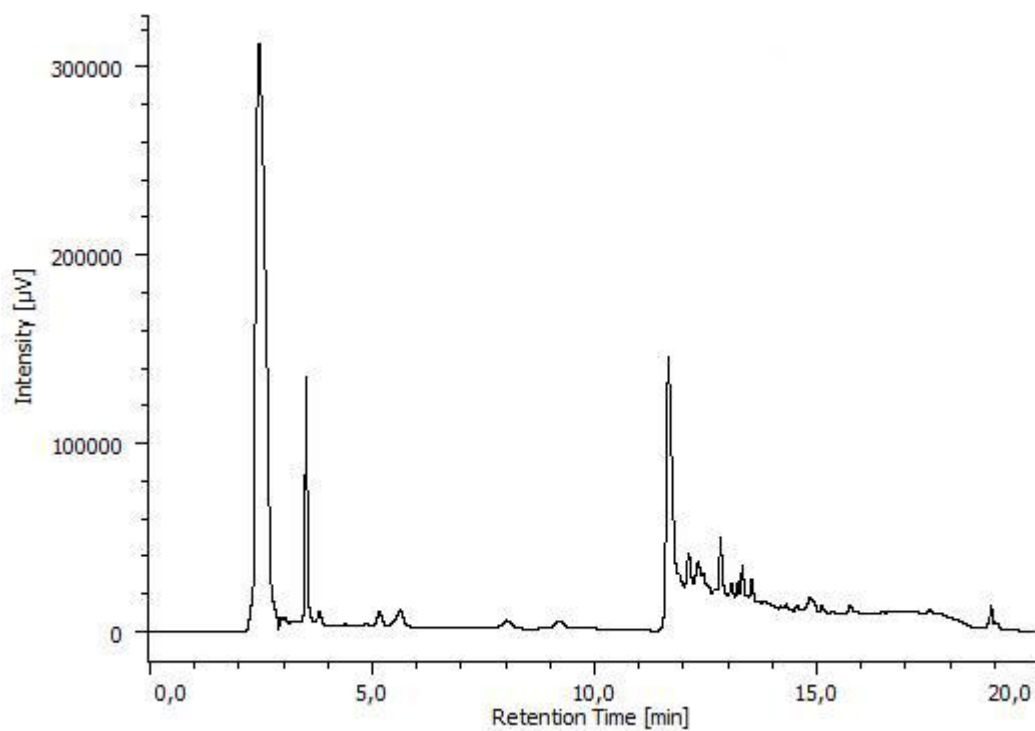
Anexo 25. Cromatograma (213nm) do extrato 05R.



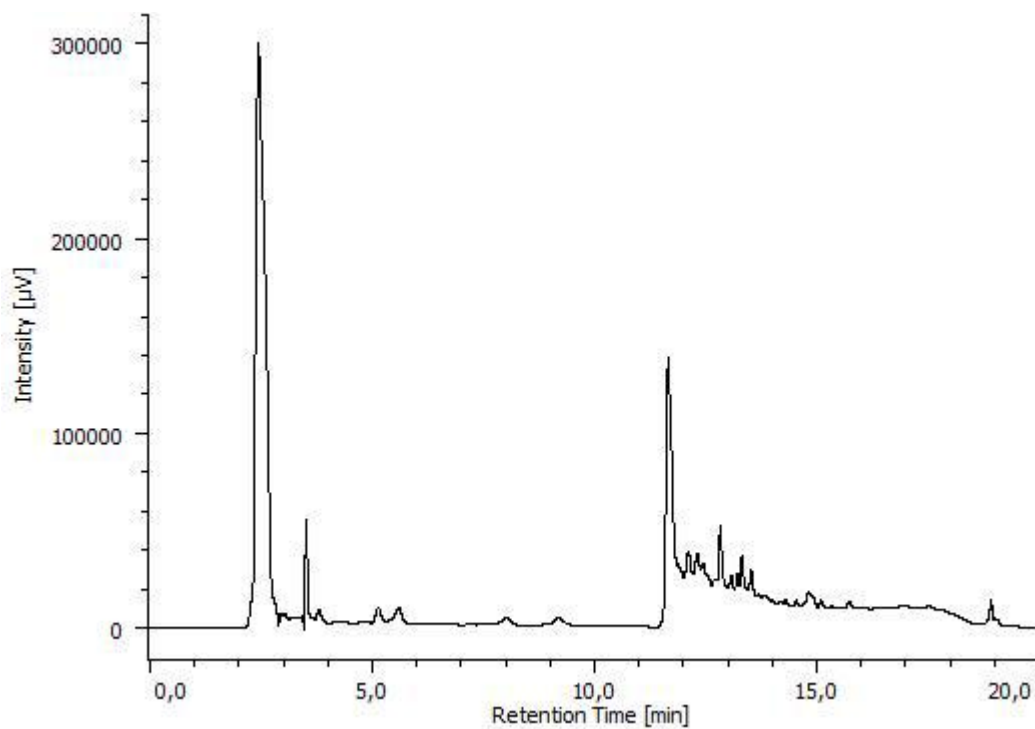
Anexo 26. Cromatograma (213nm) do extrato 06R.



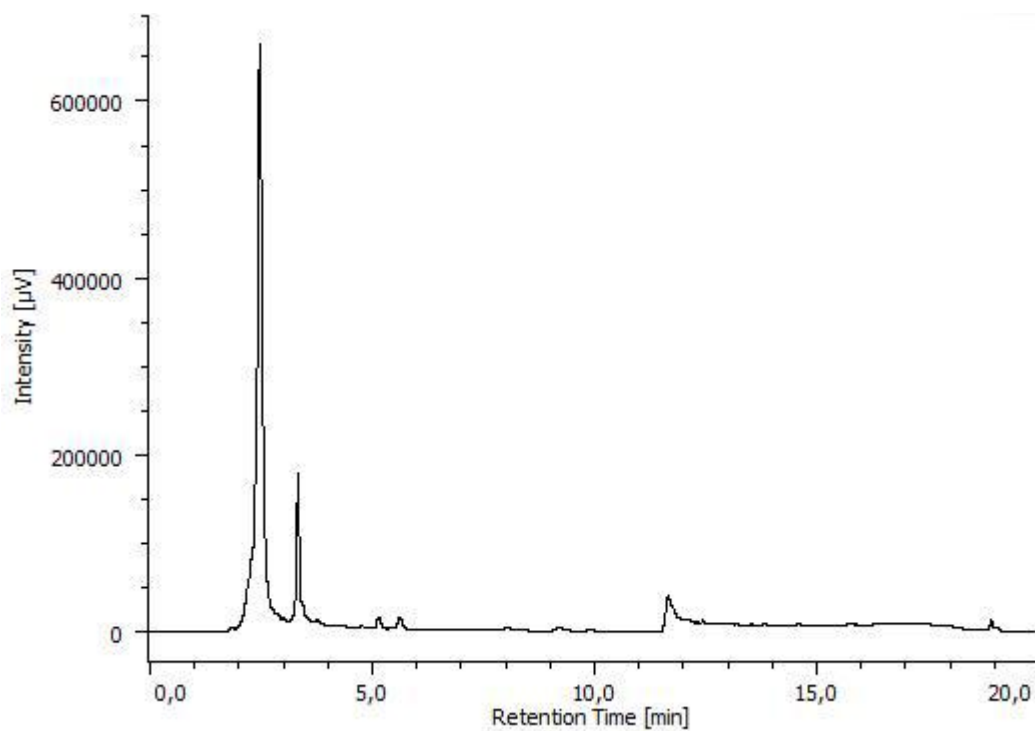
Anexo 27. Cromatograma (213nm) do extrato 07R.



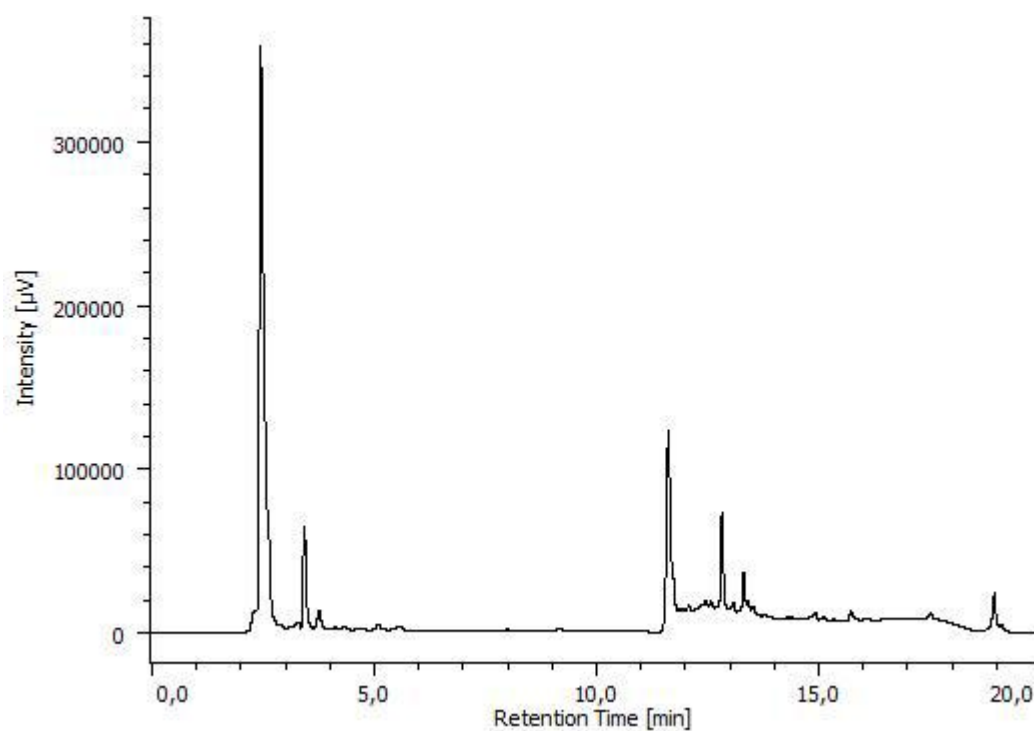
Anexo 28. Cromatograma (213nm) do extrato 08R.



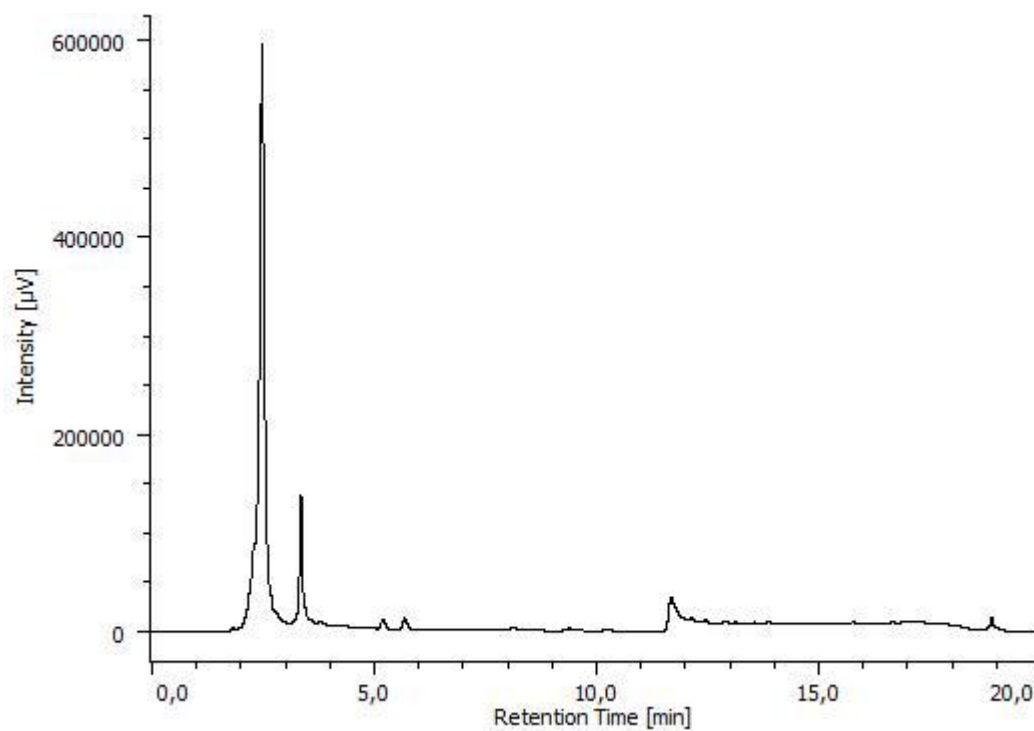
Anexo 29. Cromatograma (213nm) do extrato 09R.



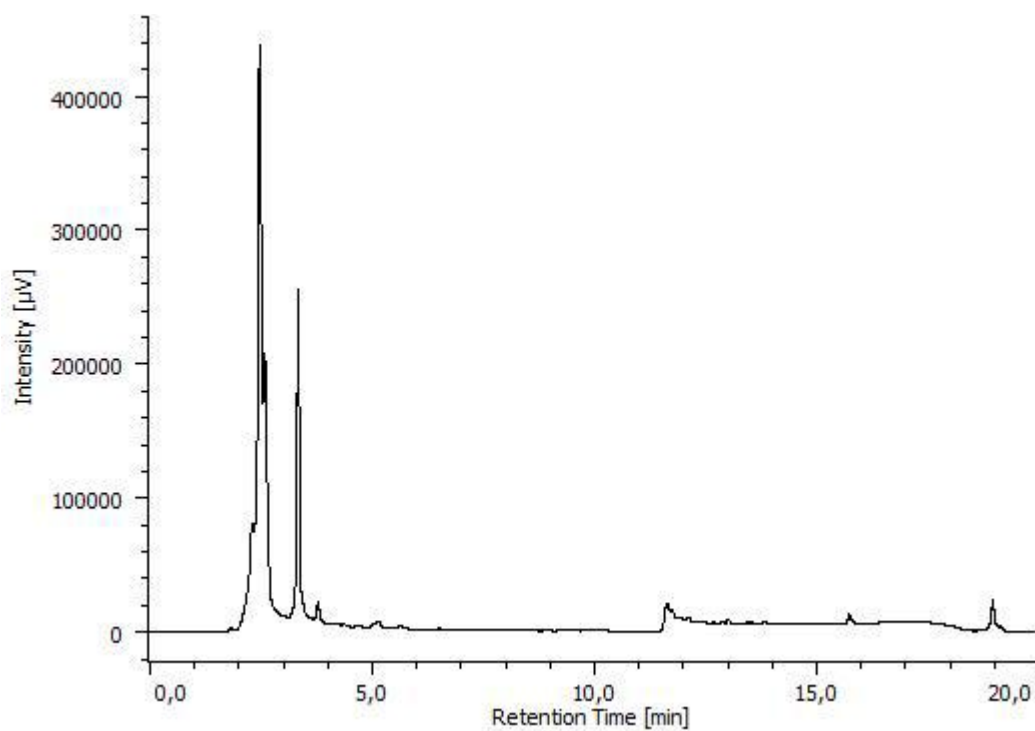
Anexo 30. Cromatograma (213nm) do extrato 10R.



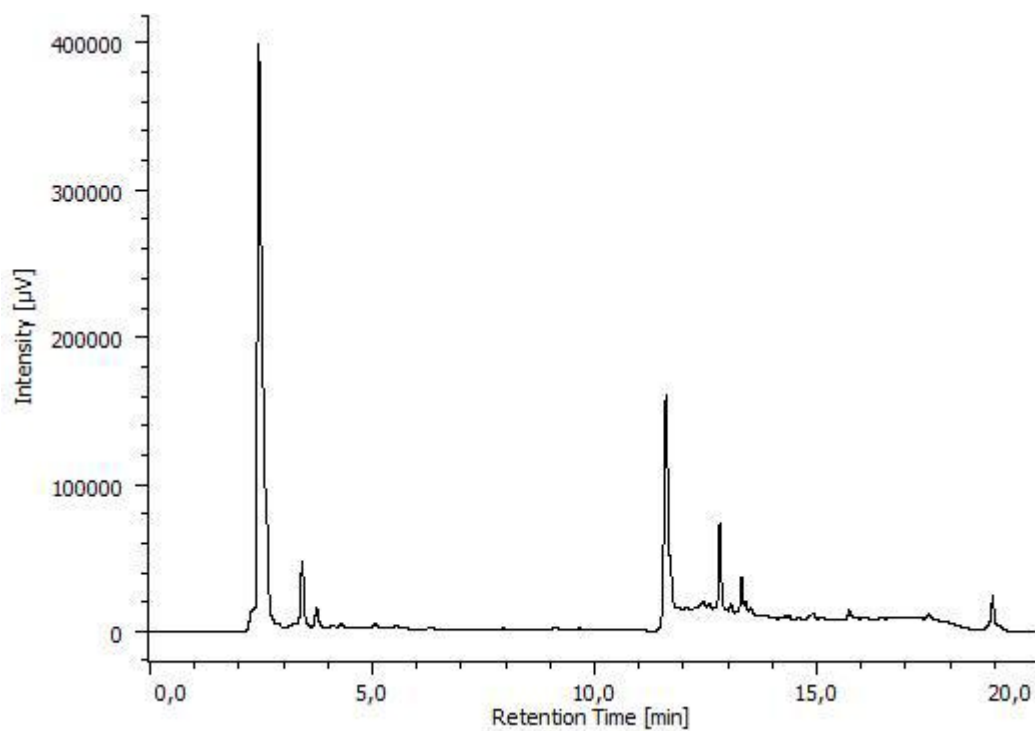
Anexo 31. Cromatograma (213nm) do extrato 01PA.



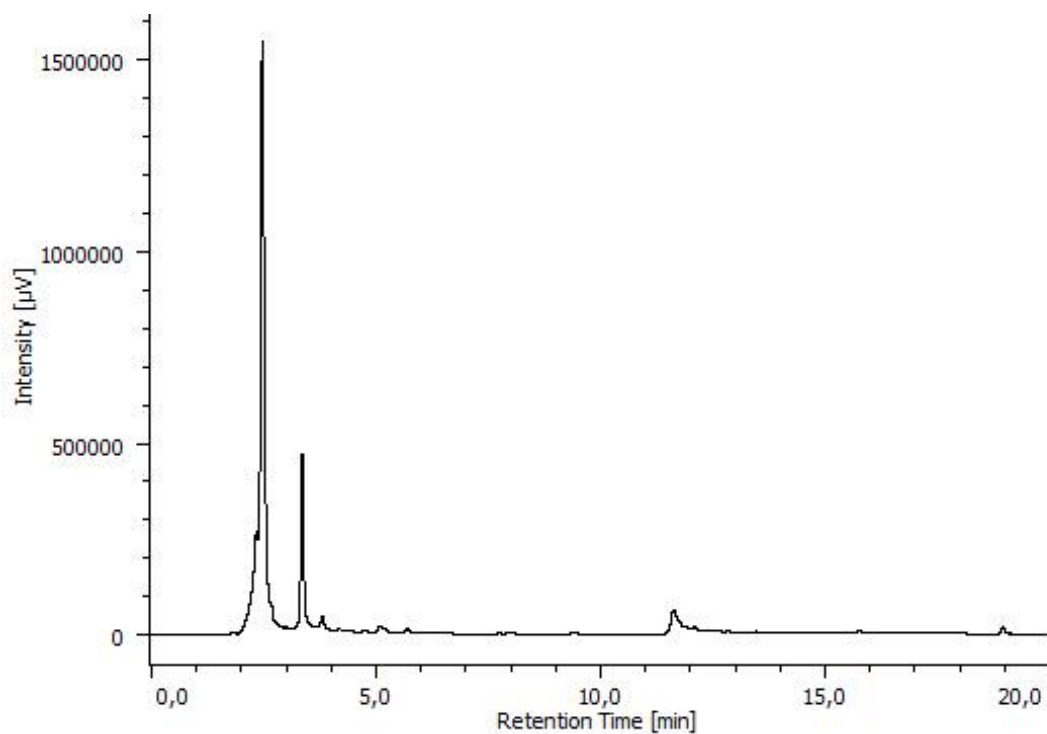
Anexo 32. Cromatograma (213nm) do extrato 02PA.



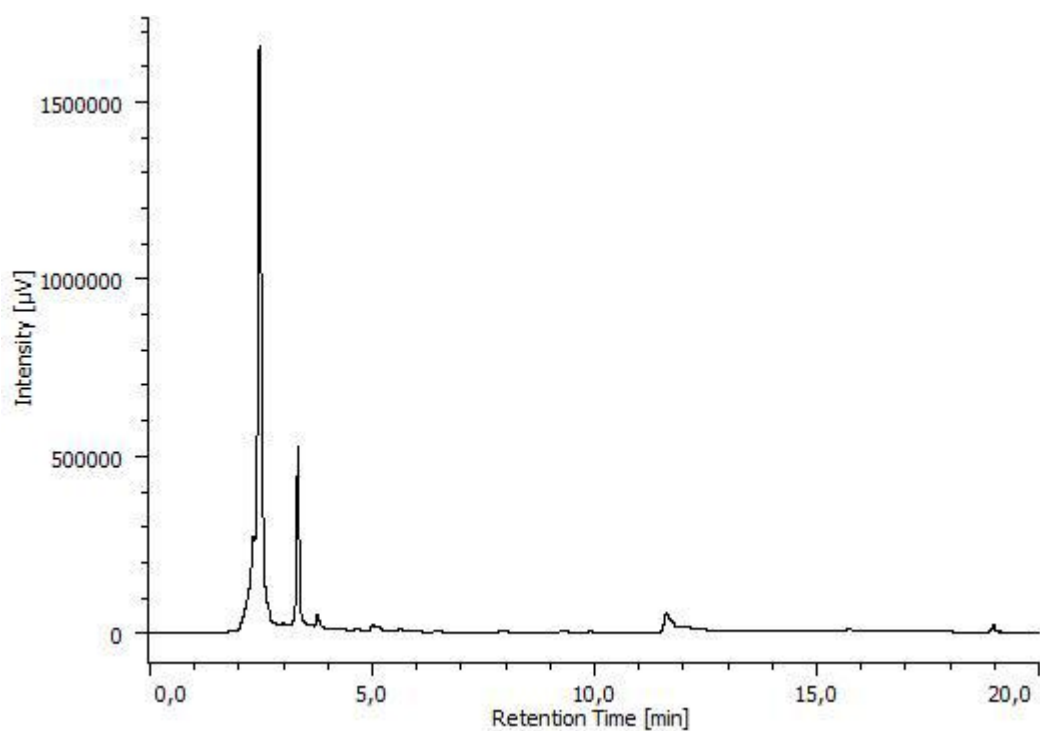
Anexo 33. Cromatograma (213nm) do extrato 03PA.



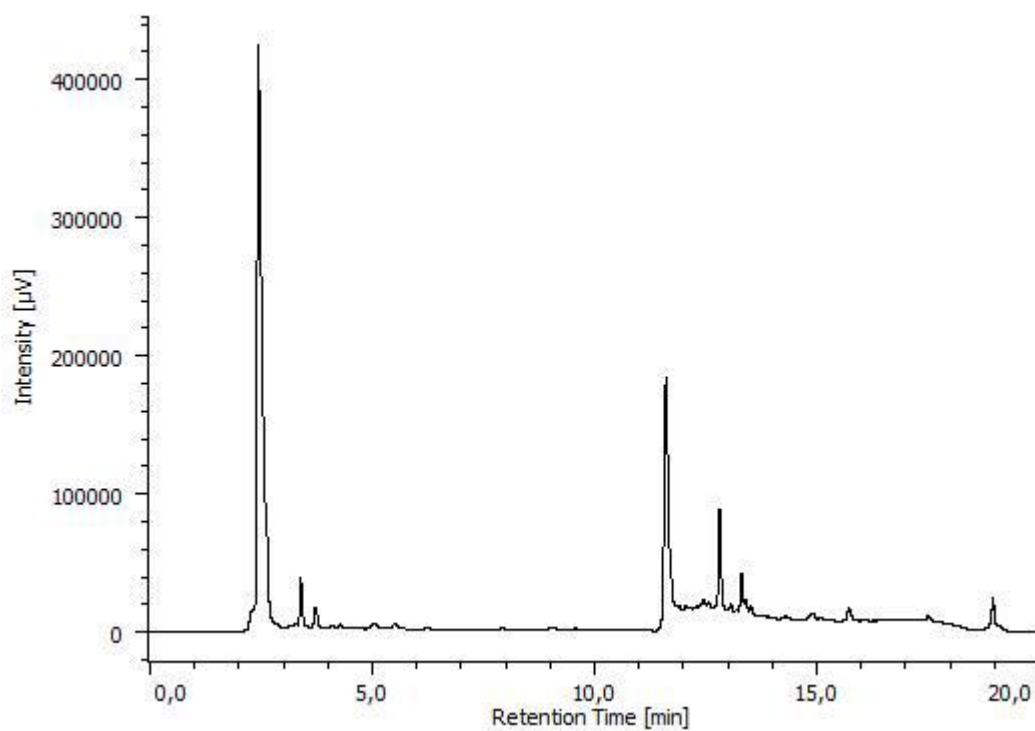
Anexo 34. Cromatograma (213nm) do extrato 04PA.



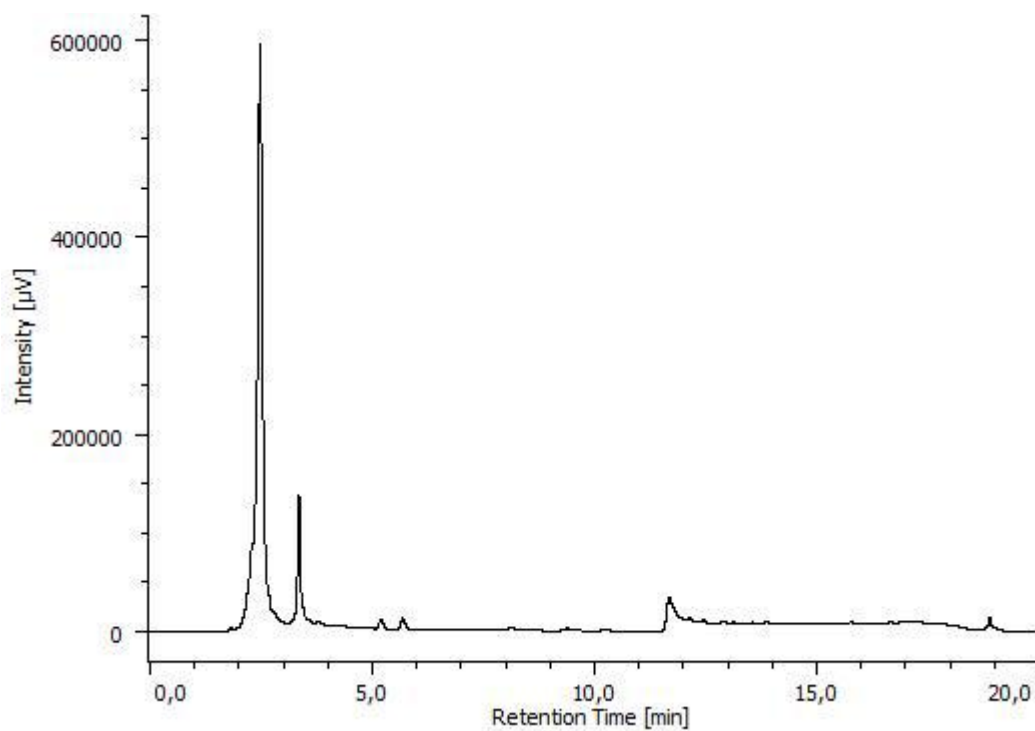
Anexo 35. Cromatograma (213nm) do extrato 05PA.



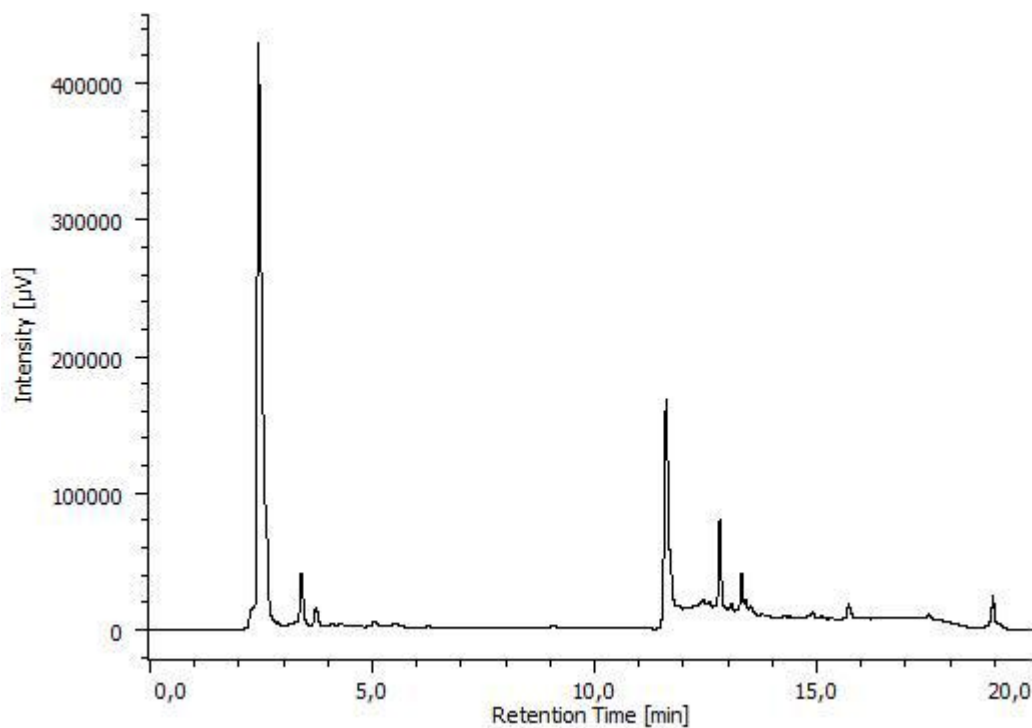
Anexo 36. Cromatograma (213nm) do extrato 06PA.



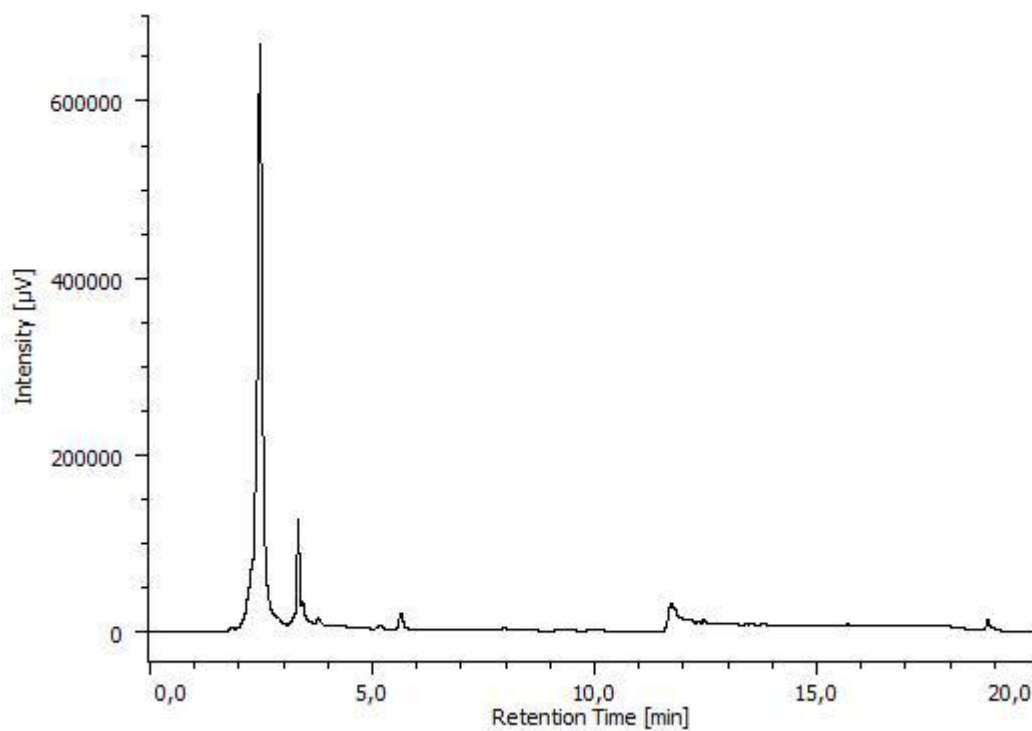
Anexo 37. Cromatograma (213nm) do extrato 07PA.



Anexo 38. Cromatograma (213nm) do extrato 08PA.



Anexo 39. Cromatograma (213nm) do extrato 09PA.



Anexo 40. Cromatograma (213nm) do extrato 10PA.

De acordo,

Araraquara, 19 de Dezembro de 2013.

Sthephanie Favalli Cardoso

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento