UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE TECNOLOGIA – ESCOLA DE QUÍMICA

ADÉLIA MARA BELÉM LIMA

EXTRAÇÃO SELETIVA DE ÁCIDOS TRITERPÊNICOS DE FOLHAS DE ESPÉCIES DE MYRTACEAE UTILIZANDO ETANOL ALCALINIZADO

Rio de Janeiro
Agosto/2014

ADÉLIA MARA BELÉM LIMA

EXTRAÇÃO SELETIVA DE ÁCIDOS TRITERPÊNICOS DE FOLHAS DE ESPÉCIES DE MYRTACEAE UTILIZANDO ETANOL ALCALINIZADO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

Orientadores:

Luiz Antonio d'Avila, D.Sc.
Antonio Carlos Siani, D.Sc.

Rio de Janeiro
Agosto/2014

Lima, Adélia Mara Belém
Extração seletiva de ácidos triterpênicos de folhas de espécies de Myrtaceae utilizando etanol alcalinizado / Adélia Mara Belém Lima. - - Rio de Janeiro, 2014.
127 f. il. 30 cm.

Orientador: Luiz Antonio d'Avila.
Coorientador: Antonio Carlos Siani.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2014.

1. Extração seletiva. 2. Myrtaceae. 3. Ácidos triterpênicos. 4. Parâmetros de solubilidade de Hansen. 5. Extração em fase sólida. I. d'Avila, Luiz Antonio, orient. II. Siani, Antonio Carlos, coorient. III. Título.

Adélia Mara Belém Lima

Extração seletiva de ácidos triterpênicos de folhas de espécies de Myrtaceae utilizando etanol alcalinizado

Dissertação de mestrado submetida ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências, e Executada sob orientação dos professores Dr. Luiz Antonio d'Avila – UFRJ/EQ e Dr. Antonio Carlos Siani.

Rio de Janeiro, 20 de agosto de 2014.

Aprovada por:

_____

Luiz Antonio d'Avila, D. Sc, UFRJ.

_____

Antonio Carlos Siani, D. Sc, FIOCRUZ.

_____

Eduardo Falabella Sousa-Aguiar, D. Sc, UFRJ.

_____

Selma Ribeiro de Paiva, D. Sc, UFF.

_____

Mary Ann Foglio, D. Sc, UNICAMP.

Dedico este trabalho ao meu marido Flávio, pelo amor, apoio e carinho em todos esses anos; ao meu filho Pedro, razão do meu viver e à minha família, que é a minha base, pelo incentivo e apoio em todas as horas.

Agradecimentos

A Deus e aos meus ‘amigos e professores’, por me iluminar nas horas difíceis e por toda a proteção durante essa jornada.

Aos meus orientadores Dr. Luiz Antonio d’Avila e Dr. Antonio Carlos Siani, pela confiança, atenção, apoio, dedicação, orientação para o desenvolvimento deste trabalho e por todo o aprendizado.

Ao meu marido Flávio, pela compreensão durante toda a realização deste trabalho e ao meu filho Pedro, por sempre me incentivar e acreditar em mim.

À minha família, pelo apoio incondicional e pela compreensão de minha ausência em muitas comemorações e reuniões.

Ao meu ‘chefe’ Leonardo Coutada, pelo apoio e incentivo e, acima de tudo, por acreditar no meu potencial.

Ao Zé do Massas, por todos os ensinamentos, não só os de cromatografia e espectrometria, mas principalmente os de vida.

À amiga Eliane Gonçalves, por sempre ajudar a resolver meus problemas.

Aos amigos Marcos Jun, Elizete Lima, Julliana Rodrigues e João Tostes, pelas horas de dedicação e que, sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria possível.

Aos amigos Bruno Lessa e Vinícius Nery, pela amizade, apoio e risadas.

Aos amigos Thiago Bandini e José Luiz Mazzei, por todo ensinamento e ajuda no decorrer deste trabalho.

Aos amigos Alexandre, Shirlei, Rafaella, Virgínia, Beth, Marcelo, Charles, Márcio e Daniel, pela convivência e Vagner, Alan, Flavia, Ana Luiza, André e Ivone, por me aturarem.

RESUMO

LIMA, Adélia Mara Belém**, Extração seletiva de ácidos triterpênicos de folhas de espécies de Myrtaceae utilizando etanol alcalinizado.** Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Os ácidos triterpênicos betulínico (AB), oleanólico (AO) e ursólico (AU) estão presentes em vegetais e possuem ampla gama de atividades farmacológicas. A disponibilidade destes compostos em grande escala está condicionada à identificação de suas fontes, assim como de métodos rentáveis para extraí-los. Com este objetivo, folhas secas e moídas de seis espécies dos gêneros *Eugenia*, *Psidium* e *Syzygium* (Myrtaceae) foram agitadas com NaOH a 2% em EtOH 95% (1:4 m/v) durante 6 h à temperatura ambiente. Foram obtidos extratos livre de pigmentos, contendo 6-50% de ácidos totais para as espécies ensaiadas. Os teores de AB, AO e AU nos extratos foram individual e simultaneamente quantificados por CG-DIC, para o qual desenvolveu-se o método analítico após ensaios com três colunas de fases distintas. AU predomina na maioria dos extratos (7-20%), mas AB sozinho perfaz 39% em *Eugenia florida*. Visando apontar procedimentos para posterior purificação dos ácidos triterpênicos, foram ensaiados métodos de Extração em Fase Sólida (EFS), onde a seleção de solventes para eluir AU nos extratos de *Psidium cattleyanum* (PC) contendo 20% de AU e *Eugenia brasiliensis* (EB) contendo 15% de AU foi indicada por cálculos de Parâmetros de Solubilidade de Hansen (*Hansen* Solubility Parameters, HSP). Entre 46-90% de AU foram recuperados de PC, com 71-100% de pureza; enquanto que, a partir de EB, recuperaram-se 64% de AU, com 82% de pureza; resultados estes dependentes do eluente na EFS. O tratamento das folhas com etanol alcalinizado demonstrou ser um método de baixo custo e ambientalmente aceitável para se obter ácidos triterpênicos. A técnica de EFS apoiada pelos cálculos de HSP demonstrou ser vantajosa na purificação de AU a partir de extratos de PC. A aplicação destes procedimentos combinados pode ser estendida a outras espécies e tecidos vegetais, com o mesmo objetivo.

Palavras-chave: Extração Seletiva, Myrtaceae, Ácidos Triterpênicos, Parâmetros de Solubilidade de Hansen, Extração em Fase Sólida

ABSTRACT

LIMA, Adélia Mara Belém**, Selective extraction of triterpene acids from leaves of species Myrtaceae using alkalinized ethanol.** Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Pentacyclictriterpene (TA) as betulinic (BA), oleanolic (OA) and ursolic (UA) acids present a plethora of pharmacological activities and therefore are potentially therapeutic agents. To meet the demands of large-scale production, exploitable sources of these compounds as well as cost-effective methods to extract them must be available. Obtaining selective and TA rich extracts from leaves of six Myrtaceae species belonging to genera *Eugenia*, *Psidium* and *Syzygium* was assayed by directly stirring the dry milled plant material with 2% NaOH solution in 95% EtOH (1:4 w/v) at room temperature for 6 h. Pigment-free extracts containing 6-50% of total TA were obtained from the six tested species. The contents of BA, OA, UA, and the individual extracts were simultaneously quantified by GC-FID, after developing the analytical method, which included assays with columns bearing three different phases. UA predominated in most extracts (7-20%), but BA was found with 39% in *Eugenia florida*.UA predominates in most extracts (7-20%), but BA alone made up 39% on *Eugenia florida*. Aiming further procedures to purify triterpene acids, the Solid Phase Extraction technique (SPE) was applied to *Psidium cattleyanum* (PC) with; 20% UA and *Eugenia brasiliensis* (EB) with 15% UA extracts, after selecting the solvent systems by theoretical prediction using Hansen Solubility Parameters (HSP) calculations. Between 46-90% of UA were recovered from PC with 71-100% purity; whereas 64% of UA with 82% purity was recovered from EB, according to the SPE eluent. Treatment of leaves with alkaline ethanol proved to be a low-cost and environmentally acceptable method to obtain triterpene acids. SPE technique supported by HSP calculations also proved to be advantageous in purifying UA from PC extracts. The combined application of these procedures could be extended to other species and plant tissues, with the same goal.

Palavras-chave: Selective Extraction, Myrtaceae, Triterpene Acids, Hansen Solubility Parameters, Solid Phase Extraction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de Myrtaceae no mundo 22
Figura 2: Imagem de *Eugenia brasiliensis* 24
Figura 3: Imagem de *Eugenia florida* 24
Figura 4: Imagem de *Eugenia uniflora* 25
Figura 5: Imagem de *Psidium cattleyanum* 25
Figura 6: Imagem de *Psidium guajava* 26
Figura 7: Imagem de *Syzygium cumini* 26
Figura 8: Estruturas químicas dos AT: Ácido Betulínico (I), Ácido Oleanólico (II) e Ácido Ursólico (III), selecionados para prospecção 27
Figura 9: Esquema do protocolo de extração alcalina em EtOH 40
Figura 10: Exemplo dos derivados obtidos com tratamento por diazometano e TMSI: ácido ursólico 49
Figura 11: Cromatogramas do extrato de *E. brasiliensis* nos métodos otimizados para os derivadados bis-trimetilsilílico: (A) Método 2 e (B) Método 3 51
Figura 12: Cromatogramas do extrato de *E. brasiliensis* no Método 3 para os derivadados (A) éster metílico e (B) bis-trimetilsilílico 53
Figura 13: Cromatogramas dos extratos obtidos através do Protocolo 1 no Método 3: (A) *E. brasiliensis*, (B) *E. florida*, (C) *E. uniflora*, (D) *P. cattleyanum*, (E) *P. Guajava* e (F) *S. Cumini*. Análises realizadas após metilação com diazometano 59
Figura 14: Cromatogramas dos extratos obtidos através do Protocolo 2 no Método 3: (A) *E. brasiliensis*, (B) *E. florida*, (C) *E. uniflora*, (D) *P. cattleyanum*, (E) *P. Guajava* e (F) *S. Cumini*. Análises realizadas após metilação com diazometano 60
Figura 15: Cromatogramas do extrato de (A) *P. cattleyanum* e (B) *E. brasiliensis* do Protocolo 1, após sililação com TMSI 66
Figura 16: Modelo de estrutura da cutina e seus componentes ácidos graxos 67
Figura 17: Padrão de fragmentação de derivados metilados (A) e sililados (B) dos ácidos graxos hidroxilados na posição C-10 e espectros obtidos para os derivados metilados (C) e sililados (D) do sinal considerado como impureza

no extrato de *P. cattleyanum* 69
Figura 18: Substâncias tomadas como modelos para os cálculos de HSP referentes ao sinal 2 no cromatograma de *E. brasiliensis* 70
Figura 19: Estruturas do AU e das principais impurezas, conforme estruturas consideradas para os cálculos de HSP 73
Figura 20: Resumo esquemático da aplicação de EFS para enriquecer o conteúdo de AT dos extratos de *E. brasiliensis* e *P.cattleyanum* 75
Figura 21: Cromatogramas do extrato de *P. cattleyanum* e das frações geradas por EFS do experimento 1. Análises realizadas após metilação com diazometano 76
Figura 22*:* Cromatogramas do extrato de *P. cattleyanum* e das frações geradas por EFS do experimento 2. Análises realizadas após sililação com TMSI 77
Figura 23*:* Cromatogramas do extrato de *P. cattleyanum* e das frações geradas por EFS do experimento 3. Análises realizadas após sililação com TMSI 78
Figura 24*:* Cromatogramas do extrato de *E. brasiliensis* e das frações geradas por EFS do experimento 4. Análises realizadas após sililação com TMSI 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados gerais de coleta e identificação das espécies de Myrtaceae 38
Tabela 2: Concentrações de AT padrões utilizadas para obter as curvas de calibração dos derivados metilados 42
Tabela 3: Concentrações de AT padrões utilizadas para obter as curvas de calibração dos derivados sililados 43
Tabela 4: Rendimento da secagem das folhas das seis espécies de Myrtaceae 47
Tabela 5: Rendimentos dos extratos após o tratamento das folhas secas com 2% NaOH em etanol, para seis espécies de Myrtaceae 48
Tabela 6: Métodos cromatográficos testados para a análise de CG-DIC do extrato de *E. brasiliensis* 52
Tabela 7: Teor de AT nos extratos de folhas de espécies de Myrtaceae após extração com etanol alcalinizado com NaOH 57
Tabela 8: Valores de parâmetros de solubilidade de Hansen parciais e totais calculados para os solventes e as substâncias consideradas como impurezas 71
Tabela 9: Valores calculados quadrado da diferença do parâmetro de solubilidade total – $(\Delta\delta T)^2$ 72
Tabela 10: Resultados experimentais de SPE para extrato PC – experimento 1 81
Tabela 11: Resultados experimentais de SPE para extrato PC – experimento 2 81
Tabela 12: Resultados experimentais de SPE para extrato PC – experimento 3 81
Tabela 13: Resultados experimentais de SPE para extrato EB 81
Tabela 14: Avaliação da Curva de Calibração 1 dos derivados metilados pela regressão linear ordinária (Faixa A) 96
Tabela 15: Avaliação da Curva de Calibração 1 dos derivados metilados pela regressão linear ponderada (Faixa A) 97
Tabela 16: Avaliação da Curva de Calibração 1 dos derivados metilados pela regressão linear ordinária (Faixa B) 98
Tabela 17: Avaliação da Curva de Calibração 1 dos derivados metilados pela

regressão linear ponderada (Faixa B) 99
Tabela 18: Comparação das Curvas de Calibração 1 e 2 do derivado metilado de AO (Faixa A) 101
Tabela 19: Comparação das Curvas de Calibração 1 e 2 do derivado metilado de AO (Faixa B) 102
Tabela 20: Comparação das Curvas de Calibração 1 e 2 do derivado metilado de AB (Faixa A) 103
Tabela 21: Comparação das Curvas de Calibração 1 e 2 do derivado metilado de AB (Faixa B) 104
Tabela 22: Comparação das Curvas de Calibração 1 e 2 do derivado metilado de AU (Faixa A) 105
Tabela 23: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AO (Faixa A) 106
Tabela 24: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AO (Faixa B) 107
Tabela 25: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AB (Faixa A) 108
Tabela 26: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AB (Faixa B) 109
Tabela 27: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AU (Faixa A) 110
Tabela 28: Resultados da curva de calibração dos derivados trimetilsililados pela regressão linear ponderada (Faixa A) 112
Tabela 29: Resultados da curva de calibração dos derivados trimetilsililados pela regressão linear ponderada (Faixa B) 113
Tabela 30: Valores de HSP calculados para o ácido oleanólico 115
Tabela 31: Valores de HSP calculados para o ácido betulínico 116
Tabela 32: Valores de HSP calculados para o ácido ursólico 117
Tabela 33: Valores de HSP calculados para a α-amirina e β-amirina 118
Tabela 34: Valores de HSP calculados para a friedelina 119
Tabela 35: Valores de HSP calculados para o γ-sitosterol 120
Tabela 36: Valores de HSP calculados para o ácido diidroxioctadecanoico 121
Tabela 37: Valores de HSP calculados para o álcool 10-nonadecanol 122

Tabela 38: Valores de HSP calculados para a hidroxicetona genérica 123
Tabela 39: Valores de HSP calculados para a 5,7-dimetoxiflavanona 124

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Rendimentos dos extratos nos Protocolos 1 e 2 48
Gráfico 2: Teor individual dos ácidos triterpênicos nos extratos das seis espécies de Myrtaceae – Protocolos 1 e 2 58
Gráfico 3: Teor total dos ácidos triterpênicos nos extratos das seis espécies de Myrtaceae, extraídos pelos Protocolos 1 e 2 58

ABREVIATURAS, FÓRMULAS QUÍMICAS E SIGLAS

AB: Ácido betulínico

ACS: *American Chemical Society*

AO: Ácido oleanólico

AT: Ácidos triterpênicos

AU: Ácido ursólico

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CG: Cromatografia em Fase Gasosa

CG-DIC: Cromatografia em fase Gasosa com Detecção por Ionização em Chama

CG-EM: Cromatografia em Fase Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EB: *Eugenia brasiliensis*

EF: *Eugenia florida*

EFS: Extração em Fase Sólida

EtOH: Álcool etílico

EU: *Eugenia uniflora*

HCl: Ácido clorídrico

HPLC: *High-performance liquid chromatography*

HSP: Parâmetros de Solubilidade de Hansen

KOH: Hidróxido de potássio

MeOH: Álcool metílico

NaOH: Hidróxido de sódio

NP/PEG: Difenilboriloxietilamina 1, 0% em metanol / solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol

PA: Pró-análise

PC: *Psidium cattleyanum*

PG: *Psidium guajava*

R_S: Resolução

SC: *Syzygium cumini*

TMSI: Trimetilsilil imidazol

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
2.1. A DIVERSIDADE VEGETAL COMO FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS: A FAMÍLIA BOTÂNICA MYRTACEAE 21
2.2 ÁCIDOS TRITERPÊNICOS 27
2.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AT 28
2.4 PARÂMETROS DE SOLUBILIDADE DE HANSEN (HSP) 32
2.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AT 34

3 MATERIAIS E MÉTODOS 36
3.1 SOLVENTES, REAGENTES E PADRÕES QUÍMICOS 36
3.2 EQUIPAMENTOS 37
3.3 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL 37
3.4 MÉTODO DE EXTRAÇÃO 39
3.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES E AMOSTRA 40
3.5.1 Preparação de diazometano 40
3.5.2 Soluções e curvas de calibração para os derivados metilados dos AT 41
3.5.3 Preparação das amostras dos derivados metilados 42
3.5.4 Soluções e curvas de calibração para os derivados trimetilsililados dos AT 42
3.5.5 Preparação das amostra para os derivados trimetilsililados 43
3.6 ANÁLISE QUANTITATIVA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM DETECÇÃO POR IONIZAÇÃO EM CHAMA (CG-DIC) 44
3.7 ANÁLISE QUALITATIVA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) 44
3.8 ESTATÍSTICA 45
3.9 ENRIQUECIMENTO DOS AT NOS EXTRATOS 45
3.9.1 Cálculo de Parâmetros de solubilidade de Hansen (HSP) 45
3.9.2 Purificação dos extratos por Extração em Fase Sólida (EFS) 45

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
4.1 SECAGEM E RENDIMENTO DAS FOLHAS 47
4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS 47
4.3 MÉTODO DE ANÁLISE QUANTITATIVA (CG-DIC) 49
4.3.1 Desenvolvimento do método analítico – derivados metil e trimetilsilil éster 49
4.3.2 Curvas de calibração para os derivados metilados 53
4.3.3 Curva de calibração para os derivados trimetilsililados 55
4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS AT POR CG-DIC NOS EXTRATOS 56
4.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO E A EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DOS AT 61
4.6 APLICAÇÃO DA TÉCNICA EFS PARA O ENRIQUECIMENTO DE AT NOS EXTRATOS 64
4.6.1 Cálculo de HSP 65
4.6.2 Desenvolvimento do método de EFS 74
4.6.2.1 EFS para o extrato de *P. cattleyanum* 74
4.6.2.2 EFS para o extrato de *E. brasiliensis* 78

5 CONCLUSÕES 82
REFERÊNCIAS 85
APÊNDICES 94
ANEXOS 125

1 INTRODUÇÃO

Ácidos triterpênicos (AT) são substâncias compostas por 30 moléculas de carbono biossintetizadas a partir de seis unidades isopropênicas (BREITMAIER, 2006). Assim como os esteróides, os triterpenos originam-se biossinteticamente do esqualeno (PRICE *et al*, 1987), sendo também dotados de efeitos biológicos diversos (LIU, 1995). Entre as propriedades farmacológicas desta classe de metabólitos podem ser destacadas as atividades anti-inflamatórias, antibactericida, antiviral, hepatoprotetora e antitumoral (LIU, 1995; LIU, 2005). As inúmeras atividades terapêuticas descritas para os AT têm levado a um aumento gradativo no interesse por essa classe de substâncias. O potencial de utilização como ingredientes ativos em produtos medicamentosos, cosméticos e alimentos funcionais, tem induzido a busca por fontes de AT no reino vegetal (JÄGER *et al*, 2009; SZAKIEL *et al*, 2012).

Entre os tecidos vegetais onde ocorrem os AT como os ácidos betulínico (AB), oleanólico (AO) e ursólico (AU), estão as cutículas vegetais que revestem as folhas e os frutos. Estas películas possuem uma estrutura polimérica básica, formada pela cutina. Esta é um biopolímero constituído de ésteres cruzados de ácidos graxos hidroxilados e epoxilados com ácidos fenilpropanóicos. A cutícula possui funções variadas nas folhas e frutos, entre proteger os órgãos dos diversos estresses bióticos e abióticos, regular o transporte de água, gases e nutrientes (BRINGE *et al*, 2006; KOLATTUKUDY, 1980), fixando em uma única matriz tanto as substâncias hidrofílicas quanto as lipofílicas (JU; BRAMLAGE, 1999). Entre os materiais lipofílicos encontram-se as chamadas ceras epicuticulares e intracuticulares, que exercem o papel de prevenir o envelhecimento destes órgãos induzidos por oxidações químicas climáticas ou sazonais indesejáveis (WHITAKER, 1998). Esta cera se compõe basicamente de alcanos lineares, alcoóis e ácidos graxos, abrangendo ainda, em sua composição, os AT, que chegam a alcançar, em determinados casos (como as cascas de maçãs), até 35% de seu conteúdo (BRINGE *et al*, 2006; JETTER; SCHAFFER, 2001). Dessa maneira, a prospecção para a presença de AT em folhas e cascas de frutos representa uma abordagem que utiliza substratos renováveis para a busca de substâncias ativas a partir da diversidade vegetal.

Entre as famílias botânicas descritas como possuindo AT estão as Myrtaceae. A família Myrtaceae compreende mais de 131 gêneros com cerca de 4500 espécies (STEVENS, 2001). É considerada uma das famílias mais importantes no Brasil devido à sua relevância na Mata Atlântica. As espécies desta família são extensivamente estudadas tanto para caracterização farmacognóstica, quanto química. Seus metabólitos secundários apresentam atividades farmacológicas diversas, sendo os AT objeto de estudo nesta dissertação, especificamente o AB, AO e AU. Os gêneros da família Myrtaceae abordados neste trabalho apresentam estes ácidos em suas folhas (FRIGHETTO *et al*, 2005a). Por este motivo, a maior parte das espécies foi selecionada com base em descrições prévias na literatura sobre o conteúdo em AT (FRIGHETO *et al*, 2005a; PEREIRA *et al*, 2005; DOMINGUES *et al*, 2010), completada por espécies selecionadas por possíveis correlações taxonômicas (FRIGHETTO *et al*, 2005b).

Esta dissertação apresenta o desenvolvimento de um processo de extração e purificação de AT a partir de folhas de espécies de Myrtaceae, utilizando o tratamento das folhas secas com álcali em meio alcoólico. Este procedimento foi inspirado na aplicação de soluções de álcali – hidróxidos de sódio (NaOH) ou de potássio (KOH) em álcool etílico (EtOH) ou metílico (MeOH), que é descrita na literatura para duas finalidades principais: (1) promover a hidrólise da cutina e estudar sua própria composição química, principalmente em termos de ácidos graxos hidroxilados (HOLLOWAY; DEAS, 1973); e (2) analisar os componentes lipofílicos ácidos dos extratos (incluindo AT). Assim, este método tem sido aplicado na partição de extratos obtidos com solventes orgânicos variados (e não diretamente sobre a matriz vegetal), visando isolar e caracterizar AT (HUELIN; GALLUP, 1951, HUELIN, 1959; CHIBNALL *et al*, 1931; HUI; MAN-MOON, 1976), ou ainda a prospecção de ácidos de valor terapêutico em geral, ou ácidos graxos em matrizes e resíduos vegetais utilizados na indústria, como a polpa de eucalipto (PEREIRA *et al*, 2005; DOMINGUES *et al*, 2010; DOMINGUES *et al*, 2011). A hidrólise da cutina por álcali, visando eliminá-la para facilitar o estudo de outros metabólitos presentes nas folhas e frutos, ficou conhecida como reação de despolimerização da cutina (KOLATTUKUDY, 1980), com o polímero poliéster resultando na mistura de ácidos graxos e fenóis.

O presente estudo visa a avaliar a ação do alcoolato diretamente sobre a matriz vegetal, dessa maneira economizando a etapa no processo relativa à

obtenção do extrato com solvente orgânico. Em resumo, as etapas do trabalho proposto consistem em: (1) Obter e preparar a matéria-prima vegetal (folhas de espécies de Myrtaceae); (2) Aplicar um protocolo uniforme de extração, com base na ação do hidroalcoolato (NaOH 2% em EtOH) sobre as matrizes selecionadas; (3) Desenvolver método de análise por Cromatografia em fase Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (CG-DIC) para traçar o perfil químico quantitativo dos extratos obtidos; (4) Ensaiar a inserção de uma operação subsequente, por Extração em Fase Sólida (EFS), visando à pré-purificação do conjunto de AT resultante; esta orientada por solventes selecionados via Parâmetros de Solubilidade de Hansen (HSP); e (5) Separar os AT individuais a partir de extratos selecionados entre aqueles que representam a maior eficiência de processo em termos de rendimento e seletividade.

A caracterização e a quantificação de AT são realizadas usualmente por técnicas cromatográficas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e CG-DIC (GU *et al*, 2006; WÓRJCIAK-KOSIOR, 2007; GUO *et al*, 2009). Entretanto, para o bom desempenho, particularmente a técnica de Cromatografia em fase Gasosa (CG) exige a derivatização dos AT, principalmente esterificando os grupos hidroxilados por metilação (grupos ácidos) ou sililação (grupos ácidos e álcoois) (RAZBORŠEK *et al*, 2008; LIMA *et al* 2014).

Os ácidos abordados no presente estudo são monohidroxilados, porém, outros AT provenientes da mesma rota biossintética podem apresentar duas ou três hidroxilas em sua estrutura (di- ou tri-hidroxilados), e também são passíveis de extração no processo álcali em meio alcoólico. A purificação de AT, em particular de AB, AO e AU, aparece na literatura como objeto de estudo recente, sem menção da utilização de parâmetros teóricos de solubilidade (CSUK; SIEWERT, 2011; DING *et al*, 2012).

Em virtude do exposto, a obtenção de extratos enriquecidos em AT ou o isolamento destas substâncias atende à necessidade de produção de substâncias de origem vegetal com alto potencial terapêutico, considerando especificamente AB, AO e AU. Atualmente, um dos principais alvos terapêuticos explorados para a ação dos AT é a atividade antitumoral (SALVADOR, 2011). Por outro lado, a utilização de matéria-prima renovável para tal produção, como as folhas de espécies da flora

brasileira tem ganhado estímulo universal como um movimento da Química Verde ou Química Sustentável.

A dissertação está estruturada em cinco capítulos. O Capítulo 1 estabelece uma relação entre as etapas realizadas, contextualizando-as brevemente com trabalhos realizados e apresenta os objetivos e a justificativa para tal pesquisa.

O segundo capítulo apresenta o desenvolvimento da contextualização iniciada no Capítulo 1, considerando os fundamentos teóricos que dão base ao postulado na investigação proposta. Serão abordados os seguintes temas: (1) A família botânica Myrtaceae, em destaque para as espécies estudadas; (2) Os AT, com ênfase em suas características químicas e farmacológicas; (3) O processo de extração e purificação dos AT, abordando o uso de álcali (NaOH ou KOH) em meio alcóolico (EtOH ou MeOH) já apresentados na literatura e os demais processos que geraram patentes; (4) Os Parâmetros de solubilidade de Hansen e sua aplicação na extração em fase sólida, e (5) Métodos de análise de AT para caracterização e quantificação, considerando diferentes técnicas e apresentando alternativas para o processamento de amostras.

O Capítulo 3 descreve os equipamentos utilizados no procedimento experimental e apresenta em detalhes a metodologia utilizada para as etapas: (1) Extração; (2) Método de análise; (3) Solubilidade de Hansen e (4) Purificação e isolamento dos AT.

O quarto capítulo apresenta os resultados obtidos, seguindo-se a análise e discussão destes, em cada processo apresentado.

O último capítulo descreve as principais conclusões obtidas com o estudo proposto e apresenta sugestões e/ou mudanças propostas para a melhoria dos processos de extração e purificação de AT em folhas de Myrtaceae.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A DIVERSIDADE VEGETAL COMO FONTE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS: A FAMÍLIA BOTÂNICA MYRTACEAE

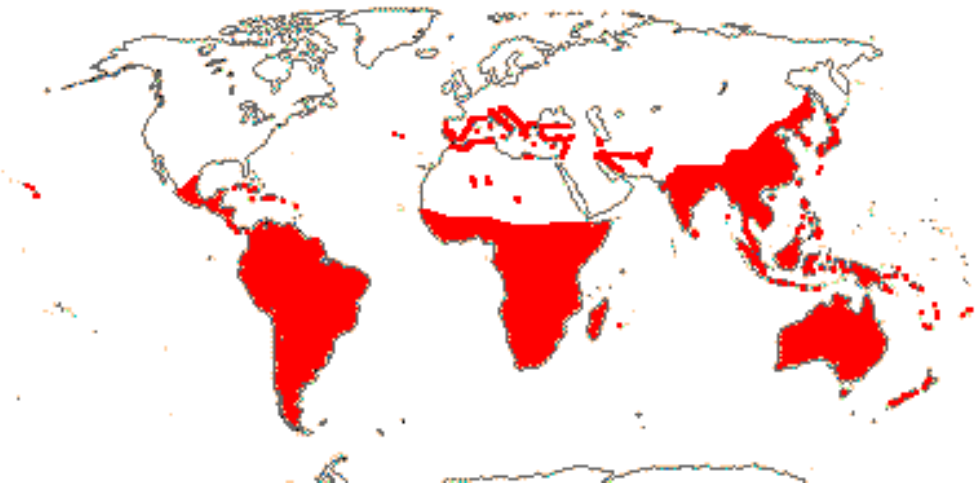
Desde tempos remotos, o reino vegetal tem sido explorado por todas as culturas do mundo, com o intuito de introduzir melhoras na qualidade de vida cotidiana das pessoas. Isto tem ocorrido de inúmeras maneiras, que incluem as descobertas de moléculas bioativas para cura ou alívio de doenças. Um dos exemplos mais proeminentes é história da aspirina (ácido acetil salicílico), sintetizada em 1898 por Felix Hofmann, que foi o resultado de um trabalho contínuo realizado na química de produtos naturais. Contudo, o início desta descoberta remonta ao ano de 1757, quando Edward Stone observou as propriedades analgésicas e antipiréticas de extratos de *Salix alba*, fonte de salicina, um glicosídeo natural, que deu início ao interesse dos estudiosos nas propriedades farmacológicas desta espécie (VIEGAS *et al*, 2006).

Desde o tratamento de malária com a artemisinina (princípio ativo observado em espécies de *Artemisia*), até o de tumores sólidos com o paclitaxel (diterpeno que ocorre em *Taxus brevifolia*) (BARREIRO; BOLZANI, 2009), as espécies de famílias botânicas foram constantemente utilizadas na descoberta de novos fármacos, sejam eles sintéticos ou semissintéticos. Embora os últimos 30 anos (até 2010) tenham sido caracterizados pela descoberta de um enorme conjunto de moléculas provenientes de fontes naturais, apenas uma substância, recentemente descoberta com atividade antitumoral, deu origem a um medicamento – o sorafenibe (Nexavar), o qual foi aprovado em 2005, para o tratamento de carcinoma hepatocelular (NEWMAN; CRAGG, 2012). Este fato demonstra que há um longo e seletivo caminho para que uma molécula natural possa se tornar um medicamento, segundo as diretrizes da metodologia científica, que é a base dos sistemas regulatórios em geral.

O Brasil tem a maior biodiversidade vegetal do planeta, e sua flora possui inúmeras espécies endêmicas que ocorrem apenas em seu território. Por isso, consistem em fontes valiosas para serem exploradas visando produtos voltados para a saúde humana, e serem transformadas em medicamentos, cosméticos ou mesmo novos alimentos.

A família botânica Myrtaceae pertence à ordem Myrtales e compreende mais de 131 gêneros com cerca de 4500 espécies (STEVENS, 2001), que estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É uma das famílias Neotropicais mais importantes (MABBERLEY, 1997), constituída por plantas arbóreas lenhosas. No Brasil são encontrados cerca de 20 gêneros e mil espécies (LANDRUM; KAWASAKI, 1977). As espécies desta família são muitas vezes dominantes em diversos habitats na Mata Atlântica no Brasil, contudo difundem-se na extensa área continental das Américas do Sul e Central, como mostrado na Figura 1.

As Myrtaceae desempenham um importante papel ecológico nas florestas em que ocorrem devido à produção de frutos carnosos e comestíveis. Este é um atrativo para os animais que dispersam as sementes (MORI *et al*, 1983; TABARELLI; PERES, 2002) e contribuem para a manutenção do sistema ecológico e diversidade ambiental onde ocorrem (BARROSO; PERON, 1994).



Fonte: STEVENS, 2001.
Figura 1: Distribuição de Myrtaceae no mundo.

O cultivo de algumas espécies de Myrtaceae já está estabelecido visando consumo humano *in natura*, ou por intermédio de produtos comestíveis como sucos e geleias, entre outros, como é o caso, por exemplo, da pitanga (*Eugenia uniflora* L.), jabuticaba (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel), goiaba (*Psidium guajava* L.) e camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh), entre outras. Além disso, são utilizadas para fins paisagísticos e ornamentais (LORENZI, 2009). Entre os gêneros mais importantes de Myrtaceae no Brasil estão: *Eugenia* (cerca de 550 espécies), *Myrcia*

*(*cerca de 220 espécies), *Psidium* e *Syzygium* (este de origem asiática) (LANDRUM; KAWASAKI, 1977).

Espécies de Myrtaceae produzem óleos essenciais e acumulam em suas folhas e frutos (RAMOS *et al*, 2010), bastante explorada comercialmente para as espécies australianas dos gêneros *Eucalyptus* e *Melaleuca* (*tea tree*). As espécies de Myrtaceae também se destacam como medicinais na terapêutica tradicional e popular, tendo sido alvo de diversos estudos farmacológicos. Como exemplos, para o uso das folhas, destacam-se a atividade diurética e hipotensora da pitanga (SCHMEDA-HIRCHMANN *et al*, 1987), antidiabética do jamelão (SAH; VERMA, 2011) e antidiarreica da goiaba (BALA; ADAMU, 2008). Além destas, outras atividades farmacológicas e medicinais são descritas para espécies de Myrtaceae, como antipirética, anti-inflamatória e antimicrobiana (PEPATO *et al*, 1993; FERREIRA *et al*, 2006; AMORIM *et al*, 2009; BRANDELLI *et al*, 2009).

Além dos óleos essenciais, constituídos principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos, as espécies desta família são conhecidas por produzir compostos polifenólicos (taninos e flavonoides) (LEE *et al*, 1997) e triterpenos em geral, onde se destacam os AT (FRIGHETTO *et al*, 2005b). Os gêneros de Myrtaceae escolhidos para este trabalho foram: *Eugenia*, *Psidium* e *Syzygium*. O uso das folhas como fonte de matéria prima para a pesquisa é considerado relevante, por se tratar de uma fonte renovável. As espécies utilizadas foram *Eugenia brasiliensis* Lam. (Figura 2), *Eugenia florida* DC. (Figura 3), *Eugenia uniflora* L. (Figura 4), *Psidium cattleyanum* Sabine (Figura 5), *Psidium guajava* L. (Figura 6) e *Syzygium cumini* (L.) Skeels. (Figura 7).

Figura 2: Imagem de *Eugenia brasiliensis.* Foto por A. C. Siani.

Figura 3: Imagem de *Eugenia florida.* Foto por A. C. Siani.

Figura 4: Imagem de *Eugenia uniflora.* Foto por A. C. Siani.

Figura 5: Imagem de *Psidium cattleyanum.* Foto por A. C. Siani.

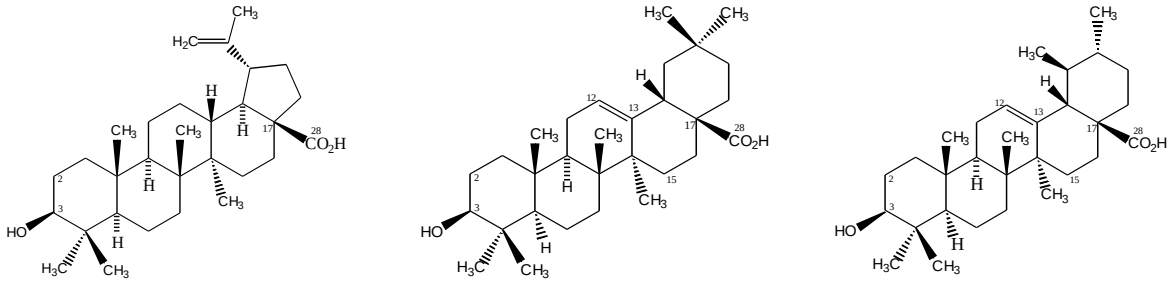
Figura 6: Imagem de *Psidium guajava.* Foto por A. C. Siani.

Figura 7: Imagem de *Syzygium cumini.*
Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Syzygium_cumini_flowers.JPG

2.2 ÁCIDOS TRITERPÊNICOS

Os AT são metabólitos vegetais secundários comuns em plantas superiores, cuja função está associada à coexistência de lipídios e componentes hidrofílicos presentes em diversos órgãos vegetais, exercendo proteção contra água e perdas de nutrientes causadas por fatores de estresse bióticos e abióticos (BRINGE *et al*, 2006). Além disso, fazem parte do arsenal de defesa química das plantas contra organismos patógenos e herbívoros (FLORES-SÁNCHEZ *et al*, 2002).

Os derivados de ácidos mais comuns pertencem aos triterpenos das séries oleanano, ursano e lupano, que apresentam o grupo hidroxila na posição C-3 e um grupo carboxila em C-28, derivando, respectivamente, os três AT mais abundantes: oleanólico (ácido 3β-hidroxi-olean-12-en-28-oico), ursólico (ácido 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oico), e betulínico (ácido 3β-hidroxi-lup-20 (29)-en-28-oico) (Figura 8).



I (esqueleto lupano) **II** (esqueleto oleanano) **III** (esqueleto ursano)

I. Ácido betulínico = ácido 3β-hidroxilup-20 (29)-en-28-oico (triterpeno da série lupano): $C_{30}H_{48}O_3$ (PM= 456, 70).
II. Ácido oleanólico = ácido 3β-hidroxiolean-12-en-28-oico (triterpeno da série oleanano): $C_{30}H_{48}O_3$ (PM= 456, 70).
III. Ácido ursólico = ácido 3β-hidroxiursan-12-en-28-oico (triterpeno da série ursano): $C_{30}H_{48}O_3$ (PM= 456, 70).
Figura 8: Estruturas químicas dos AT: Ácido Betulínico (I), Ácido Oleanólico (II) e Ácido Ursólico (III), selecionados para prospecção.

Os ácidos AB, AO e AU são isômeros e derivam biossinteticamente do 2, 3-oxido esqualeno (via do mevalonato) (BREITMAIER, 2006), sendo produzidos por subsequentes reações de ciclização. Metabólitos do mesmo tipo, porém mais funcionalizados, derivam de variações na presença e posição de ligações duplas na estrutura pentacíclica, bem como a presença de grupos químicos adicionais (hidroxilas, cetona, etc.).

De maneira geral, os três AT mencionados na Figura 8, ocorrem naturalmente em alimentos, frutos e ervas, possuindo papel importante em muitos produtos

terapêuticos da Medicina Tradicional Chinesa (DUFOUR *et al*, 2007), ou ainda representando marcadores químicos em plantas medicinais e alimentos funcionais (CUI *et al*, 2006).

Uma compilação recente aponta cerca de 40 fontes vegetais, entre diferentes partes de plantas e resíduos da indústria de alimentos, que possuem acima de 0,1% do peso seco em conteúdo de AT, quando obtidos por extração acelerada com solventes (JÄGER *et al*, 2009). Entre as fontes mais comuns de AB estão a bétula (betulina como precursor industrial) (LASZCZYK *et al*, 2006) e as folhas de plátano (GALGON *et al*, 1999). Como fontes representativas do AO estão as folhas e bagaço do fruto de oliveira (SÁNCHEZ-ÁVILA *et al*, 2009), brotos de visco (JUAN *et al*, 2006), flores de cravo (CAI; WU, 1996) e raízes de lantana (BANIK; PANDEY, 2008). O AU está presente principalmente nas cascas de maçãs (FRIGHETTO *et al*, 2008) e algumas rosáceas medicinais (LIN *et al*, 2011). É usual a matriz vegetal apresentar uma mistura às vezes equitativa de AT, como nas folhas de alecrim (RAZBORŠEK *et al*, 2008).

As propriedades farmacológicas dos AT são descritas extensivamente para uma grande variedade de derivados e alvos terapêuticos. Neste aspecto, AO e AU foram exaustivamente revistos nas últimas duas décadas (LIU, 1995; 2005), evidenciando sua atividade anti-inflamatória (DUFOUR; PICHETTE *et al*, 2007), antitumoral (ACHIWA *et al*, 2005), hepatoprotetora, antiviral, anti-diabetogênico, antioxidante, e diversas outras (RONG *et al*, 2011). O AO já é comercializado como um medicamento sem prescrição na China, para o tratamento de doenças de fígado humano, como a hepatite aguda e crônica (XI *et al*, 2009). O AB tem atraído a atenção científica devido à sua ampla atuação terapêutica, entre as quais se destacam a atividade anticâncer (CHINTHARLAPALLI *et al*, 2007) e propriedades antivirais, em especial anti-HIV (AIKEN; CHEN, 2005; FULDA, 2008).

2.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AT

A obtenção de AT a partir de matrizes vegetais tem sido efetuada pelo emprego de solventes orgânicos apropriados, segundo a finalidade desejada. Usualmente utiliza-se álcool, acetato de etila ou solventes clorados (DOMINGUES *et al*, 2010; ROMERO *et al*, 2010; DOMINGUES *et al*, 2011). Métodos de extração variados são empregados, entre eles, a maceração à temperatura ambiente

(GUINDA *et al*, 2010); extração assistida por ultrassom (SÁNCHEZ-ÁVILA *et al*, 2007); refluxo por aquecimento; uso de aparato de Soxhlet ou, microondas, etc. (GOULAS; MANGANARIS, 2012).

Os procedimentos também variam em conformidade com o objetivo da separação, incluindo por vezes solventes menos polares (BANIK; PANDEY, 2008; SCHNEIDER *et al*, 2009; TARVAINEN *et al*, 2010) e partições para eliminar os lipídios mais comuns, como alcanos e ácidos graxos, presentes nas matrizes (JEONG *et al*, 2009). Extrações sequenciais da matriz com solventes de polaridades crescentes também são normalmente utilizadas (PAINULY; TANDON, 1983). Os exemplos são inúmeros na literatura, e esses métodos têm sido extensivamente aplicados a diversos órgãos vegetais, como folhas, partes aéreas de plantas em geral, frutos, madeira, raízes, etc., além de resíduos específicos das indústrias alimentícias e da madeira (DOMINGUES *et al*, 2010).

Alguns processos de extração e separação de AT foram objetos de patentes; geralmente aplicados a matrizes de interesse comercial e incorporando algumas variações específicas, ou explorando alguma propriedade dessas substâncias. Um rápido levantamento num banco de patentes (EPO, 2013), buscando-se o processo de extração de AU (como exemplo de AT), resultou em cerca de uma dezena de processos, onde se destacam métodos envolvendo: (1) planta unha-de-gato (*Uncaria*) utilizando álcool, seguido de partição e purificação (SHANDONG, 2010); (2) folhas de nespereira, utilizando a técnica de cromatografia de contracorrente, (GUILIN, 2009); (3) folhas secas e pulverizadas de caquizeiro, utilizando etanol 95% e ultrassom (XIE, 2008); (4) cravo Dian seco e moído, por repetidas macerações à temperatura ambiente em etanol 95% seguido de cromatografia de exclusão (metanol em Sephadex LH-20) (HENAN, 2009); (5) refluxo das “lascas” de *Crataegus* sp. com solução alcoólica alcalina (QINGDAO, 2008); e (6) maçãs, com álcool hidratado seguido de tratamento com resina macroporosa (WUHAN, 2010).

A presença e os procedimentos de extração e separação de AT em espécies de Myrtaceae também foi buscado num levantamento bibliográfico na base de dados SciFinder (SCIFINDER, 2013), utilizando como palavra-chave “triterpene acid” e os principais gêneros da família relevantes para este estudo. O resultado levou a uma compilação de 165 artigos, abarcando 14 gêneros (entre eles, *Eugenia*, *Psidium* e *Syzygium*, pertinentes a esta pesquisa) e 68 espécies. Os artigos descrevendo triterpenos não ácidos e outras substâncias não estão aqui computados.

O levantamento dos métodos aplicados às diferentes partes de Myrtaceae para a obtenção de AT corrobora e amplia os procedimentos acima mencionados para a separação destas substâncias, entre aqueles comumente utilizados na escala de bancada. Contudo, são dignos de nota os procedimentos baseados em hidrólises alcalinas (KOH) para obter misturas concentradas em AT; como aqueles em meio aquoso, aplicado aos lipídios cuticulares de folhas de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (PEREIRA *et al*, 2005), ou em meio metanólico, aplicado às suas cascas externas que sobram da indústria papeleira (DOMINGUES *et al*, 2010; DOMINGUES *et al*, 2011). Todavia, estes estudos foram focados na prospecção qualitativa de AT, não atentando para possível produção escalonada da molécula purificada.

O método da extração alcalina foi importante durante os estudos promovidos na investigação da estrutura e composição da cutina, principalmente em termos dos ácidos graxos hidroxilados que constituem o polímero. Esta composição foi relacionada com a capacidade protetiva que a cutícula foliar exerce nas folhas, que são vitais para a respiração e sobrevivência do vegetal como um todo (EGLINTON; HUNNEMAN, 1968; BAKER, 1970; BAKER; HOLLOWAY, 1970; HOLLOWAY; DEAS, 1973). No caso dos frutos, esta composição é importante para os estudos relacionados à durabilidade, principalmente no período pós-colheita, quando o valor comercial está relacionado à sua qualidade e capacidade nutricional.

Visando a separação de AT, o tratamento de extratos, usualmente alcoólicos, com soluções alcalinas aquosas tem sido relatado desde a década de 1950, com os primeiros estudos sendo realizados sobre as cascas de espécies australianas de Myrtaceae (WHITE; ZAMPATTI, 1952; CORBETT; McCRAW, 1959) e a goiaba sul-americana (ARTHUR; HUI, 1954). Apesar de o tratamento alcalino ter sido eventualmente aplicado durante partições de extratos oriundos de espécies de Myrtaceae (WANG; FUJIMOTO, 1993), este procedimento foi gradualmente abandonado, com o intuito de evitar a degradação de outras moléculas presentes no extrato, de interesse eventual, que fossem suscetíveis a este tratamento específico. Todavia, a retomada deste método nas descrições de algumas patentes, demonstra que podem ser extremamente úteis, de baixo custo e ambientalmente amigáveis, a depender dos extrativos que se têm como alvos, como é o caso dos três ácidos nesta pesquisa.

Uma técnica que, de maneira crescente, vem sendo aplicada na obtenção de extratos enriquecidos e na purificação de AT, tem sido a EFS. A depender da

composição da matriz vegetal, há descrições na literatura referentes ao isolamento de AT (individuais ou em misturas), envolvendo cartuchos contendo fases estacionárias variáveis eluídas por solventes de polaridades distintas e sequenciados por combinações adequadas. Alguns exemplos de pré-purificação de matrizes contendo AT incluem:

- extrato medicinal de 'tansagem' (*Plantago major*) obtidos em etanol ou por fluido supercrítico, eluído com *n*-heptano e etanol, em cartuchos com fase reversa C-18 condicionados com etanol (STRÖMSTEDT *et al*, 2013);
- extratos de várias lamiáceas medicinais, obtidos com mistura etanol:tertraidrofurano, eluído com os mesmos solventes separados, em cartuchos de carbono grafitizado condicionados com etanol (RAZBÓRZEK *et al*, 2008);
- extrato metanólico ou etéreo, condicionados e eluidos com metanol, em cartuchos de sílica derivatizada com grupos amino quaternários (TARVAINEN *et al*, 2010);
- amostras de óleo de oliva eluídas com éter etílico:ácido acético, em cartuchos de aminopropil condicionados com metanol (PÉREZ-CAMINO; CERT, 1999);
- extrato medicinal de alcaçuz eluído com metanol, em cartuchos de polímero específico, gerado por metacrilato e etilenoglicol, condicionado com clorofórmio ou acetonitrila (CLAUDE *et al*, 2008).
- extratos de várias plantas medicinais, eluídos com metanol, em cartuchos de amônio quaternário, condicionado com água (JANICSÁK *et al*, 2003).

Conforme descrito nestes exemplos selecionados, a técnica de EFS tem sido utilizada, tanto para (1) preparar amostras mais concentradas em AT e limpas (*clean up*), no sentido de melhor viabilizar a análise qualitativa e quantitativa de extratos contendo estas substâncias; quanto para (2) embasar o aumento de escala de experimentos de purificação de AT de matrizes vegetais específicas.

2.4 PARÂMETROS DE SOLUBILIDADE DE HANSEN (HSP)

Como uma evolução dos trabalhos de Hildelbrand, da década de 1950 (BARTON, 1985), os parâmetros de solubilidade de Hansen (HSP) são parâmetros que permitem a avaliação de miscibilidade entre solventes e sua aplicação data de 1967 (HANSEN, 2007). A evolução e consolidação deste conceito tem possibilitado a previsão teórica de uma série de fenômenos químicos e físicos, o que gera um impacto positivo nas relações custo-benefício nas práticas que envolvem solvatação molecular em geral. Entre as áreas de aplicação, estão os métodos de extração de substâncias de interesse que estão presentes em matrizes de natureza variada, onde a relação solvente-soluto é crucial para o êxito dos experimentos.

O parâmetro de solubilidade é avaliado pelo potencial de energia molar de um líquido ($-e^0$) em seu volume molar (V_m); sendo esta a base da teoria de HSP. Para fins de cálculo, $-e^0$ é substituído pela energia de evaporação (ΔE), calculado pela raiz quadrada da densidade de energia coesiva de um líquido. Segundo Hansen (2007), a densidade de energia coesiva de um líquido é composta por três fatores: força de dispersão atômica – D, atribuída às forças de London; forças de dipolo-dipolo moleculares permanentes – P, forças polares e forças moleculares de ligações de hidrogênio – H. ΔE, então, é dado pelo somatório das três forças que a compõe, originando na equação básica que rege HSP (Equação 1).

$$\Delta E = \Delta E_d + \Delta E_p + \Delta E_h \qquad \text{(Equação 1)}$$

Usualmente o HSP é determinado a 25 ˚C, sendo possível que seja recalculado para outras temperaturas. Neste caso, assume-se que todos os parâmetros sofrem influência da temperatura da mesma forma; o que não ocorre na realidade (HANSEN, 2007). A utilidade mais prática e básica do HSP é que solventes com parâmetros de solubilidade próximos são prontamente miscíveis, enquanto solventes com parâmetros de solubilidade distantes são praticamente imiscíveis (HANSEN, 2007). HSP pode ser calculado utilizando o *software* HSPiP®, produzido e disponibilizado pela equipe de Hansen, ou através de fórmulas apresentadas por outros autores, como nos métodos de contribuição de grupos (STEFANIS; PANAYIOTOU, 2008).

Hoftyzer e van Krevelen introduziram em 1976 um método para o cálculo de HSP, alternativamente ao de Hansen. Este método é baseado na contribuição de grupos funcionais presentes na estrutura da substância. Stefanis e Panayiotou demonstraram em 2008, um método de contribuição de grupos mais eficiente, onde as considerações de grupos funcionais de primeira ordem, que descrevem a estrutura molecular básica, e de segunda ordem, que são baseados na teoria de conjugação, são a base dos cálculos (STEFANIS; PANAYIOTOU, 2008). Isto posto, a equação básica que fornece os valores de cada parâmetro da estrutura molecular é dada pela Equação 2:

$$f(x) = \sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j \qquad \text{(Equação 2)}$$

onde C_i é a contribuição dos grupos funcionais de primeira ordem, que ocorrem N_i vezes, D_j é a contribuição dos grupos funcionais de segunda ordem, que ocorrem M_j vezes na estrutura e a constante *W* é igual a 1 ou a 0, dependendo se a substância apresenta ou não grupos de segunda ordem, respectivamente.

Os parâmetros: forças de dispersão atômica (δ_d), forças de dipolo-dipolo moleculares permanentes (δ_p) e forças moleculares de ligações de hidrogênio (δ_h) são calculados através das Equações 3, 4a e 5a, respectivamente. As Equações 4b e 5b são usadas quando os valores de δ_p e δ_h, calculados pelas Equações 4a e 5a, respectivamente, forem menores que 3 $\mathrm{MPa}^{\left(\frac{1}{2}\right)}$.

$$\delta_\mathrm{d} = \left(\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 17{,}3231\right) \mathrm{MPa}^{\left(\frac{1}{2}\right)} \qquad \text{(Equação 3)}$$

$$\delta_\mathrm{p} = \left(\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 7{,}3548\right) \mathrm{MPa}^{\left(\frac{1}{2}\right)} \qquad \text{(Equação 4a)}$$

$$\delta_\mathrm{p} = \left(\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 2{,}7647\right) \mathrm{MPa}^{\left(\frac{1}{2}\right)} \qquad \text{(Equação 4b)}$$

$$\delta_\mathrm{h} = \left(\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 7{,}9793\right) \mathrm{MPa}^{\left(\frac{1}{2}\right)} \qquad \text{(Equação 5a)}$$

$$\delta_\mathrm{h} = \left(\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 1{,}3720\right) \mathrm{MPa}^{\left(\frac{1}{2}\right)} \qquad \text{(Equação 5b)}$$

Os cálculos demonstrados até o momento foram para efetuar os parâmetros parciais de solubilidade. Contudo, para calcular HSP total (δ_T), Bielicka-Daszkiewicz e colaboradores (2010) afirmam que a Equação 1 pode ser similarmente aplicada

substituindo a energia coesiva pela solubilidade total (Equação 6) e a aplicação do conceito de solubilidade pode ser extrapolada ao nível de interação molecular, uma vez que os parâmetros calculados compõem-se da estrutura molecular.

$$\delta_{\mathrm{T}}{}^{2} = \delta_{d}{}^{2} + \delta_{p}{}^{2} + \delta_{h}{}^{2} \qquad \text{(Equação 6)}$$

Estes cálculos são bastante úteis para aplicação em técnicas onde a interação molecular é de suma importância, como na EFS, uma técnica utilizada para separação e isolamento de substâncias. Sua eficácia depende da magnitude da interação entre o analito e o adsorvente, que pode ser estimada a partir dos valores de δ_{T} das substâncias, ou pela mínima diferença entre elas, que pode ser calculada pelo quadrado da diferença do valor de solubilidade total – $(\Delta\delta_T)^2$. Portanto, os valores de δ_{T}, podem ser aplicados em EFS para descrever as interações moleculares entre o par analito-solvente (BIELICKA-DASZKIEWICZ *et al*, 2010).

2.5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AT

A necessidade de obter extratos padronizados, com conteúdo químico uniforme, visando aplicação medicinal, cosmética ou alimentícia, tem gerado uma série de estudos nos últimos anos, voltados para a caracterização e quantificação destas moléculas. As descrições sobre métodos utilizados na recuperação de AT de tecidos vegetais, assim como sobre suas propriedades físico-químicas têm avançado até a literatura recente (GOULAS; MANGANARIS, 2012). Também as análises de identificação e quantificação de AT em complexos fitoquímicos têm sido descritas na literatura com mais assiduidade nos últimos 10 anos, quando é possível se notar o aumento de estudos sistemáticos envolvendo CLAE aplicada a estas substâncias, devido provavelmente não só aos avanços da técnica em si, que passou a ser aplicada com mais ênfase aos triterpenos, mas igualmente derivada do potencial biológico e farmacêutico que estes vêm assumindo (MARTELANC *et al*, 2009).

Para processos que exigem rápida detecção da presença de AT, a CCD ainda é uma ferramenta extremamente útil e ágil, principalmente quando a substância é disponível comercialmente (MARTELANC *et al*, 2009; TIAN *et al*, 2010). Também

neste contexto, algumas publicações têm sugerido refinamentos nas abordagens para separar e identificar AT (WÓJCIAK-KOSIOR, 2007).

A aplicação de CG, originalmente bastante utilizada, todavia menos utilizada nos anos mais recentes, vem ganhando novo fôlego com o refinamento dos métodos baseados na análise de derivados, principalmente por reagentes específicos de sililação. Por exemplo, os AT trimetilsililados e o emprego de suportes cromatográficos mais polares nas colunas têm resultado em melhores separações e menores tempos de análises dos extratos contendo AT (RAZBORŠEK, 2008; LIMA *et al*, 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLVENTES, REAGENTES E PADRÕES QUÍMICOS

- Acetonitrila grau HPLC/Spectro, Tedia (Fairfield, OH, USA), Lote: 1102215R
- Álcool etílico absoluto grau ACS, Tedia (Fairfield, OH, USA), Lote: 13040123
- Álcool metílico grau HPLC/Spectro, Tedia (Fairfield, OH, USA), Lote: 12080430
- Diclorometano grau ABSOLV, Tedia (Fairfield, OH, USA), Lote: 13020250
- Clorofórmio grau ACS, Tedia, Tedia (Fairfield, OH, USA): 1103179
- n-Hexano 95% grau ACS, Tedia (Fairfield, OH, USA), Lote: 1102512R
- Tolueno grau HPLC/Spectro, Tedia (Fairfield, OH, USA), Lote: 704069R
- Ciclohexano grau UV/HPLC, Vetec (Xerém, RJ, BRA), Lote: 982921
- Acetato de etila grau HPLC/Spectro, Tedia (Fairfield, OH, USA), Lote: 1007016R
- Éter dietílico grau PA/ACS, Merck (Darmstadt, HE, DEU), Lote: 1009211000
- N-metil-N-nitroso-*p*-tolueno-sulfonamida (Diazald®) Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)
- N- (trimetilsilil)imidazol, Fluka (St Louis, MO, USA), Lote: S45372 15007B14
- N- (trimetilsilil)imidazol, Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), Lote: STBC8850V
- Ácido clorídrico grau PA/ACS, Vetec (Xerém, RJ, BRA), Lote: 1007178
- Hidróxido de sódio lentilhas grau PA, Vetec (Xerém, RJ, BRA), Lote: 0800741
- Cartuchos de EFS sílica LC-Si 1g, Supelco, Lote: 2509601
- Ácido oleanólico (97%) Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) art. O5504, Lote: 093K0961
- Ácido betulínico (90%) Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) art. 91466, Lote: S43559-239
- Ácido ursólico (90%) Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) art. U6753, Lote: BCBD4525V

3.2 EQUIPAMENTOS

- Gerador de ultrassom USC (Indaiatuba, SP, BRA) 1850 A, frequência 25 kHz
- Balança Analítica BP 2215 (máx. 220 g d = 0,0001 g) Sartorius (Göttingen, DEU)
- Agitador mecânico IKA (Leiden, NLD) Modelo: K5501
- Estufa com aeração De Leo e Cia (Porto Alegre, RS, BRA)
- Liquidificador culinário, Britânia (Curitiba, PR, BRA)
- Rotavapor Buchi (Flawil, CHE) Modelo R-210
- Liofilizador Christ (Merrington, GBR) Modelo Beta 2-16
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama, modelo 6890 produzido por Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- Cromatógrafo a gás modelo 6890N acoplado a espectrômetro de massas mono quadrupolar modelo 5973N Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

3.3 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As folhas das seis espécies de Myrtaceae foram coletadas conforme descrição na Tabela 1, sendo secas em estufa a 45 °C sob fluxo constante de ar, até obtenção de peso constante. Após a secagem, as folhas foram trituradas em liquidificador, por 30 segundos ininterruptamente, para diminuição do tamanho de partícula. Este material foi tamisado em peneira de mesh 16, para uniformizar o tamanho das partículas utilizadas na extração.

Tabela 1: Dados gerais de coleta e identificação das espécies de Myrtaceae.

Espécie / data de coleta	Nome comum	Local de coleta	Geocoordenadas	Voucher[a]
Eugenia brasiliensis Lam. Outubro 2009	grumixama	Cultivada, campus da UNICAMP, Campinas, SP	S 22° 49´ 10.7´´ W 47° 04 27.1´´ alt. 604 m	RB 326234
Eugenia florida D.C. Outubro 2009	*guamirim-cereja, pitanga preta*	Zona urbana, Bairro Guará, Campinas, SP	S 22°47´ 29.8´´ W 47° 04´ 25.4´´ alt. 583 m	RFA 39907
Eugenia uniflora L. Julho 2010	*pitanga*	Campus da Fiocruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ	S 22° 52´ 36.4´´ W 43° 15´ 01.39´´ alt. 15 m	RB 361704
Syzygium cumini L. Skeels Julho 2010	*jambolão*, *jamelão*, *azeitona-da-terra*	Campus da Fiocruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ	S 22° 52´ 34.3´´ W 41° 15' 01.25´´ alt. 15 m	RB 380789
Psidium cattleyanum Sabine Junho 2010	*araçá, araçá comum, araçá-rosa*	Cultivada, jardim urbano, Campinas, SP	S 22° 53´ 20.3´´ W 47° 02´ 39.9´´ alt. 625 m	RB 361721
Psidium guajava L. Novembro 2013	*goiaba, guava*	Campus da Fiocruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ	S 22° 52´ 37.42´´ W 43° 15´ 02.15´´ alt. 13 m	RFA 39916

[a]RB = Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro; RFA = Herbário do Departamento de Biologia, UFRJ, Rio de Janeiro.

3.4 MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Protocolo 1: As folhas secas e moídas (25 g ou 40 g) foram imersas em uma solução 2% de NaOH em EtOH 95% (100 mL ou 180 mL) e agitadas em agitador orbital à temperatura ambiente durante 6 h. Em seguida, a mistura foi filtrada por gravidade em papel de filtro e o filtrado foi evaporado à pressão reduzida (rotavapor) até aproximadamente 10% de seu volume original. Ao resíduo foram adicionados 10 mL de uma mistura 1:1 de água:MeOH. À suspensão resultante, sob agitação e com auxílio de uma pipeta, foram adicionadas alíquotas sequenciais de solução de HCl 1,0 N, até pH 2. Formou-se a suspensão de um sólido, que foi deixada em repouso na geladeira por 1 h e então filtrada em papel de filtro n^{o} 4 com auxílio de um funil de Buchner e trompa de vácuo. O sólido branco ou amarelo pálido resultante foi inicialmente seco à temperatura ambiente; e depois deixado 48 h sob alto vácuo. Amostras deste sólido foram derivatizadas diretamente, para análise por CG. Os experimentos de extração foram conduzidos em triplicata.

Protocolo 2: Paralelamente, 150 g das folhas secas foram maceradas com *n*-hexano (250 mL) durante 4 dias à temperatura ambiente. A carga de solvente foi trocada e o procedimento repetido. Os filtrados foram misturados e em seguida o solvente foi removido em rotavapor, para originar o extrato hexânico bruto. Este foi analisado por CG, após derivatização das amostras. Após este tratamento, as folhas foram secas por exposição ao ar (capela), e em seguida submetidas ao procedimento de extração com NaOH em EtOH, de maneira idêntica ao descrito acima para as folhas íntegras. Estes experimentos também foram realizados em triplicata.

Um sumário dos protocolos das duas extrações (mesma matéria-prima) está esquematizado na Figura 9.

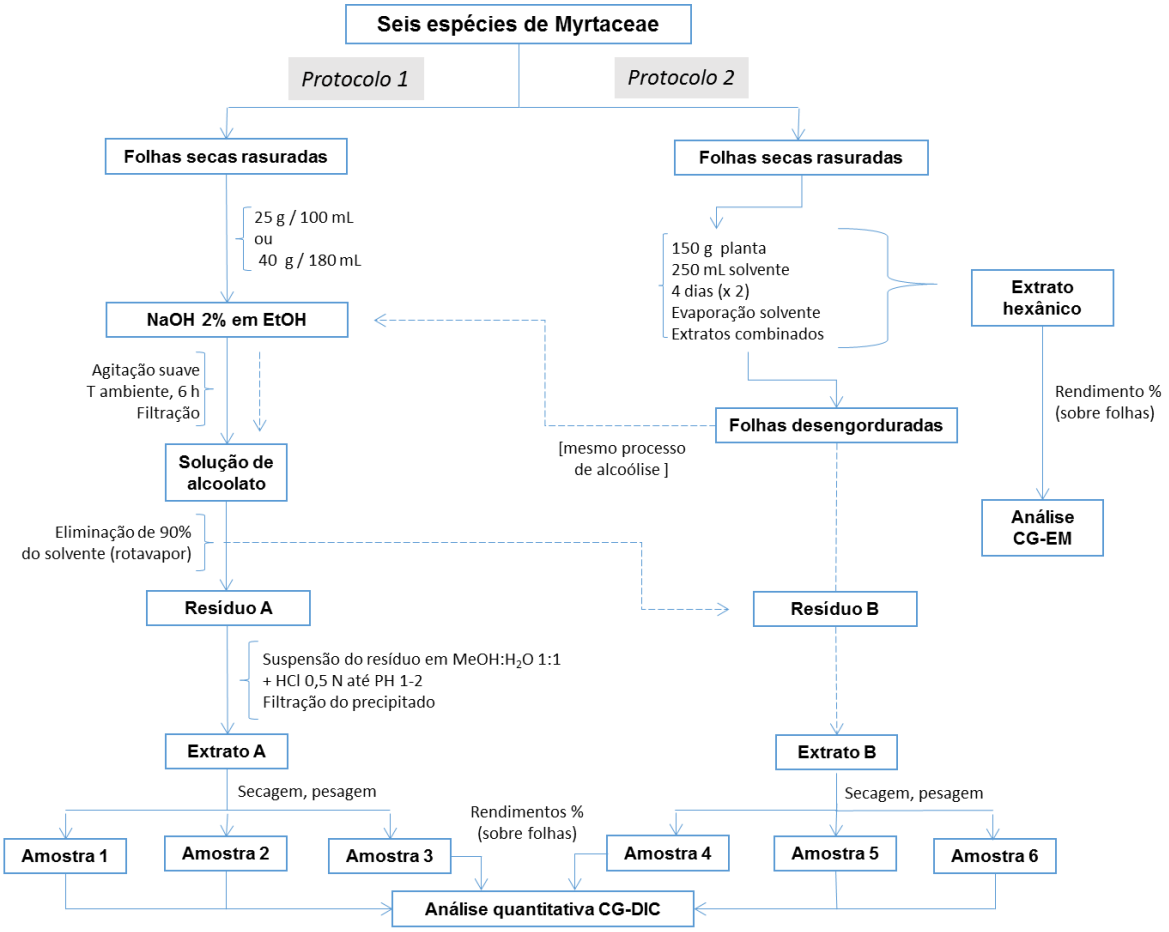


Figura 9: Esquema do protocolo de extração alcalina em EtOH

3.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES E AMOSTRA

3.5.1 Preparação de diazometano

Em um balão de fundo redondo de 125 mL, foram pesados 5 g de KOH. Estes foram dissolvidos em 8 mL de água destilada, com posterior adição de 30 mL de álcool etílico (Solução A). Em uma ampola de decantação de 100 mL, dissolveram-se 11 g de N-metil-N-nitroso-*p*-tolueno-sulfonamida (Diazald®) em 75 mL de éter etílico anidro (Solução B). A solução A foi aquecida em banho-maria na faixa de 55-65 ºC, com agitação constante. A este balão foram conectados uma ampola de adição com a solução B e um condensador reto refrigerado a ~8 ºC, contendo a saída direcionada a um balão coletor. A adição lenta da solução A sobre a solução B produz o diazometano gasoso, que foi então recolhido no balão coletor, dissolvido em éter etílico.

3.5.2 Soluções e curvas de calibração para os derivados metilados dos AT

Os padrões comerciais de AB (~10 mg), AO (~10 mg), AU (~20 mg) foram pesados num único balão volumétrico de 5 mL, no qual foram acrescentados 4 mL de diazometano em éter etílico, gerando uma mistura dos derivados: betulinato de metila, oleanolato de metila e ursolato de metila. Após evaporação do solvente com auxílio de uma corrente de nitrogênio, o resíduo foi ressuspendido em 5 mL de diclorometano no mesmo balão, para gerar uma solução estoque contendo concentrações de 2 mg/mL, 2 mg/mL e 4 mg/mL de AB, AO e AU, respectivamente. A partir desta solução estoque, foram preparadas nove soluções com concentrações correspondendo às diluições: 0,01, 0,02, 0,03, 0,06, 0,1, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 mg/mL para oleanolato e betulinato de metila e 0,02, 0,04, 0,06, 0,12, 0,2, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0 mg/mL para o ursolato de metila. Para obter as curvas de calibração, as amostras foram randomicamente dispostas no injetor automático do equipamento e injetadas no sistema CG-DIC em triplicatas. Para o ursolato de metila, foi utilizada uma única faixa de concentrações, compreendendo entre 0,06 a 1,2 mg/mL. Para oleanolato e betulinato de metila foram utilizadas duas faixas distintas deste intervalo: **Curva A**, entre 0,01 e 0,10 mg/mL, e **curva B**, entre 0,10 e 1,0 mg/mL, as quais foram utilizadas segundo a contribuição proporcional dos ácidos AB e AO para a composição dos extratos. Os dados de suporte à construção desta calibração estão dispostos na Tabela 2. Para definição do modelo estatístico, assim como para assegurar a constância nas respostas das análises, esta calibração, incluindo-se a preparação da solução estoque, foi repetida mais duas vezes, em distintos momentos, coincidentes com o início, meio e final da análise quantitativa dos AT.

Tabela 2: Concentrações de AT padrões utilizadas para obter as curvas de calibração dos derivados metilados

Solução Estoque				
		Massa (mg)	Volume (mL)	Conc. (mg/mL)
	AO	10,00	5,00	2,00
	AB	10,00		
	AU	20,00		4,00

Concentrações da Curva (AO e AB)					Concentrações da Curva (AU)				
	Alíquota (mL)	Volume (mL)	Conc. (mg/mL)			Alíquota (mL)	Volume (mL)	Conc. (mg/mL)	
Conc. 1	0,025	5,00	0,01	Faixa A	**Conc. 1**	0,025	5,00	0,02	
Conc. 2	0,050	5,00	0,02		**Conc. 2**	0,050	5,00	0,04	
Conc. 3	0,150	10,00	0,03		**Conc. 3**	0,150	10,00	0,06	
Conc. 4	0,300	10,00	0,06		**Conc. 4**	0,300	10,00	0,12	
Conc. 5[a]	0,500	10,00	0,10	**A e B**	**Conc. 5**	0,500	10,00	0,20	Faixa A
Conc. 6	0,200	1,00	0,40	Faixa B	**Conc. 6**	0,200	1,00	0,80	
Conc. 7	0,300	1,00	0,60		**Conc. 7**	0,300	1,00	1,20	
Conc. 8	0,400	1,00	0,80		**Conc. 8**	0,400	1,00	1,60	
Conc. 9	0,500	1,00	1,00		**Conc. 9**	0,500	1,00	2,00	

[a]concentração pertencente às duas Faixas (A e B) nas curvas de AO e AB

3.5.3 Preparação das amostras dos derivados metilados

Aproximadamente 3 mg dos sólidos obtidos nas extrações foram pesados e metilados pelo tratamento com 1 mL de diazometano em éter etílico recém-preparado. A mistura reacional foi deixada em repouso até evaporação completa do solvente, e o mesmo tratamento foi repetido. Após evaporação do éter, complementada sob fluxo de nitrogênio, as amostras esterificadas foram ressuspendidas em diclorometano (1,0 mL) antes da análise por CG-DIC.

3.5.4 Soluções e curvas de calibração para os derivados trimetilsililados dos AT

Padrões comerciais de AB, AO e AU foram submetidos à reação com reagente trimetilsilil imidazol (TMSI) para gerar os derivados: ácido 3-O-silil,28-O-silil-betulínico, 3-O-silil,28-O-silil-oleanólico e 3-O-silil,28-O-silil-ursólico, respectivamente. As soluções-padrão foram preparadas a partir de uma solução estoque contendo os padrões dos ácidos a uma concentração de 2 mg/mL para oleanólico e betulínico e 4 mg/mL para ursólico, em diclorometano. A total dissolução das substâncias foi assistida por ultrassom durante 10 minutos. Alíquotas

de 0,01, 0,02, 0,03, 0,06, 0,1, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mL desta solução estoque foram transferidas para tubos de ensaio e evaporadas com auxílio de corrente de nitrogênio. Os resíduos foram ressuspendidos em 2 mL de uma solução de acetonitrila:TMSI (1:1 v/v). Os tubos foram selados e aquecidos em banho-maria a 60 ºC durante 30 min, fornecendo as concentrações de suporte à construção da curva de calibração (0,01, 0,02, 0,03, 0,06, 0,1, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 mg/mL para os derivados de AB e AO; e 0,02, 0,04, 0,06, 0,12, 0,2, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0 mg/mL para o derivado de AU). As amostras foram randomicamente dispostas no injetor automático do equipamento e injetadas no sistema CG-DIC em triplicatas. Para o ursolato de trimetilsilila, foi utilizada uma única faixa de concentrações, compreendendo entre 0,06 a 1,2 mg/mL. Para oleanolato e betulinato de trimetilsilila foram utilizadas duas faixas distintas deste intervalo: **Curva A**, entre 0,01 e 0,10 mg/mL, e **curva B**, entre 0,10 e 1,0 mg/mL, as quais foram utilizadas segundo a contribuição proporcional de AB e AO para a composição dos extratos. Os dados de suporte à construção desta calibração estão explícitos na Tabela 3.

Tabela 3: Concentrações de AT padrões utilizadas para obter as curvas de calibração dos derivados sililados

Solução Estoque				
		Massa (mg)	Volume (mL)	Conc. (mg/mL)
	AO	10,00	5,00	2,00
	AB	10,00		
	AU	20,00		4,00

Concentrações da Curva (AO e AB)					**Concentrações da Curva (AU)**				
	Alíquota (mL)	Volume (mL)	Conc. (mg/mL)			Alíquota (mL)	Volume (mL)	Conc. (mg/mL)	
Conc. 1	0,010	2,00	0,01	Faixa A	**Conc. 1**	0,010	2,00	0,02	
Conc. 2	0,020	2,00	0,02		**Conc. 2**	0,020	2,00	0,04	
Conc. 3	0,030	2,00	0,03		**Conc. 3**	0,030	2,00	0,06	Faixa A
Conc. 4	0,060	2,00	0,06		**Conc. 4**	0,060	2,00	0,12	
Conc. 5[a]	0,100	2,00	0,10	**A e B**	**Conc. 5**	0,100	2,00	0,20	
Conc. 6	0,400	2,00	0,40	Faixa B	**Conc. 6**	0,400	2,00	0,80	
Conc. 7	0,600	2,00	0,60		**Conc. 7**	0,600	2,00	1,20	
Conc. 8	0,800	2,00	0,80		**Conc. 8**	0,800	2,00	1,60	
Conc. 9	1,000	2,00	1,00		**Conc. 9**	1,000	2,00	2,00	

3.5.5 Preparação das amostras para os derivados trimetilsililados

Em tubos de ensaios, 3 mg de cada amostra de extrato foram dissolvidos em 2 mL de diclorometano com auxílio de ultrassom por 10 min, sendo em seguida

evaporadas com auxílio de corrente de nitrogênio. Os resíduos foram ressuspendidos em 1 mL de uma solução de acetonitrila:TMSI (1:1 v/v). Os tubos foram selados e aquecidos em banho-maria a 60 ºC durante 30 min e, após reação de sililação, submetidas a análise por CG-DIC.

3.6 ANÁLISE QUANTITATIVA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM DETECÇÃO POR IONIZAÇÃO EM CHAMA (CG-DIC)

As análises quantitativas dos AT nas amostras metiladas e sililadas foram realizadas após o desenvolvimento do método analítico, que foi realizado com amostras dos extratos de *Eugenia brasiliensis*, onde os três ácidos (AB, AO e AU) estavam presentes, em diferentes proporções. O objetivo do desenvolvimento foi reduzir o tempo total de análise e maximizar a resolução (R_S) entre os sinais referentes aos AO e AB, então derivatizados como metil ou trimetilsilil ésteres.

Diversas condições analíticas foram ensaiadas utilizando as colunas capilares listadas a seguir:

- Coluna capilar de sílica fundida BP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) preenchida com 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (SGE, Vic, AUS)
- Coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) preenchida com 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (J&W Scientific, CA, EUA)
- Coluna capilar de sílica fundida DB-17HT (30 m x 0,32 mm x 0,15 µm) preenchida com 50% fenil e 50% metilpolisiloxano (J&W Scientific, CA, EUA)

3.7 ANÁLISE QUALITATIVA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

As amostras metiladas foram analisadas em um equipamento hifenizado CG-EM com IE a 70 eV, nas seguintes condições analíticas: coluna capilar DB-5MS (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25µ m espessura de filme); sistema de injeção a 270 ^{o}C no modo de divisão de fluxo, com razão de 10:1; programação de temperatura do forno de 150 ^{o}C a 290 ^{o}C com taxa de aquecimento de 4 ^{o}C/min e isoterma final por 30 minutos; tempo total de corrida de 65 minutos; hélio como gás carreador com vazão de 1 mL/min; temperatura da interface com o detector de 280 ^{o}C; volume de injeção

de 1μl; temperatura da fonte de ionização 230 ^{o}C; temperatura do quadrupolo 150 ^{o}C; modo de aquisição em varredura de 50 a 700 (m/z).

3.8 ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o *software* Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Os testes de Levene, Shapiro–Wilk's e Durbin-Watson foram utilizados para verificação do modelo linear das curvas de calibração, através da avaliação da homogeneidade das variâncias, distribuição dos resíduos e autocorrelação dos resíduos, respectivamente. Um nível de confiança de 95% foi considerado estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

3.9 ENRIQUECIMENTO DOS AT NOS EXTRATOS

3.9.1 Cálculo de Parâmetros de solubilidade de Hansen (HSP)

Para o cálculo de HSP, foi utilizado o método de contribuição de grupos de Stefanis e Panayiotou e a aplicação de HSP, neste trabalho, foi conduzida para predição de solventes e adsorventes que melhor se aplicassem no processo de purificação dos AT por EFS. As Equações 3, 4 (a e b) e 5 (a e b) foram usadas para calcular os parâmetros parciais e a Equação 6 foi usada para calcular o parâmetro total. A solubilidade de cada AT em diversos solventes foi avaliada através da diferença mínima entre eles ($(\Delta\delta_T)^2$).

3.9.2 Purificação dos extratos por Extração em Fase Sólida (EFS)

Os solventes foram selecionados pelos cálculos de HSP. O adsorvente selecionado foi a sílica e os cartuchos foram ativados e condicionados com 4 mL de metanol seguidos de 4 mL de clorofórmio. As amostras (~25 mg) dissolvidas em 2 mL de clorofórmio foram aplicadas. Solventes de eluição (4 mL) e lavagem (4 mL), escolhidos com base em HSP, foram utilizados para eluição dos AT ou das impurezas, respectivamente. As frações recolhidas foram evaporadas sob fluxo de nitrogênio, derivatizadas pelos procedimentos de sililação e metilação (em alguns casos) e submetidas à análise quantitativa. Em alguns casos as frações foram

evaporadas sob pressão reduzida (rotavapor) e posterior liofilização por 12 horas, antes do procedimento de derivatização. Este procedimento foi aplicado aos extratos de *P. cattleyanum* e *E. brasiliensis*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SECAGEM E RENDIMENTO DAS FOLHAS

As folhas das seis espécies de Myrtaceae coletadas e secas em estufa foram pesadas para cálculo de rendimento do material vegetal, utilizado no procedimento de extração, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Rendimento da secagem das folhas das seis espécies de Myrtaceae

Espécie	Massa de folhas coletadas (g)	Massa de folhas Secas (g)	Rendimento
Eugenia brasiliensis	1150,0	601,4	52,3%
Eugenia florida	1054,0	471,7	44,8%
Eugenia uniflora	463,3	300,0	64,8%
Psidium cattleyanum	1009,0	463,3	45,9%
Psidium guajava	1295,0	560,7	43,3%
Syzygium cumini	678,0	275,9	40,7%

Os rendimentos das folhas secas em relação às folhas coletadas variaram de 40 a 65%. Esta variação observada nos valores se deve ao fato da coleta ter ocorrido em diferentes locais e meses e anos.

4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Os rendimentos dos extratos das seis espécies extraídas pelos Protocolos 1 e 2, estão apresentados na Tabela 5 e no Gráfico 1 e foram calculados conforme fórmula apresentada a seguir (Equação 7).

$$\text{Rendimento } (\%) = \frac{Massa\ final\ de\ extrato\ (g) \times 100}{Massa\ inicial\ de\ folha\ (g)} \qquad \text{(Equação 7)}$$

A Tabela 5 contém também os rendimentos dos extratos hexânicos obtidos por maceração (desengraxamento dos extratos).

Tabela 5: Rendimentos dos extratos após o tratamento das folhas secas com 2% NaOH em etanol, para seis espécies de Myrtaceae

Espécie	Rendimento do extrato EtOH/NaOH 2% (% m/m)		
	Folhas Íntegras	Folhas desengorduradas[1]	Extrato *n*-hexano[2]
Eugenia brasiliensis	2,36 ± 0,13	2,00 ± 0,26 (< 15%)	1,10 %
Eugenia florida	2,00 ± 0,10	1,90 ± 0,04 (< 5,0%)	1,10 %
Eugenia uniflora	2,47 ± 0,10	1,88 ± 0,13 (< 24%)	2,03 %
Psidium cattleyanum	1,19 ± 0,12	1,13 ± 0,12 (< 5,0%)	0,56 %
Psidium guajava	2,91 ± 0,34	2,83 ± 0,09 (< 2,7%)	1,23 %
Syzygium cumini	2,78 ± 0,22	2,65 ± 0,11 (< 4,7%)	1,33 %

[1]Valores entre parêntesis: decréscimo no rendimento total do extrato após maceração prévia das folhas em *n*-hexano.
[2]O extrato hexânico foi gerado de um lote único de folhas secas (ver Figura 9); exceto para este procedimento, todos os outros valores são resultados de triplicatas de experimentos.

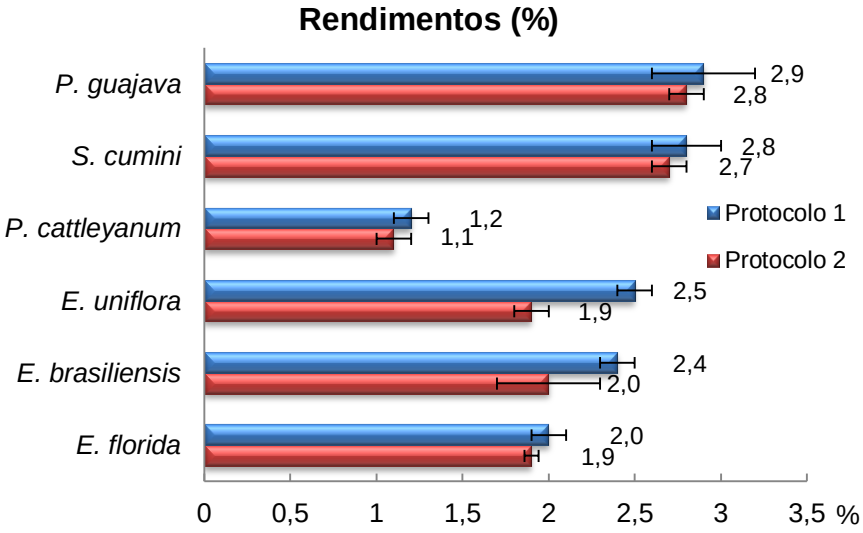


Gráfico1: Rendimentos dos extratos nos Protocolos 1 e 2

Os maiores rendimentos foram observados, nos dois protocolos de extração, para a espécie *Psidium guajava* (2,92% no Protocolo 1 e 2,83% no Protocolo 2) e os menores rendimentos foram observados, nos dois protocolos, para a espécie *Psidium cattleyanum* (1,19% no Protocolo 1 e 1,14% no Protocolo 2). As variações no processo de extração dos dois protocolos foram medidas e avaliadas através do cálculo do desvio padrão das repetições. À exceção da *E. brasiliensis*, o Protocolo 1 apresentou maiores valores de desvio-padrão; o que pode ser atribuído à maior quantidade de metabólitos disponíveis na matriz (onde não houve a retirada de constituintes apolares).

Uma avaliação mais detalhada do processo extrativo, incluindo fatores como rendimento e seletividade para AT, está descrito mais adiante, na seção 4.5.

4.3 MÉTODO DE ANÁLISE QUANTITATIVA (CG-DIC)

4.3.1 Desenvolvimento do método analítico – derivados metil e trimetilsilil éster

O desenvolvimento do método foi idealizado para avaliar R_S entre os derivados de AT formados através das reações de derivatização (esterificação – metil éster e sililação – trimetilsilil éster), mostrados na Figura 10, permitindo verificar a influência do derivado formado nos resultados obtidos com os métodos analíticos otimizados. Os sinais dos ácidos AB e AO ocorrem em t_R muito próximos na maioria das condições de análises descritas (GU *et al*, 2006; RAZBORŠEK *et al*, 2007; 2008). A R_S é definida como a separação de dois picos em relação à sua largura média, indicando o grau de separação entre os dois picos (HINSHAW, 2004). Resolução maior que 1,5 foi considerada satisfatória e maior que 2,0 foi considerada ótima, pois separa as substâncias até a linha de base.

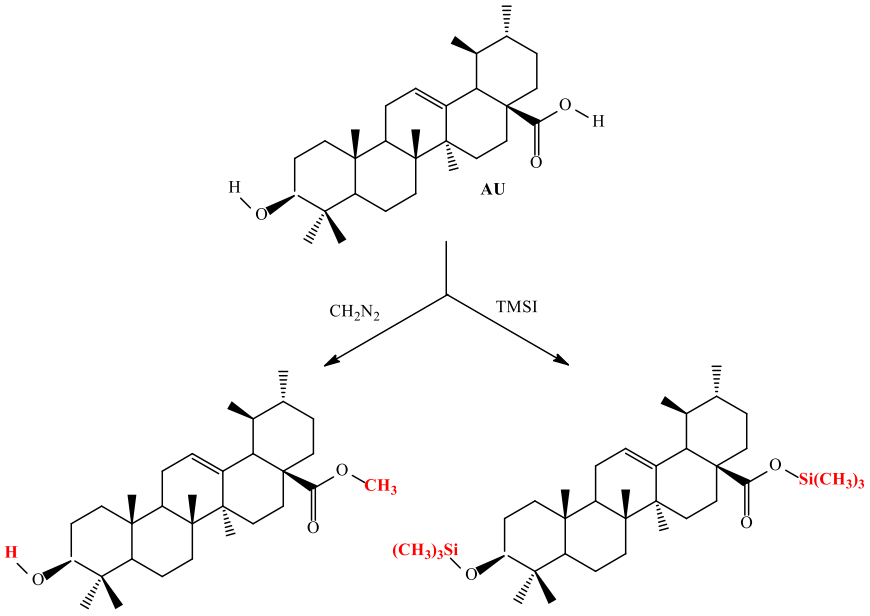


Figura 10: Exemplo dos derivados obtidos com tratamento por diazometano e TMSI: ácido ursólico

No caso dos derivados metil éster, o método otimizado com a coluna de fase estacionária de baixa polaridade e de diâmetro interno de 0,32 mm (BP-5) – Método 1, não produziu uma resolução satisfatória (R_S = 0,70) entre os sinais referentes aos ésteres metílicos dos ácidos AO e AB. Entretanto, a redução do diâmetro interno

para 0,25 mm com o uso da coluna DB-5 – Método 2, favoreceu o aumento da R_S entre as substâncias, ainda não satisfatória (Rs = 0,96), indicando que a diminuição do diâmetro interno da coluna aumenta a separação entre as substâncias avaliadas. Considerando que na reação de esterificação com diazometano, ocorre a substituição do hidrogênio ácido por um grupamento metila, e que os AT analisados são monohidroxilados e isômeros, a estrutura do derivado formado após a reação de derivatização ainda apresenta uma polaridade relativa, devido à presença da hidroxila do álcool. Isso dificulta a melhora da R_S, pois a polaridade da coluna ainda permanece baixa. Contudo, com o uso da coluna DB-17HT aumentando a polaridade da fase – Método 3, promove-se uma melhora significativa na R_S entre as substâncias (R_S = 2,47), e no tempo de análise (20 min), tornando este método aplicável para os derivados metil éster de AT nas amostras derivatizadas com diazometano. Portanto, o aumento da polaridade da fase estacionária favoreceu a separação entre as substâncias avaliadas devido às características químicas dos derivados formados.

Para os derivados trimetilsilil éster, o Método 1 mostrou-se mais eficiente (R_S = 1,96) comparado ao resultado obtido com os derivados metil éster nas mesmas condições. Isso significa dizer que, com a diminuição da polaridade dos derivados formados a interação entre eles e a fase estacionária também diminui, promovendo uma melhor separação. Assim, este método é mais aplicável para estes derivados do que para os derivados metil éster. Contudo, seguiu-se em busca da diminuição do tempo de análise, avaliando a influência da redução do diâmetro interno (Método 2) nas características apolares dos derivados. Como resultado, o valor de R_S entre as substâncias aumentou (R_S = 2,14). Porém, ainda na consideração das características de polaridade dos derivados formados nas reações de sililação comparada à esterificação, a coluna de maior polaridade foi utilizada com o intuito de melhorar o tempo total de análise. Com isso, o Método 3 foi aplicado aos derivados sililados e a R_S aumentou ainda mais (2,84). Estas condições foram as melhores obtidas para estes derivados. Entretanto, com relação ao valor ótimo de R_S definido como 2, tanto o Método 2, quanto o Método 3 são satisfatoriamente aplicáveis à quantificação das amostras sililadas (Figura 11).

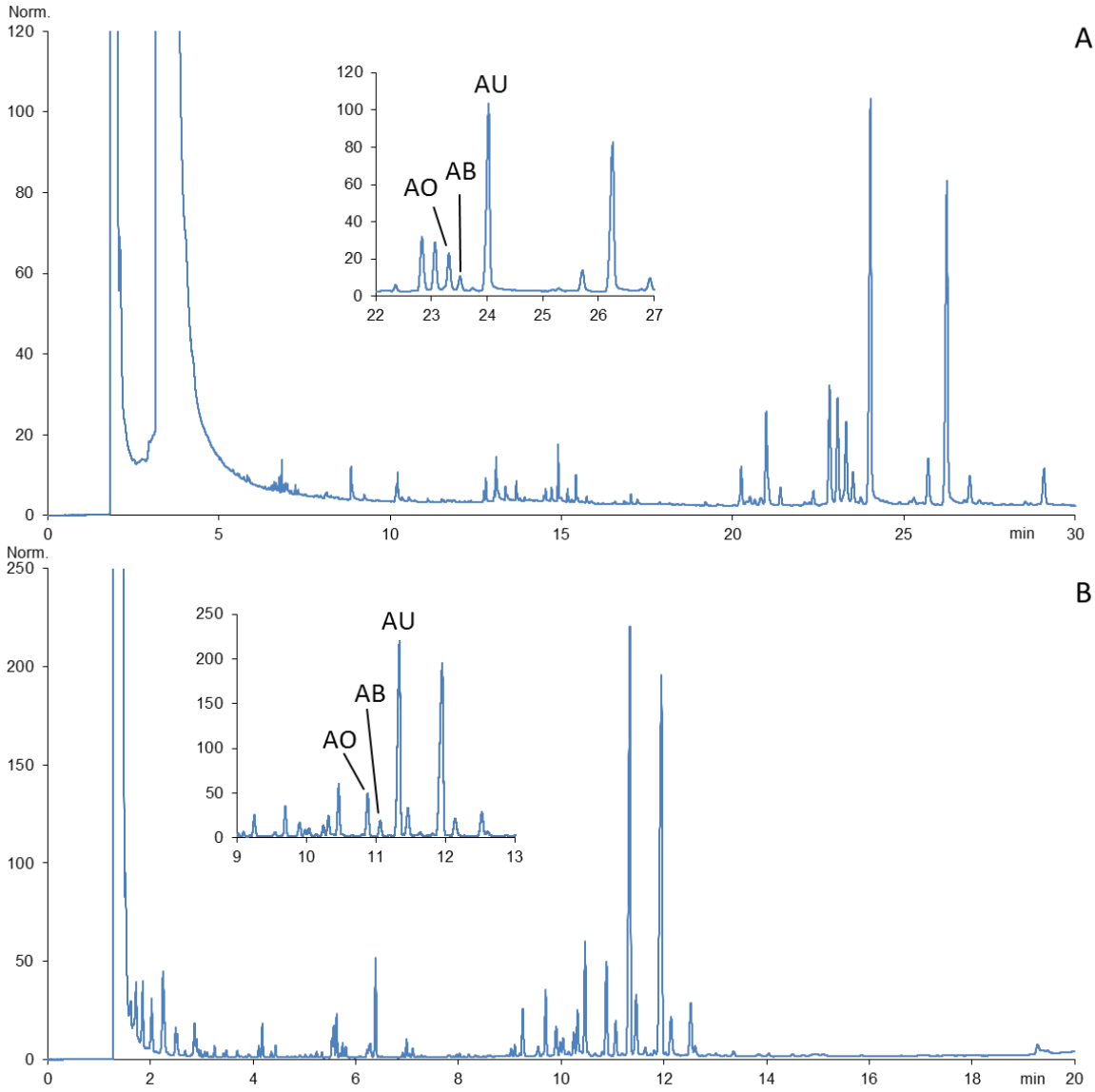


Figura 11: Cromatogramas do extrato de *E. brasiliensis* nos métodos otimizados para os derivados bis-trimetilsilílico: (A) Método 2 e (B) Método 3.

As condições otimizadas nos Métodos 1, 2 e 3, utilizadas no desenvolvimento do método analítico para quantificação dos AT nos extratos, estão listadas abaixo:

- Método 1: coluna capilar BP-5 (30 m, 0,32 mm d.i., 0,25 μm espessura de filme); sistema de injeção a 280 ^{o}C no modo de divisão de fluxo, com razão de 10:1; programação de temperatura do forno de 220 ^{o}C, com isoterma de 2 min e taxa de aquecimento de 3 ^{o}C/min a 300 ^{o}C; tempo total de corrida de 50 minutos; hélio foi usado como gás carreador com vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção de 1μl; temperatura do detector 300 ^{o}C.

- Método 2: coluna capilar DB-5 (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μm espessura de filme); sistema de injeção a 280 °C no modo de divisão de fluxo, com razão de 10:1; programação de temperatura do forno de 115 °C, com isoterma de 1 min e taxa de aquecimento 1 de 20 °C/min a 200 °C, taxa de aquecimento 2 de 10 °C/min a 290 °C com isoterma de 2 min, taxa de aquecimento 3 de 15 °C/min a 300 °C com isoterma de 2 min e taxa de aquecimento 4 de 2 °C/min a 320 °C; tempo total de corrida de 30 minutos; hélio foi usado como gás carreador com vazão de 1,1 mL/min; volume de injeção de 1μl; temperatura do detector 300 °C.
- Método 3: coluna capilar DB-17HT (30 m, 0,32 mm d.i., 0,15 μm espessura de filme); sistema de injeção a 280 °C no modo de divisão de fluxo, com razão de 10:1; programação de temperatura do forno de 200 °C com taxa de aquecimento 1 de 10 °C/min a 290 °C, taxa de aquecimento 2 de 3 °C/min a 320 °C, taxa de aquecimento 3 de 20 °C/min a 340 °C; tempo total de corrida de 20 minutos; hélio foi usado como gás carreador com vazão de 2 mL/min; volume de injeção de 1μl; temperatura do detector 300 °C.

A Tabela 6 resume os experimentos realizados com o extrato de *E. brasiliensis*, para o desenvolvimento do método analítico quantitativo a ser utilizado nos outros extratos.

Tabela 6: Métodos cromatográficos testados para a análise de CG-DIC do extrato de *E. brasiliensis*

Método	**Coluna**	**Reagente de derivatização**	**Tempo de corrida (min)**	**R_S[a]**
1	BP-5	Diazometano	50	0,70
		TMSI		1,96
2	DB-5	Diazometano	30	0,96
		TMSI		2,14
3	DB-17HT	Diazometano	20	2,47
		TMSI		2,84

[a] Resolução entre os ácidos oleanólico e betulínico

A Figura 12 traz os cromatogramas do extrato de *E. brasiliensis* no método que se mostrou melhor para análise dos derivados metilado e sililado (Método 3).

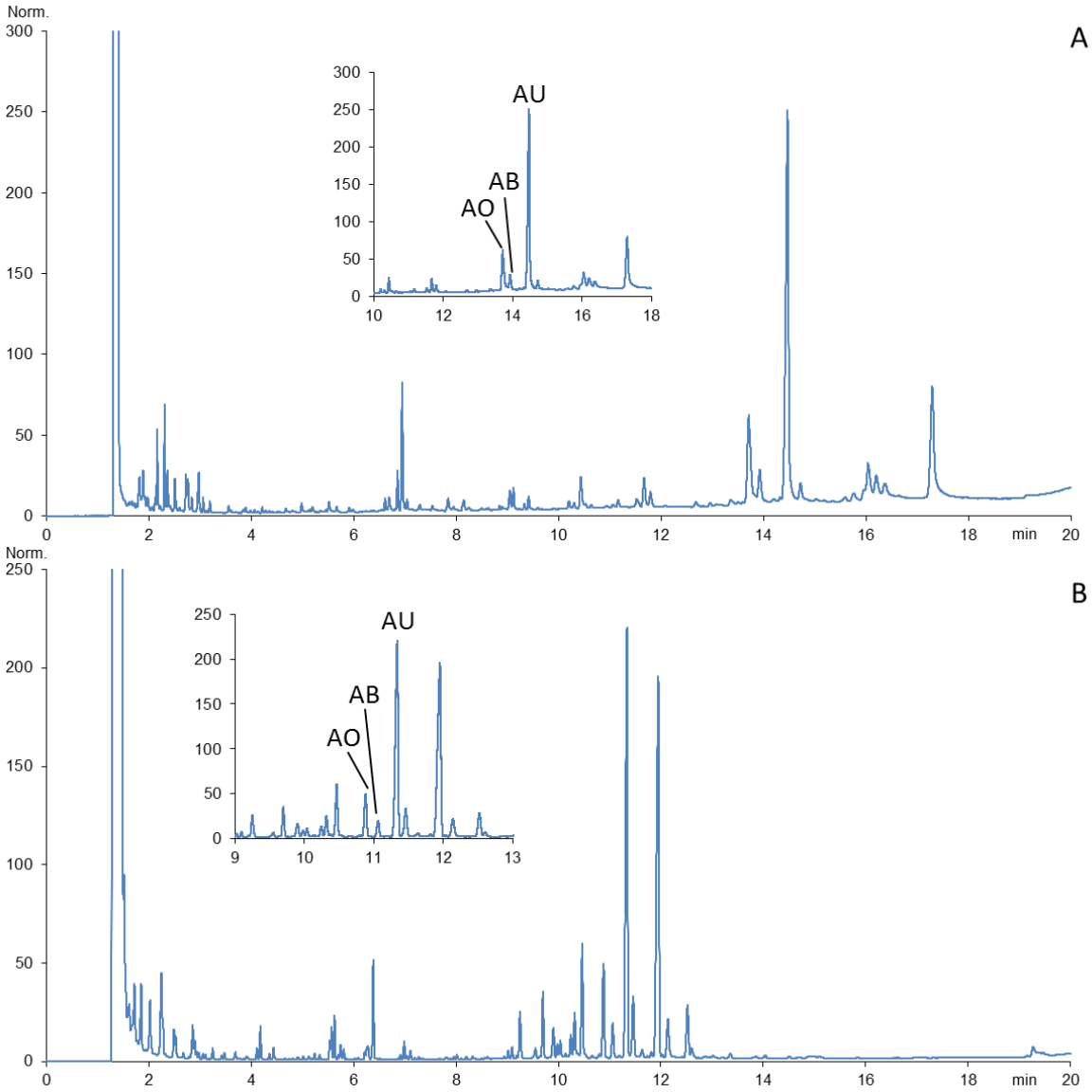


Figura 12: Cromatogramas do extrato de *E. brasiliensis* no Método 3 para os derivadados (A) éster metílico e (B) bis-trimetilsilílico

Portanto, as análises quantitativas de AT, tanto utilizando o procedimento de derivatização por metilação quanto por sililação, foram conduzidas através das condições analíticas otimizadas do Método 3.

4.3.2 Curvas de calibração para os derivados metilados

As curvas de calibração foram construídas em nove níveis divididos em duas faixas de concentração, para os derivados metil éster de AB e AO, e em uma faixa de cinco concentrações para AU. Todas as soluções foram preparadas no solvente

diclorometano, injetadas em triplicata e no modo aleatório. Cinco concentrações na faixa de 10 a 100 µg/mL foram utilizadas na construção da Curva A e outras cinco na faixa de 100 a 1000 µg/mL para a construção da Curva B, para os derivados de AB e AO. Para o derivado de AU foram utilizadas cinco concentrações na faixa de 60 a 1200 µg/mL.

Três curvas de calibração foram preparadas em três dias distintos para avaliação do modelo linear e, através de testes estatísticos, o modelo foi verificado e validado para um dia de preparo assumindo-se este modelo para os demais dias. As três curvas então, foram comparadas entre si (duas a duas) através da comparação dos coeficientes angulares, via Teste t. A avaliação estatística do modelo linear da curva 1 encontra-se nas Tabelas 14 a 17 do Apêndice A, e a comparação das curvas nas Tabelas 18 a 27 do Apêndice B.

Para seguir o modelo linear gerado através do método dos mínimos quadrados ordinários, os dados da curva de calibração devem ser avaliados quanto às premissas correspondentes para este modelo, que são: resíduos com homogeneidade nas variâncias; distribuição normal dos resíduos e não autocorrelação dos resíduos.

Na avaliação das Curvas A (referente aos ésteres metílicos de AB, AO e AU), observou-se a ocorrência de violações de uma ou mais premissas para o modelo linear de primeira ordem. Com isso, os dados foram ajustados através do método dos mínimos quadrados ponderados com transformação 1/x da variável y para AO e AB e 1/y para AU. Como resultados da transformação, os valores de desvio padrão residual, representado pelo erro padrão da estimativa, para as curvas dos três ácidos, foram diminuídos, comprovando o ajuste dos dados ao modelo linear ponderado.

Como observado para as Curvas A, as Curvas B dos ésteres metílicos de AB e AO seguiram as mesmas avaliações. Então, ajustando-se os dados com o método dos mínimos quadrados ponderados com transformação 1/x da variável y, os valores de erro padrão da estimativa para as curvas dos dois ácidos foram diminuídos, comprovando o ajuste dos dados ao modelo linear ponderado.

A comparação entre as três curvas incluiu o cálculo inicial de semelhança das variâncias dos resíduos, pelo Teste F. A avaliação das curvas de calibração obtidas em dois dias diferentes (curvas 1 e 2), e considerando-se as faixas de concentrações A e B, resultaram em variâncias semelhantes. Com o Teste F

avaliado e aprovado nas duas curvas, a comparação dos coeficientes angulares foi realizada através do Teste t, que resultou na ausência de diferenças significativas, ou seja, as curvas 1 e 2, nas faixas avaliadas para os três derivados ésteres metilícos, são estatisticamente semelhantes. Já as curvas 2 e 3 (obtidas no segundo e terceiro dia) não apresentaram variâncias semelhantes nas duas faixas de concentração. Com isso, a comparação dos coeficientes angulares pelo Teste t não pode ser realizada, pois para a realização deste teste estatístico, a semelhança das variâncias é uma premissa. Provavelmente esse resultado se deve ao fato de que as curvas 1 e 2 foram preparadas com 17 dias de intervalo e as curvas 2 e 3 foram preparadas com 5 meses de intervalo. Esta avaliação foi importante para estipular uma periodicidade de preparo de curva de calibração. Dessa maneira, para este método de análise, é possível idealizar-se uma curva de calibração quinzenal.

4.3.3 Curva de calibração para os derivados trimetilsililados

A curva de calibração dos derivados bis-trimetilsilil de AB, AO e AU seguiram os mesmos padrões de concentração e avaliação dos resultados com os ésteres metílicos, tanto nos intervalos definidos como Curva A quanto Curva B. Todas as concentrações foram preparadas na solução derivatizante (acetonitrila:TMSI 1:1, v/v), injetadas em triplicata e no modo aleatório. Cinco concentrações na faixa de 10 a 100 µg/mL foram utilizadas na construção da Curva A e na faixa de 100 a 1000 µg/mL para a construção da Curva B, para os derivados de AB e AO. Para o derivado do AU foram utilizadas cinco concentrações na faixa de 60 a 1200 µg/mL para a construção da Curva A. Os resultados das curvas, seguindo o modelo linear ponderado observado para os derivados metilados, encontra-se nas Tabelas 28 e 29 do Apêndice C.

Os dados foram ajustados pelo método dos mínimos quadrados ponderados com transformação 1/x da variável y para oleanólico e betulínico e 1/y para ursólico. Como resultados da transformação, os valores de desvio padrão residual, representado pelo erro padrão da estimativa para as curvas dos três ácidos, foram baixos, comprovando que os dados foram ajustados ao modelo linear ponderado.

Como observado para as Curvas A, as Curvas B dos derivados metil éster de AO e AB seguiu as mesmas avaliações e, ajustando os dados com o método dos mínimos quadrados ponderados, com transformação 1/x da variável y, os valores de

erro padrão da estimativa para as curvas dos dois ácidos foram baixos, comprovando o ajuste dos dados ao modelo linear ponderado.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS AT POR CG-DIC NOS EXTRATOS

Os teores dos AT individuais nos extratos das seis espécies de Myrtaceae produzidos pelos dois protocolos da extração com NaOH/EtOH foram obtidos após derivatização com diazometano, no método analítico desenvolvido (Método 3). A Tabela 7 resume os resultados obtidos e o Gráfico 2 mostra, visualmente, a distribuição dos ácidos individuais nas espécies considerando os dois protocolos. Ainda, o Gráfico 3 ilustra uma comparação entre os valores obtidos para os AT totais em cada espécie, segundo a obtenção pelos dois protocolos. As Figuras 13 e 14 mostram os cromatogramas dos extratos obtidos através do Protocolo 1 e 2, respectivamente, das seis espécies de Myrtaceae analisadas após derivatização por esterificação com diazometano, no método analítico desenvolvido.

Tabela 7: Teor de AT nos extratos de folhas de espécies de Myrtaceae após extração com etanol alcalinizado com NaOH

(A) Conteúdo de AT nos extratos de folhas íntegras – protocolo 1 (%)				
Espécie	**AO**	**AB**	**AU**	**Ácidos totais**
EB	4,3 ± 0,20	1,5 ± 0,10	14,8 ± 0,2	20,6 ± 0,30
EF	2,4 ± 0,50	38,8 ± 0,30	9,0 ± 0,1	50,2 ± 0,30
EU	1,7 ± 0,04	< LQ	4,7 ± 0,2	6,4 ± 2,40
PC	5,7 ± 0,10	< LQ	20,4 ± 1,2	26,1 ± 1,30
PG	2,2 ± 0,10	1,5 ± 0,10	7,3 ± 0,2	11,0 ± 0,30
SC	4,8 ± 0,40	3,5 ± 0,10	8,8 ± 1,0	17,1 ± 1,50
(B) Conteúdo de AT nos extratos de folhas desengorduradas – protocolo 2 (%)[a]				
Espécie	**AO**	**AB**	**AU**	**Ácidos totais**
EB	4,2 ± 0,30	1,3 ± 0,10	16,0 ± 0,90	21,5 ± 1,20
EF	2,5 ± 0,02	42,9 ± 0,30	9,5 ± 0,10	54,8 ± 0,30
EU	1,6 ± 0,10	< LQ	5,4 ± 0,04	7,0 ± 0,10
PC	5,7 ± 0,20	< LQ	21,4 ± 1,70	27,1 ± 1,80
PG	2,2 ± 0,01	1,9 ± 0,20	8,0 ± 0,10	12,1 ± 0,30
SC	5,5 ± 0,40	3,9 ± 0,20	10,0 ± 1,30	19,4 ± 1,90
	(C) Conteúdo de AT nos extratos *n*-hexânicos (%)			
Espécie	**AO**	**AB**	**AU**	**Ácidos totais**
EB	0,4 ± 0,030	0,1 ± 0,01	<LQ	0,5 ± 0,20
EF	0,2 ± 0,10	0,4 ± 0,10	0, 7 ± 0, 10	1,3 ± 0,20
EU	<LQ	<LQ	<LQ	–
PC	<LQ	<LQ	<LQ	–
PG	0,2 ± 0,04	0,4 ± 0,10	<LQ	0,7 ± 0,10
SC	<LQ	<LQ	<LQ	–

EB = *Eugenia brasiliensis*; EF = *Eugenia florida*; EU = *Eugenia uniflora*; PC = *Psidium cattleyanum*; PG = *Psidium guajava*. [a]Todos os valores são médias de experimentos de extração realizados em triplicatas, e médias de três injeções em CG-DIC (ver Experimental). AO = ácido oleanólico; AB = acid betulínico; AU = ácido ursólico. LQ = Limite de Quantificação.

Observa-se que AU e AO estão presentes nos extratos das seis espécies gerados pelos dois protocolos, estando AO em menor quantidade. O AB foi considerado ausente (valores inferiores ao limite de detecção do equipamento) nos extratos das espécies *Psidium cattleyanum* e *Eugenia uniflora*, por ambos os protocolos de extração. Apesar de AB não estar presente em todas as espécies, ele se apresenta majoritariamente na *Eugenia florida*, com teor individual acima do teor total de AT apresentados nas demais espécies.

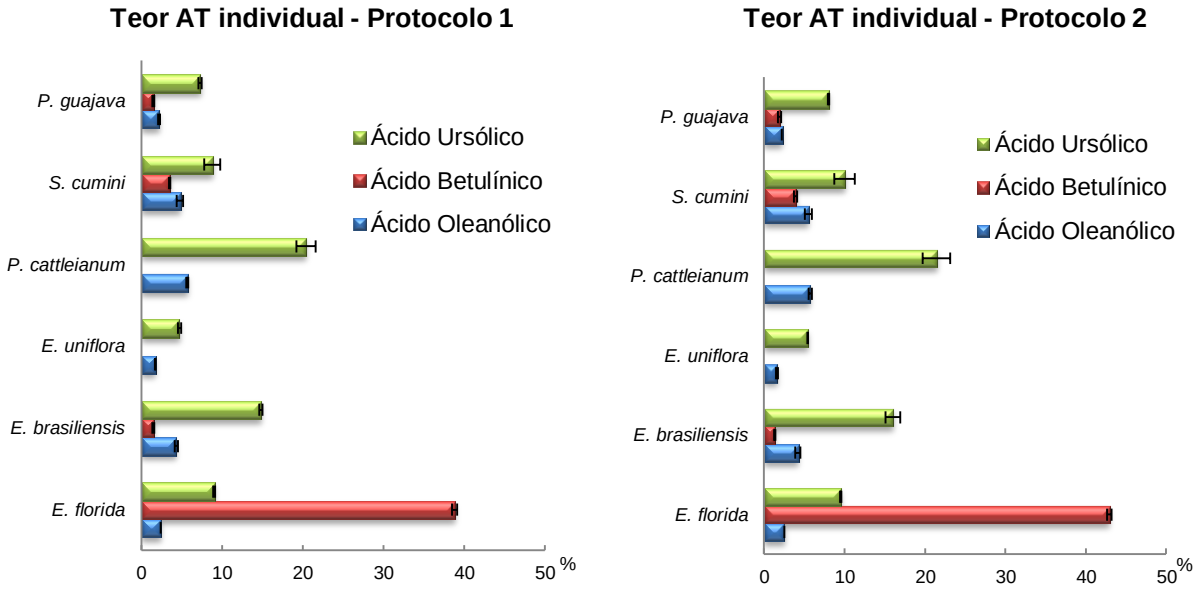


Gráfico 2: Teor individual dos ácidos triterpênicos nos extratos das seis espécies de Myrtaceae – Protocolos 1 e 2.

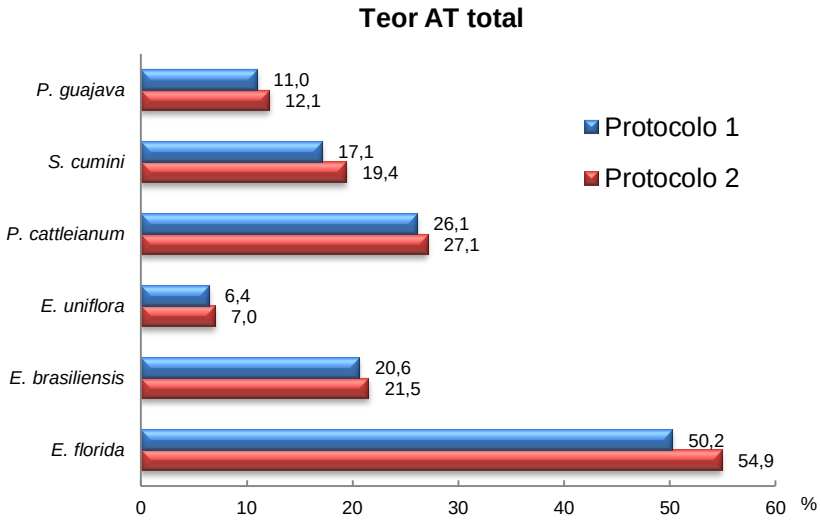


Gráfico 3: Teor total dos ácidos triterpênicos nos extratos das seis espécies de Myrtaceae, extraídos pelos Protocolos 1 e 2.

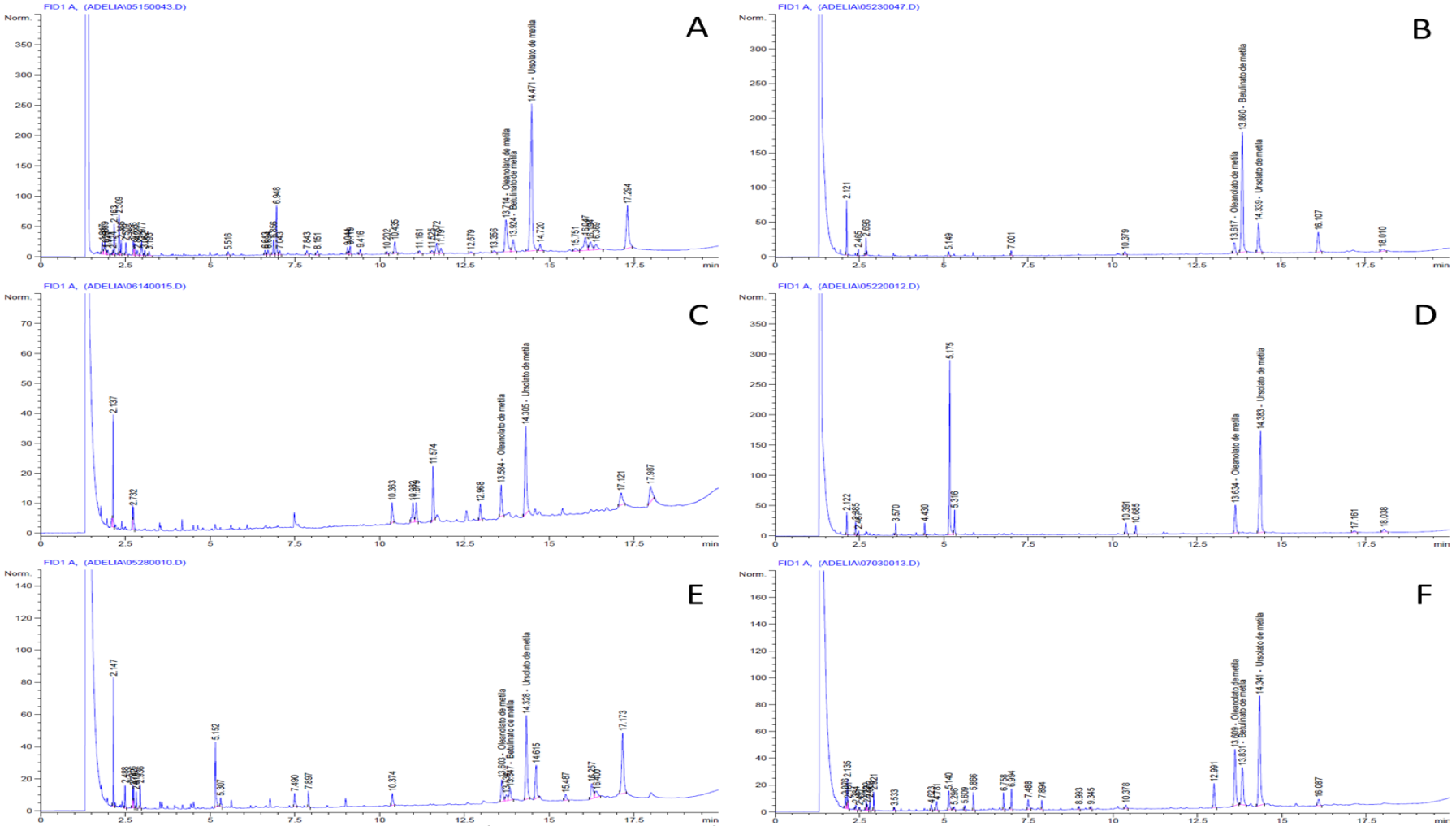


Figura 13: Cromatogramas dos extratos obtidos através do Protocolo 1 no Método 3: (A) *E. brasiliensis*, (B) *E. florida*, (C) *E. uniflora*, (D) *P. Cattleyanum*, (E) *P. Guajava* e (F) *S. Cumini*. Análises realizadas após metilação com diazometano

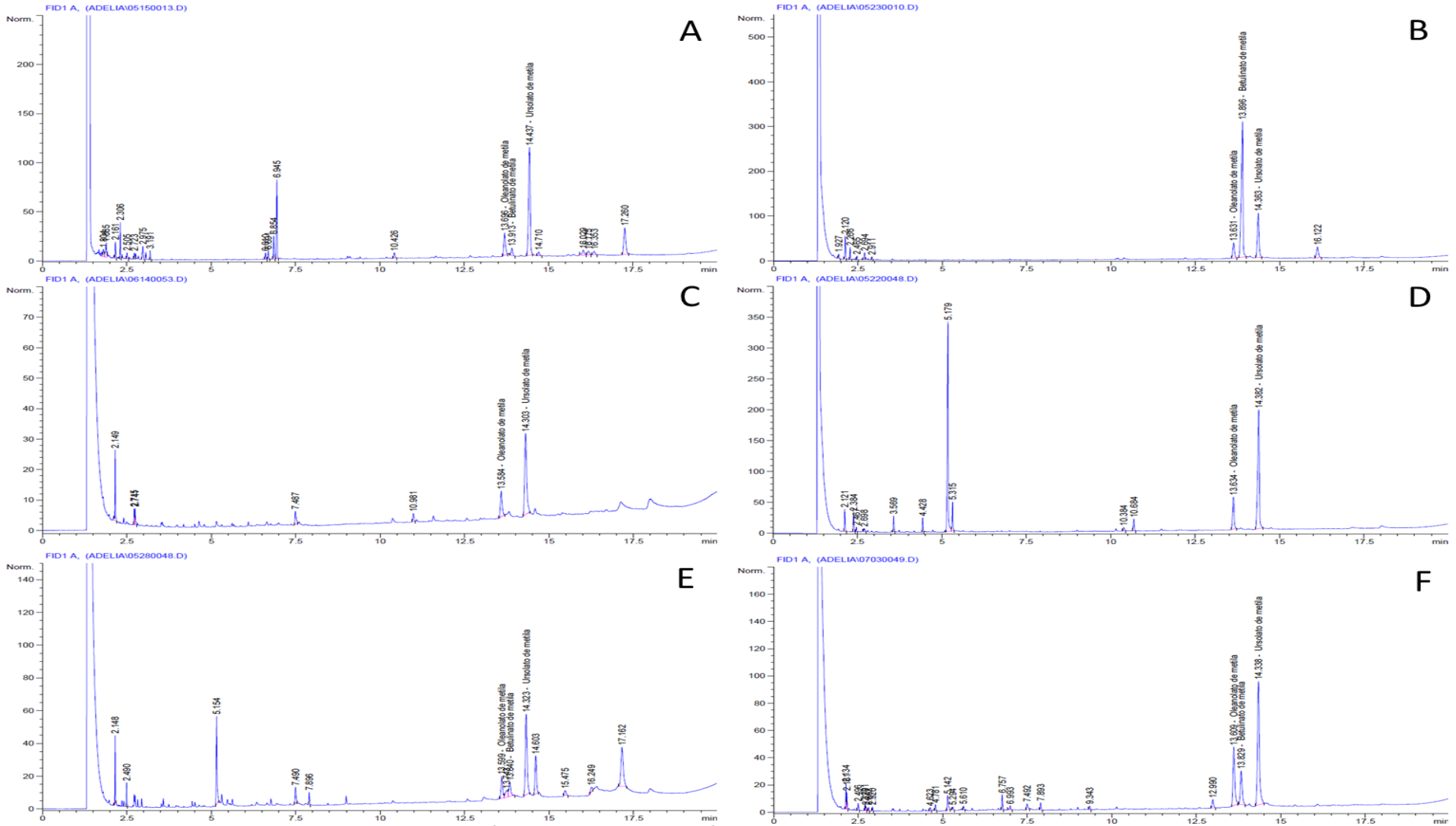


Figura 14: Cromatogramas dos extratos obtidos através do Protocolo 2 no Método 3: (A) *E. brasiliensis*, (B) *E. florida*, (C) *E. uniflora*, (D) *P. Cattleyanum*, (E) *P. Guajava* e (F) *S. Cumini*. Análises realizadas após metilação com diazometano

Os valores da Tabela 7 e Gráfico 2 demonstram a distribuição individual dos AT nas seis espécies analisadas. É possível se observar que as espécies mais promissoras, em termos de quantidade de AT total e de AT majoritários, visando desenvolver processos de enriquecimento de extrato, foram: *E. florida*, com 50,2% de AT total e 38,8% de AB e *P. cattleyanum*, com 26,1% de AT total e 20,4% de AU, com ênfase no Protocolo 1. Adicionalmente, outra espécie que pode ser considerada promissora é a *E. brasiliensis*, 20,6% de AT total e 14,8% de AU.

Complementarmente, os dados do Gráfico 3 revelam que o Protocolo 2, desenvolvido a partir de folhas previamente desengorduradas com *n*-hexano, apresenta teores de AT totais maiores, indicando que este tratamento aumenta a disponibilidade dos AT frente à extração com solução de NaOH 2% em EtOH 95%. Entretanto, esta diferença somente se apresenta de forma significativa nos extratos da espécie *E. florida*, que aumentou 4,6%.

Por consequência, os ácidos triterpênicos AB e AU podem ser obtidos majoritariamente em extratos de folhas de Myrtaceae, principalmente das espécies *Eugenia florida* e *Psidium cattleyanum*, respectivamente. Contudo, a espécie *Eugenia brasiliensis* também pode ser utilizada como fonte de AU, alternativamente ao *Psidium cattleyanum*.

4.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO E A EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DOS AT

Obter AT a partir de tecidos vegetais requer inicialmente a otimização das condições de extração, com o objetivo de superar a baixa solubilidade destas substâncias na maioria dos solventes convencionais (JIN *et al*, 1997; JÄGER *et al*, 2007; SCHNEIDER *et al*, 2009). Em segundo lugar, no caso de cascas de frutas e extratos de folhas, deve-se evitar ao máximo a co-extração da cutina residual. Cutina é um composto polimérico natural constituído de ésteres fenólico cruzados de hidroxi-ácidos graxos, altamente insolúvel que, quando arrastada para os extratos, torna-os com uma consistência viscosa, à semelhança de um plástico, que dificulta muito os processos que resultem em extratos orgânicos secos apropriados para uso farmacêutico (HUELIN, 1959).

Assim, é necessário lançar mão de algum tratamento que promova a hidrólise desta rede poliestérica da cutina, visando facilitar a penetração de solventes para o

interior da matriz e assim recuperar os metabólitos. Este procedimento é conhecido como ‘despolimerização’ da cutina (KOLATTUKUDY, 1980) e, geralmente, é conduzido em meio alcalino, utilizando KOH ou NaOH. Este tratamento tem sido extensivamente utilizado para investigar as estruturas químicas dos epoxi- e hidroxi-ácidos graxos esterificados originalmente na matriz cutina, principalmente com a finalidade de estabelecer correlações úteis entre a especificidade da composição da cutina e sua capacidade para proteger os tecidos vegetais que revestem (HOLLOWAY; DEAS, 1973).

Por outro lado, este tratamento também pode ser aplicado para a separação de AT, ou outros metabolitos ácidos, que sejam estáveis nas condições alcalinas utilizadas. Neste contexto, este tratamento hidrolítico foi empregado nos primeiros estudos relacionados com isolamento e identificação de AT a partir de extratos orgânicos de cascas de maçãs (SANDO, 1931). Alguns exemplos posteriores demonstraram o tratamento de extratos etanólicos, clorofórmicos ou etéreos com soluções aquosas ou alcoólicas de KOH (3-10% m/v), aplicados à liberação de AT de extratos vegetais viscosos (HUELIN, 1959; HOLLOWAY; DEAS, 1973). Mais recentemente, a hidrólise alcalina tem sido também utilizada para produzir amostras viáveis para as análises cromatográficas quantitativas de AT (PEREIRA *et al*, 2005).

Entretanto, este procedimento sempre foi utilizado de maneira circunstancial, via de regra visando identificar as substâncias nos extratos, não sendo merecedor de estudos sistemáticos que visassem a produção de extratos padronizados em AT, ou mesmo a otimização de processos de purificação destas substâncias.

Os resultados do tratamento direto das folhas secas íntegras (Protocolo 1) ou previamente desengorduradas (Protocolo 2) com 2% de NaOH em EtOH 95% (Tabela 5) mostraram que os maiores rendimentos (2,7-2,9%) foram obtidos para os casos de *P. guajava*, *S. cumini* e *E. florida*, seguidos de *E. uniflora* e *E. brasiliensis* (2,3-2,5%). O menor rendimento foi obtido para as folhas de *P. cattleyanum* (1,2%). No Protocolo 2, as folhas foram desengorduradas com *n*-hexano para investigar se a remoção prévia de constituintes apolares, principalmente ácidos graxos e alcanos, produziria um possível aumento nos rendimentos de AT nos extratos obtidos pelo tratamento alcalino subsequente. A literatura traz indícios da efetividade desta abordagem, para o caso de cascas de maçãs, cujo rendimento do extrato etanólico neutro aumenta quando se trata antes as cascas secas com *n*-hexano (ELLGARDT, 2006).

Embora os AT sejam pouco solúveis em hidrocarbonetos (JIN *et al*, 1997), alguma quantidade pode ser arrastada pelo solvente, principalmente quando se utiliza uma relação alta entre solvente:folhas, que não foi o caso neste estudo. Este fenômeno também pode ser favorecido por efeitos de co-solvatação resultante do conteúdo de outros componentes na matriz, em particular derivados de ácidos graxos, o que é um fato comum em folhas (JÄGER *et al*, 2007).

Para examinar esta possibilidade, os extratos hexânicos também foram analisados quantitativamente quanto à presença de AT. Como resultado da maceração das folhas com *n*-hexano à temperatura ambiente produziu extratos contendo entre 0,5%-1,3% de AT, para os casos de *E. brasiliensis*, *P. guajava* e *E. florida*. Não se detectaram perdas significativas de AT para as outras três espécies submetidas ao mesmo procedimento (Tabela 7). A maior perda de massa de AT mediante o processo de desengorduramento foi no caso das folhas de *E. florida*. Este fato pode estar relacionado com o seu elevado teor em AB, que é o mais solúvel dos três ácidos em solventes orgânicos, já que em todas as outras amostras esta perda foi abaixo de 1,0%. Ainda nesta linha, estes resultados corroboram também a baixa eficiência na extração de AT com *n*-hexano (ELLGARDT, 2006; LIMA *et al*, 2014). Entretanto, o aumento no rendimento dos AT totais, alcançado pelo tratamento prévio das folhas com solventes apolares, deve ser convenientemente reavaliado quando se objetivam preparações em larga escala, verificando-se com mais meticulosidade os balanços de massas envolvidos no processo.

Como vantagens adicionais, os protocolos utilizando alcoolato resultaram em extratos que se apresentaram livres de clorofila e outros pigmentos, e prováveis baixos conteúdos de polifenóis, demonstrando o potencial desta técnica para posterior purificação de AT. O procedimento também tem uma relação positiva de custo-benefício – já que apenas consome álcool, hidróxido de sódio e ácido clorídrico – além de ser ambientalmente amigável quanto aos resíduos que produz (água e cloreto de sódio). Uma limitação potencial do método seria a sua eficácia para extratir metabólitos suscetíveis ao meio alcalino, como ésteres e lactonas de AT. Este é um ponto que requer investigações subsequentes.

Assim, o tratamento direto de folhas secas com NaOH em EtOH, além de suprimir a etapa inicial habitual na separação de AT, que normalmente envolve extração alcoólica neutra, também promove a hidrólise da cutina e gera extratos

limpos e claros. Uma busca na literatura sobre a aplicação de método análogo apontou a existência de raros exemplos, envolvendo plantas medicinais (QINGDAO, 2008). A inclusão de um procedimento de desengorduramento prévio, com o solvente adequado, deve ser considerada para melhorar a relação custo-eficácia do processo global. Neste contexto, a seletividade de extração deve ser investigada nos tecidos vegetais ricos em sesquiterpenos.

4.6 APLICAÇÃO DA TÉCNICA EFS PARA O ENRIQUECIMENTO DE AT NOS EXTRATOS

Entre os extratos brutos obtidos a partir do processo direto das folhas secas (sem o tratamento com *n*-hexano) com NaOH/EtOH, três deles apontaram a presença de um AT como elemento predominante entre os três ácidos considerados. São eles os extratos de *E. florida*, *E. brasiliensis* e *P. cattleyanum*. No primeiro caso, o cromatograma apresentou AB como o ácido altamente predominante entre os três. A ocorrência destacada do sinal do AB no cromatograma e a baixa ocorrência de impurezas individuais sugerem que a sua purificação a partir dessa fonte possa ser alcançada diretamente por recristalização do extrato resultante.

Já o AU foi majoritário nos extratos das duas últimas espécies; contudo teores concorrentes de AB e, principalmente, de AO foram observados. Nestes casos, a viabilidade de ambos como fontes de AU exige ainda experimentos adicionais, onde o primeiro passo incluiria a eliminação máxima das outras substâncias presentes, significando um enriquecimento do conteúdo dos extratos tanto em AT, quanto do AU predominante. Assim, a seletividade alcançada na etapa de enriquecimento do extrato em AT deve também incluir um ganho na proporção de AU em relação aos outros ácidos. Estes parâmetros podem ser ensaiados pelo uso da técnica de EFS, mediante um planejamento adequado quanto à fase sólida a ser utilizada como suporte e combinação de solventes.

Assim, foram desenvolvidos métodos para o enriquecimento de AT nos extratos de *E. brasiliensis* e *P. cattleyanum*, considerando a composição específica de cada um. Para tal, primeiramente foram detectadas as principais impurezas em cada caso, lançando-se mão das respostas obtidas pela análise dos extratos por CG-EM. Em seguida, a estas moléculas foi aplicado o cálculo teórico de HSP,

considerando uma série de solventes utilizados convencionalmente no laboratório, além da escolha do suporte a ser utilizado no cartucho de EFS.

No caso das impurezas a serem consideradas não terem sido suficientemente caracterizadas, dada a insuficiência de informações provenientes do padrão de fragmentação de massas e da biblioteca de espectros acoplada ao sistema CG-EM, foram considerados para os cálculos de HSP, alguns modelos moleculares que refletissem moléculas similares, principalmente de mesma classe química, contendo grupos funcionais correlatos.

Em resumo, os métodos em EFS foram desenvolvidos para os extratos de *E. brasiliensis* e *P. cattleyanum*, com base nos solventes selecionados através dos cálculos de HSP, com a finalidade de obter extratos enriquecidos em AT com máxima seletividade para AU. Por este motivo, as frações obtidas por EFS, em ambos os casos, foram quantificadas com relação ao teor de AU por CG-FID, utilizando o método analítico quantitativo com base na metilação e sililação dos conteúdos dos extratos com diazometano e TMSI, respectivamente, conforme disponibilidade de reagentes, e utilizando AU como padrão externo.

4.6.1 Cálculo de HSP

De acordo com o exposto acima, os parâmetros de Hansen foram aplicados aos casos de *P. cattleyanum* e da *E. brasiliensis*. As Figuras 15a e 15b mostram os cromatogramas dos extratos de ambos, onde, além dos AT, estão indicadas as substâncias relacionadas como impurezas, dadas às suas quantidades relativas na composição dos extratos, estes obtidos pelo Protocolo 1 (folhas íntegras).

Portanto, as substâncias utilizadas para os cálculos de Hansen foram aquelas que correspondem aos picos assinalados na Figura 15 (a e b), como sinais 1 (4,12 min) e 2 (5,55 min), em *P. cattleyanum* e *E. brasiliensis*, respectivamente. Estas substâncias foram caracterizadas quanto à classe que pertencem através da fragmentação característica obtida por CG-EM.

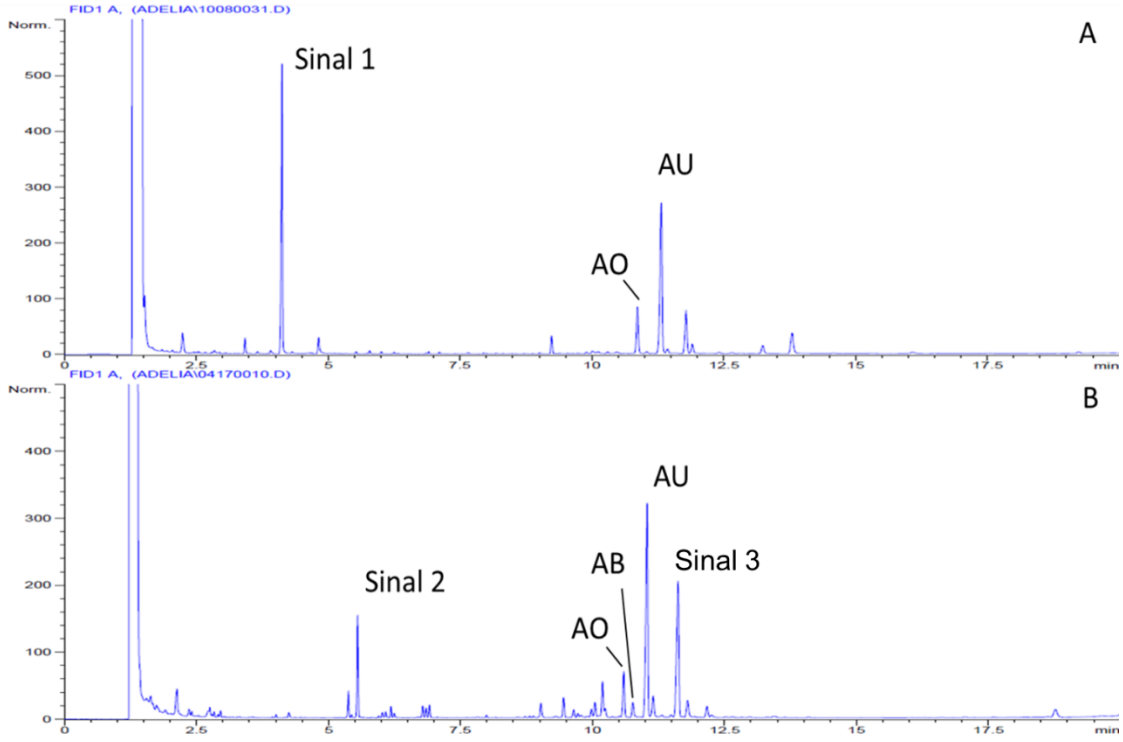
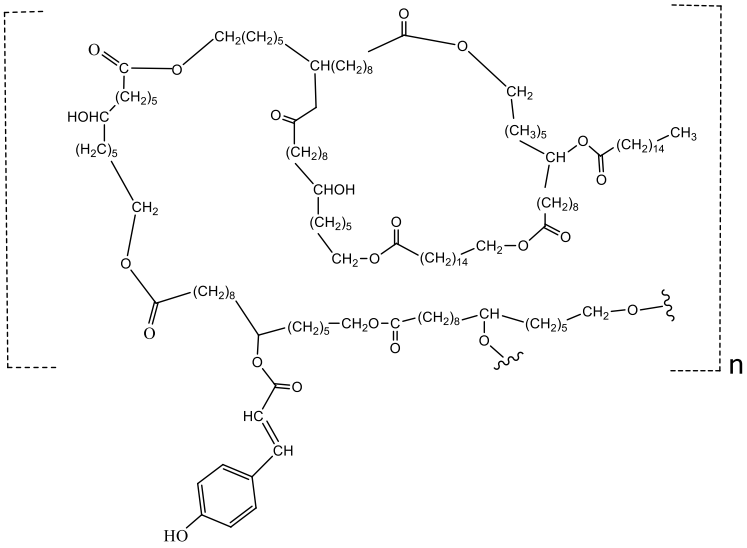


Figura 15:Cromatogramas do extrato de (A) *P. cattleyanum* e (B) *E. brasiliensis* do Protocolo 1, após sililação com TMSI. Sinal 3 = provável ácido triterpênico dihidroxilado (ver texto).

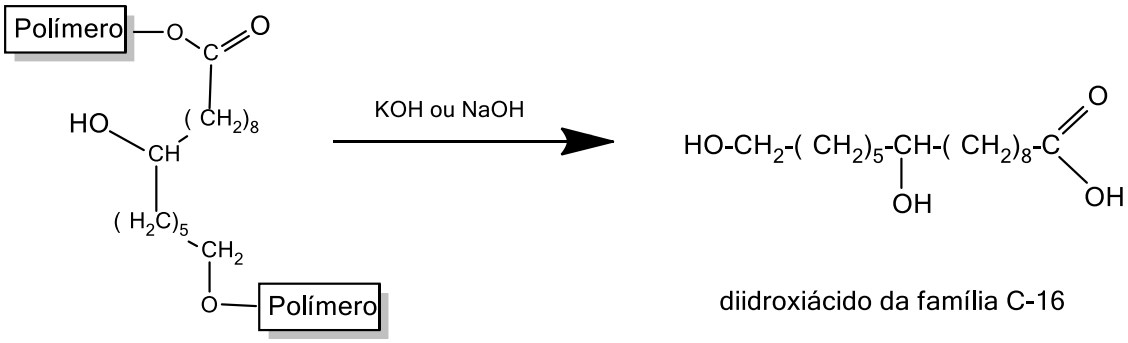
Tomando-se por base que a reação de hidrólise da cutina produz ácidos graxos hidroxilados de baixa solubilidade em água, é provável que estas substâncias pertençam a esta classe, pois os ácidos fenólicos complementares seriam descartados na filtração do extrato final, uma vez que são razoavelmente solúveis em água, sendo então arrastados para a fase aquosa (lembrando que o processo inclui uma lavagem final do extrato obtido com água). Um modelo da estrutura da cutina e dos principais ácidos graxos provenientes da sua hidrólise estão na Figura 16 (KOLATTUKUDY, 1980).

Assim, o sinal 1 deve corresponder a um ácido graxo dihidroxilado residual da hidrólise da cutina, contendo um grupo hidroxila terminal e outro em C-10, sendo derivado do ácido palmítico (C-16) ou esteárico (C-18) (Figuras 16b e 16c).

(A) Estrutura genérica da cutina



(B) Exemplo genérico de hidrólise alcalina da cutina



(C) Monômeros de ácidos graxos hidroxilados predominantes na cutina

Família C-16

CH_3-$(CH_2)_{14}$-COOH

HO-CH_2-$(CH_2)_{14}$-COOH

HO-CH_2-$(CH_2)_x$-CH(OH)-$(CH_2)_y$-COOH

[**y** = 8,7,6,5; **x**+**y** = 13]

Família C-18

CH_3-$(CH2)_7$-CH=CH-$(CH2)_7$-COOH

HO-CH_2-$(CH2)_7$-CH=CH-$(CH2)_7$-COOH

HO-CH_2-$(CH2)_7$-CH-CH-$(CH2)_7$-COOH

HO-CH_2-$(CH2)_7$-CH-CH-$(CH2)_7$-COOH

HO OH

Fonte: Adaptado de KOLATTUKUDY, 1980
Figura 16: Modelo de estrutura da cutina e seus componentes ácidos graxos.

De fato, a fragmentação da substância responsável pelo sinal 1 corresponde a um éster metílico de ácido graxo contendo ao menos um grupo hidroxila na molécula. Isso fica evidente quando se comparam as Figuras 17a com a 17c e as

Figuras 17b com a 17d. Os fragmentos com m/z em 201 e 169 no primeiro caso, e o fragmento com m/z 273 no segundo caso, confirmam a presença do grupo éster metílico terminal e do grupo hidroxila no carbono C-10. O fragmento complementar da molécula não forneceu íon molecular que permitisse deduzir o tamanho da cadeia completa. Esta ausência do M^+ é um evento comum em ácidos graxos lineares de cadeia longa. Ainda, espera-se que este padrão de fragmentação se repita para ácidos hidroxilados com cadeias homólogas.

Portanto, este conjunto de evidências oriundas das fragmentações dos derivados metilado e silil-metilado, somado à predominância de ácidos polihidroxilados nos produtos de hidrólise da cutina (Figura 16), permitiram usar um um ácido dihidroxilado como modelo para efetuar os cálculos de HSP. O modelo escolhido foi a molécula do ácido graxo octadecanóico (18 carbonos) contendo dois grupos hidroxilas.

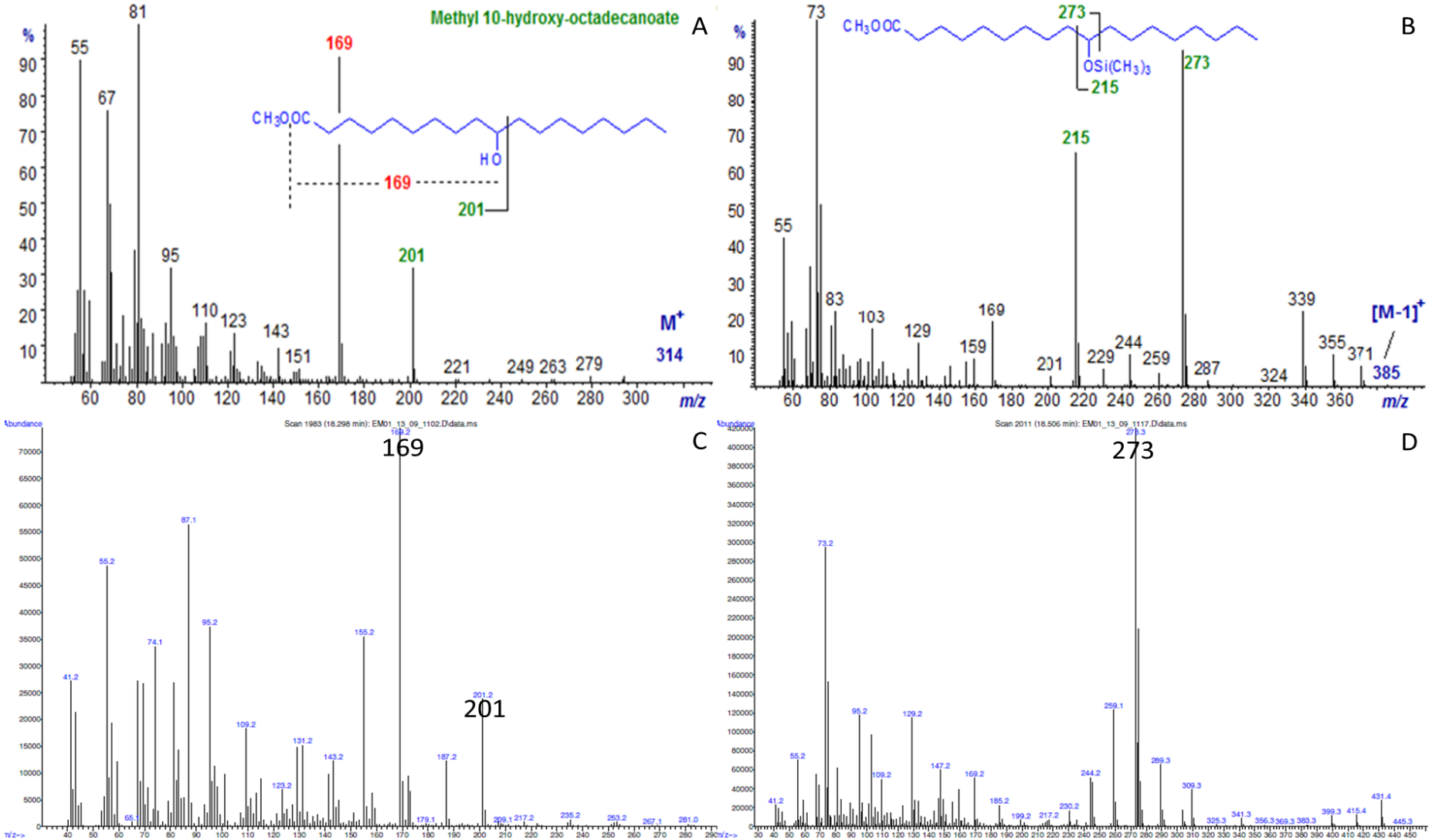


Figura 17: Padrão de fragmentação de derivados metilados (**A**) e sililados (**B**) dos ácidos graxos hidroxilados na posição C-10 e espectros obtidos para os derivados metilados (C) e sililados (D) do sinal 1 considerado como impureza no extrato de *P. cattleyanum*.

Para o extrato de *E. brasiliensis*, foi considerado como impureza principal o sinal 2 (6.94 min, Figura 15b). A biblioteca do equipamento aponta o sinal 2 como correspondendo à 5,7-dimetoxiflavanona (Figura 18a), segundo a probabilidade de qualificação do espectro. Em favor desta possibilidade, uma análise rápida por CCD (revelação com NP/PEG) apontou um leve sinal para a presença de flavonoide no extrato (resultado não mostrado). Adicionalmente, levando-se em consideração a composição química de folhas em geral em conjunto com valores possíveis de M^+ 284, duas outras substâncias foram tomadas em consideração, para efetuar os cálculos de HSP: o álcool 10-nonadecanol (Figura 18b), componente de folhas, e uma hidróxi-cetona genérica (Figura 18c).

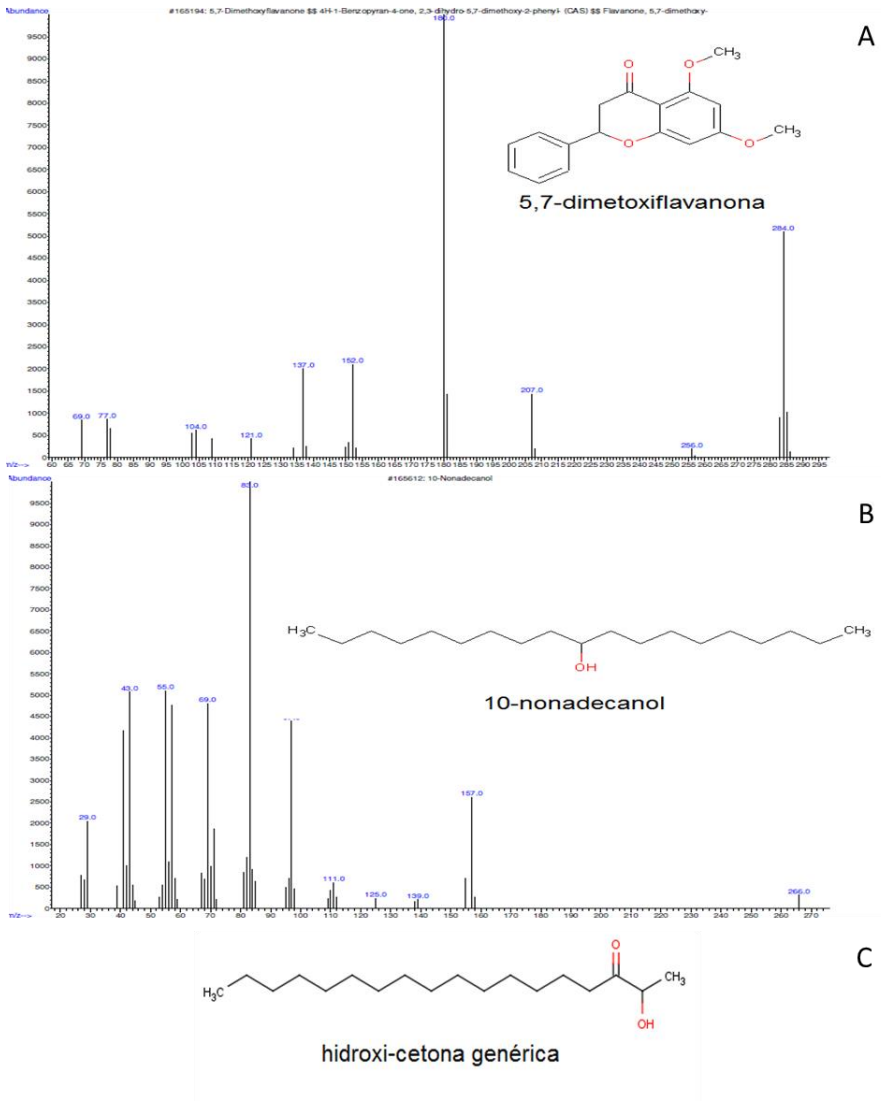


Figura 18: Substâncias tomadas como modelos para os cálculos de HSP referentes ao sinal 2 no cromatograma de *E. brasiliensis*.

Dessa maneira, para os cálculos de HSP, foram consideradas as estruturas moleculares acima supostas para os sinais 1 e 2. Estes cálculos, assim como aqueles realizados para as estruturas dos três AT, estão nas Tabelas 30-39 do Apêndice D.

Além disso, outras impurezas comuns nos extratos produzidos pelo Protocolo 1 também foram objeto dos cálculos de Hansen; entre elas α-amirina e β-amirina (álcoois triterpênicos pentacíclicos monohidroxilados); a friedelina (cetona triterpênica pentacíclica) e o esteróide γ-sitosterol. Os resultados gerados não foram aplicados diretamente aos casos de *P. cattleyanum* e *E. brasiliensis*, já que, nestes extratos, estas substâncias não foram relevantes. Contudo, podem ser úteis em estudos subsequentes. A Tabela 8 sumariza os resultados dos cálculos de HSP parciais e totais para cada substância envolvida, apresentadas nas tabelas do Apêndice D.

Tabela 8: Valores de parâmetros de solubilidade de Hansen parciais e totais para os solventes, AT e para as substâncias consideradas como impurezas

Substâncias	**Valores de HSP**			
	δd	**δp**	**δh**	**δT**
n-Butanol	16,0	5,7	15,8	23,2
Álcool tetraidrofurfurílico	17,8	8,2	12,9	23,5
Isopropanol	15,8	6,1	16,4	23,6
Dioxano	19,0	1,8	7,4	20,5
Acetona	15,5	10,4	7,0	19,9
Diclorometano	17,0	7,3	7,1	19,8
Tetraidrofurano	16,8	5,7	8,0	19,5
Clorofórmio	17,8	3,1	5,7	18,9
Tolueno	18,0	1,4	2,0	18,2
Acetato de etila	15,8	5,3	7,2	18,2
Etanol	15,8	8,8	19,4	26,5
Cicloexano	16,8	0,0	0,2	16,8
Metanol	15,1	12,3	22,3	29,6
n-Hexano	14,9	0,0	0,0	14,9
AB	16,8	7,4	7,7	19,9
AO	18,8	10,3	7,0	22,5
AU	18,8	9,6	7,3	22,3
α- e β-Amirina	18,1	8,7	3,5	20,4
Friedelina	16,8	-7,4	4,9	19,0
γ-Sitosterol	17,0	4,5	2,9	17,8
Sinal 1 (sugestão: ácido octadecanoico dihidroxilado)	16,3	5,9	19,2	25,8
Sinal 2 a (sugestão: 10-nonadecanol)	15,3	1,3	7,2	17,0
Sinal 2 b (sugestão: hidroxicetona genérica)	14,9	2,4	9,5	17,8
Sinal 2 c (sugestão: 5,7-dimetoxiflavanona)	17,2	-2,2	4,2	17,8

Com base na avaliação prévia dos cálculos de HSP sumarizados na Tabela 8, os solventes de eluição foram escolhidos baseado nos valores obtidos dos

quadrados da diferença do parâmetro de solubilidade total – $(\Delta\delta T)^2$ de cada par analito-solvente. Quanto menor o valor de $(\Delta\delta T)^2$, maior é a interação entre o par avaliado, indicando o solvente mais adequado para eluir o respectivo analito (BIELICKA-DASZKIEWICZ *et al*, 2010). Os valores de $(\Delta\delta T)^2$ estão evidenciados na Tabela 9, de onde foram escolhidos os solventes visando a separação do analito alvo AU de suas impurezas de cada extrato.

Tabela 9: Valores calculados do quadrado da diferença do parâmetro de solubilidade total – $(\Delta\delta T)^2$.

Solvente	**$(\Delta\delta T)^2$**				
	AU	**Sinal 1**	**Sinal 2 (a)**	**Sinal 2 (b)**	**Sinal 2 (c)**
n-Butanol	0,8	6,9	39,0	29,4	29,2
Álcool tetraidrofurfurílico	1,3	5,6	42,4	32,3	32,1
Isopropanol	1,6	5,1	43,9	33,6	33,4
Dioxano	3,4	28,7	12,4	7,2	7,1
Acetona	5,7	34,7	8,9	4,7	4,6
Diclorometano	6,3	36,1	8,2	4,2	4,1
Tetraidrofurano	8,2	40,5	6,3	2,8	2,8
Clorofórmio	11,4	47,3	4,0	1,4	1,3
Tolueno	17,3	58,7	1,5	0,1	0,1
Acetato de etila	17,4	58,8	1,4	0,1	0,1
Etanol	17,6	0,5	91,6	76,5	76,1
Cicloexano	30,5	81,4	0,0	1,0	1,0
Metanol	53,0	14,3	160,1	139,9	139,5
n-Hexano	55,1	119,4	4,2	8,3	8,4

Estruturas-base de cálculo de HSP: 1 = ácido diidroxioctadecanoico (considerando 2 hidroxilas secundárias); 2 (a) = 10-nonadecanol; 2 (b) = hidroxicetona genérica; 2 (c) = 5,7-dimetoxiflavanona

Considerando os valores de $(\Delta\delta T)^2$ apresentados na Tabela 9 para o AU e para as impurezas, sugeridas pela biblioteca do CG-EM ou pelo suposto íon molecular (m/z 284), e a avaliação das diferenças de polaridade entre as substâncias, a sílica foi escolhida como adsorvente por promover interações do tipo polares, como exemplo as ligações de hidrogênio.

Nestes cálculos, foram consideradas uma sugestão de estrutura para o sinal 1 (de *P. cattleyanum*), e 3 sugestões de estruturas para o sinal 2 (de *E. brasiliensis*), mostradas na Figura 19.

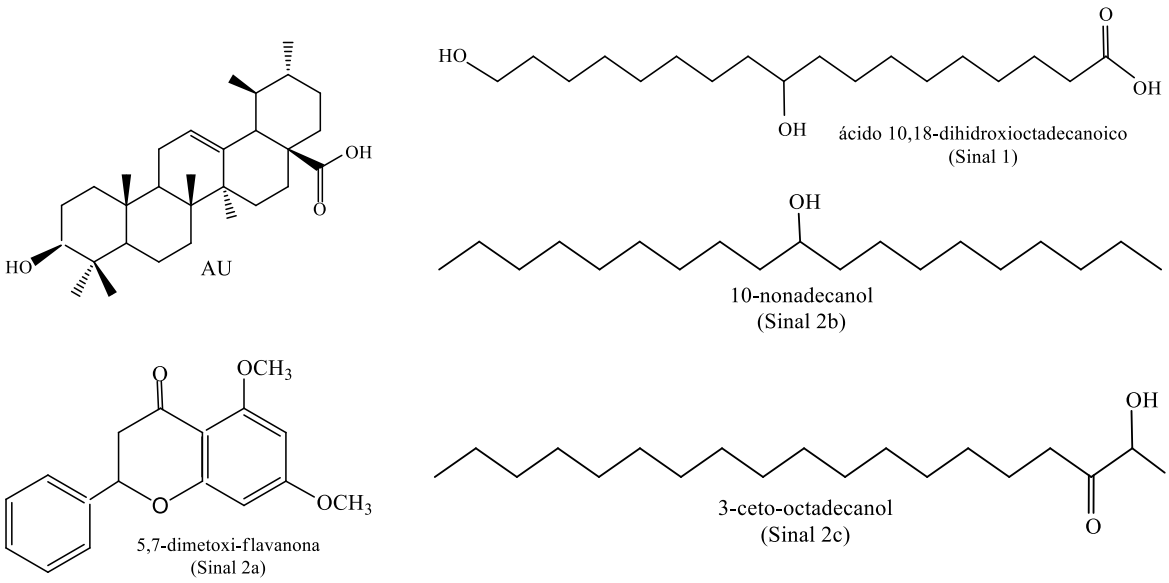


Figura 19: Estruturas do AU e das principais impurezas, conforme estruturas consideradas para os cálculos de HSP.

Conforme pode-se deduzir da avaliação da polaridade relativa das estruturas de AU e das impurezas, sinais 1 e 2, as suas retenções prováveis em sílica devem ser sinal 1 > AU > sinal 2a, b, c. O sinal 1 é representado por um ácido carboxílico dihidroxilado com cadeia hidrocarbônica menor (C18) certamente mais polar do que o ácido carboxílico mono hidroxilado, de cadeia hidrocarbônica maior (C30) de AU. Este por sua vez é mais polar do que qualquer estrutura proposta para o sinal 2, constituidas de cadeias com grupos cetona, éter e álcoois.

Ao avaliar os valores apresentados na Tabela 9 visando a obtenção de uma fração enriquecida em AU, através da aplicação da EFS, a comparação feita entre as interações conduziu à escolha dos solventes para desenvolver o método de EFS a ser utilizado em cada caso. Para o extrato de *P. cattleyanum*, os solventes indicados visando então a eluição prioritária de AU foram: cicloexano, tolueno e acetato de etila. Já para o extrato de *E. brasiliensis*, o solvente indicado foi *n*-hexano, que demonstrou uma interação maior com a substância referente ao sinal 2 (eluição prioritária da impureza).

O sinal de relativa intensidade que elui após o AU no cromatograma de *E. brasiliensis* (Figura 15B, Sinal 3, tR ≈ 11, 6 min) provavelmente trata-se de um ácido triterpênico dihidroxilado. Contribui para esta caracterização a massa molecular do mesmo sinal após sililação do extrato, que revela a incorporação de 3 grupos trimetilsilil, gerando M^+ = 673 u.m.a. Por exemplo, o ácido 29-hidroxioleanolico foi

isolado das folhas desta espécie (MAGINA *et al*, 2012). Por se tratar de um triterpeno ácido, não foi considerado como impureza nesta primeira abordagem com o uso de HSP.

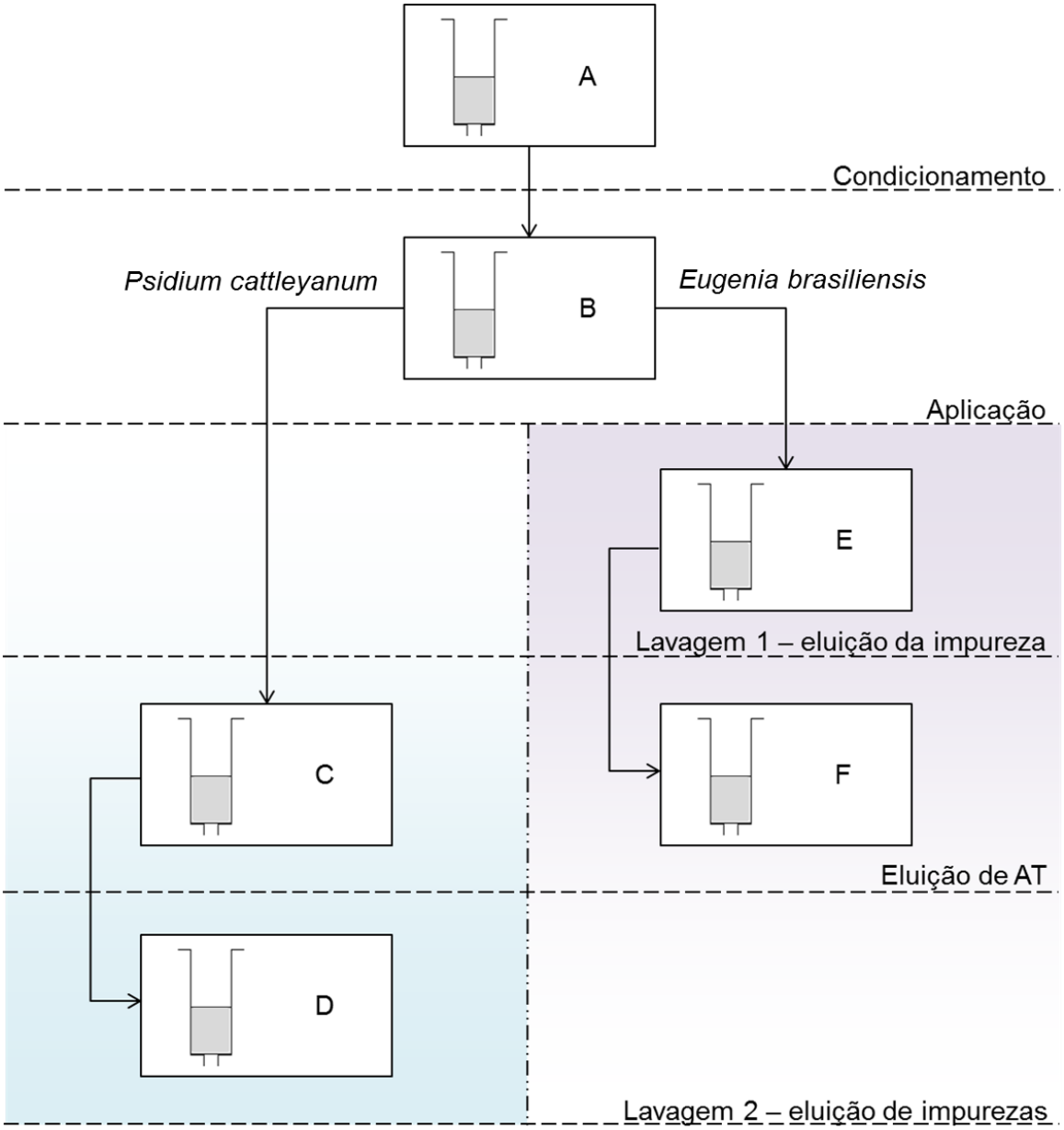
4.6.2 Desenvolvimento do método de EFS

4.6.2.1 EFS para o extrato de *P. cattleyanum*

O desenvolvimento do método de EFS para o extrato de *P. cattleyanum* foi realizado com amostras provenientes do Protocolo 1, que apresentou uma principal impureza com alto teor em relação ao sinal majoritário de AU, e também em relação ao teor de AT total (26%). Os solventes testados em sílica como adsorvente foram tolueno, cicloexano e acetato de etila, selecionados pela avaliação prévia de HSP.

Cartuchos com fase de sílica de 1 g foram utilizados para aplicar 25 mg de extrato dissolvido em clorofórmio. A aplicação desta massa de extrato foi resultado de uma série rápida de testes preliminares para se escolher a máxima carga suportada, mas ainda sem saturação da fase estacionária no cartucho, com valores ensaiados entre 5 e 100 mg. Metanol foi idealizado como solvente de eluição final das substâncias, devido à sua força eluotrópica. Em alguns casos, esta eluição final não foi necessária.

Os primeiros experimentos com *P. cattleyanum* foram realizados com cicloexano como solvente de eluição. Considerando os valores de $(\Delta\delta T)^2$ apresentados na Tabela 9 e a avaliação da polaridade relativa das estruturas, o AU é eluído na etapa de lavagem do cartucho, devido à sua menor interação com a sílica em relação à impureza considerada (Sinal 1). Para a condução destes experimentos, os solventes de escolha de eluição do AU são inseridos após a aplicação do extrato, como esquematizado na Figura 20.



A- 4 mL de metanol + 4 mL de clorofórmio.

B- 25 mg de extrato em 2 mL de clorofórmio.

C- **Exp. 1**: 4 mL de cicloexano **Exp. 2**: 4 mL de tolueno **Exp. 3**: 4 mL de acetato de etila.

D- **Exp. 1**: 4 mL de acetato de etila + 4 mL de metanol **Exp. 2**: 4 mL de acetato de etila **Exp. 3**: 4 mL de metanol.

E- **Exp. 4**: 4 mL de *n*-hexano.

F- **Exp. 4**: 4 mL de metanol.

Figura 20: Resumo esquemático da aplicação de EFS para enriquecer o conteúdo de AT dos extratos de *E. brasiliensis* e *P.cattleyanum*.

Os resultados obtidos com o experimento 1 (Figura 20) mostraram que, na fração ciclohexânica, 46,4% do AU foram recuperados com 100% de pureza com relação à impureza do Sinal 1 (Tabela 10), já que ela não foi detectada (Figura 21).

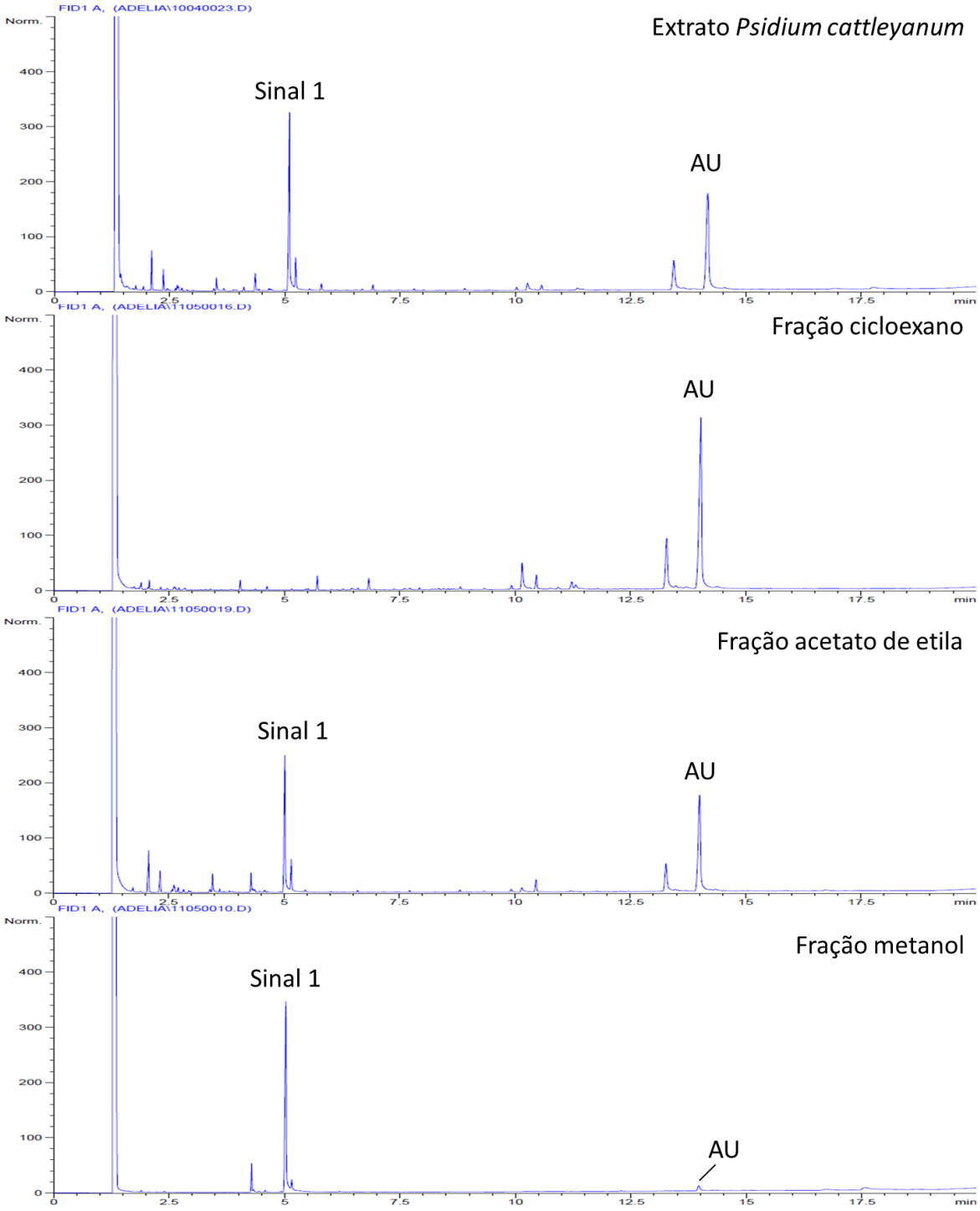


Figura 21: Cromatogramas do extrato de *P. cattleyanum* e das frações geradas por EFS do experimento 1. Análises realizadas após metilação com diazometano.

Os resultados obtidos com o experimento 2 (Figura 20) mostraram que, na fração de tolueno, 54% do AU foram recuperados com 99% de pureza com relação à impureza do Sinal 1 (Tabela 11 e Figura 22).

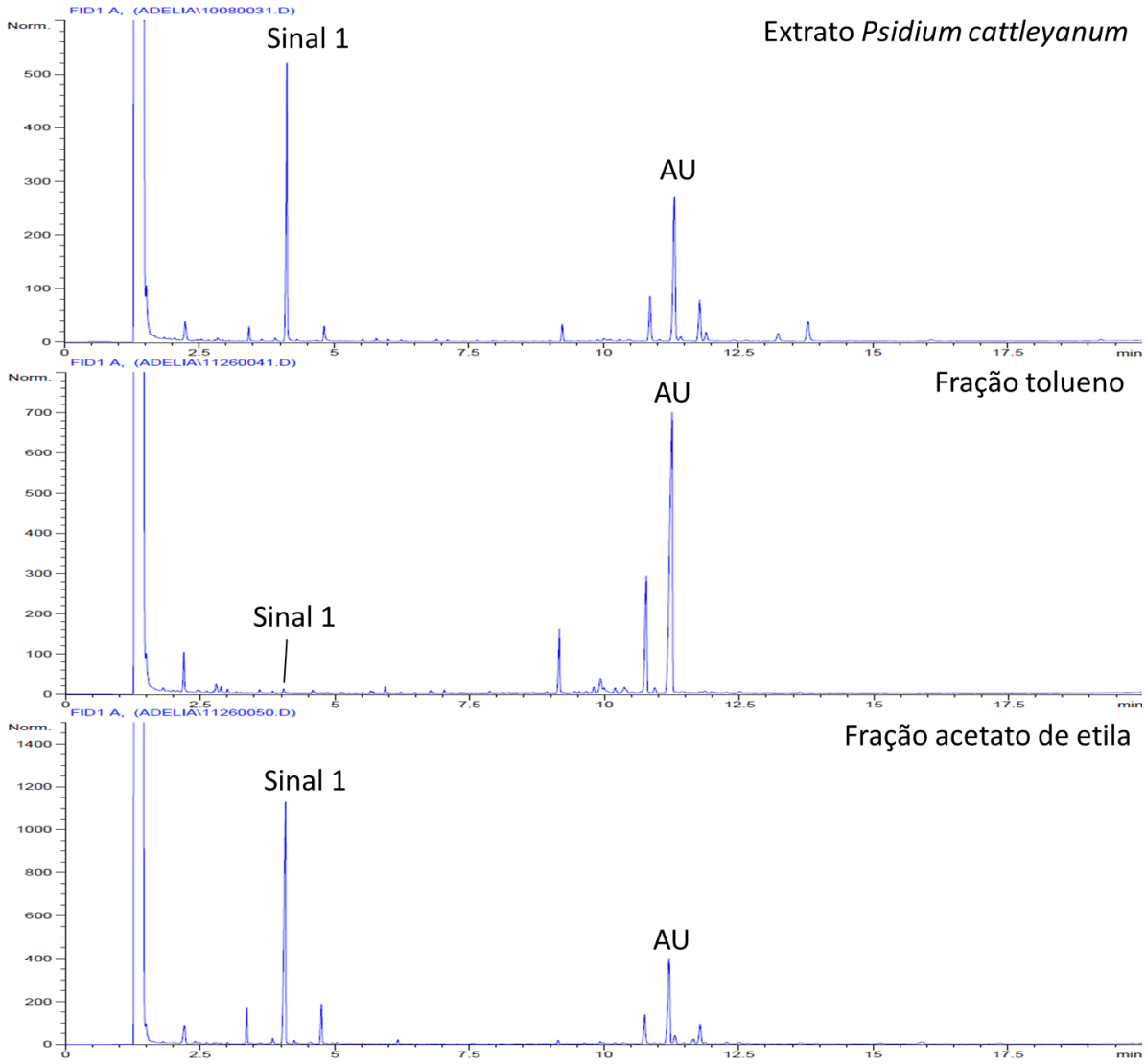


Figura 22*:* Cromatogramas do extrato de *P. cattleyanum* e das frações geradas por EFS do experimento 2. Análises realizadas após sililação com TMSI.

O experimento 3 (Figura 20) utilizou acetato de etila como solvente de eluição seletiva do AU, resultando numa fração com 90% de recuperação do AU, porém com 71% de pureza com relação à impureza do Sinal 1. Complementarmente, a Figura 23 revela que a fração de eluição final com metanol possui apenas uma pequena quantidade de AU, acompanhada por uma quantidade considerável da impureza (Sinal 1) (Tabela 12).

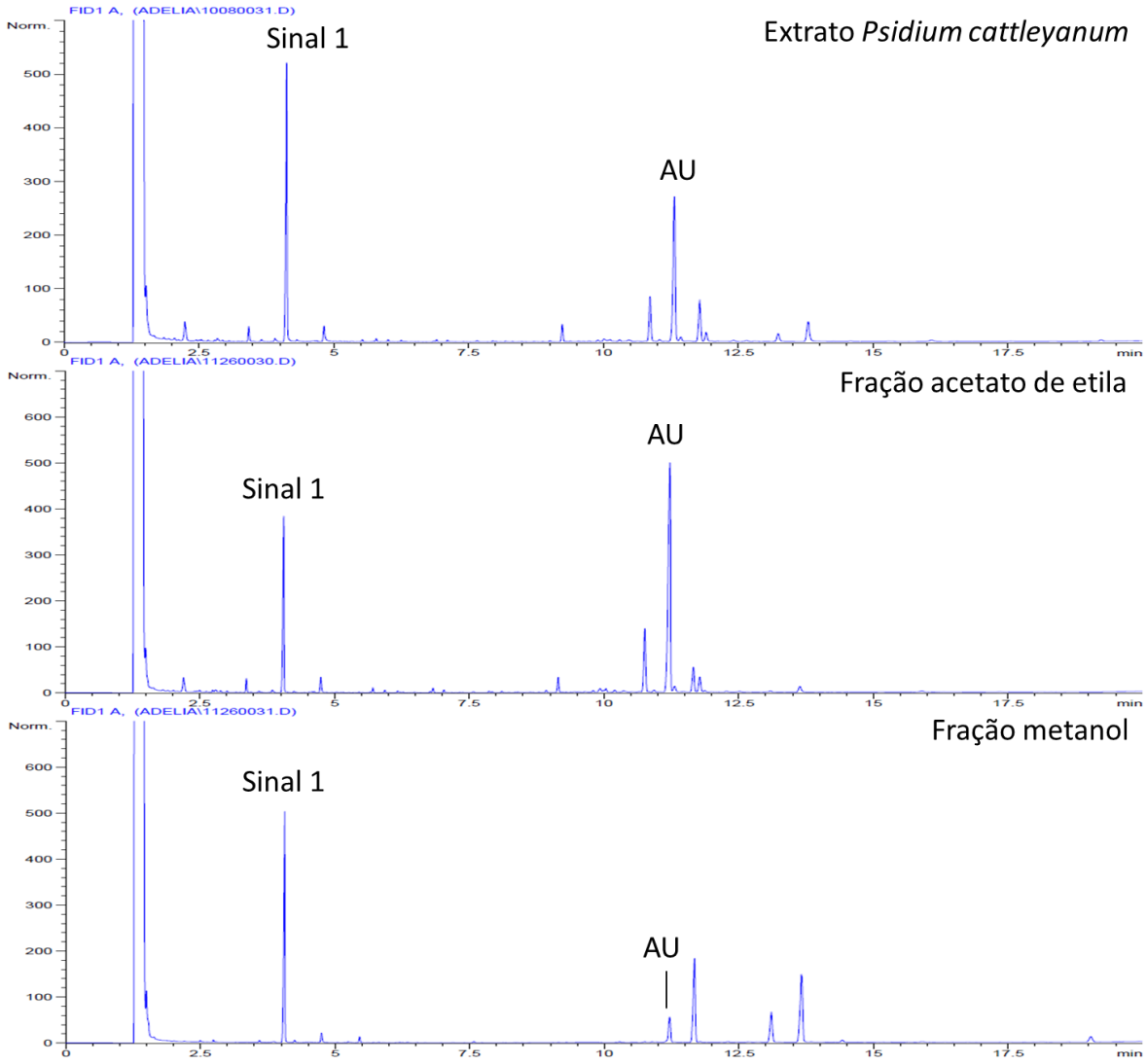


Figura 23*:* Cromatogramas do extrato de *P. cattleyanum* e das frações geradas por EFS do experimento 3. Análises realizadas após sililação com TMSI.

4.6.2.2 EFS para o extrato de *E. brasiliensis*

O desenvolvimento do método de EFS para o extrato de *E. brasiliensis* também foi realizado com amostras provenientes do Protocolo 1, ainda com foco no AU. Além deste ácido majoritário (15% num total de 21% de AT), o cromatograma do extrato bruto apresentou uma principal impureza, nomeada como Sinal 2 (Figura 15b).

O solvente testado em sílica como adsorvente foi o *n*-hexano, selecionado pela avaliação prévia de HSP para três possibilidades de estruturas moleculares consideradas (Tabela 9).

Com base nos resultados obtidos com o extrato de *P. cattleyanum*, cartuchos com fase de sílica de 1 g foram utilizados para aplicar 25 mg de extrato dissolvido

em clorofórmio. Também, de maneira similar, utilizou-se metanol como eluente final. É pertinente mencionar-se que, no caso do extrato de *E. brasiliensis*, os resultados da avaliação de Hansen convergiram para a escolha de apenas um sistema de solventes, resultando apenas no experimento 4 (Figura 20); este voltado para a eluição seletiva da impureza e consequente retenção do AU. O método utilizado está esquematizado na Figura 20, e os cromatogramas das frações resultantes deste tratamento estão na Figura 24.

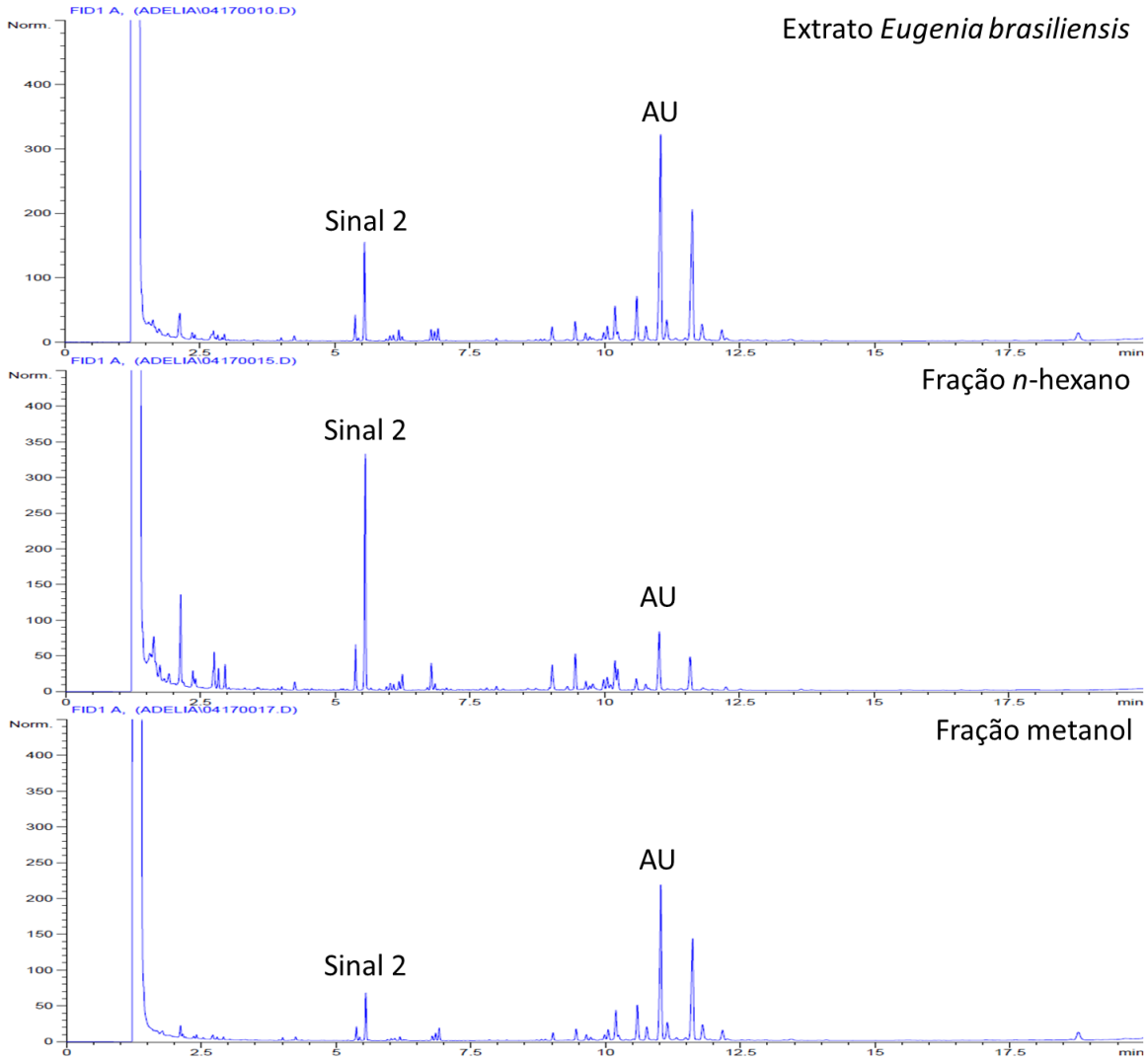


Figura 24*:* Cromatogramas do extrato de *E. brasiliensis* e das frações geradas por EFS do experimento 4. Análises realizadas após sililação com TMSI.

A análise dos resultados apresentados nas Figuras 21, 22, 23 e na Figura 24, permitiu avaliar a aplicabilidade da utilização dos parâmetros de Hansen como suporte ao enriquecimento dos extratos de folhas de espécies de Myrtaceae, aqui representadas pelas espécies *P. cattleyanum* e *E. brasiliensis*.

No caso de *P. cattleyanum*, o experimento 1 (cicloexano como eluente inicial) (Tabela 10) forneceu uma fração enriquecida em ácido ursólico (100% com 46% de recuperação) e isenta da impureza majoritária. O experimento 2 (tolueno como eluente inicial) (Tabela 11) forneceu resultados similares em relação à massa recuperada (54%), contudo este solvente arrastou traços da impureza na fração enriquecida em AU (99%). O experimento 3 (acetato de etila como eluente inicial) (Tabela 12) gerou uma fração contendo 90% de AU recuperados, porém com pureza de 71%. Isso significa que o experimento 3 forneceu maior recuperação de AU, contudo os experimentos 1 e 2 foram mais seletivos, produzindo menores recuperações de massas (46-54%), porém com maior teor relativo de AU. Dessa maneira, os três experimentos com base nos cálculos de HSP possibilitaram propor abordagens diferentes, que podem ser adotadas de acordo com o propósito do estudo, seja no sentido de se planejar processos que visem a recuperação de massas altas de AU, porém não tão seletivas; ou de obter frações contendo altos teores relativos de AU.

No caso do extrato de *E. brasiliensis*, o experimento 4 (Figura 17) incluiu uma etapa inicial de lavagem do sistema com *n*-hexano, seguido da eluição com metanol. Este procedimento não resultou na eliminação total da impureza, como mostra a Figura 24. A fração metanólica conteve 64% de AU recuperados com 82% de pureza em relação à impureza sinal 2. Como a intenção original era de concentrar o AU nesta fração, o resultado obtido não se apresentou como vantajoso, agravado pelo fato da fração eluída com *n*-hexano arrastar 5,7% em massa de AU (Tabela 13). Estes resultados demonstram que o processo não foi totalmente adequado para o extrato de *E. brasiliensis*, já que misturas foram obtidas em ambos eluentes.

Estes resultados revelaram que replicar as condições de aplicação do extrato de *P. cattleyanum* para o caso da *E. brasiliensis* não resultou de maneira similar quanto ao enriquecimento em AU e à seletividade das frações. Foram obtidas frações relativamente enriquecidas, mas não seletivas. Isso demonstra que as distintas composições dos extratos resultam em interações diferentes com a sílica, e estas interações não foram reproduzidas pelo extrato de *E. brasiliensis*, que é mais complexo quanto à mistura de componentes. Esse fato tem impacto na saturação do sistema, que não foi ensaiada para este caso; com a carga ideal do cartucho de sílica provavelmente ficando abaixo de 25 mg. Outra fonte de desvio a ser considerada refere-se aos cálculos de Hansen efetuados para o sinal 2, com base

em estruturas incertas – embasadas em indícios insuficientes – ainda que três suposições tenham sido consideradas.

Tabela 10: Resultados experimentais de SPE para extrato PC – experimento 1.

***Psidium cattleyanum* – experimento 1 (cicloexano)**						
	Massa (mg)	**AU**			**Impureza**	
		Massa (mg)	**Recuperação (%)**	**Pureza (%)**	**Massa (mg)**	**Pureza (%)**
Extrato	27,1	5,5	–	52,5	5,0	47,5
Fração cicloexano	4,0	2,6	46,4	100,0	–	0,0
Fração acetato de etila	12,2	2,8	50,9	57,9	2,0	42,1
Fração metanol	7,5	0,1	2,2	7,3	1,5	92,7
Total	23,6	5,5	99,5	–	3,6	–

Tabela 11: Resultados experimentais de SPE para extrato PC – experimento 2.

***Psidium cattleyanum* – experimento 2 (tolueno)**						
	Massa (mg)	**AU**			**Impureza**	
		Massa (mg)	**Recuperação (%)**	**Pureza (%)**	**Massa (mg)**	**Pureza (%)**
Extrato	27,7	5,3	–	52,4	4,8	47,6
Fração tolueno	6,7	2,8	54,1	99,0	0,03	1,0
Fração acetato de etila	9,2	1,2	23,0	30,9	2,7	69,1
Total	15,9	4,1	77,1	–	2,7	–

Tabela 12: Resultados experimentais de SPE para extrato PC – experimento 3.

***Psidium cattleyanum* – experimento 3 (acetato de etila)**						
	Massa (mg)	**AU**			**Impureza**	
		Massa (mg)	**Recuperação (%)**	**Pureza (%)**	**Massa (mg)**	**Pureza (%)**
Extrato	25,1	5,1	–	52,4	4,7	47,6
Fração acetato de etila	17,0	4,6	90,0	71,3	1,9	28,7
Fração metanol	6,9	0,2	3,3	16,2	0,9	83,8
Total	23,9	4,8	93,4	–	2,7	–

Tabela 13: Resultados experimentais de SPE para extrato EB.

***Eugenia brasiliensis* – experimento 4**						
	Massa (mg)	**AU**			**Impureza**	
		Massa (mg)	**Recuperação (%)**	**Pureza (%)**	**Massa (mg)**	**Pureza (%)**
Extrato	24,8	3,7	–	73,9	1,3	26,1
Fração *n*-hexano	5,1	0,2	5,7	25,3	0,6	74,7
Fração metanol	17,5	2,4	64,2	82,2	0,5	17,8
Total	22,6	2,6	69,9	–	1,1	–

5.CONCLUSÕES

❖ O presente estudo provou a viabilidade de um processo de extração eficiente para AT quimicamente estáveis em meio alcalino, nas condições trabalhadas: EtOH, NaOH 2% e temperatura ambiente diretamente sobre a matriz vegetal. Este método baseou-se na adaptação de procedimentos anteriormente utilizados para efetuar a despolimerização da cutina, um biopolímero que reveste alguns órgãos vegetais, em especial as folhas.

❖ Os protocolos desenvolvidos, com base numa solução de alcoolato e hidróxido, resultaram em extratos livres de clorofila e outros pigmentos.

❖ Os extratos ensaiados pelo método, quando aplicado a folhas de seis espécies da família Myrtaceae, geraram rendimentos em torno de 2,5% de extrato bruto.

❖ O método permitiu uma simultânea pré-purificação dos AT, que são os constituintes concentrados nos extratos. Os teores destas substâncias nos extratos foram variados, considerando-se a mistura principal de AB, AO e AU, que foram o foco do estudo. Em um dos casos (*E. florida*), este teor chegou a atingir cerca de 50% do extrato.

❖ O processo desenvolvido é de baixo custo, já que utiliza apenas álcool, hidróxido de sódio e ácido clorídrico, sem acréscimo de energia adicional, além da agitação do sistema. Neste aspecto, ele ainda oferece a economia da etapa convencionalmente realizada em alguns processos antigos, que envolve a obtenção prévia do extrato com algum solvente orgânico, seguido então pelo tratamento com hidróxido de sódio ou potássio em água ou álcool, sob refluxo.

❖ Quanto aos resíduos produzidos, o processo pode ser classificado como amigável, já que resulta no descarte apenas de água e cloreto de sódio.

❖ Uma limitação potencial do método seria a sua eficácia para extratir metabólitos suscetíveis ao meio alcalino, como por exemplo ésteres e lactonas derivados de AT. Este é um ponto que requer investigações subsequentes.

❖ Folhas de espécies de Myrtaceae provaram ser fontes de AT. Quando aplicadas ao protocolo deste estudo, *Eugenia florida* forneceu extratos ricos em AB e, *Psidium cattleyanum* e *Eugenia brasiliensis* disponibilizaram extratos ricos em AU. Contudo, outras espécies também mostraram ser fonte para obtenção de misturas de AT (AB, AO e AU), ainda que apresentando baixos teores totais, como o caso de *Syzygium cumini* e *Psidium guajava*. Portanto, a escolha das espécies para obtenção de extratos enriquecidos em AB, AO e AU, ou para posterior purificação de algum AT individual, dependerá da escolha e do acesso à fonte vegetal.

❖ A utilização de partes renováveis do vegetal como fonte de matéria-prima também foi um dos objetivos deste estudo, visando estimular a responsabilidade com relação ao impacto ambiental, e circunscrevê-los no âmbito da química sustentável.

❖ Obtenção de extratos com quantidades consideráveis de AT total e individual, no caso de AB em *E. florida (*39%) e AU em *P. cattleyanum (*20%) e *E. brasiliensis* (15%), demonstram que este protocolo fornece extratos contendo maiores teores de AT do que os procedimentos descritos na literatura, ainda que, eventualmente, em menor rendimento total.

❖ Foram otimizadas duas condições analíticas em CG-DIC para a separação e melhor resolução entre AB e AO nos extratos de folhas de espécies de Myrtaceae. Os métodos foram desenvolvidos utilizando a derivatização das amostras para se obter os ésteres metílicos ou os derivados bis-trimetilsililados. As condições foram otimizadas visando análises rápidas e resoluções máximas entre AB e AO, o que possivelmente poderá ser aplicado na prospecção de AT em outras matrizes vegetais, ou no auxílio à padronização de fitofármacos e produtos à base de plantas contendo extratos ricos nestes ácidos.

❖ O item precedente gerou a publicação do artigo intitulado '*Comparison between methyl and trimethylsilyl ester derivatives in the separation and GC quantification of triterpene acids in Eugenia brasiliensis leaf extract*' com base no estudo das condições analíticas envolvendo os métodos de derivatização, que está apresentado no Anexo A.

❖ Foi testada a aplicabilidade dos parâmetros de solubilidade de Hansen visando a previsão de modelos aplicados à purificação ou o enriquecimento de extratos. Para tal, utilizaram-se métodos alternativos, que levaram em conta a contribuição de grupos de Stefanis e Panayiotou. O sucesso desta aplicação foi ensaiado considerando-se dois extratos contendo AU (*P. cattleyanum* e *E. brasiliensis*), e duas impurezas (analito alvo) principais e distintas para cada extrato.

❖ O modelo proposto para a EFS foi satisfatório do extrato de *P. cattleyanum*, gerando frações mais seletivas (100% de AU, 46% de recuperação) ou com maior recuperação (71% de AU, 90% de recuperação). Todavia, para o extrato de *E. brasiliensis*, o modelo proposto não foi satisfatório para gerar frações seletivas (82% de AU) ou para recuperação (64%). Ambos os estudos exigiram classificar quimicamente as impurezas-alvo, com o objetivo de dar suporte aos cálculos de HSP. Para este objetivo foram utilizadas informações do fragmentograma e íon molecular, obtidos por CG-EM.

REFERÊNCIAS

ACHIWA, Y.; HASEGAWA, K.; UDAGAWA, Y. Molecular mechanism of ursolic acid induced by apoptosis in poorly differentiated endometrial cáncer HEC108 cells. **Oncology Reports**, v. 14, n. 2, p. 507-12, 2005.

AIKEN, C.; CHEN, C. H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. **Trends Mol Med**, v. 11, n. 1, p. 31-6, 2005.

AMORIM, A. C.; LIMA, C. K. F.; HOVELLA, A. M. C.*et al* Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, p. 923-928, 2009.

ARTHUR, H. R.; HUI, W. H. Triterpene acids from the leaves of *Psidium guaijava*, L. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1403, 1954.

BAKER, E. A. The morphology and composition of isolated plant cuticles. **New Phytology**, v. 69, p. 1053-1058, 1970.

BAKER, E. A.; HOLLOWAY, P. J. The constituent acids of Angiosperm cutins. **Phytochemistry**, v. 9, p. 1557-1562, 1970.

BALA, A. Y.; ADAMU, T. Anti-diarrhoeal Activity of *Psidium guajava* (Gauva) Aqueous Leaf Extract in Experimental Animals. **Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences,** v. 16, n.2, p. 115-121, 2008.

BANIK, R. M.; PANDEY, D. K. Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from Lantana camara roots using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 3, p. 241-248, 2008.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROSO, G. M.; PERON, M. V. Myrtaceae. In: LIMA, M. P. M.; GUEDES-BRUNI, R. R. **Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ: Aspectos florísticos das espécies vasculares**. v. 1. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1994. p. 262-302.

BARTON, A. F. M. **Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters**. 2 ed. ed. Boca Raton: CRC Press, 1985. 541 p.

BIELICKA-DASZKIEWICZ, K.; VOELKEL, A.; PIETRZYNSKA, M.*et al* Role of Hansen solubility parameters in solid phase extraction.**J Chromatogr A**, v. 1217, n. 35, p. 5564-70, 2010.

BRANDELLI, C. L.; GIORDANI, R. B.; DE CARLI, G. A.*et al*Indigenous traditional medicine: in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. **Parasitol Res**, v. 104, n. 6, p. 1345-9, 2009.

BREITMAIER, E. **Terpenes - Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones**. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. 214 p.

BRINGE, K.; SCHUMACHER, C. F.; SCHMITZ-EIBERGER, M.*et al* Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. **Phytochemistry**, v. 67, n. 2, p. 161-70, 2006.

CAI, L.; WU, C. D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 10, p. 987-990, 1996.

CHIBNALL, A. C.; PIPER, S. H.; POLLARD, A.; SMITH, J. A. B.; WILLIAMS, E. F. CCXXCI. The wax constituents of the apple cuticle. **Biochemical Journal**, v. 25, p. 2095-2110, 1931.

CHINTHARLAPALLI, S.; PAPINENI, S.; RAMAIAH, S. K.*et al* Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. **Cancer Res**, v. 67, n. 6, p. 2816-23, 2007.

CLAUDE, B.; MORIN, P.; LAFOSSE, M.; BELMONT, A-S.; HAUPT, K. Selective solid-phase extraction of a triterpene acid from a plant extract by molecularly imprinted polymer. **Talanta**, v. 75, p. 344–350, 2008.

CORBETT, R. E.; McCRAW, E. H. Extractives from the New Zealand Myrtaceae. IV. Triterpene acids from the bark of *Leptospermum ericoides*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 29-31, 1959.

CSUK, R.; SIEWERT, B. A convenient separation of ursolic and oleanolic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 49, p. 6616-6618, 2011.

CUI, T.; LI, J.-Z.; KAYAHARA, H.*et al* Quantification of the polyphenols and triterpene acids in Chinese Hawthorn fruit by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4574-4581, 2006.

DING, K. E.; XIAO, S.; LU, J.*et al* Rapid Large-Scale Purification of Betulinic Acid. **Journal of Food Process Engineering**, v. 35, n. 6, p. 881-886, 2012.

DOMINGUES, R. M. A.; SOUSA, G. D. A.; FREIRE, C. S. R.*et alEucalyptus globulus* biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 65-70, 2010.

DOMINGUES, R. M. A.; SOUSA, G. D. A.; SILVA, C. M.*et al* High value triterpenic compounds from the outer barks of several *Eucalyptus* species cultivated in Brazil and in Portugal. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 158-164, 2011.

DUFOUR, D.; PICHETTE, A.; MSHVILDADZE, V.*et al* Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from Ledum groenlandicum Retzius. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 1, p. 22-8, 2007.

EGLINTON, G.; HUNNEMAN, D. H. Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids - I. The constituent cutin acids of apple cuticle. **Phytochemistry**, v. 7, p. 313-322, 1968.

ELLGARDT, K. 2006. **Triterpenes in apple cuticle of organically and IP cultivated apples. Bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture programme**, Sveriges Lantbruks Universitet, Alnarp, Sweden. Disponível em:<http://ex-epsilon.slu.se:8080/archive/00001291/01/Karin_Ellgardt_Bachelor.pdf>. Acesso em: 16 Abril 2014.

EPO. **European Patent Office.** Julho 2013. Disponível em:<http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html>. Acesso em: 20 outubro 2012.

FERREIRA, A. C. F.; NETO, J. C.; SILVA, A. C. M.*et al*Inhibition of Thyroid Peroxidase by Myrcia uniflora flavonoids. **Chemical Res. Toxicol.**, v. 19, p. 351-355, 2006.

FLORES-SÁNCHEZ, I. J.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; MONTES-HORCASITAS, M. D. C.*et al*Biosynthesis of Sterols and Triterpenes in Cell Suspension Cultures of *Uncaria tomentosa*. **Plant Cell Physiol.**, v. 43, n. 12, p. 1502-1509, 2002.

FRIGHETTO, N., WELENDORF, R. M., SILVA, A. M. P., NAKAMURA, M. J., SIANI, A. C. Purification of betulinic acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by high speed counter-current chromatography. **Phytochemical Analalysis**, v. 16, p. 411-414, 2005a.

FRIGHETTO N, WELENDORF MR, SILVA, AMP, NAKAMURA MJ, SIANI AC. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 338-343, 2005b.

FRIGHETTO, R. T. S.; WELENDORF, R. M.; NIGRO, E. N.*et al*Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 767-771, 2008.

FULDA, S. Betulinic Acid for cancer treatment and prevention. **Int J Mol Sci**, v. 9, n. 6, p. 1096-1107, Jun 2008.

GALGON, T.; HOKE, D.; DRAGER, B. Identification and quantification of betulinic acid. **Phytochemical Analalysis**, v. 10, p. 187-190, 1999.

GOULAS, V.; MANGANARIS, G. A. Towards an efficient protocol for the determination of triterpenic acids in olive fruit: a comparative study of drying and extraction methods. **Phytochem Anal**, v. 23, n. 5, p. 444-9, 2012.

GU, J.-Q.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.*et al* Dereplication of pentacyclic triterpenoids in plants by GC-EI/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 17, n. 2, p. 102-106, 2006.

GUILIN PULANDE BIOTECHNOLOGY CO LTD (China). Lu Guangzheng; Wei Caizhu; Liu Zhangyan; Chen Yuansheng; Liang Changxiang; Chen Lian. **Method for extracting ursolic acid from persimmon leaf by composite countercurrent method.**CN n. 101538309 (A), 2009.

GUINDA, A.; RADA, M.; DELGADO, T.*et al*Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 17, p. 9685-91, 2010.

GUO, S.; DUAN, J. A.; TANG, Y.*et al* High-performance liquid chromatography--two wavelength detection of triterpenoid acids from the fruits of Ziziphus jujuba containing various cultivars in different regions and classification using chemometric analysis. **J Pharm Biomed Anal**, v. 49, n. 5, p. 1296-302, 2009.

HANSEN, C. M. **Hansen Solubility Parameters: a user's handbook**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

HENAN UNIVERSITY (China). Wang Jinmei; Ji Zhiqiang; Song Yanli; Kang Wenyi. **Method for extracting ursolic acid from vegetable Dian clove.** CN n. 101544679, 2009.

HINSHAW, J. V. Optimization of separation and computer assistance. In: GROB, R. L.; BARRY, E. F. **Modern practice of gas chromatography**. 4. ed. New York: Wiley, 2004. p. 193-228.

HOLLOWAY, P. J.; DEAS, A. H. B. Epoxyoctadecanoic acids in plant cutins and suberins. **Phytochemistry**, v. 12, p. 1721-1735, 1973.

HUELIN, F. E. Studies in the natural coating of apples. IV. The nature of cutin. **Australian Journal of Biological Scince**, v. 12, p. 175-180, 1959.

HUELIN, F. E.; GALLUP, R. A. Studies in the natural coating of apples. I. Preparation and properties of fractions. **Australian Journal of Biological Scince**, v. 4, n. 4, p. 526-533, 1951.

HUI, W.-H.; MAN-MOON, L. Two new triterpenoids from *Rhodomyrtus tomentosa*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 11, p. 1741-1743, 1976.

JÄGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.*et al* Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016-31, 2009.

JÄGER, S.; WINKLER, K.; PFULLER, U.; SCHEFFER, A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. **Planta Med,** v. 73, p. 157-162, 2007.

JANICSAK, G.; VERES, K.; KALLAI, M.; MATHE, I. Gas chromatography method for routine determination of oleanolic and ursolic acids in medicinal plants. **Chromatographia**, v. 58, p. 295-299, 2003.

JEONG, W.; HONG, S. S.; KIM, N.*et al* Bioactive triterpenoids from Callistemon lanceolatus. **Arch Pharm Res**, v. 32, n. 6, p. 845-9, 2009.

JETTER, R.; SCHÄFFER, S. Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1725-1737, 2001.

JIN, I. J.; KO, Y.; KIM, Y. M.; HAN, S. K. Solubilization of oleanolic acid and ursolic acid by cosolvency. **Arch Pharm Res**, v. 20, p. 269-274, 1997.

JU, Z.; BRAMLAGE, W. J. Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. **Post-harvest Biology and Technology**, v. 16, p. 107-118, 1999.

JUAN, M. E.; WENZEL, U.; RUIZ-GUTIERREZ, V.*et al* Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 2553-2557, 2006.

KOLATTUKUDY, P. E. Biopolyester Membranes of Plants: Cutin and Suberin. **Science**, v. 208, p. 990-1000, 1980.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, p. 508-536, 1977.

LASZCZYK, M.; JÄGER, S.; SIMON-HAARHAUS, B. *et al.* Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (betulae cortex). **Planta Medica**, v. 72, p. 1389-1395, 2006.

LEE, M-H.; NISHIMOTO, S.; YANG, L-L. *et al* Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, n. 44, p. 1343-2349, 1997.

LIMA, A. M. B.; d'AVILA, L. A.; SIANI, A. C. Comparison between methyl and trimethylsilyl ester derivatives in the separation and gc quantification of triterpene acids in *Eugenia brasiliensis* leaf extract. **Chromatographia**, v. 77, p. 629-635, 2014.

LIN, Y.; VERMEER, M. A.; TRAUTWEIN, E. A. Triterpenic Acids Present in Hawthorn Lower Plasma Cholesterol by Inhibiting Intestinal ACAT Activity in Hamsters. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 801272, 2011.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

_____. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 92-4, 2005.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 3. Nova Odessa: Plantarum, 2009. 386 p.

MABBERLEY, D. J. **The Plant-book**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 874 p.

MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, J. B.; *et al.* Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Quím Nova** v. 35, n. 6, p. 1184-1488, 2012.

MARTELANC, M.; VOVK, I.; SIMONOVSKA, B. Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1216, n. 38, p. 6662-70, 2009.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; CARVALHO, A. M. *et al.* Ecological importance of Myrtaceae in an Eastern Brazilian wet forest. **Biotropica**, v. 15, n. 1, p. 68-70, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**. v. 75, p. 311-335, 2012.

PAINULY, P.; TANDON, J. S. A new triterpene from *Eugenia kurzii* Duthie. **Indian Journal of Chemistry B**, v. 22, p. 284-5, 1983.

PEPATO, M. T.; OLIVEIRA, J. R.; KETTELHUT, I. C.*et al* Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin diabetic rats. **Diabetes Research**, v. 22, n. 2, p. 49-57, 1993.

PEREIRA, S. I.; FREIRE, C. S. R.; PASCOAL NETO, C.*et al*Chemical composition of the epicuticular wax from the fruits of *Eucalyptus globulus*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 364-369, 2005.

PÉREZ-CAMINO, M. C.; CERT, A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic Triterpene acids in vegetable oils. **J. Agric. Food Chem**, v. 74, p. 1558-1562, 1999.

PRICE, K. R.; JOHNSON, L. T.; FENWICK, G. R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **CRC Critical Review Food Science and Nutrition**, v. 26, p. 27-135, 1987.

QINGDAO UNIVERSITY (China). Zhao, A. **Method for extracting ursolic acid from haw.**CN n. 101148469-A; 100543030-C, 2008.

RAMOS, M. F. S.; MONTEIRO, S. S.; SILVA, V. P.*et al*Essential Oils From Myrtaceae Species of the Brazilian Southeastern Maritime Forest (Restinga). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 109-113, 2010.

RAZBORŠEK, M. I.; VONČINA, D. B.; DOLEČEK, V.*et al* Determination of Major Phenolic Acids, Phenolic Diterpenes and Triterpenes in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. **Acta Chim. Slov.**, v. 54, p. 60-67, 2007.

_____. Determination of Oleanolic, Betulinic and Ursolic Acid in Lamiaceae and Mass Spectral Fragmentation of Their Trimethylsilylated Derivatives. **Chromatographia**, v. 67, n. 5-6, p. 433-440, 2008.

ROMERO, C.; GARCÍA, A.; MEDINA, E.*et al*Triterpenic acids in table olives. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 670-674, 2010.

RONG, Z. T.; GONG, X. J.; SUN, H. B.*et al* Protective effects on cerebral ischemic damage in vivo H_2O_2 injury in vitro. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 1, p. 78-85, 2011.

SAH, A. K.; VERMA, V. K. *Syzygium cumini*: An overview. **J. Chem. Pharm. Res**, v. 3, n. 3, p. 108-113, 2011.

SALVADOR, J. A. R. **Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer**. Portugal: Nova Science Publishers Inc, 2011, 321 p.

SÁNCHEZ-ÁVILA, N.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography-mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, n. 1-2, p. 158-65, 2007.

SÁNCHEZ-ÁVILA, N.; PRIEGO-CAPOTE, F.; RUIZ-JIMÉNEZ, J. *et al.* Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 40-8, 2009.

SANDO, C. E. Ursolic acid. **J Biol Chem**, v. 90, p. 477-495, 1931.

SCHMEDA-HIRCHMANN, G.; THEODOLUZ, C.; FRANCO, L. *et al* Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora*: xantina oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 183-186, 1987.

SCHNEIDER, P.; HOSSEINY, S. S.; SZCZOTKA, M.*et al* Rapid solubility determination of the triterpenes oleanolic acid and ursolic acid by UV-spectroscopy in different solvents. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 2, p. 85-87, 2009.

SCIFINDER. 2013. Disponível em:<https://scifinder.cas.org>. Acesso em: 10 julho 2013.

SHANDONG PROVINCIAL INSTITUTE OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE (China). Yan Xuesheng; Zhu Jianwei; Yu Zongyuan; Liu Qing; Li Yan. **Method for extracting and preparing ursolic acid from uncaria.** CN n. 101643492, 2010.

STEFANIS, E.; PANAYIOTOU, C. Prediction of Hansen Solubility Parameters with a New Group-Contribution Method. **International Journal of Thermophysics**, v. 29, n. 2, p. 568-585, 2008.

STEVENS, P. F. (2001 onwards). **Angiosperm Phylogeny Website.** Version 12, July 2012. Disponível em:<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em: 03 julho 2013.

STRÖMSTEDT, A. A.; GÖRANSSON, U.; BOHLIN, L. Bioassay-guided Supercritical Fluid Extraction of Cyclooxygenase-2 Inhibiting Substances in *Plantago major* L. **Phytochem. Anal**., v. 24, p. 176–183, 2013.

SZAKIEL, A.; CZKOWSKI, P.; PENSEC, F. *et al* Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids.**Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 263-284, 2012.

TABARELLI, M.; PERES, C. A. Abiotic and vertebrate seed dispersal in the Brazilian Atlantic Forest: implications on Forest regeneration. **Biological Conservation**, v. 106, p. 165-176, 2002.

TARVAINEN, M.; SUOMELA, J.-P.; KALLIO, H.*et al* Triterpene Acids in Plantago major: Identification, Quantification and Comparison of Different Extraction Methods. **Chromatographia**, v. 71, n. 3-4, p. 279-284, 2010.

TIAN, S.; SHI, Y.; YU, Q. *et al* Determination of oleanolic acid and ursolic acid contents in *Ziziphora clinopodioides* Lam. by HPLC method.**Pharmacogn Mag**., v. 6, n. 22, p. 116–119, 2010.

VIEGAS, JR. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna.**Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, H.; FUJIMOTO, Y. Triterpene esters from Eucalyptus tereticornis. **Phytochemistry Letters**, v. 33, n. 1, p. 151-153, 1993.

WHITAKER, B. D. Phenolic fatty-acid esters from peel of Gala apples and their possible role in resistance to superficial scald. **Postharvest Biology and Technology**, v. 13, p. 1-10, 1998.

WHITE, D. E.; ZAMPATTI, L. S. The Chemistry of Western Australian Plants. Part VII. Oleanolic acid acetate from Eucalyptus calophylla bark. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 5035-5054, 1952.

WÓJCIAK-KOSIOR, M. Separation and determination of closely related triterpenic acids by high performance thin-layer chromatography after iodine derivatization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 2, p. 337-40, 2007.

UNIVERSITY WUHAN (China). Xiangjiu He; Hui Hu; Yixuan Wu. **Total triterpenoids of apples and method for preparing same.** CN n. 101810696, 2010.

XI, J.; CHANG, Q.; CHAN, C. K.*et al* Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 1, p. 172-82, 2009.

XIE, J (China). Jialiang Xie. **Preparation method for ursolic acid, produced products and application thereof.**CN n. 101318985 (A), 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA OS DERIVADOS METILADOS

Tabela 14: Avaliação da Curva de Calibração 1 dos derivados metilados pela regressão linear ordinária (Faixa A)

Testes	**Ácido Oleanólico**	**Ácido Betulínico**	**Ácido Ursólico**
	Dados brutos Regressão linear ordinária (k=5, n=3, N=15)	**Dados brutos Regressão linear ordinária (k=5, n=3, N=15)**	**Dados brutos Regressão linear ordinária (k=5, n=3, N=15)**
Avaliação de homogeneidade das variâncias *Levene Test* p≤0,05 – variâncias não constantes 0, 05<p≤0,1 – homogeneidade duvidosa p>0,1 – variâncias constantes	p = 0,116160 Variâncias constantes	p = 0,016388 Variâncias não constantes	p = 0,035653 Variâncias não constantes
Avaliação da distribuição dos resíduos (Teste de normalidade) - *Shapiro-Wilk's* p≤0,05 – distribuição não normal dos resíduos	p = 0,00367 Distribuição não normal dos resíduos	p = 0,00199 Distribuição não normal dos resíduos	p = 0,00883 Distribuição não normal dos resíduos
Avaliação de autocorrelação dos resíduos Estatística de *Durbin-Watson* – para K=2 e N=15 d_L tab.=1,07697 e d_U tab.=1,36054 a 5% Avaliação da autocorrelação positiva: $d<d_L$ – resíduos positivamente autocorrelacionados $d_L \leq d \leq d_U$ – teste inconclusivo $d>d_U$ – resíduos não positivamente autocorrelacionados Avaliação da autocorrelação negativa: $(4-d)<d_L$ – resíduos negativamente autocorrelacionados $d_L \leq (4-d) \leq d_U$ – teste inconclusivo $(4-d)>d_U$ – resíduos não negativamente autocorrelacionados	d= 0,500535 Serial corr.= 0,753012 Resíduos positivamente autocorrelacionados	d= 0,498795 Serial corr.= 0,755998 Resíduos positivamente autocorrelacionados	d= 0,845699 Serial corr.= 0,592123 Resíduos positivamente autocorrelacionados
Equação da reta ($y = b_1 x + b_0$)	b_0 = -2,90652 b_1 = 0,81818	b_0 = -3,59024 b_1 = 0,85919	b_0 = -20,7540 b_1 = 0,9083
Avaliação da significância do parâmetro b_0 p≤0,05 – intercepto estatisticamente significativo	p = 0,147041 Intercepto não significativo	p = 0,085967 Intercepto não significativo	p = 0,113920 Intercepto não significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 p≤0,05 – regressão estatisticamente significativa	p <0,000001 Estatisticamente significativo	p <0,000001 Estatisticamente significativo	p <0,000001 Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	1,884816	1,932377	12,24576
Erro padrão b_1	0,034004	0,033858	0,01896
R^2	0,978038817	0,980211571	0,994364738
R^2 ajustado	0,976349495	0,978689384	0,993931256
Erro padrão da estimativa	4,34735239	4,45705169	32,5189398
Avaliação de *outliers* da regressão (resíduos padronizados)	Sem *outliers*	Sem *outliers*	Sem *outliers*

Tabela 15: Avaliação da Curva de Calibração 1 dos derivados metilados pela regressão linear ponderada (Faixa A)

Testes	**Ácido Oleanólico**	**Ácido Betulínico**	**Ácido Ursólico**
	Dados brutos Regressão linear ponderada (1/x) (k=5, n=3, N=15)	**Dados brutos Regressão linear ponderada (1/x) (k=5, n=3, N=15)**	**Dados brutos Regressão linear ponderada (1/y) (k=5, n=3, N=15)**
Equação da reta ($y = b_1 x + b_0$)	b_0 = -0,210968 b_1 = 0,757646	b_0 = -0,889561 b_1 = 0,800285	b_0 = -16,2181 b_1 = 0,8956
Avaliação da significância do parâmetro b_0 p≤0,05 – intercepto estatisticamente significativo	p = 0,874107 Intercepto não significativo	p = 0,520623 Intercepto não significativo	p = 0,001620 Intercepto estatisticamente significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 p≤0,05 – regressão estatisticamente significativa	p <0,000001 Estatisticamente significativo	p <0,000001 Estatisticamente significativo	p <0,000001 Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	1,305512	1,347314	4,091866
Erro padrão b_1	0,039856	0,039948	0,017052
R^2	0,96527365	0,968623305	0,995309515
R^2 ajustado	0,962602392	0,966209713	0,994948709
Erro padrão da estimativa	0,697762984	0,709662885	1,27663306
Avaliação de *outliers* da regressão (resíduos padronizados)	Sem *outliers*	Sem *outliers*	Sem *outliers*

Tabela 16: Avaliação da Curva de Calibração 1 dos derivados metilados pela regressão linear ordinária (Faixa B)

Testes	**Ácido Oleanólico**	**Ácido Betulínico**
	Dados brutos Regressão linear ordinária (k=5, n=3, N=15)	**Dados brutos Regressão linear ordinária (k=5, n=3, N=15)**
Avaliação de homogeneidade das variâncias *Levene Test* p≤0,05 – variâncias não constantes 0,05<p≤0,1 – homogeneidade duvidosa p>0,1 – variâncias constantes	p = 0,215502 Variâncias constantes	p = 0,186792 Variâncias constantes
Avaliação da distribuição dos resíduos (Teste de normalidade) - *Shapiro-Wilk's* p≤0,05 – distribuição não normal dos resíduos	p = 0,00950 Distribuição não normal dos resíduos	p = 0,01206 Distribuição normal
Avaliação de autocorrelação dos resíduos Estatística de *Durbin-Watson* – para K=2 e N=15 d_L tab.=1,07697 e d_U tab.=1,36054 a 5% Avaliação da autocorrelação positiva: $d<d_L$ – resíduos positivamente autocorrelacionados $d_L \leq d \leq d_U$ – teste inconclusivo $d>d_U$ – resíduos não positivamente autocorrelacionados Avaliação da autocorrelação negativa: $(4-d)<d_L$ – resíduos negativamente autocorrelacionados $d_L \leq (4-d) \leq d_U$ – teste inconclusivo $(4-d)>d_U$ – resíduos não negativamente autocorrelacionados	d= 0,582005 Serial corr.= 0,681854 Resíduos positivamente autocorrelacionados	d= 0,569997 Serial corr.= 0,693603 Resíduos positivamente autocorrelacionados
Equação da reta ($y = b_1 x + b_0$)	b_0 = -52,3250 b_1 = 0,9924	b_0 = -60,5488 b_1 = 1,0602
Avaliação da significância do parâmetro b_0 p≤0,05 – intercepto estatisticamente significativo	p = 0,008367 Intercepto estatisticamente significativo	p = 0,007321 Intercepto estatisticamente significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 p≤0,05 – regressão estatisticamente significativa	p <0,000001 Estatisticamente significativo	p <0,000001 Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	16,85227	19,07491
Erro padrão b_1	0,02528	0,02779
R^2	0,991637247	0,991149421
R^2 ajustado	0,990993959	0,990468607
Erro padrão da estimativa	30,951677	35,0338735
Avaliação de *outliers* da regressão (resíduos padronizados)	Sem *outliers*	Sem *outliers*

Tabela 17: Avaliação da Curva de Calibração 1 dos derivados metilados pela regressão linear ponderada (Faixa B)

Testes	**Ácido Oleanólico**	**Ácido Betulínico**
	Dados brutos Regressão linear ponderada (1/x) (k=5, n=3, N=15)	**Dados brutos Regressão linear ponderada (1/x) (k=5, n=3, N=15)**
Equação da reta ($y = b_1 x + b_0$)	b_0 = -20,6702 b_1 = 0,9385	b_0 = -24,9870 b_1 = 1,0014
Avaliação da significância do parâmetro b_0 p≤0,05 – intercepto estatisticamente significativo	p = 0,055675 Intercepto não significativo	p = 0,040854 Intercepto estatisticamente significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 p≤0,05 – regressão estatisticamente significativa	p <0,000001 Estatisticamente significativo	p <0,000001 Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	9,836546	11,00656
Erro padrão b_1	0,023126	0,02513
R^2	0,992168278	0,991878409
R^2 ajustado	0,991565837	0,991253671
Erro padrão da estimativa	1,49536873	1,6489738
Avaliação de *outliers* da regressão (resíduos padronizados)	Sem *outliers*	Sem *outliers*

APÊNDICE B – COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA OS DERIVADOS METILADOS

Tabela 18: Comparação das Curvas de Calibração 1e 2 do derivado metilado de AO (Faixa A).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 1	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x1)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	3,6016	12,971	245,7	13,00	4,3474	18,90	0,69	**2,949**	26	4, 81	0,10	**2,056**
PD 1_2	2,3984	5,752										
PD 1_3	3,2263	10,409										
PD 2_1	2,3636	5,587										
PD 2_2	3,8642	14,932										
PD 2_3	3,4094	11,624										
PD 3_1	-4,8486	23,509										
PD 3_2	-4,3052	18,535										
PD 3_3	-5,3920	29,074										
PD 4_1	-5,7979	33,615										
PD 4_2	-4,6311	21,447										
PD 4_3	-4,1493	17,216										
PD 5_1	2,1030	4,423										
PD 5_2	2,7894	7,780										
PD 5_3	5,3683	28,818										
CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**						
PD 1_1	4,2407	17,9839	355,4	13,00	5,228	27,34						
PD 1_2	4,2985	18,4771										
PD 1_3	5,0038	25,0384										
PD 2_1	2,5912	6,7141										
PD 2_2	2,9788	8,8732										
PD 2_3	4,0452	16,3637										
PD 3_1	-6,7509	45,5746										
PD 3_2	-6,2453	39,0041										
PD 3_3	-6,5504	42,9082										
PD 4_1	-6,1657	38,0164										
PD 4_2	-5,4564	29,7722										
PD 4_3	-3,8735	15,0036										
PD 5_1	2, 5211	6,3561										
PD 5_2	3,8285	14,6571										
PD 5_3	5,5344	30,6298										

Tabela 19: Comparação das Curvas de Calibração 1 e 2 do derivado metilado de AO (Faixa B).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 1	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x1)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	33,8860	1148,2582	12454,1	13,00	30,9517	958,01	0,38	**2,949**	26	41,60	-1,45	**2,056**
PD 1_2	34,5723	1195,2460										
PD 1_3	37,1513	1380,2161										
PD 2_1	-39,2451	1540,1793										
PD 2_2	-37,7300	1423,5513										
PD 2_3	-32,5283	1058,0935										
PD 3_1	-23,7606	564,5641										
PD 3_2	-20,0735	402,9445										
PD 3_3	-11,4078	130,1372										
PD 4_1	-17,3607	301,3931										
PD 4_2	-11,3587	129,0193										
PD 4_3	-7,5297	56,6962										
PD 5_1	24,0148	576,7094										
PD 5_2	35,3392	1248,8623										
PD 5_3	36,0307	1298,2117										
CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**						
PD 1_1	52,6188	2768,7342	32530,8	13,00	50,024	2502,37						
PD 1_2	53,9261	2908,0225										
PD 1_3	55,6321	3094,9253										
PD 2_1	-59,1811	3502,4068										
PD 2_2	-53,1984	2830,0704										
PD 2_3	-49,9854	2498,5428										
PD 3_1	-34,3126	1177,3560										
PD 3_2	-21,1079	445,5439										
PD 3_3	-20,5833	423,6727										
PD 4_1	-47,2686	2234,3175										
PD 4_2	-35,8059	1282,0638										
PD 4_3	-7, 6190	58,0487										
PD 5_1	52,0135	2705,4006										
PD 5_2	56,0325	3139,6417										
PD 5_3	58,8394	3462,0745										

Tabela 20: Comparação das Curvas de Calibração 1 e 2 do derivado metilado de AB (Faixa A).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 1	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x1)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	3,4442	11,8624	258,2	13,00	4,4571	19,87	0,59	**2,95**	26	5,19	-0,29	**2,056**
PD 1_2	2,3675	5,6050										
PD 1_3	3,2231	10,3886										
PD 2_1	3,2320	10,4458										
PD 2_2	3,6830	13,5645										
PD 2_3	3,6953	13,6552										
PD 3_1	-4,9843	24,8434										
PD 3_2	-4,8834	23,8475										
PD 3_3	-5,5445	30,7415										
PD 4_1	-5,7469	33,0266										
PD 4_2	-4,6762	21,8670										
PD 4_3	-4,1545	17,2596										
PD 5_1	2,3367	5,4603										
PD 5_2	2,6589	7,0698										
PD 5_3	5,3490	28,6119										
CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**						
PD 1_1	4,6748	21,8535	441,0	13,00	5,824	33,92						
PD 1_2	4,4611	19,9015										
PD 1_3	5,7656	33,2419										
PD 2_1	2,8901	8,3525										
PD 2_2	3,3242	11,0502										
PD 2_3	4,3752	19,1427										
PD 3_1	-7,0263	49,3695										
PD 3_2	-7,2224	52,1630										
PD 3_3	-7,3494	54,0143										
PD 4_1	-7,1001	50,4115										
PD 4_2	-5,3196	28,2979										
PD 4_3	-4,4907	20,1668										
PD 5_1	1,4447	2,0873										
PD 5_2	4,3721	19,1150										
PD 5_3	7,2009	51,8523										

Tabela 21: Comparação das Curvas de Calibração 1 e 2 do derivado metilado de AB (Faixa B).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 1	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x1)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	38,3457	1470,3902	15955,8	13,00	35,0339	1227,37	0,47	**2,95**	26	43,94	-1,68	**2,056**
PD 1_2	38, 6678	1495,2017										
PD 1_3	41,3579	1710,4790										
PD 2_1	-41,0257	1683,1088										
PD 2_2	-43,2138	1867,4350										
PD 2_3	-35,1322	1234,2749										
PD 3_1	-27,1109	735,0029										
PD 3_2	-23,5188	553,1357										
PD 3_3	-14,9400	223,2029										
PD 4_1	-22,3087	497,6769										
PD 4_2	-7, 3374	53,8378										
PD 4_3	-13,7705	189,6276										
PD 5_1	25,2557	637,8488										
PD 5_2	39,6322	1570,7151										
PD 5_3	45,0988	2033,9025										
CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**						
PD 1_1	51,9911	2703, 0780	34236,8	13,00	51,319	2633,60						
PD 1_2	54,9185	3016,0377										
PD 1_3	57,7472	3334,7442										
PD 2_1	-62,3365	3885,8452										
PD 2_2	-56,3893	3179,7518										
PD 2_3	-50,3011	2530,1995										
PD 3_1	-35,9468	1292,1750										
PD 3_2	-18,9750	360,0497										
PD 3_3	-15,0373	226,1200										
PD 4_1	-52,4842	2754,5959										
PD 4_2	-38,5125	1483,2130										
PD 4_3	-2,9601	8,7620										
PD 5_1	53,2913	2839,9667										
PD 5_2	55,2208	3049,3343										
PD 5_3	59,7739	3572,9176										

Tabela 22: Comparação das Curvas de Calibração 1 e 2 do derivado metilado de AU (Faixa A).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 1	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x1)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	1,962	3,850	13747,3	13,00	32,5189	1057,48	0,40	**2,95**	26	43,18	-1,37	**2,056**
PD 1_2	3,690	13,618										
PD 1_3	1,491	2,224										
PD 2_1	1,022	1,044										
PD 2_2	2,661	7,083										
PD 2_3	4,142	17,152										
PD 3_1	14,719	216,640										
PD 3_2	15,108	228,239										
PD 3_3	19,605	384,362										
PD 4_1	-58,945	3474,511										
PD 4_2	-58,006	3364,733										
PD 4_3	-48,113	2314,896										
PD 5_1	21,595	466,327										
PD 5_2	31,581	997,386										
PD 5_3	47,489	2255,194										
CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**						
PD 1_1	4,298	18,474	34730,1	13,00	51,687	2671,55						
PD 1_2	5,707	32,566										
PD 1_3	5,298	28,067										
PD 2_1	5,349	28,616										
PD 2_2	8,346	69,648										
PD 2_3	11,797	139,158										
PD 3_1	15,615	243,820										
PD 3_2	20,570	423,128										
PD 3_3	24,523	601,389										
PD 4_1	-102,659	10538,936										
PD 4_2	-86,597	7499,040										
PD 4_3	-74,953	5617,964										
PD 5_1	35,499	1260,193										
PD 5_2	55,293	3057,359										
PD 5_3	71,915	5171,728										

Tabela 23: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AO (Faixa A).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**
PD 1_1	4,241	17,984	355,4	13,00	5,2284	27,34
PD 1_2	4,298	18,477				
PD 1_3	5,004	25,038				
PD 2_1	2,591	6,714				
PD 2_2	2,979	8,873				
PD 2_3	4,045	16,364				
PD 3_1	-6,751	45,575				
PD 3_2	-6,245	39,004				
PD 3_3	-6,550	42,908				
PD 4_1	-6,166	38,016				
PD 4_2	-5,456	29,772				
PD 4_3	-3,873	15,004				
PD 5_1	2,521	6,356				
PD 5_2	3,828	14,657				
PD 5_3	5,534	30,630				

CURVA 3	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	1,039	1,079	45,7	13,00	1,875	3,52	7,78	**2,949**	26	3,93	-1,28	**2,056**
PD 1_2	0,754	0,569										
PD 1_3	0,924	0,853										
PD 2_1	0,756	0,571										
PD 2_2	0,011	0,000										
PD 2_3	0,714	0,510										
PD 3_1	-0,591	0,350										
PD 3_2	-2,076	4,308										
PD 3_3	-0,336	0,113										
PD 4_1	1,441	2,077										
PD 4_2	-4,568	20,863										
PD 4_3	-0,693	0,480										
PD 5_1	1,786	3,188										
PD 5_2	2,698	7,281										
PD 5_3	-1,859	3,457										

Tabela 24: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AO (Faixa B).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**						
PD 1_1	52,6188	2768,7342	32530,8	13,00	50,024	2502,37						
PD 1_2	53,9261	2908,0225										
PD 1_3	55,6321	3094,9253										
PD 2_1	-59,1811	3502,4068										
PD 2_2	-53,1984	2830,0704										
PD 2_3	-49,9854	2498,5428										
PD 3_1	-34,3126	1177,3560										
PD 3_2	-21,1079	445,5439										
PD 3_3	-20,5833	423,6727										
PD 4_1	-47,2686	2234,3175										
PD 4_2	-35,8059	1282,0638										
PD 4_3	-7,6190	58,0487										
PD 5_1	52,0135	2705,4006										
PD 5_2	56,0325	3139,6417										
PD 5_3	58,8394	3462,0745										
CURVA 3	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	11,7890	138,9817	2893,7	13,00	14,919	222,59	11,24	**2,95**	26	36,91	-2,78	**2,056**
PD 1_2	12,7019	161,3387										
PD 1_3	8,1442	66,3278										
PD 2_1	-22,1281	489,6520										
PD 2_2	-22,7020	515,3804										
PD 2_3	-22,4586	504,3892										
PD 3_1	5,4009	29,1700										
PD 3_2	-2,0019	4,0076										
PD 3_3	2,3912	5,7179										
PD 4_1	3,3536	11,2468										
PD 4_2	15,0685	227,0608										
PD 4_3	25,0052	625,2618										
PD 5_1	-5,9640	35,5692										
PD 5_2	-8,9150	79,4780										
PD 5_3	0,3149	0,0992										

Tabela 25: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AB (Faixa A).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**
PD 1_1	4,675	21,853	441,0	13,00	5,8245	33,92
PD 1_2	4,461	19,901				
PD 1_3	5,766	33,242				
PD 2_1	2,890	8,352				
PD 2_2	3,324	11,050				
PD 2_3	4,375	19,143				
PD 3_1	-7,026	49,370				
PD 3_2	-7,222	52,163				
PD 3_3	-7,349	54,014				
PD 4_1	-7,100	50,411				
PD 4_2	-5,320	28,298				
PD 4_3	-4,491	20,167				
PD 5_1	1,445	2,087				
PD 5_2	4,372	19,115				
PD 5_3	7,201	51,852				

CURVA 3	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	0,958	0,917	22,8	13,00	1,324	1,75	19,35	**2,95**	26	4,22	-1,03	**2,056**
PD 1_2	0,983	0,967										
PD 1_3	0,833	0,694										
PD 2_1	0,706	0,499										
PD 2_2	-0,135	0,018										
PD 2_3	0,689	0,475										
PD 3_1	-0,665	0,442										
PD 3_2	-2,511	6,305										
PD 3_3	-0,038	0,001										
PD 4_1	-0,280	0,078										
PD 4_2	-2,058	4,234										
PD 4_3	-0,801	0,641										
PD 5_1	0,063	0,004										
PD 5_2	2,704	7,314										
PD 5_3	-0,449	0,202										

Tabela 26: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AB (Faixa B).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**
PD 1_1	51,991	2703,078	34236,8	13,00	51,3186	2633,60
PD 1_2	54,918	3016,038				
PD 1_3	57,747	3334,744				
PD 2_1	-62,337	3885,845				
PD 2_2	-56,389	3179,752				
PD 2_3	-50,301	2530,199				
PD 3_1	-35,947	1292,175				
PD 3_2	-18,975	360,050				
PD 3_3	-15,037	226,120				
PD 4_1	-52,484	2754,596				
PD 4_2	-38,513	1483,213				
PD 4_3	-2,960	8,762				
PD 5_1	53,291	2839,967				
PD 5_2	55,221	3049,334				
PD 5_3	59,774	3572,918				

CURVA 3	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	7,738	59,873	3001,0	13,00	15,194	230,84	11,41	**2,95**	26	37,84	-3,24	**2,056**
PD 1_2	10,380	107,738										
PD 1_3	7,226	52,213										
PD 2_1	-21,562	464,940										
PD 2_2	-24,907	620,341										
PD 2_3	-16,296	265,560										
PD 3_1	1,007	1,015										
PD 3_2	6,504	42,305										
PD 3_3	12,243	149,888										
PD 4_1	-7,998	63,968										
PD 4_2	16,001	256,028										
PD 4_3	26,738	714,946										
PD 5_1	-13,193	174,051										
PD 5_2	1,266	1,602										
PD 5_3	-5,147	26,490										

Tabela 27: Comparação das Curvas de Calibração 2 e 3 do derivado metilado de AU (Faixa A).

Estimativa do desvio padrão residual=erro pd estimativa / S y/x = raiz ((soma dos quadrados dos resíduos) / N-2)

Teste F para diferença estatística das variâncias residuais

F = (((Sy/x 1)^2) / ((Sy/x 2)^2))

Fcalc < Ftab não há diferença significativa, variâncias semelhantes

tcalc < ttab não há diferença significativa, curvas semelhantes

Estimativa do desvio padrão residual agregado / S y/x a = raiz (((n1-2) (Sy/x1)^2 + (n2-2) (Sy/x2)^2) / n1 + n2 -4))

Teste t para comparação dos coeficientes angulares

t = ((a 1 - a 2) / Sy/x a* (raiz ((1/soma (x1-x1media)^2 + (1/soma (x2-x2media)^2))

CURVA 2	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**
PD 1_1	4,298	18,474	34730,1	13,00	51,6870	2671,55
PD 1_2	5,707	32,566				
PD 1_3	5,298	28,067				
PD 2_1	5,349	28,616				
PD 2_2	8,346	69,648				
PD 2_3	11,797	139,158				
PD 3_1	15,615	243,820				
PD 3_2	20,570	423,128				
PD 3_3	24,523	601,389				
PD 4_1	-102,659	10538,936				
PD 4_2	-86,597	7499,040				
PD 4_3	-74,953	5617,964				
PD 5_1	35,499	1260,193				
PD 5_2	55,293	3057,359				
PD 5_3	71,915	5171,728				

CURVA 3	**resíduo**	**resíduo^2**	**soma**	**N-2**	**S y/x**	**(S y/x2)^2**	**Fcalc**	**Ftab**	**n1+n2-4**	**S y/x a**	**tcalc**	**ttab**
PD 1_1	16,316	266,198	8305,4	13,00	25,276	638,88	4,18	**2,95**	26	40,68	-7,33	**2,056**
PD 1_2	12,653	160,099										
PD 1_3	15,872	251,918										
PD 2_1	8,522	72,624										
PD 2_2	3,430	11,764										
PD 2_3	7,931	62,905										
PD 3_1	-8,857	78,449										
PD 3_2	-8,100	65,605										
PD 3_3	-6,840	46,789										
PD 4_1	-40,357	1628,699										
PD 4_2	-45,870	2104,098										
PD 4_3	-35,759	1278,737										
PD 5_1	24,729	611,535										
PD 5_2	21,864	478,035										
PD 5_3	34,467	1187,993										

APÊNDICE C – RESULTADOS DA REGRESSÃO LINEAR PONDERADA DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA OS DERIVADOS TRIMETILSILILADOS

Tabela 28: Resultados da curva de calibração dos derivados trimetilsililados pela regressão linear ponderada (Faixa A)

Testes	**Ácido Oleanólico**	**Ácido Betulínico**	**Ácido Ursólico**
	Dados brutos Regressão linear ponderada (1/x) (k=5, n=3, N=15)	**Dados brutos Regressão linear ponderada (1/x) (k=5, n=3, N=15)**	**Dados brutos Regressão linear ponderada (1/y) (k=5, n=3, N=15)**
Equação da reta ($y = b_1 x + b_0$)	b_0 = -1,05190 b_1 = 1,71621	b_0 = -1,28998 b_1 = 1,79890	b_0 = -6,67666 b_1 = 1,89666
Avaliação da significância do parâmetro b_0 p≤0,05 – intercepto estatisticamente significativo	p = 0,756411 Intercepto não significativo	p = 0,704969 Intercepto não significativo	p = 0,485042 Intercepto não significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 p≤0,05 – regressão estatisticamente significativa	p <0,000001 Estatisticamente significativo	p <0,000001 Estatisticamente significativo	p <0,000001 Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	3,320200	3,332714	9,289876
Erro padrão b_1	0,102171	0,100065	0,030076
R^2	0,955954808	0,961330797	0,996741761
R^2 ajustado	0,952566717	0,958356243	0,996491127
Erro padrão da estimativa	1,78161794	1,76647545	1,60631122
Avaliação de *outliers* da regressão (resíduos padronizados)	Sem *outliers*	Sem *outliers*	Sem *outliers*

Tabela 29: Resultados da curva de calibração dos derivados trimetilsililados pela regressão linear ponderada (Faixa B)

Testes	**Ácido Oleanólico**	**Ácido Betulínico**
	Dados brutos Regressão linear ponderada (1/x) (k=5, n=3, N=15)	**Dados brutos Regressão linear ponderada (1/x) (k=5, n=3, N=15)**
Equação da reta ($y = b_1 x + b_0$)	b_0 = -6,33895 b_1 = 1,79849	b_0 = -6,38197 b_1 = 1,87385
Avaliação da significância do parâmetro b_0 p≤0,05 – intercepto estatisticamente significativo	p = 0,318803 Intercepto não significativo	p = 0,321298 Intercepto não significativo
Avaliação da significância do parâmetro b_1 p≤0,05 – regressão estatisticamente significativa	p <0,000001 Estatisticamente significativo	p <0,000001 Estatisticamente significativo
Erro padrão b_0	6,114917	6,189501
Erro padrão b_1	0,014491	0,014311
R^2	0,999156742	0,999242278
R^2 ajustado	0,999091876	0,999183991
Erro padrão da estimativa	0,933296518	0,933133606
Avaliação de *outliers* da regressão (resíduos padronizados)	Sem *outliers*	Sem *outliers*

APÊNDICE D – PARÂMETROS HSP CALCULADOS PELO MÉTODO DE CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS DE STEFANIS-PANAYIOTOU

Tabela 30: Valores de HSP calculados para o ácido oleanólico.

ÁCIDO OLEANÓLICO							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
CH3	7	-0,9714	-6,7998	3,3820	17,3231	20,7051	**18,77**
CH2	10	-0,0269	-0,2690				
CH	4	0,6450	2,5800				
C	6	1,2686	7,6116				
−CH=C<	1	0,5372	0,5372				
>C=C<	1	0,3592	0,3592				
COOH	1	-0,2910	-0,2910				
OH	1	-0,3462	-0,3462				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	5	-0,3874	-1,9370	-1,9370	1	-1,937	
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 2,7467)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
CH3	7	-0,7241	-5,0688	12,3601	2,7467	15,1068	**10,32**
CH2	10	-0,1403	-1,4030				
CH	4	0,5898	2,3591				
C	6	2,0838	12,5028				
−CH=C<	1	1,2257	1,2257				
>C=C<	1	***					
COOH	1	0,9042	0,9042				
OH	1	2	1,8401				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	5	-0,9569	-4,7843	-4,7843	1	-4,78426	
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 1,3720)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
CH3	7	0,2990	2,0931	5,5933	1,3720	6,9653	**6,97**
CH2	10	-0,1161	-1,1610				
CH	4	0,1386	0,5544				
C	6	0,0866	0,5196				
−CH=C<	1	-0,0307	-0,0307				
>C=C<	1	-0,12117	-0,1212				
COOH	1	3,7391	3,7391				
OH	1	***					
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	5	0,0000	0,0000	0,0000	1	0,0000001	

Tabela 31: Valores de HSP calculados para o ácido betulínico.

ÁCIDO BETULÍNICO							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
CH3	6	-0,9714	-5,8284	1,7000	17,3231	19,0231	**16,81**
CH2	11	-0,0269	-0,2959				
CH	6	0,6450	3,8700				
C	4	1,2686	5,0744				
CH2=C	1	-0,4829	-0,4829				
COOH	1	-0,2910	-0,2910				
OH	1	-0,3462	-0,3462				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	4	-0,3874	-1,5496	-2,2177	1	-2,2177	
Anel de 5	1	-0,6681	-0,6681				
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 2,7467)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
CH3	6	-0,7241	-4,3447	9,3784	2,7467	12,1251	**7,40**
CH2	11	-0,1403	-1,5433				
CH	6	0,5898	3,5387				
C	4	2,0838	8,3352				
CH2=C	1	0,6482	0,6482				
COOH	1	0,9042	0,9042				
OH	1	1,8401	1,8401				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	4	-0,9569	-3,8274	-4,7253	1	-4,72532	
Anel de 5	1	-0,8979	-0,8979				
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 7,9793)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
CH3	6	-0,7813	-4,6878	0,0208	7,9793	8,0001	**7,69**
CH2	11	-0,4119	-4,5309				
CH	6	-0,2018	-1,2108				
C	4	0,0866	0,3464				
CH2=C	1	-0,8260	-0,8260				
COOH	1	3,7391	3,7391				
OH	1	7,1908	7,1908				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	4	***		-0,3079	1	-0,3079	
Anel de 5	1	-0,3079	-0,3079				

Tabela 32: Valores de HSP calculados para o ácido ursólico.

ÁCIDO URSÓLICO							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
CH3	7	-0,9714	-6,7998	3,4303	17,3231	20,7534	**18,82**
CH2	9	-0,0269	-0,2421				
CH	6	0,6450	3,8700				
C	5	1,2686	6,3430				
−CH=C<	1	0,5372	0,5372				
>C=C<	1	0,3592	0,3592				
COOH	1	-0,2910	-0,2910				
OH	1	-0,3462	-0,3462				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	5	-0,3874	-1,9370	-1,9370	1	-1,937	
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 2,7467)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
CH3	7	-0,7241	-5,0688	11,5961	2,7467	14,3428	**9,56**
CH2	9	-0,1403	-1,2627				
CH	6	0,5898	3,5387				
C	5	2,0838	10,4190				
−CH=C<	1	1,2257	1,2257				
>C=C<	1	***					
COOH	1	0,9042	0,9042				
OH	1	2	1,8401				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	5	-0,9569	-4,7843	-4,7843	1	-4,78426	
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 1,3720)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
CH3	7	0,2990	2,0931	5,9000	1,3720	7,2720	**7,27**
CH2	9	-0,1161	-1,0449				
CH	6	0,1386	0,8316				
C	5	0,0866	0,4330				
−CH=C<	1	-0,0307	-0,0307				
>C=C<	1	-0,12117	-0,1212				
COOH	1	3,7391	3,7391				
OH	1	***					
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	5	0,0000	0,0000	0,0000	1	0,0000001	

Tabela 33: Valores de HSP calculados para a α-amirina e β-amirina.

α e β-AMIRINA							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
CH3	8	-0,9714	-7,7712	2,7499	17,3231	20,0730	**18,14**
CH2	9	-0,0269	-0,2421				
CH	6	0,6450	3,8700				
C	5	1,2686	6,3430				
−CH=C<	1	0,5372	0,5372				
>C=C<	1	0,3592	0,3592				
OH	1	-0,3462	-0,3462				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	5	-0,3874	-1,9370	-1,9370	1	-1,937	
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 2,7467)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
CH3	7	-0,7241	-5,0688	10,6919	2,7467	13,4386	**8,65**
CH2	9	-0,1403	-1,2627				
CH	6	0,5898	3,5387				
C	5	2,0838	10,4190				
−CH=C<	1	1,2257	1,2257				
>C=C<	1	***					
OH	1	2	1,8401				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	5	-0,9569	-4,7843	-4,7843	1	-4,78426	
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 1,3720)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
CH3	7	0,2990	2,0931	2,1609	1,3720	3,5329	**3,53**
CH2	9	-0,1161	-1,0449				
CH	6	0,1386	0,8316				
C	5	0,0866	0,4330				
−CH=C<	1	-0,0307	-0,0307				
>C=C<	1	-0,12117	-0,1212				
OH	1	***					
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	5	0,0000	0,0000	0,0000	1	0,0000001	

Tabela 34: Valores de HSP calculados para a friedelina.

FRIEDELINA							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
CH3	8	-0,9714	-7,7712	1,6902	17,3231	19,0133	**16,78**
CH2	11	-0,0269	-0,2959				
CH	4	0,6450	2,5800				
C	6	1,2686	7,6116				
C=O	1	-0,4343	-0,4343				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
C (ciclico)=O	1	-0,2981	-0,2981	-2,2351	1	-2,2351	
Anel de 6	5	-0,3874	-1,9370				
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 2,7467)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
CH3	8	-0,7241	-5,7930	-5,7930	2,7467	-3,0463	**-7,38**
CH2	11	-0,1403	-1,5433				
CH	4	0,5898	2,3591				
C	6	2,0838	12,5028				
C=O	1	0,7905	0,7905				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
C (ciclico)=O	1	0,4497	0,4497	-4,3346	1	-4,33456	
Anel de 6	5	-0,9569	-4,7843				
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 1,3720)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
CH3	8	0,2990	2,3921	4,0037	1,3720	5,3757	**4,90**
CH2	11	-0,1161	-1,2771				
CH	4	0,1386	0,5544				
C	6	0,0866	0,5196				
C=O	1	1,8147	1,8147				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
C (ciclico)=O	1	-0,4794	-0,4794	-0,4794	1	-0,4793999	
Anel de 6	5	0,0000	0,0000				

Tabela 35: Valores de HSP calculados para o γ-sitosterol.

γ-SITOSTEROL							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
CH3	6	-0,9714	-5,8284	1,4781	17,3231	18,8012	**16,97**
CH2	11	-0,0269	-0,2959				
CH	7	0,6450	4,5150				
C	2	1,2686	2,5372				
−CH=C<	1	0,5372	0,5372				
>C=C<	1	0,3592	0,3592				
OH	1	-0,3462	-0,3462				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 5	1	-0,6681	-0,6681	-1,8303	1	-1,8303	
Anel de 6	3	-0,3874	-1,1622				
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 2,7467)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
CH3	6	-0,7241	-4,3447	5,4738	2,7467	8,2205	**4,45**
CH2	11	-0,1403	-1,5433				
CH	7	0,5898	4,1285				
C	2	2,0838	4,1676				
−CH=C<	1	1,2257	1,2257				
>C=C<	1	***					
OH	1	2	1,8401				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 5	1	-0,8979	-0,8979	-3,7685	1	-3,768468	
Anel de 6	3	-0,9569	-2,8706				
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 1,3720)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
CH3	6	0,2990	1,7941	1,5085	1,3720	2,8805	**2,88**
CH2	11	-0,1161	-1,2771				
CH	7	0,1386	0,9702				
C	2	0,0866	0,1732				
−CH=C<	1	-0,0307	-0,0307				
>C=C<	1	-0,12117	-0,1212				
OH	1	***					
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 5	1			0,0000	1	0,00000006	
Anel de 6	3	0,0000	0,0000				

Tabela 36: Valores de HSP calculados para o ácido diidroxioctadecanóico.

ÁCIDO DIIDROXIOCTADECANOICO							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
CH3	1	-0,9714	-0,9714	-1,0414	17,3231	16,2817	**16,28**
CH2	14	-0,0269	-0,3766				
CH	2	0,6450	1,2900				
C		1,2686	0,0000				
−CH=C<		0,5372	0,0000				
>C=C<		0,3592	0,0000				
COOH	1	-0,2910	-0,2910				
OH	2	-0,3462	-0,6924				
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 7,3548)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
CH3	1	-1,6448	-1,6448	-1,4246	7,3548	5,9302	**5,93**
CH2	14	-0,3045	-4,2630				
CH	2	0,6491	1,2982				
C		2,0838	0,0000				
−CH=C<		-0,9024	0,0000				
>C=C<		1,0526	0,0000				
COOH	1	0,9042	0,9042				
OH	2	1,1404	2,2808				
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 7,9793)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
CH3	1	-0,7813	-0,7813	11,1692	7,9793	19,1485	**19,15**
CH2	14	-0,4119	-5,7666				
CH	2	-0,2018	-0,4036				
C		0,0866	0,0000				
−CH=C<		-1,8872	0,0000				
>C=C<		-15,4659	0,0000				
COOH	1	3,7391	3,7391				
OH	2	7,1908	14,3816				

Tabela 37: Valores de HSP calculados para o álcool 10-nonadecanol

10-NONADECANOL							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
CH3	2	-0,9714	-1,9428	-2,0475	17,3231	15,2756	**15,28**
CH2	15	-0,0269	-0,4035				
CH	1	0,6450	0,6450				
C		1,2686	0,0000				
−CH=C<		0,5372	0,0000				
>C=C<		0,3592	0,0000				
COOH		-0,2910	0,0000				
OH	1	-0,3462	-0,3462				
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 7,3548)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
CH3	2	-1,6448	-3,2896	-6,0676	7,3548	1,2872	**1,29**
CH2	15	-0,3045	-4,5675				
CH	1	0,6491	0,6491				
C		2,0838	0,0000				
−CH=C<		-0,9024	0,0000				
>C=C<		1,0526	0,0000				
COOH		0,9042	0,0000				
OH	1	1,1404	1,1404				
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 7,9793)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
CH3	2	-0,7813	-1,5626	-0,7521	7,9793	7,2272	**7,23**
CH2	15	-0,4119	-6,1785				
CH	1	-0,2018	-0,2018				
C		0,0866	0,0000				
−CH=C<		-1,8872	0,0000				
>C=C<		-15,4659	0,0000				
COOH		3,7391	0,0000				
OH	1	7,1908	7,1908				

Tabela 38: Valores de HSP calculados para a hidroxicetona genérica

HIDROXICETONA							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
CH3	2	-0,9714	-1,9428	-2,4549	17,3231	14,8682	**14,87**
CH2	14	-0,0269	-0,3766				
CH	1	0,6450	0,6450				
>C=0	1	-0,4343	-0,4343				
OH	1	-0,3462	-0,3462				
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 7,3548)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
CH3	2	-1,6448	-3,2896	-4,9726	7,3548	2,3822	**2,38**
CH2	14	-0,3045	-4,2630				
CH	1	0,6491	0,6491				
>C=0	1	0,7905	0,7905				
OH	1	1,1404	1,1404				
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 7,9793)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
CH3	2	-0,7813	-1,5626	1,4745	7,9793	9,4538	**9,45**
CH2	14	-0,4119	-5, 7666				
CH	1	-0,2018	-0, 2018				
>C=0	1	1,8147	1,8147				
OH	1	7,1908	7,1908				

Tabela 39: Valores de HSP calculados para a 5, 7-dimetoxiflavanona

5, 7-DIMETOXIFLAVANONA							
Cálculo de δd = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 17,3231)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δd**
ACH	12	0,1105	1,3260	0,6195	17,3231	17,9426	**17,17**
CH2	1	-0,0269	-0,0269				
CH	1	0,6450	0,6450				
CH2O (cyclic)	1	0,2753	0,2753				
CH3O	2	-0,5828	-1,1656				
>C=0 (except as above)	1	-0,4343	-0,4343				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	2	-0,3874	-0,7748	-0,7748	1	-0,7748	
Cálculo de δp = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 2,7467)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δp**
ACH	12	-0,1931	-2,3176	-3,0075	2,7467	-0,2608	**-2,17**
CH2	1	-0,1403	-0,1403				
CH	1	0,5898	0,5898				
CH2O (cyclic)	1	-0,3331	-0,3331				
CH3O	2	-0,4032	-0,8064				
>C=0 (except as above)	1	***					
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
			0,0000	-1,9137	1	-1,913704	
Anel de 6	2	-0,9569	-1,9137				
Cálculo de δhb = (Σi Ni.Ci + W . Σj Mj.Dj + 7,9793)							
Grupo 1a ordem	**Ni**	**Ci**	**Ni.Ci**	**Σi Ni.Ci**	**C**	**Σi Ni.Ci + C**	**δh**
ACH	12	-0,4305	-5,1660	-3,8340	7,9793	4,1453	**4,15**
CH2	1	-0,4119	-0,4119				
CH	1	-0,2018	-0,2018				
CH2O (cyclic)	1	-0,1610	-0,1610				
CH3O	2	0,1460	0,2920				
>C=0 (except as above)	1	1,8147	1,8147				
Grupo 2a ordem	**Mj**	**Dj**	**Mj.Dj**	**Σj Mj.Dj**	**W**	**Σj Mj.Dj . W**	
Anel de 6	2		0,0000	0,0000	1	0	

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS

Manuscrito submetido à revista **Pharmacognosy Magazine**, em Jul/2014 (em avaliação).
LIMA, A. M. B., SIANI, A. C, NAKAMURA, M. J., D'AVILA, L. A. Selective and cost-effective protocol to separate bioactive triterpene acids from plant matrices using alkalinized ethanol: application to leaves of Myrtaceae species.

LIMA, A. M. B., D'AVILA, L. A., SIANI, A. C. Comparison between methyl and trimethylsilyl ester derivatives in the separation and GC quantification of triterpene acids in *Eugenia brasiliensis* leaf extract. **Chromatographia**, v. 77, p. 629-635, 2014.

Author's personal copy

Chromatographia (2014) 77:629–635
DOI 10.1007/s10337-014-2659-z

ORIGINAL

Comparison Between Methyl and Trimethylsilyl Ester Derivatives in the Separation and GC Quantification of Triterpene Acids in *Eugenia brasiliensis* Leaf Extract

Adélia Mara Belém Lima · Luiz Antonio d'Avila · Antonio Carlos Siani

Received: 23 October 2013 / Revised: 26 February 2014 / Accepted: 28 February 2014 / Published online: 16 March 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract This study details a method to characterize the triterpene acid-rich extract obtained from the defatted leaves of *Eugenia brasiliensis* (Myrtaceae) via extraction with 2 % NaOH in ethanol at room temperature. The crude extract (yield 2.35 %) was submitted to analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) confirming ursolic acid as its major compound. The optimal conditions for the separation of oleanolic, betulinic and ursolic acids were assayed by GC with flame ionization detection (GC–FID) using two different columns (DB-5 and DB-17HT) and by applying two distinct derivatizing protocols. The use of a DB-17HT column led to the best results, with a shorter runtime and a better resolution (Rs) between the oleanolic and betulinic signals for both the bis-trimethylsilyl (Rs 2.84) and methyl ester derivatives (Rs 2.47). A DB-5 column also gave satisfactory results for the TMS ester, with a runtime of 30 min and Rs 2.14. Ursolic acid in the crude extract was quantified by comparison to two individual standard curves determined using commercial ursolic as its TMS derivative on the DB-5 column and its methyl ester on the DB-17HT column. Good linearity was achieved in both cases (r^2 = 0.9776 and 0.9953, respectively), and the amounts of ursolic acid in the extracts were calculated to be 144.7 and 147.9 mg·g^{-1}, respectively. These results showed no significant differences when compared using Tukey's HSD test. Total triterpene acids amounted to 0.52 % in *E. brasiliensis* dry leaves.

Keywords Gas chromatography · Triterpene acids · Ursolic acid · Trimethylsilyl derivatives · Methyl ester derivatives · *Eugenia brasiliensis*

Introduction

Interest in pentacyclic triterpene acids has recently increased because of their wide spectra of pharmacological activities [1] and potential pharmaceutical applications [2, 3]. The search for this class of molecules from new plant sources, as well as conventional sources, has recently been reviewed [4, 5]. Betulinic, oleanolic and ursolic acids (Fig. 1) are the three most ubiquitous triterpene acids in the plant kingdom. Screening for the presence of these three acids in plant extracts is usually supported by either gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) [6] or high-performance liquid chromatography (HPLC) [7], and prospection of these compounds in specific plant matrices by gas chromatography with flame ionization detector (GC–FID) has been reported [4, 6]. Studies involving quantification of these compounds in plant extracts may be focused on a single acid, as is the case of betulinic acid [8] or binary mixture of oleanolic and ursolic acid [9, 10]. There are rare reports on the simultaneous quantitative determination of the three acids in bioactive plant extracts by CG. The GC–MS study by Razborsek et al. [11]

A. M. B. Lima
Plataforma de Métodos Analíticos, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21041-250, Brazil

L. A. d'Avila
Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos 149, Bl. E, Sl I-222, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil

A. C. Siani (✉)
Departamento de Produtos Naturais, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Sizenando Nabuco 100, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21041-250, Brazil
e-mail: siani@far.fiocruz.br