

**Universidade Federal Da Bahia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

EDNA MAURA PRATA DE ARAÚJO

**TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E QUIMIOMÉTRICAS COMO
FERRAMENTAS NA CONFIRMAÇÃO DA ESTRUTURA DE SUBSTÂNCIAS
ISOLADAS DE PRODUTOS NATURAIS OU OBTIDAS POR SÍNTESE**

**Salvador - BA
Agosto - 2011**

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Araújo, Edna Maura Prata de.

Técnicas espectroscópicas e quimiométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidas por síntese / Edna Maura Prata de Araújo. - 2012.

130 f. : il.

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Juceni Pereira de Lima David

Co-orientador: Prof.^a. Dr.^a Marilena Meira

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2011.

1. Produtos naturais. 2. Síntese orgânica. 3. Análise espectral. 4. Análise de componentes principais. 5. Inibidores enzimáticos. I. David, Juceni Pereira de Lima. II. Meira, Marilena. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD – 547

CDU – 547..9

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Edna Maura Prata de Araújo

Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima David
Orientadora

Profa. Dra. Marilena Meira
Co-Orientadora

**TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E QUIMIOMÉTRICAS COMO
FERRAMENTAS NA CONFIRMAÇÃO DA ESTRUTURA DE SUBSTÂNCIAS
ISOLADAS DE PRODUTOS NATURAIS OU OBTIDAS POR SÍNTESE**

Tese submetida ao Colegiado do Curso
de Pós-graduação em Química da
UFBA - Universidade Federal da Bahia
para obtenção do título de Doutor em Química.


Salvador – BA
Agosto – 2011


TERMO DE APROVAÇÃO


EDNA MAURA PRATA DE ARAÚJO

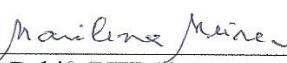
Técnicas espectroscópicas e quimiométricas como ferramentas na confirmação da estrutura de substâncias isoladas de produtos naturais ou obtidas por síntese

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Mauricio David 
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima David - Orientadora 
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Marilena Meira - Co-Orientadora 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia

Prof. Dr. Maurício Moraes Victor 
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Neci Matos Soares 
Doutorado em Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 25 de agosto de 2011.

Dedicatória

PARA MEUS AMORES: Marco, Maira e Tainá, juntos em um só coração, sempre presentes em cada momento da minha vida, me apoiando, motivando, ensinando a ser uma pessoa melhor e, principalmente, feliz e realizada.

À minha mãe, meu pai (in memoriam) e minha avó (in memoriam), exemplos de força, dedicação e determinação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai todo poderoso, por ter me concedido a graça de realizar este trabalho, colocando em meu caminho pessoas maravilhosas, sem as quais não teria conseguido cumprir mais esta etapa da minha vida.

À Profa. Dra. Juceni Pereira de Lima David, mais que orientadora, amiga e incentivadora, sempre presente em todos os momentos, disponibilizando os meios para a realização deste trabalho.

À Profa Dra Marilena Meira, co-orientadora e idealizadora do presente trabalho, amiga, cuja iniciativa generosa, presença constante e apoio incondicional, contribuíram de forma fundamental para a realização do mesmo.

Ao Prof. Dr. Jorge Maurício David pelas sugestões, ajuda e atenção.

À Profa. Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima e a sua orientanda Sílvia Caroline Oliveira Santos pela realização dos testes de bioatividade.

Ao Dr. Luciano da Silva Lima pela obtenção dos espectros de RMN^{1H} e ¹³C.

A Alessandra da Silva Guedes, mais que colega de curso, amiga inseparável, companhia constante nas jornadas laboratoriais, dando-me força e apoio para seguir em frente.

Aos alunos de iniciação científica Jazy Lobo e Andréa Brandão pela colaboração.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVEATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	35
3. JUSTIFICATIVA.....	36
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
7. PRODUTOS GERADOS.....	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. QUIMIOMETRIA.....	5
1.1.1. Análise de componentes principais - PCA.....	7
1.1.2. Calibração multivariada – PLS.....	11
1.2. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	15
1.2.1. Espectroscopia UV/VIS.....	16
1.2.2. Espectroscopia de fluorescência.....	19
1.3. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	23
1.3.1. Flavonoides.....	25
1.3.2. Ácidos fenólicos.....	27
1.4. ÉSTERES DO ÁCIDO CAFEICO E FERÚLICO E A INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	30
1.4.1. Processos gerais de esterificação de ácidos carboxílicos.....	32
1.4.2. Obtenção de ésteres de ácidos <i>trans</i> -cinâmicos.....	33
2. OBJETIVOS.....	35
3. JUSTIFICATIVA.....	36
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
4.1. SUBSTÂNCIAS ANALISADAS.....	37

4.2. EQUIPAMENTOS.....	40
4.3. METODOLOGIA.....	41
4.3.1. Preparação de soluções para o PCA.....	42
4.3.2. Preparação de soluções para o PLS.....	43
4.3.3. Espectrofluorimetria e PCA.....	44
4.3.4. Espectroscopia UV/Vis e PCA.....	45
4.3.5. Construção dos modelos de calibração multivariada.....	46
4.3.6. Síntese dos ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico.....	46
4.3.7. Ensaio de Bioatividade.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. PCA DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA.....	48
5.1.1. Mapa de fluorescência.....	48
5.1.2. PCA dos espectros das substâncias fenólicas comerciais.....	50
5.2. PCA DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV/VIS.....	60
5.2.1. PCA dos espectros das substâncias fenólicas comerciais.....	60
5.2.2. PCA dos espectros dos ésteres obtidos por síntese juntamente com ácido cafeico e ácido ferúlico.....	67
5.2.3. PCA dos espectros dos ésteres obtidos por síntese.....	72
5.3. MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR PLS.....	77

5.4. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DOS ÉSTERES SINTETIZADOS DOS ÁCIDOS CAFEICO E FERÚLICO.....	82
5.4.1. Identificação dos ésteres de cafeato de etila e de butila.....	83
5.4.2. Identificação dos ésteres de cafeato de metila e de pentila.....	89
5.4.2. Identificação dos ésteres de ferulato de butila e de pentila.....	93
5.5. ENSAIOS DE BIOATIVIDADE.....	96
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
7. PRODUTOS GERADOS.....	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Substâncias fenólicas comerciais.....	37
Tabela 2. Reagentes utilizados na síntese dos ésteres.....	38
Tabela 3. Outros reagentes utilizados.....	38
Tabela 4. Substâncias aromáticas sintetizadas.....	39
Tabela 5. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA.....	52
Tabela 6. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA.....	56
Tabela 7. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA.....	61
Tabela 8. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA.....	68
Tabela 9. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA.....	73
Tabela 10. Concentrações usadas de ácido cafeico e de ácido ferúlico para construção do PLS.....	77
Tabela 11. Concentrações usadas de ácido gálico para construção do PLS	78
Tabela 12. Características físicas e rendimento percentual dos ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico	82
Tabela 13. Dados dos espectros CL/ME dos compostos cafeato de metila (CMe), cafeato de etila (CEt), cafeato de butila (CBu) e cafeato de pentila (CPe).....	84
Tabela 14. Dados dos espectros de RMN de ¹ H dos cafeatos de etila (CEt) e butila (CBu) [300 MHz, MeOH , δ (ppm), J (Hz)].....	86
Tabela 15. Dados dos espectros de RMN de ¹³ C dos cafeatos de etila (CEt) e butila (CBu).....	88
Tabela 16: Dados dos espectros de IV dos cafeatos de metila (CMe) e pentila (CPe).....	92
Tabela 17. Dados dos espectros de RMN de ¹ H dos ferulatos de butila (FBu) e de pentila (FPe) [300 MHz, MeOH , δ (ppm), J (Hz)].....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema para encontrar as raízes características que formarão os autovetores.....	9
Figura 2: Gráfico <i>scree plot</i>	9
Figura 3. Representação da matriz de dados decomposta em matrizes <i>scores</i> e <i>loadings</i>	11
Figura 4. Quadro representativo do fenômeno de interação radiação eletromagnética com a matéria.....	16
Figura 5: Esquema de um espectrofotômetro.....	18
Figura 6: Partes essenciais de um espectrofotômetro.....	19
Figura 7. Diagrama de Jablonski.....	20
Figura 8: Esquema óptico de um espectrofluorímetro.....	21
Figura 9. Espectro de absorção, excitação e fluorescência do DTTz.....	22
Figura 10: Vanilina.....	24
Figura 11. Foto orquídea <i>Vanilla planifolia</i>	25
Figura 12. Estrutura básica dos flavonoides (I) e Estrutura básica dos flavonoides com grupo carbonila no C-4 (II).....	26
Figura 13. Quercetina.....	27
Figura 14. Ácidos fenólicos comuns. Ácido gálico (I). Ácido salicílico (II).....	28
Figura 15. Ácidos hidroxicinâmicos.....	29
Figura 16. Esquema da equação geral da reação de esterificação.....	32
Figura 17. Esquema do mecanismo de reação de esterificação com catálise ácida.....	33
Figura 18. Estrutura do ácido cinâmico.....	33
Figura 19. Esquema geral das sínteses efetuadas	34

Figura 20. Esquema da metodologia geral utilizada.....	42
Figura 21. Mapas de fluorescência dos compostos fenólicos analisados...	49
Figura 22. Gráfico de Autovalor x PC.....	53
Figura 23. PC1 x PC2 x PC3 dos espectros de fluorescência da quercetina, vanilina e dos ácidos cafeico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico e gálico.....	53
Figura 24. PC1 x PC2 dos espectros de fluorescência da quercetina, vanilina e dos ácidos cafeico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico e gálico.....	54
Figura 25. PC1 x PC3 dos espectros de fluorescência da quercetina, vanilina e dos ácidos cafeico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico e gálico.....	54
Figura 26. <i>Loadings</i> para PC1.....	55
Figura 27. <i>Loadings</i> para PC2.....	55
Figura 28. <i>Loadings</i> para PC3.....	56
Figura 29. PC1 x PC2 x PC3 dos espectros de fluorescência da, vanilina e dos ácidos cafeico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico e gálico	57
Figura 30. PC1 x PC2 dos espectros de fluorescência da vanilina e dos ácidos cafeico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico e gálico.....	57
Figura 31. PC1 x PC3 dos espectros de fluorescência da vanilina e dos ácidos cafeico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico e gálico	58
Figura 32. <i>Loadings</i> para PC1 x número da variável.....	58
Figura 33. <i>Loadings</i> para PC2 x número da variável.....	59
Figura 34. <i>Loadings</i> para PC3 x número da variável.....	59
Figura 35. Gráfico de Autovalor x PC	61
Figura 36. PC1xPC2 dos espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, <i>m</i> -cumárico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, gálico e salicílico.....	62
Figura 37. PC1xPC3 dos espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, <i>m</i> -cumárico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, gálico e	

Figura 38. PC1xPC4 dos espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, <i>m</i> -cumárico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, gálico e salicílico.....	63
Figura 39. PC1xPC5 dos espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, <i>m</i> -cumárico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, gálico e salicílico.....	63
Figura 40. PC1xPC6 dos espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, <i>m</i> -cumárico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, gálico e salicílico.....	64
Figura 41. <i>Loadings</i> para PC1.....	64
Figura 42. <i>Loadings</i> para PC2.....	65
Figura 43. <i>Loadings</i> para PC3.....	65
Figura 44 <i>Loadings</i> para PC4.....	66
Figura 45 <i>Loadings</i> para PC5.....	66
Figura 46. <i>Loadings</i> para PC6.....	67
Figura 47. Gráfico de autovalor x PC.....	69
Figura 48. PC1xPC2 dos espectros de absorção no UV/Vis dos ácidos cafeico e ferúlico e seus ésteres.....	69
Figura 49. PC1xPC3 dos espectros de absorção no UV/Vis dos ácidos cafeico e ferúlico e seus ésteres.....	70
Figura 50. <i>Loadings</i> para PC1.....	70
Figura 51. <i>Loadings</i> para PC2.....	71
Figura 52. <i>Loadings</i> para PC2.....	71
Figura 53. Gráfico de Autovalor x PC.....	73
Figura 54. PC1xPC2 dos espectros de absorção no UV/Vis dos ácidos cafeico e ferúlico e seus ésteres.....	74

Figura 55. PC1xPC3 de espectros de absorção no UV/Vis para os ácidos cafeico e ferúlico e seus ésteres.....	74
Figura 56. <i>Loadings</i> para PC1.....	75
Figura 57. <i>Loadings</i> para PC2.....	75
Figura 58. <i>Loadings</i> para PC3.....	76
Figura 59. Modelo PLS para o ácido cafeico na faixa de 0,5-5 mg/ml.....	79
Figura 60. Modelo PLS para o ácido cafeico na faixa de 0,5-5 mg/ml.....	80
Figura 61. Modelo PLS para o ácido gálico na faixa de 2-5 mg/ml.....	81
Figura 62. Ésteres sintetizados.....	83
Figura 63. Espectro de massa CL/ME do cafeato de etila.....	84
Figura 64. Espectro de massa CL/ME do cafeato de butila	85
Figura 65. Espectro de RMN de ¹ H do cafeato de etila.....	86
Figura 66. Espectro de RMN de ¹ H do cafeato de butila	86
Figura 67. Espectro de RMN de ¹³ C do cafeato de etila.....	89
Figura 68. Espectro de RMN de ¹³ C do cafeato de butila.....	89
Figura 69. Espectro de massa CL-ME do cafeato de metila.....	90
Figura 70. Espectro de massa CL-ME do cafeato de pentila.....	91
Figura 71. Espectro de IV do cafeato de metila.....	92
Figura 72. Espectro de IV do cafeato de pentila.....	93
Figura 73. Espectro de RMN de ¹ H do ferulato de butila.....	95
Figura 74. Espectro de RMN de ¹ H do ferulato de pentila.....	95
Figura 75. Eletroforese em gel de poliacrilamida. BAS/Papaína.....	96
Figura 76. Eletroforese em gel de poliacrilamida. BAS/Tripsina.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Soroalbumina bovina (BSA)

CD - Dicroísmo circular

CL/EM – Cromatografia líquida/Espectrometria de massa

COSY - Espectroscopia de correlação homonuclear

CP - Componentes principais

CSV - *Comma-separated values*

DEPT - *Distortionless enhancement by polarization transfer*

DTT - Ditioneitol

E-64 ou N-(N-(L-3-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil)agmatina

EM - Espectrometria de massa

HMBC - *Heteronuclear multiple bond coherence*

HMQC - *Heteronuclear multiple quantum coherence*

HSQC - *Heteronuclear single quantum coherence*

IV - Espectroscopia de infravermelho

nm - Nanômetro

NOESY - *Nuclear overhauser effect spectroscopy*

PC - *Principal component*/Componente Principal

PCA/ACP – *Principal component analysis*/Análise de componentes principais

PLS – *Partial least square* (Mínimos quadrados parciais)

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

TOCSY - Espectroscopia de Correlação Total

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano (THAM)

UV/Vis - Espectroscopia UV/Visível

UV - Ultravioleta

RESUMO

A elucidação estrutural de substâncias orgânicas é feita, atualmente, mediante o uso de diversas técnicas espectroscópicas, tais como a ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, HMBC, HMQC, TOCSY, dentre outras), espectrometria de massa, infravermelho e ultravioleta, com o subsequente trabalho de interpretação dos espectros obtidos. Entretanto, o isolamento de substâncias inéditas está se tornando cada vez mais raro, sendo a grande maioria dos compostos isolados de produtos naturais já amplamente conhecidos. Esta constatação demonstra a necessidade de se desenvolver um método para a confirmação da identidade de substâncias já conhecidas, que tenha como requisitos principais o baixo custo e rapidez da análise, para que possa substituir o uso desnecessário de técnicas avançadas que, via de regra, demandam tempo e elevam os custos excessivamente. Mais especificamente, o método consiste na comparação dos espectros, de uma ou mais técnicas espectroscópicas, das substâncias desconhecidas com espectros de substâncias padrões, através da aplicação de uma ou mais técnicas de Análise Multivariada. Neste trabalho, a Espectrofluorimetria e a Espectroscopia UV-Vis, associadas à Análise de Componentes Principais (PCA), foram utilizadas para classificar compostos fenólicos semelhantes em diferentes grupos. Integraram a lista das substâncias ensaiadas, a quercetina, a vanilina e os ácidos cafeico, cumárico, ferúlico, gálico, 3-hidroxicinâmico e salicílico; bem como os estéres do ácido cafeico e do ácido ferúlico, sintetizados para testes de bioatividade relativos à inibição de serino e cisteíno proteases, representadas por tripsina e papaína, respectivamente. Modelos de calibração multivariada também foram desenvolvidos e permitiram propor uma nova metodologia para a determinação da concentração de ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico em extratos vegetais, combinando espectrofluorimetria com PLS.

Palavras-chave: substâncias aromáticas, identificação, UV-Vis, espectrofluorimetria, calibração multivariada.

ABSTRACT

Nowadays structural elucidation of organic compounds is carried out by using various spectroscopic techniques such as NMR (^1H , ^{13}C , DEPT, HMBC, HMQC, TOCSY), mass spectrometry, IR, UV, with the subsequent interpretation of the spectra data. However, the isolation of new compounds is becoming increasingly rare, and the vast majority of compounds isolated from natural products already widely known. This finding demonstrates the need to develop a method for confirming the identity of Known compounds presenting as main requirements low cost and speed of analysis, in order to replace the unnecessary use of advanced techniques that, in general, demand time and raise costs excessively. More specifically the method consists in comparing the spectra of one or more instrumental technique, the spectra of unknown compounds with substances standards, by applying one or more multivariate analysis technique. In this work the spectrofluorimetry and UV-Vis spectroscopy associated with Principal Component Analysis (PCA) were used to classify into different groups, similar phenolic compounds such as gallic acid, salicylic acid, caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid, 3-hydroxycinnamic acid, quercetin and vanillin. The synthetic esters of caffeic acid and ferulic acid which were submitting to testing bioactivity relative to the inhibition of serine and cysteine proteases represented by trypsin and papain, respectively, were also grouped to list of compound tested. Multivariate calibration models were developed and allowed to propose a new methodology for determining the concentration of of caffeic acid, ferulic acid and gallic acid in plant extracts combined with PLS spectrofluorimetry.

Keywords: aromatic substances, identification, UV-Vis, spectrofluorimetry, multivariate calibration.

1. INTRODUÇÃO

Os estudos com plantas medicinais têm sido responsáveis por inúmeras e importantes descobertas. Vários elementos permeiam as investigações científicas a partir das plantas medicinais, elementos estes que envolvem desde a cultura popular até o desafio do estudo detalhado de uma espécie vegetal, visando de modo exato e racional a determinação estrutural de uma nova molécula com potencialidades de se transformar em um medicamento disponível e aprovado.

Incontestável é a afirmação de que o uso das espécies vegetais com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas, remonta ao início da civilização, sendo que no século XIX, esta prática sofreu um declínio devido à substituição paulatina dos extratos totais pelas substâncias ativas isoladas, os chamados princípios ativos. Entretanto, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, o interesse pelas drogas de origem vegetal permanece e, atualmente, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 44% de todas as novas drogas têm envolvimento de produtos naturais. De acordo com Hostettmann (2007), dos medicamentos atualmente prescritos, 56% são produtos sintéticos, 24% são derivados de produtos naturais, 9% são produtos sintéticos modelados a partir de produtos naturais, 6% são produtos naturais e 5% biológicos.

Para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode-se realizar pesquisas por meio de diferentes processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas e a modificação molecular de substâncias naturais ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas. Destaca-se, ainda, a extração, o isolamento e a purificação de novos compostos a partir de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como fonte

inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamentos (BRITO & BRITO, 1993).

Para a elucidação da estrutura de uma substância é essencial seu isolamento, purificação e uso de técnicas espectroscópicas que auxiliam na determinação da sua composição. Na caracterização desta como o princípio ativo, responsável pelas propriedades medicinais atribuídas à planta, é necessário o estudo de sua atividade farmacológica, mecanismo de ação, toxicidade, determinação de seus efeitos colaterais e, ainda, obtenção de derivados sintéticos mais potentes e menos tóxicos.

Na realização destas investigações são necessárias quantidades superiores a 1,0 grama da substância de interesse, sendo que o processo de obtenção não é simples. Nas plantas estão presentes centenas de constituintes diferentes e, na maioria das vezes, a substância ou substâncias responsáveis pelas propriedades farmacológicas observadas estão presentes em quantidades muito pequenas (CHAVES, 2006).

O sucesso do trabalho só é alcançado quando se obtém finalmente, após o emprego de sucessivas técnicas complexas e dispendiosas, a substância isolada e pura para determinação da sua estrutura, composição e, se for o caso, bioatividade.

As principais técnicas para determinação da estrutura de substâncias isoladas são as técnicas espectroscópicas, onde os dados físico-químicos são levantados através da transmissão, absorção ou reflexão da energia de radiação incidente em uma amostra. Englobam essas técnicas a espectrometria de massa (EM), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (IV), espectroscopia UV/Visível, espectroscopia de fluorescência, rotação óptica específica, dicroísmo circular (CD) e cristalografia de raios X, entre outros.

Atualmente, a utilização de técnicas hífenadas ou acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas tem sido de grande valor na análise de produtos à base de plantas medicinais. Uma estratégia é a plataforma de LCL/EM/RMN aplicada à identificação de substâncias isoladas de produtos

naturais. Nesta plataforma temos o acoplamento de um método eficiente de separação como a cromatografia líquida (CL), com técnica espectrométrica (EM) e ressonância magnética nuclear (NMR). Ressalte-se, entretanto, que a análise integrada dos métodos espectroscópicos ainda se constitui como o meio mais prático para a elucidação de estruturas químicas (MOLINSKI, 2010a).

Faz parte da rotina nos laboratórios de pesquisa de produtos naturais a obtenção de espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H , pela facilidade de consecução, pois quando os núcleos de hidrogênio são abundantes a análise pode ser feita em 10 minutos, e a obtenção dos espectros de RMN de ^{13}C e do espectro de RMN ^{13}C -DEPT que é utilizado na determinação do número de átomos de hidrogênio ligados a ^{13}C . Todos estes são espectros de ressonância magnética nuclear em uma dimensão (1D).

No entanto, muitas vezes é necessário usar técnicas para obtenção de espectros em duas dimensões (2D), como COSY (espectroscopia de correlação homonuclear – correlações entre hidrogênios que estão acoplados por $^{2-3}J_{\text{H,H}}$), NOESY (espectroscopia bidimensional do efeito nuclear de *Overhauser* – correlação entre hidrogênios espacialmente próximos), HMQC/HMBC (espectroscopia bidimensional de coerência múltiplo *quantum* heteronuclear (C,H) a uma ligação) e HSQC (espectroscopia bidimensional envolvendo transições quânticas heteronucleares simples (C,H) a uma ligação), dentre outras técnicas, para elucidar as estruturas das substâncias. A obtenção de todos esses espectros resulta geralmente em consumo de tempo do instrumento, bem como do especialista para a interpretação dos espectros.

A obtenção de um espectro de RMN de ^{13}C e técnicas em 2D como HSQC e HMBC podem exigir, em função da baixa sensibilidade inerente do núcleo de ^{13}C e, via de regra, a pequena quantidade de amostra disponível (muitas vezes inferior a 20 mg), um tempo de análise às vezes superior a 24 horas. Deve ser registrado, entretanto, que avanços nas técnicas espectroscópicas em microescala, como RMN *microcryoprobe*, permitem a elucidação estrutural de uma nova molécula com apenas alguns microgramas e, ainda, a introdução de novos métodos para a utilização de dicroísmo circular

(CD) têm diminuído os limites de detecção para nível picomolar ((MOLINSK, 2009 e 2010b).

Tratando-se de substâncias desconhecidas é imprescindível, para a determinação de suas estruturas, a utilização de técnicas avançadas e a análise integrada dos vários espectros obtidos. Entretanto, a condição mais constante é o isolamento de substâncias com estruturas já conhecidas, mas, ainda assim, na maioria dos casos, a confirmação das estruturas é feita utilizando várias técnicas sofisticadas, resultando em gastos desnecessários de tempo e elevação dos custos (MEIRA *et al.*, 2008; MAAS *et al.*, 2009; ALBARICI *et al.*, 2010; MAHAJAN & PAI, 2010; ELDAHSHAN, 2011; ESHBAKOVA, 2011; HEINKE *et al.*, 2011).

Na busca da economicidade de tempo e aumento da eficiência, vislumbrou-se a necessidade de desenvolver um método para a confirmação da identidade das substâncias já conhecidas, que congregasse os requisitos de alta sensibilidade, simplicidade, baixo custo e rapidez. O método proposto consiste na identificação de substâncias aromáticas por comparação de seus espectros obtidos por espectrofluorimetria e espectroscopia de UV-Vis, com os espectros correspondentes de substâncias padrões através de métodos quimiométricos, como a Análise de Componentes Principais (PCA). Além disso, também é possível quantificar a substância através de técnicas de calibração multivariada, tais como por mínimos quadrados parciais (PLS).

1.1. QUIMIOMETRIA

O desenvolvimento de técnicas instrumentais sofisticadas e de processos químicos avançados em conjunto com a grande evolução na área da computação conduziram a uma necessidade crescente do uso de procedimentos matemáticos e estatísticos mais complexos no tratamento dos dados obtidos.

Por muitos anos, predominou o paradigma de que se era necessário uma complexa análise dos dados, então o experimento não teria sido planejado de forma correta. Na atualidade reconhece-se que a maioria dos sistemas são de natureza múltipla e, assim sendo, as abordagens univariadas não podem resultar em soluções ideais (HOPKE, 2003).

Em todo experimento, a parte essencial e determinante do sucesso na obtenção dos resultados é a análise de dados, que pode ser univariada ou multivariada. Nomeia-se de análise univariada de dados quando somente uma variável é medida sistematicamente para várias amostras, sendo esta uma forma de tratamento de dados bastante utilizada, apesar de sua aplicação estar se tornando cada vez mais limitada. Já a análise multivariada de dados vem ganhando espaço cada vez maior. Esta consiste na verificação da relação entre grupos de variáveis dependentes coletadas sobre a mesma amostra e corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos (BARROS NETO *et al.*, 2006).

Dados univariados são gerados por instrumentos como fotômetros de filtro, pHmetros e condutivímetros cuja leitura medida de uma amostra resulta em apenas um único valor escalar ou valor numérico. Dados multivariados são gerados por instrumentos, tais como espectrômetros e cromatógrafos que fornecem um conjunto de variáveis para cada amostra.

A introdução da instrumentação analítica fornecendo respostas multivariadas para cada amostra analisada associada à disponibilidade de computadores, bem como de programas estatísticos sofisticados, fez surgir a QUIMIOMETRIA (SENA *et al.*, 2000), que é uma área especificamente

destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada, podendo ser definida como uma área da química que visa planejar ou otimizar a seleção de procedimentos experimentais, empregando métodos matemáticos e estatísticos na análise dos dados resultantes que terminam por fornecer o máximo de informação química relevante, além de conhecimentos sobre sistemas químicos (FERREIRA *et al.*, 1999; HOPKE, 2003).

Com o crescimento da quimiometria foram desenvolvidas novas ferramentas para tratamento de dados encontrando aplicações distintas conforme o objetivo do estudo como, por exemplo, a otimização de processos, a classificação de dados e as determinações qualitativas e quantitativas.

Uma das ferramentas mais utilizadas da quimiometria nas mais diversas áreas de pesquisa tem sido a Análise de Componentes Principais (PCA) que visa principalmente reduzir o número de variáveis, eliminar dados redundantes e facilitar a interpretação dos dados, sendo considerado um método descritivo e exploratório (REIS, 2001). Outra ferramenta também muito importante na quimiometria é a calibração multivariada que tem sido aplicada em estudos relacionados com os alimentos, agricultura, indústria e meio-ambiente (MORA *et al.*, 2006; LÓPEZ *et al.*, 2009; SAMISTRARO *et al.*, 2009). Dentre os métodos de calibração multivariada empregados com maior frequência, a regressão por mínimos quadrados parciais, do inglês *partial least square* (PLS) é uma das técnicas que tem seu uso mais frequente (FORINA *et al.*, 2007).

Nesse trabalho foi testado um novo método para análise de metabólitos frequentemente isolados no estudo fitoquímico, tais como ácido gálico, salicílico e outros fenólicos comuns. Para tanto, foram analisados os espectros dessas substâncias obtidos por espectrofluorimetria e espectroscopia UV-Vis por meio de tratamento quimiométrico de análise de componentes principais (PCA). Esse método permite separar essas substâncias em diferentes grupos mediante características específicas que só são evidenciadas após a análise dos dados resultantes sob a ótica do referido método quimiométrico.

Na determinação da concentração de alguns componentes utilizou-se o método de calibração multivariada de análise quantitativa de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), que é um método linear porque resulta em

um modelo que descreve uma relação linear entre as respostas e as concentrações dos componentes na amostra.

1.1.1. Análise de Componentes Principais/*Principal Component Analysis* (ACP/PCA)

A análise de componentes principais foi descrita pela primeira vez por Karl Pearson em seu trabalho - *On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space* - datado de 1901, que buscava demonstrar como determinar linhas e planos que melhor se ajustassem a um conjunto de pontos em um espaço p -dimensional, sendo, por conseguinte, dentre as técnicas de análise multivariada, a mais antiga. Esta técnica foi posteriormente reformulada por Harold Hotelling que em um trabalho de psicometria publicado em 1933, a denominou de - *Principal Component Analysis (PCA)* - traduzido para o português como “Análise de Componentes Principais (ACP)” (SANTOS & PEREIRA, 2010).

Técnica matemática de análise multivariada, a análise de componentes principais permite investigações com um grande número de dados disponíveis e ainda possibilita, sem perdas significativas de informações, a identificação das medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados. A redução do número de variáveis originais se constitui no principal objetivo da técnica.

A ACP transforma, com a menor perda de informação possível, um conjunto original de variáveis em outro conjunto: denominado “componentes principais” (CP) de dimensões equivalentes, resultante das combinações lineares das variáveis originais com eliminação de algumas destas variáveis que não possuam informação relevante. Observe-se que só ocorrerá a redução das variáveis se as p variáveis iniciais não forem independentes e possuírem coeficientes de correlação não-nulos (BEEB *et al.*, 1997).

Os componentes principais resultam da transformação de um conjunto de variáveis aleatórias correlacionadas em um conjunto de variáveis não correlacionadas e ortogonais entre si. Essas variáveis são combinações lineares das variáveis originais, sendo que a primeira variável ou primeira

componente principal obtida com essa transformação será responsável pela maior variância do conjunto original de dados, em sequência a segunda componente ou segunda variável será responsável pela maior variância restante, não havendo correlação com a primeira. Nessa mesma linha a terceira componente será responsável pela maior variância restante e não será correlacionada com a primeira e a segunda componente e assim por diante, ou seja, a importância relativa dos componentes principais decresce do primeiro para o último (SMITH & VERDINELLI, 1980).

Mais especificamente, as combinações lineares das variáveis iniciais são colocadas em ordem decrescente por suas variâncias. Assim sendo, pode-se concluir que os últimos componentes serão responsáveis pela explicação de uma pequena parte da variação total dos dados. Registre-se que o número de componentes principais pode ser no máximo igual ao número de variáveis (SCREMIN, 2003).

As componentes principais são, basicamente, uma combinação linear das variáveis originais, que são escritas por meio dos autovalores (λ) e dos autovetores (ℓ). Os autovalores de uma matriz de correlação representam a variabilidade de cada componente, e os autovetores são a base para a construção das cargas fatoriais (VICINI, 2005)

A análise de componentes principais agrupa os indivíduos de acordo com sua variação, isto é, os indivíduos são agrupados segundo suas variâncias ou seu comportamento dentro da população, representado pela variação do conjunto de características que define o indivíduo. A técnica agrupa os indivíduos de uma população segundo a variação de suas características.

Calcular a matriz de variância-covariância (Σ) ou a matriz de correlação (R) e encontrar os autovalores e os autovetores, são os passos necessários para a determinação das componentes principais. Considerando que os autovalores são a representação da variabilidade de cada componente, a soma dos mesmos equivale ao número de variáveis, sendo que se as componentes forem extraídas da matriz de correlação, a soma dos componentes explicará, sem perda de informação, 100% dos dados. Um esquema prático para determinação dos componentes principais é descrito na Figura 1.

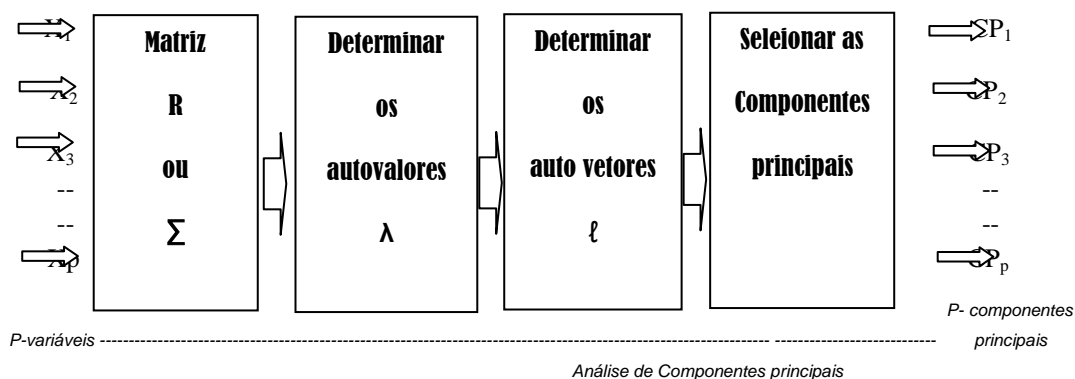


Figura 1 - Esquema para encontrar as raízes características que formarão os autovetores Fonte: SOUZA, Adriano Mendonça (2000, p.25).

Na escolha do número de componentes principais pode-se fazer uso de algumas alternativas. Johnson e Wichern (2002) indicam a variância total acumulada de pelo menos 80%. Uma ferramenta também muito utilizada é o gráfico *scree plot* proposto por Cattell (1966) que é um gráfico dos autovalores em função da ordem das componentes principais, representando graficamente a porcentagem de variância explicada por componente; quando a porcentagem se reduz e a curva passa a ser quase paralela ao eixo das abscissas, podem-se excluir os componentes correspondentes (Figura 2).

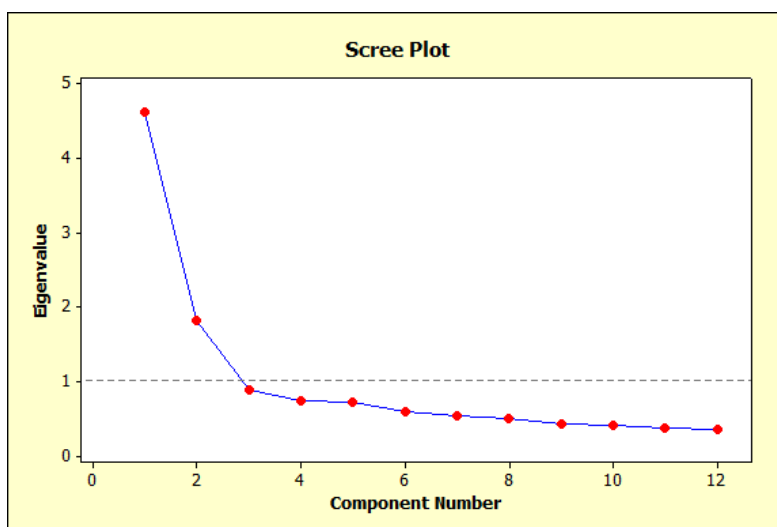


Figura 2: Gráfico *scree plot*. Fonte: FOGO, José Carlos (2009, p. 5).

Da interpretação do gráfico depende-se que o número de componentes principais indicado pelo *scree plot* é $k = 3$, ponto no qual se

observa a estabilização da inclinação na curva. A seleção do número dos componentes principais, também, pode ser feita incluindo-se somente aquelas componentes cujos valores próprios são superiores a um. Neste caso, são dois autovalores, este critério foi sugerido por Kaiser (1958, apud MARDIA, 1979).

Além de ser capaz de separar informações importantes das incertas, desnecessárias e repetidas, a ACP auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, sendo, por conseguinte, um método exploratório (PANERO & DA SILVA, 2008). Neste tipo de análise, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados, mediante a geração de gráficos de *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (CP) nos quais os dados são projetados. Os *scores* fornecem a composição das componentes principais, relativamente às amostras. Os *loadings*, por sua vez, fornecem a composição das componentes principais em relação às variáveis. Como as componentes principais são ortogonais, ou seja, estão todos a 90° uma em relação à outra, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos *scores* e dos *loadings*. O estudo do conjunto de *scores* e *loadings* permite, ainda, estimar a influência de cada variável em cada amostra (BEEB *et al.*, 1997; FERREIRA *et al.*, 2002; CORREIA & FERREIRA, 2007).

Em síntese, a ACP é um método que tem como objetivo reduzir, mediante combinações lineares das variáveis originais, a extensão do conjunto dos dados e identificar novas variáveis significantes. Um grande número de variáveis correlacionadas pode ser reduzido a um pequeno número de componentes artificiais não correlacionadas, determinadas mediante combinações lineares das variáveis observadas, sem perda das informações relevantes dos dados brutos. Na ACP os dados são organizados em uma matriz de dados brutos X ($n \times p$) onde as n linhas correspondem aos objetos e as p colunas às variáveis, sendo esta matriz decomposta no produto de duas matrizes, onde:

$$X = T \times P^t + (1)$$

\mathbf{T} é a matriz dos *scores* das componentes principais, \mathbf{P} é a matriz *loadings* (pesos) das componentes principais, $\boldsymbol{\varepsilon}$ é a matriz dos resíduos. O sobrescrito \mathbf{t} indica a transposta da matriz e q é um escalar que indica o número de componentes principais que descreve a maior parte da variância dos dados (MATOS *et al.*, 2003). Este procedimento está representado esquematicamente na Figura 3.

$$\begin{array}{c} \boxed{\text{X}} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} \boxed{\text{T}} \\ n \end{array} \times q \begin{array}{c} \boxed{\text{P}^t} \end{array} + \begin{array}{c} \boxed{\boldsymbol{\varepsilon}} \\ n \end{array}$$

Figura 3. Representação da matriz de dados decomposta em matrizes *scores* e *loadings*.

Após uma sequência de complexos cálculos, tomando-se como base a distribuição das amostras em um gráfico bidimensional das componentes principais, interpretam-se os resultados, identificando-se e avaliando-se, inclusive, a importância das variáveis originais escolhidas, pois as variáveis originais com maiores valores de *loadings* na combinação linear das componentes principais são as mais importantes no ponto de vista estatístico.

Registre-se que apesar de ser uma ferramenta importante para a análise e avaliação de dados, cujo surgimento data de 1901, a utilização em larga escala das técnicas multivariadas só ocorreu após o advento dos computadores, pois sem o auxílio de aplicativos específicos para análise de dados complexos, não haveria possibilidade de se gerar com rapidez, eficiência e clareza, os gráficos que permitem examinar o inter-relacionamento das variáveis (VICINI, 2005).

1.1.2. Calibração multivariada - Regressão por mínimos quadrados parciais/*Partial least squares* (PLS)

O processo que possibilita relacionar um sinal analítico ou resposta instrumental com uma determinada propriedade da amostra é denominado de

calibração. O modelo ou método de calibração é a equação matemática que irá descrever a relação sinal *versus* propriedade, podendo ser definido ainda como o processo matemático ou estatístico de extração de informação a partir do sinal instrumental. A representação gráfica da relação sinal *versus* propriedade é feita mediante construção da curva analítica ou de calibração (BOOKSH & KOWALSKI, 1994; FORINA, 2007). De acordo com critérios relativos a número de variáveis, tipo de função matemática, obtenção dos parâmetros de calibração e a variável independente, o método de calibração pode ser classificado em, respectivamente, univariado e multivariado, linear e não linear, direto ou indireto, clássico e inverso (MARTENS & NAES, 1996).

Denomina-se calibração univariada quando a relação matemática estabelecida ocorre entre uma única variável dependente e uma única variável independente; multivariada, quando a relação envolve mais de uma variável. Para um modelo de calibração ser dito linear as variáveis dependentes estão relacionadas com funções lineares das variáveis independentes; não se observando esta relação, o modelo é não-linear. A calibração é direta quando os parâmetros são conhecidos diretamente a partir do sinal analítico de cada um dos analitos de forma individual; indireta, quando os parâmetros são determinados a partir dos sinais analíticos de misturas de componentes. Quando a concentração é a variável independente e o sinal analítico a variável dependente, caracteriza-se a calibração clássica; em caso reverso a calibração é inversa (BARROS NETO *et al.*, 2002; PIMENTEL *et al.*, 2008).

O princípio básico da calibração multivariada é a quantificação de uma variável dependente, mediante a utilização concomitante de muitas variáveis independentes para quantificar. No campo das análises químicas, com o avanço da instrumentação e automação dos laboratórios gerando uma enorme quantidade de dados, tabelas e gráficos para serem identificados, classificados e interpretados de forma eficiente, foi que a calibração multivariada passou a ser largamente empregada, principalmente nos casos em que os resultados da análise gerados pelo equipamento apresentam superposição de sinais ou quando se deseja fazer determinações simultâneas de analitos. É uma técnica aplicada a matrizes reais complexas, onde os procedimentos de separação e tratamentos químicos necessários para aplicar a calibração usual simples são

caros e demorados. Dentre os métodos de calibração multivariada destaca-se, por ser um dos empregados com maior frequência, o método de regressão por mínimos quadrados parciais (SALDANHA *et al.*, 1999).

Técnica introduzida por Wold (1975), o método dos mínimos quadrados parciais é um modelo baseado em variáveis latentes (fatores), onde cada fator é definido como uma combinação linear das variáveis originais das matrizes X (variáveis independentes) ou Y (variáveis dependentes). Assim sendo, é um método linear de calibração multivariada pois os dados das variáveis independentes X e dependentes Y são utilizados para estabelecer um modelo de regressão linear. O método consiste em decompor ou modelar as matrizes originais, tanto a matriz X como a matriz Y, formando dois conjuntos de fatores lineares ou grupos de matrizes denominados de escores (*scores*) e pesos (*loadings*), sendo, por conseguinte, um método bilinear (SALDANHA *et al.*, 1999; ARAÚJO *et al.*, 2001).

A regressão por mínimos quadrados parciais consiste em encontrar um conjunto de componentes principais (vetores base) para os dados espectrais e um conjunto separado de componentes principais para os dados de concentração, relacionando, em seguida, um conjunto com o outro, buscando encontrar uma perfeita linearidade entre os escores, ou seja, entre as projeções dos dados espectrais e dos dados de concentração sobre seus respectivos fatores.

Na regressão por mínimos quadrados são utilizadas tanto a informação da matriz de dados X como as informações da matriz de concentração Y, as variáveis originais são trocadas por um novo subconjunto originado daquelas, denominados de variáveis latentes, fatores ou componentes. Na construção do modelo de calibração, os dados de variáveis independentes x e dependentes y são dispostos na forma de matrizes X e Y, que são decompostas em uma soma de produtos de dois vetores, os *scores* e os *loadings*, de acordo com o modelo estrutural:

$$X = TP^t + E = \sum_f^t p_f^t + E \quad (2)$$

$$Y = TQ^t + F = \sum_f^t q_f^t \quad (3)$$

na qual \mathbf{T} é a matriz de *scores*; \mathbf{P} e \mathbf{Q} são os *loadings* (matrizes de pesos) para \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente; \mathbf{E} e \mathbf{F} são as matrizes resíduos, representando os erros ou falta de ajuste do modelo. O sobrescrito \mathbf{t} indica a matriz transposta. Encontra-se uma relação entre as variáveis independentes x e as variáveis dependentes y , fazendo a correlação entre os *scores* da matriz \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Para se encontrar a melhor correlação possível é mister uma leve rotação das CP (componentes principais), sendo que após esse procedimento, as variáveis passam a ser nominadas de variáveis latentes, ocorrendo, por consequência, alteração nos valores dos *scores*. Para se obter o número de variáveis latentes utilizado no processo de calibração, faz-se necessário o uso de uma metodologia centrada na magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração denominada de validação cruzada (BRERETON, 2000). Após a determinação do número de variáveis latentes e o modelo, a concentração de novas amostras poderá ser estimada a partir dos novos *scores* \mathbf{T}^* e dos novos *loadings* \mathbf{Q} do modelo de calibração, que podem ser substituídos na equação 3, resultando na equação:

$$Y_N = T^* Q^t \quad (4)$$

Via de regra, o modelo PLS apresenta uma relação linear entre os parâmetros analisados, sendo capaz de dar uma boa previsão, ainda que ocorram desvios aceitáveis de linearidade, desde que mais variáveis latentes sejam incorporadas (BARTHUS *et al.*, 2007; MORANO *et al.*, 2007).

1.2. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Métodos que se baseiam na detecção e análise de um feixe de radiação eletromagnética vinda de uma amostra que está sob investigação são nominados espectroscópicos. São métodos que determinam a interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria, fundamentados na absorção ou emissão de radiação eletromagnética por muitas moléculas quando os seus elétrons movimentam-se entre níveis energéticos. Diferentes intervalos no amplo espectro da radiação eletromagnética, desde os raios-X até microondas, são cobertos pelos diferentes métodos ditos espectroscópicos. Considerando que as interações da radiação com a matéria podem ocorrer tanto em nível atômico como em nível molecular, os métodos instrumentais espectrométricos compreendem (Figura 4) emissão (emissão atômica), luminescência (fluorescência atômica e molecular, fosforescência), espalhamento (Raman, turbidimetria e nefelometria) e absorção (absorção atômica e molecular) (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de radiações eletromagnéticas estende-se, em ordem crescente de energia, das ondas de rádio, com longos comprimentos de onda ($10^3 - 100$ m), até radiações de altíssima energia (raios-X e raios- γ) com comprimentos de onda muito curtos, entre 10^{-10} e 10^{-15} m. O espectro inclui também regiões de radiações com energias intermediárias, entre microondas e o ultravioleta de vácuo. Cada uma dessas regiões tem suas formas próprias de serem produzidas e detectadas, não existindo uma interface perfeitamente definida entre regiões adjacentes, sendo o espectro contínuo do ponto de vista macroscópico (ITO, 2004).

TIPO DE ESPECTROSCOPIA	FAIXA DE COMPRIMENTO DE	FAIXA DE NÚMERO DE ONDA USUAL CM ⁻¹	TIPO DE TRANSIÇÃO
Emissão de raios gama	0,005-1,4 Å	-----	Nuclear
Absorção, emissão, fluorescência e difração de raios-X	0,1 – 100 Å	-----	Elétrons internos
Absorção de ultravioleta de vácuo	10 – 180 nm	1 x 10 ⁶ a 5 x 10 ⁴	Elétrons ligados
Absorção, emissão e fluorescência no UV/Visível	180 a 780 nm	5 x 10 ⁴ a 1,3 x 10 ⁴	Elétrons ligados
Absorção no IV e espalhamento Raman	0,78 – 300 µm	1,3 x 10 ⁴ a 33	Rotação/vibração de moléculas
Absorção de microondas	0,75 – 375 mm	13 a 0,03	Rotação de moléculas
Ressonância de spin eletrônico	3 cm	0,33	Spin de elétrons em um campo magnético
Ressonância magnética nuclear	0,6 – 10 m	1,7x10 ⁻² a 1x10 ³	Spin de núcleos em um campo magnético

Figura 4. Quadro representativo do fenômeno de interação radiação eletromagnética com a matéria. Fonte: BASS, 2001. Disponível em: <http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/articel.php?u=Y29uY2VpdG9zLWZ1bmRhbWVudGFpcy1lc3BIY3Ryb3Njb3BpYQ==>. Acessado em 20/12/2010

1.2.1. Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia de forma genérica consiste no estudo da radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo. A espectroscopia UV-Vis permite determinar a absorção da luz numa amostra, no intervalo de comprimentos de onda, compreendido entre 200 a 800 nm. A região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de 200 a 400 nm, enquanto a região do visível fica entre 400 a 800 nm. As energias correspondentes a essas regiões são ao redor de 150 a 72 k.cal.mol⁻¹ na região ultravioleta, e 72 a 36 k.cal.mol⁻¹ para a região visível (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). Energias dessa magnitude correspondem, muitas vezes, à diferença entre estados eletrônicos de muitas moléculas. A absorção da região visível e ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2006).

Para a determinação espectrofotométrica na região ultravioleta é necessário empregar células de quartzo que não absorvem nesta zona do espectro. É um método de análise baseado na propriedade de que espécies

químicas iônicas ou moleculares absorvem radiações na região do ultravioleta e visível. As radiações nestas regiões envolvem fótons com energia suficiente para provocar transições de elétrons de valência, sendo um processo específico relacionado com a estrutura molecular da espécie absorvente. A quantidade dos fótons absorvidos será sempre proporcional ao número de centros absorventes que a radiação encontra ao longo do seu percurso através da solução (SKOOG *et al.*, 2002).

O método está fundamentado nos princípios teóricos da lei de Lambert-Beer, os quais explicam a absorção da luz em função da espessura do meio, relacionando-a com a absorbância ou transmitância dos eletrólitos presentes na solução reacional. A lei de Lambert-Beer estabelece uma relação entre a intensidade da luz incidindo na solução (I_0), e a intensidade da luz saindo da solução (I) (5):

$$\text{Log } (I_0 / I) = A = \epsilon c l \quad (5)$$

A = absorbância

ϵ = absortividade molecular ou coeficiente de extinção molar

c = concentração do material absorvedor

l = espessura do compartimento da amostra da amostra através da qual a luz passa.

A absorção na região visível e ultravioleta depende, em primeiro lugar, do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou íons absorventes. Como consequência, o pico de absorção pode ser correlacionado com o tipo de ligação que existe na espécie que está sendo estudada. Do ponto de vista prático, o aspecto mais importante do cálculo quântico é a determinação de quanta luz é absorvida pela amostra. Nos compostos orgânicos, os que possuem dupla ligação absorvem fortemente no ultravioleta distante. Os compostos que possuem ligações simples e duplas alternadamente, chamadas de ligações conjugadas, produzem absorção em comprimentos de ondas maiores. Quanto mais extenso for o sistema conjugado, mais longos serão os

comprimentos de onda absorvidos, podendo chegar à região do visível (PAVIA *et al.*, 2010).

O processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma região do espectro eletromagnético, ou seja, que mede a radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo é designado espectrofotometria.

Denominam-se de espectrofotômetros os instrumentos capazes de registrar dados de absorbância ou transmitância em função do comprimento de onda. O espectro é o registro dos dados, sendo nominando espectro de absorção ou espectro de transmissão, de acordo com o dado registrado, se absorbância ou transmitância. O espectro de absorção é característico para cada espécie química, sendo possível a identificação de uma espécie química por seu “espectro de absorção” (BASSI, 2001).

Uma particularidade importante dos espectrofotômetros é a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer. Quando a região espectral usada é a UV/Vis, são necessários componentes óticos de quartzo e detectores altamente sensíveis capazes de detectar radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. Os espectrofotômetros, em geral, contêm cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as soluções, detectores e indicadores de sinal (Figuras 5 e 6) (VINADÉ & VINADÉ, 2005).

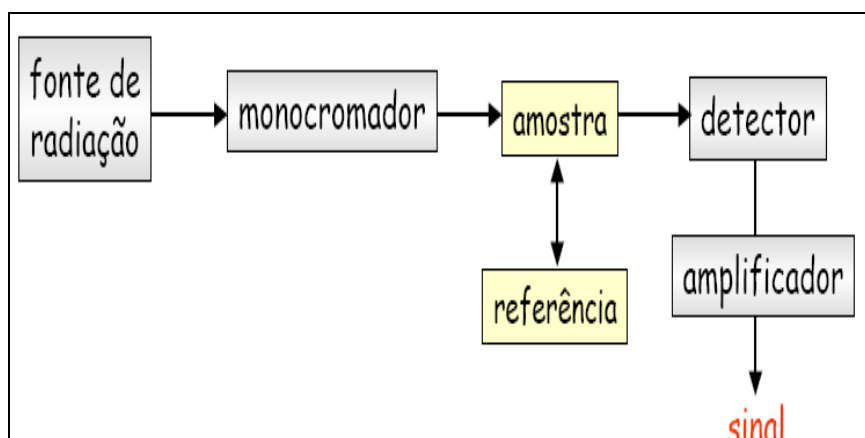


Figura 5: Esquema de um espectrofotômetro

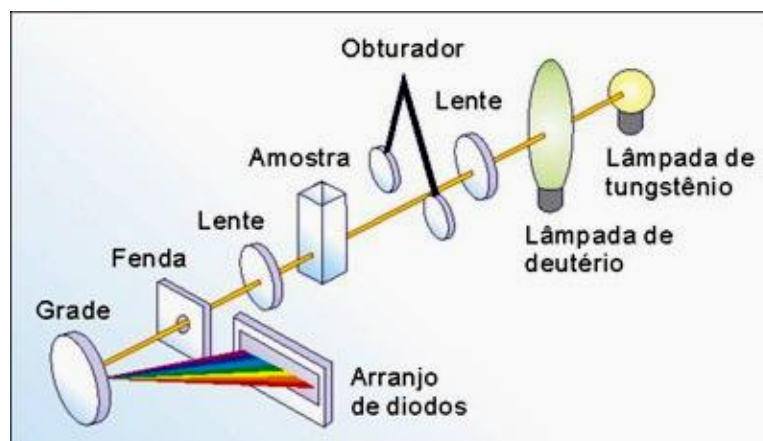


Figura 6: Partes essenciais de um espectrofotômetro

Fonte: ATVARS & MARTELLI, 2002. Disponível em:
<http://chemkeys.com/en/2002/02/20/electronic-absorption-spectroscopy/>
 Acessado em 10/03/2011.

1.2.2. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica de elementos múltiplos que possibilita analisar espécies que apresentam o fenômeno de fluorescência molecular ou que possam, por meio do processo conhecido como derivatização, ser convertidas a moléculas fluorescentes (SKOOG *et al.*, 2005).

A fluorescência é o fenômeno no qual a absorção de fótons de luz ($h\nu_{ex}$) é o responsável pela excitação da molécula, mediante a elevação de elétrons de valência de um orbital menos energético para um orbital de maior energia. Neste fenômeno, o spin do elétron excitado mantém sua orientação original e a natureza do estado excitado envolvido no processo é singleto, sendo que o intervalo de tempo entre a captação do fóton e a emissão da energia captada é extremamente curto ($<10^{-5}$ s, podendo ser de até 10^{-12} s). Na hipótese de a natureza do estado excitado envolvido no processo ser tripleto, ou seja, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado pela a absorção de fótons de luz é invertida, sendo bem maior (de alguns segundos ou até mais) o intervalo de tempo entre a captação e a emissão de energia, ocorre o fenômeno da fosforescência (VOGEL *et al.*, 2002).

A fluorescência e a fosforescência são fenômenos similares, embora distintos, resultantes da luminescência, que é a propriedade que numerosas

espécies apresentam de emitir radiação eletromagnética na região do ultravioleta próximo-visível, proveniente de moléculas que foram excitadas, retornando ao seu estado fundamental.

Pelo diagrama de Jablonski (Figura 7) pode-se entender melhor a sequência de etapas que leva à fluorescência e fosforescência. Durante a absorção de radiação eletromagnética UV/Vis, as moléculas são elevadas a um estado eletrônico excitado (S_1 ou S_2). A maioria das moléculas dissipa este excesso de energia na forma de calor pela colisão com outras moléculas, mas algumas emitem parte deste excesso energético como luz em um comprimento de onda diferente daquele correspondente à radiação absorvida. Quando a luz emitida pelo decaimento para o estado eletrônico fundamental (S_0) é proveniente de uma transição entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade ($S_1 \rightarrow S_0$), tem-se o fenômeno da fluorescência (F). Quando a relaxação do elétron ocorre pela emissão de um fóton devido ao decaimento de um estado tripleto (T_1) para o estado eletrônico fundamental (S_0), tem-se o fenômeno da fosforescência.

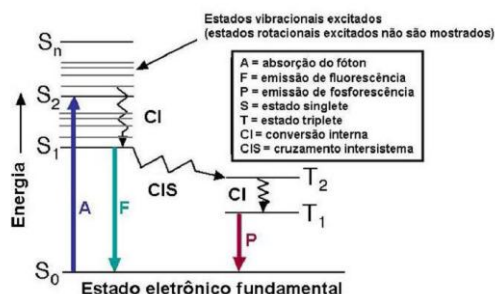


Figura 7. Diagrama de Jablonski. Fonte: SILVA, 2007.

A fluorescência é a base da espectrofluorimetria que é um dos métodos espectroscópicos mais extensivamente usado em meios analíticos. Fundamenta-se na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas de caráter singleto quando estas retornam para o estado fundamental. É uma ferramenta importante na química analítica, apresentando grande sensibilidade, uma vez que os limites de detecção encontram-se na faixa de ng mL^{-1} , cerca de quase 100 vezes maior do que a espectroscopia UV-Vis. Este método também é seletivo, considerando que nem todas as substâncias que absorvem radiação eletromagnética são capazes de emitir fluorescência (SIERRA, 1996).

O instrumento utilizado para medir a fluorescência é o espectrofluorímetro. A maioria dos espectrofluorímetros possui dois monocromadores, um de excitação e um de emissão, um sistema de excitação e um sistema de detecção (Figura 8).

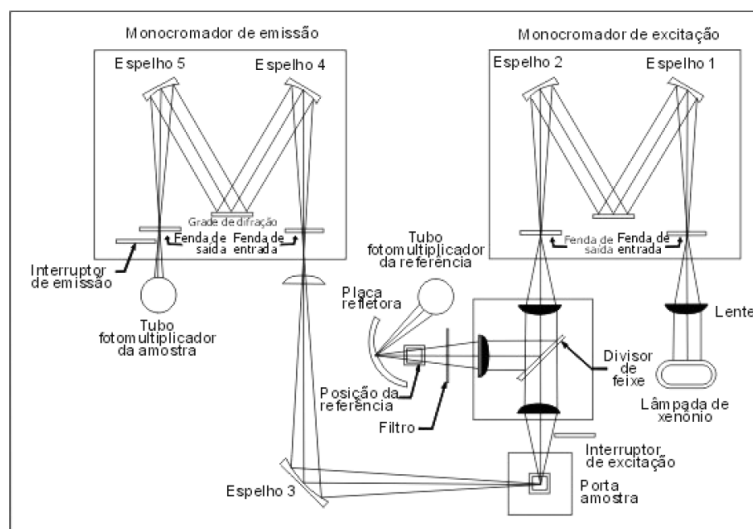


Figura 8: Esquema óptico de um espectrofluorímetro

Fonte: ATVARS & MARTELLI, 2002. Disponível em:

<http://chemkeys.com/br/2002/02/18/espectroscopia-eletronica-de-emissao/>.

Acessado em 10/03/2011.

Denomina-se de monocromadores dispositivos que permitem isolar uma linha de comprimento de onda λ oriundo da fonte de radiação policromática. Comumente, um monocromador é composto por um arranjo óptico que, através de uma grade de difração, decompõe em diferentes comprimentos de onda uma fonte de luz policromática incidente. No espectrofluorímetro, é por intermédio do monocromador de excitação que são selecionados os comprimentos de onda para excitação da amostra, sendo que o monocromador de emissão analisa a radiação emitida e o tubo fotomultiplicador determina a intensidade desta radiação (Figura 8). Nos espectrofluorímetros mais comuns a fonte de radiação é uma lâmpada de emissão contínua, que pode ser de xenônio e mercúrio. O critério para a seleção entre uma ou outra lâmpada depende condição necessária para o procedimento analítico. Na hipótese de se precisar do maior número de comprimentos de onda possíveis para a excitação da amostra, opta-se pela lâmpada de xenônio, mas, no caso da amostra apresentar fraca absorção, é mister uma maior intensidade nos comprimentos de onda emitidos, então a escolha deve ser pela lâmpada de mercúrio (HOLLER, 2009).

Os espectrofluorímetros que possuem fonte de radiação com lâmpada de emissão contínua fornecem dois tipos de espectros: espectros de fluorescência (emissão) e espectros de excitação.

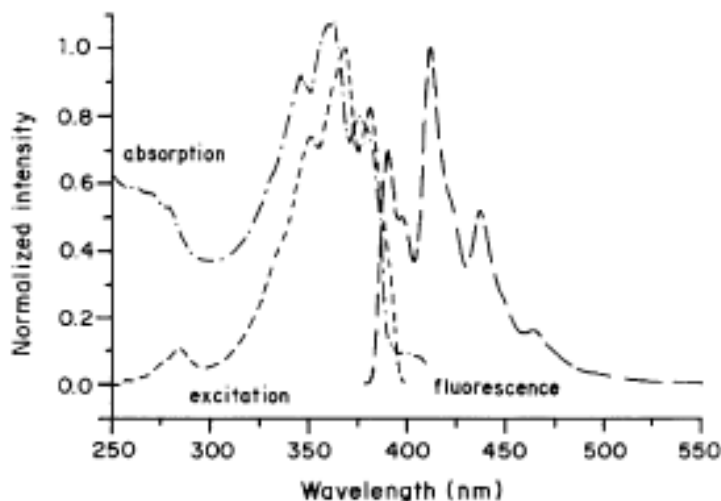


Figura 9. Espectro de absorção, excitação e fluorescência do DTTz. . Comprimento de onda de excitação = 350 nm, comprimento de onda de emissão = 410 nm. Fonte: PINTO, 2001.

Na obtenção do espectro de fluorescência ou de emissão a amostra deve ser irradiada com um comprimento de onda fixo e a intensidade de luz reemitida é medida em uma faixa espectral definida. A escolha do comprimento de onda de excitação ideal para o registro do espectro de emissão é feita, via de regra, com base no espectro de absorção e, comumente, corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção. Após a definição do comprimento de onda, este permanecerá fixo e passa-se a se registrar as intensidades de emissão nos diversos comprimentos de onda da banda de emissão. Já o espectro de excitação é obtido, mantendo-se fixo o comprimento de onda de emissão e fazendo-se variar o comprimento de onda de excitação, sobre toda a faixa do seu espectro de absorção. Então, para registrar o espectro de excitação, seleciona-se o comprimento de onda de emissão correspondente ao máximo desta banda e variando-se os comprimentos de onda de excitação na região espectral que corresponde à absorção da amostra (ATVARS & MARTELLI, 2002). Para ilustrar o registro dos diversos espectros, a Figura 9 mostra o espectro de fluorescência, absorção e de excitação do 2,5-difeniltiazolo[5,4-d]tiazol (PINTO, 2001).

1.3. COMPOSTOS FENÓLICOS

Dentre os metabólitos secundários isolados de produtos naturais os compostos fenólicos se apresentam como um grupo de destaque, amplamente distribuído na natureza, frequentemente isolado de espécies de diferentes famílias de plantas. Grupo diversificado de metabólitos secundários, constituído por substâncias derivadas da fenilalanina e tirosina e que são referidas como essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, sendo sintetizadas durante o desenvolvimento normal da planta. Os compostos fenólicos participam de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma nas mais diversas espécies vegetais e também desempenham a função de proteção, uma vez que também são compostos produzidos, via de regra, em resposta a condições de estresse como infecções, lesões, radiações UV, condições ambientais adversas, baixas temperaturas, ataque de microorganismos, dentre outras (NACZK & SHAHIDI, 2004; PELEG *et al.*, 1998). Estudos demonstraram que os tecidos mais jovens são mais resistentes ao ataque de patógenos que os maduros, em função da concentração de compostos fenólicos nos mesmos, o que leva a classificar estas substâncias também como agentes antipatogênicos (CHITARRA & CHITARRA, 2005).

Muito se tem pesquisado sobre a presença de compostos fenólicos em plantas, em face das propriedades farmacológicas que apresentam. Vários estudos demonstram que estes compostos podem reduzir o risco de muitas doenças (TAPIERO *et al.*, 2002). Embora não sejam considerados essenciais para a saúde humana e careçam de uma função nutricional no sentido clássico, podem exercer impacto bastante significativo no curso de algumas enfermidades. Na atualidade, as investigações destas substâncias fitoquímicas, consideradas alimentos funcionais, estão centradas nos possíveis efeitos benéficos para a saúde humana por serem capazes de capturar radicais livres e aumentar a atividade antioxidante, inibindo, entre outros efeitos biológicos e farmacológicos, os processos oxidativos (ISHIGE, 2001; ROSS & KASUM, 2002; MOYER, 2002).

Os processos oxidativos estão relacionados com doenças degenerativas crônicas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose,

complicações da *Diabetes mellitus*, o envelhecimento precoce, dentre outras. Substâncias como os compostos fenólicos que apresentam a capacidade de inibir ou atrasar estes processos (atividade antioxidante) passam a ter uma importância muito grande e são objeto de inúmeras investigações científicas (SORG, 2004).

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos, ligados a um ou mais substituintes hidroxílicos, podendo apresentar outros grupos funcionais. Esses fitoquímicos englobam desde moléculas simples, como ácido gálico, epicatequina, procianidinas, até moléculas com alto grau de polimerização, como taninos e ligninas. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas (SOARES, 2002).

Dentre os critérios que podem ser utilizados para classificar o grupo das substâncias fenólicas, pode ser destacado o adotado por Ribéreau-Gayon (1968) baseado na distribuição destes compostos no reino vegetal, a saber, fenólicos pouco distribuídos na natureza, fenólicos sob forma de polímeros e os fenólicos largamente distribuídos na natureza.

Um reduzido número de compostos fenólicos compõe o grupo dos “fenólicos pouco distribuídos na natureza”. Fenóis simples, pirocatecol, resorcinol, hidroquinona e aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, como a vanilina (Figura 10), são os mais comuns. A vanilina ou 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído é tradicionalmente conhecida como aroma de baunilha. É um composto cristalino de cor branca, solúvel em clorofórmio e éter, com peso molecular de 152,14 g.mol⁻¹ e fórmula química (CH₃O)(OH)C₆H₃CHO.

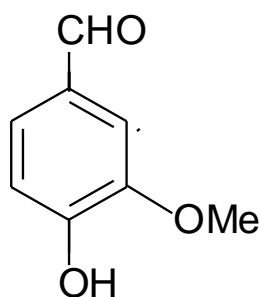


Figura 10. Vanilina

Vanilla planifolia (Figura 11), uma orquídea tropical, é a fonte natural de onde se extrai a vanilina, o que torna esta orquídea a única de interesse comercial fora do contexto ornamental. Além de possuir propriedades antimicrobianas e antioxidantes, a vanilina é um importante aromatizante, largamente empregado em alimentos, bebidas, perfumes e fármacos (CLARK, 1990).



Figura 11. Foto da orquídea *Vanilla planifolia*.

Fonte: Orto Botanico di Napoli. Disponível em:

http://www.ortobotanico.unina.it/VerInglese/p_aree_espositiveE/SerrePianteUtiliE.htm

Acesso em 12/04/2011.

Taninos e ligninas são os compostos que não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais, mas sim sob a forma de polímeros. Na família dos “fenólicos largamente distribuídos na natureza” agrupam-se os compostos desta classe encontrados geralmente em todo o reino vegetal e que estão divididos em dois grandes grupos, que são os flavonoides e derivados e os ácidos fenólicos e seus derivados.

1.3.1. Flavonoides

Compostos largamente distribuídos no reino vegetal, os flavonoides encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6–C3–C6 (ANGELO & JORGE, 2007).

Pertencente ao grupo dos fenilpropanoides, mais de 4000 tipos desta classe de metabólitos secundários foram isolados de diversas plantas. Estruturalmente, os flavonoides se apresentam formados por um núcleo que consiste de dois anéis fenólicos A e B e um anel C (Figura 12). O anel C pode ser um pirano heterocíclico, como se observa nos flavanóis e antocianinas, ou pirona, como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, que possuem um grupo carbonila na posição C-4 do anel C, compreendendo as principais classes dos flavonóides (Figura 12).

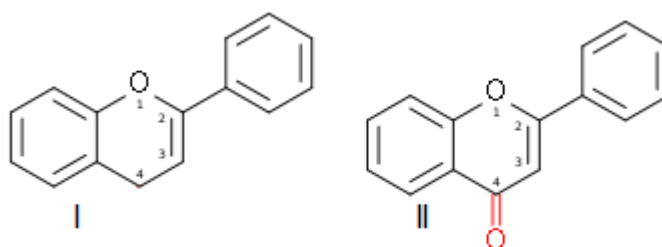


Figura 12. Estrutura básica dos flavonoides (I) e Estrutura básica dos flavonoides com grupo carbonila no C-4 (II).

Na fisiologia vegetal, estas substâncias desempenham diferentes e importantes papéis, uma vez que são responsáveis pela coloração das flores e frutos; estimulam o crescimento das plantas mediante sinergismo com hormônios vegetais; apresentam propriedades antifúngicas e antibióticas conferindo resistência às enfermidades e por absorverem radiações UV, atuam como mecanismo de defesa frente a essas radiações (ANGELO & JORGE, 2007).

Na terapêutica humana as substâncias pertencentes a esta classe despertam muito interesse, em face de mostrarem uma grande variedade de propriedades. Diversas pesquisas utilizando variados modelos biológicos demonstraram que os flavonoides podem atuar em diferentes sistemas no organismo e apresentam atividade anti-inflamatória, antialérgica, anti-hipertensiva, diurética e antineoplásica (MACHADO, 2008), além de diminuir o risco de doenças cardíacas por inibição da oxidação da LDL, lipoproteína de baixo peso molecular, inibição da agregação plaquetária e pelo efeito vasodilatador (LEMONS *et al.*, 1999; PIGNTELLI *et al.*, 2000). A maioria dos efeitos farmacológicos atribuídos aos flavonoides pode estar relacionados à

sua propriedade antioxidante e às propriedades inibitórias que apresentam em vários sistemas enzimático nos quais foram testados (HEIM, 2002).

Dentre os flavonoides amplamente distribuídos na natureza, a quercetina, 3,5,7,3',4'-pentahidroxiavona ou 5,7,3',4' tetrahidroxiavonol (Figura 13) ocupa lugar de destaque, sendo objeto de numerosas investigações científicas, que demonstram sua potente atividade antioxidante, antiviral, antitumoral, gastroprotetora, dentre outras (BEHLING *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2002; KANEUCHI *et al.*, 2003; KESSLER *et al.*, 2003; KAHRAMAN *et al.*, 2003).

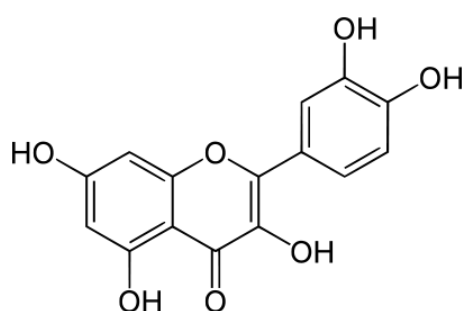


Figura 13. Quercetina

1.3.2. Ácidos Fenólicos

Metabólitos secundários aromáticos amplamente distribuídos por todo o reino vegetal, os "ácidos fenólicos" constituem uma classe de compostos que, além de possuírem a hidroxila ligada ao anel aromático, apresentam grupo funcional carboxila, entretanto, quando se refere especificamente a metabólitos isolados de plantas, restringe-se a um grupo distinto de ácidos orgânicos. Estes ácidos fenólicos de ocorrência natural pertencem a duas estruturas diferenciadas: os hidroxibenzoicos e os hidroxicinâmicos.

Os ácidos hidroxibenzoicos mais comuns incluem os ácidos gálico e o ácido salicílico (Figura 14).



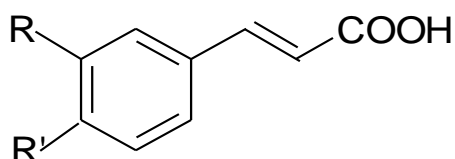
Figura 14. Ácidos fenólicos comuns. Ácido gálico (I). Ácido salicílico (II).

Presente em numerosas plantas medicinais o ácido gálico (3,4,5-trihidroxibenzóico) é associado a diversas bioatividades. Estudos atribuem a este composto atividades anticancerígena, anti-inflamatória, antimutagênica, e antioxidante (AGARWAL *et al.*, 2006; ABDELWAHED *et al.*, 2007; BORDE *et al.*, 2011; INOUE *et al.*, 1995; KROES *et al.* 1992). Também é relatado como possuindo atividade anti-diabética por seu efeito anti-hiperglicemiante e, ainda, atividade inibidora do processo de peroxidação lipídica, minimizando a ocorrência de prejuízos teciduais oxidativos, que podem causar alterações associadas ao envelhecimento e diversas doenças degenerativas como artrite e aterosclerose (PUNITHAVATHI, 2011).

O ácido salicílico (2-hidroxibenzóico) é um composto aromático de referência do tipo β -hidroxiácido (HAB), amplamente distribuído no reino vegetal. Presente nas plantas, tanto nas folhas quanto nas estruturas reprodutivas, é considerado por alguns autores um hormônio vegetal, pois desempenha papel importante nos fenômenos fisiológicos, retardando a senescência ou envelhecimento das flores, induzindo o crescimento das raízes e a floração em algumas espécies, bem como atuando na defesa das plantas contra fungos, bactérias e vírus (GUTIERREZ-CORONADO *et al.*, 1998; HAYAT & AHMAD, 2007; KIRIACHEK *et al.*, 2009; VILLANUEVA-COUOH *et al.*, 2009).

Os ácidos hidroxicinâmicos se constituem no maior grupo dos ácidos fenólicos, encontrados em quase todas as plantas, sendo que os mais comuns são o ácido cafeico (3,4-di-hidroxicinâmico), ácido ferúlico (2-metox, 3-hidroxicinâmico), ácido cumárico (4-hidroxicinâmico ou p-hidroxicinâmico) e o 3-hidroxicinâmico (m-hidroxicinâmico) (Figura 15). São fenilpropanoides cujos

estudos científicos demonstram que possuem atividades antioxidantes (KARAMAĆ *et al.*, 2005), anti-inflamatórias, inibidoras do crescimento de células cancerosas (FIUZA *et al.*, 2004), bem como inibidoras do processo de metastização (angiogênese), ou seja, do surgimento de novos tumores em outros órgãos a partir do tumor original (CHEN *et al.*, 1996; CHUNG *et al.*, 2004; FIUZA *et al.*, 2004; FRESCO *et al.*, 2006; KAMP *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2000; RAO, 1995; SOUSA *et al.*, 2010).



Ácido	R	R'
Cafeico	OH	OH
Ferúlico	OH	OCH ₃
Cumárico	H	OH
m-Cumárico	OH	H

Figura 15. Ácidos hidroxicinâmicos

Recentes pesquisas têm destacado as múltiplas funções dos compostos fenólicos para o organismo, particularmente dos flavonoides e dos ácidos fenólicos, e vários são os mecanismos de atuação destas substâncias, que não se relacionam apenas a sua atividade antioxidante, mas também a habilidade de se ligarem a proteínas, incluindo a receptores celulares e transportadores de membrana e serem capazes de influenciar a expressão gênica, sinalização e adesão celular, podendo desta forma exercer outras funções de extrema importância no organismo humano (KROOW & WILLIAMSON, 2005; MNEN *et al.*, 2005; MANNACH *et al.*, 2005).

1.4. ÉSTERES DO ÁCIDO CAFEICO E FERÚLICO E A INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Como já referido, os compostos fenólicos estão associados a numerosos efeitos farmacológicos que podem ser decorrentes da atuação por mecanismos distintos, quais sejam, a quelação de metais e a atividade antioxidante associada à capacidade inibitória apresentada sobre determinadas enzimas (CHANG *et al.*, 2010; MELZIG *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2005; RAGHAVENDRA *et al.*, 2007; SEGUENI *et al.*, 2011).

Dentre o grupo de enzimas que recentemente norteiam variadas pesquisas, destacam-se as proteases ou enzimas proteolíticas por estarem envolvidas em diversas atividades fisiológicas fundamentais. São enzimas essenciais para o bom funcionamento do metabolismo celular, para a degradação do colágeno e a clivagem de proteínas precursoras. São produzidas por lisossomos das células nucleadas do organismo e estão presentes nos diferentes fluidos biológicos, tais como soro, líquido seminal, líquido cefalorraquidiano, dentre outros (ANAZETTI & MELO, 2007; TURK, 2006). Estudos têm demonstrado que alterações na atividade destas enzimas podem desencadear o surgimento de diversas patologias importantes, dentre elas podem ser destacadas infecções virais, derrame cerebral ou acidente vascular cerebral, doenças degenerativas como mal de Alzheimer, artrite reumatóide, câncer e diabetes (POWERS *et al.*, 2002; SHELTON *et al.*, 2004; REED, 2003).

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas entre as proteínas (BERG *et al.*, 2004) e, de acordo com o grupo funcional presente no sítio ativo, podem ser classificadas em aspartil proteases, serino proteases, cisteíno proteases e metalo proteases (RAO *et al.*, 1998). As serino proteases, metalo proteases e cisteíno proteases são enzimas bastante estudadas, uma vez que os estados de inflamação, doenças neurológicas, invasão tumoral e formação de metástases são alguns, entre uma série de processos patológicos, que estas se encontram envolvidas (FAYARD *et al.*, 2009; REINHECKEL *et al.*, 2008). Vários estudos demonstram que a produção

aumentada de metalo proteases (HU *et al.*, 2006), cisteíno proteases (REINHECKEL *et al.*, 2008) e serino proteases (FAYARD *et al.*, 2009), dentre outras enzimas, são responsáveis por processos de proteólise que contribuem para a invasão do tumor maligno, a metástase e a angiogênese (MCCAWLEY e MATRISIAN, 2000; DUFFY *et al.*, 2008). Tripsina e a quimiotripsina são as serino proteases mais estudadas; a papaína destaca-se entre as cisteíno proteases; a colagenase ou MMP1 é uma metalo protease.

Estudos têm demonstrado que os ácidos fenólicos são compostos que, além de exibirem atividade antioxidante, o que explica, pelo menos em parte, a participação destas substâncias no processo de defesa contra danos oxidativos (JAIKANG *et al.*, 2011; NIWA, 2001; SAIJA *et al.*, 1999; SHAHIDI & CHANDRASEKARA, 2010; WANG *et al.*, 2007; ZHAO & MOGHADASIAN, 2008), estão associados também a atividade quimiopreventiva, anti-inflamatória e antifúngica, que parece está relacionada tanto com a sua atividade antioxidante, como a sua capacidade de inibir sistemas enzimáticos envolvendo lipoxigenases, acetiltransferases, elastases, colagenases (CHANG *et al.*, 2010; COMBET *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; LO & CHANG, 1999; LÖSER *et al.*, 2000; MA *et al.*, 2010; MAHMOUD *et al.*, 2000; MELZIG *et al.*, 2005; MIRZOEVA *et al.*, 1996; RAGHAVENDRA *et al.*, 2007; SEGUENI *et al.*, 2011; STANIFORTH *et al.*, 20011; SRINIVASAN *et al.*, 2007).

Sabe-se que as enzimas proteolíticas são fatores importantes nas mais variadas atividades fisiológicas e que graves são as consequências decorrentes de alterações no funcionamento regular das mesmas. Assim sendo, seus inibidores surgem como potentes candidatos no tratamento de doenças relacionadas com a disfunção dos sistemas nos quais estas enzimas participam. O emprego de inibidores de proteases já é uma realidade para o tratamento da AIDS e de outras doenças como enfisema pulmonar, hipertensão arterial, alguns tipos de cânceres e trombose (KAUR *et al.*, 2007; KENNEDY, 1998; NADAL *et al.*, 2005; RIBEIRO & FLORÊNCIO, 2000; SILVA-LOPEZ, 2010).

Considerando os estudos desenvolvidos, cujos resultados apontam os ácidos fenólicos como substâncias que podem ter uma participação importante

no bloqueio da atividade de diversas enzimas, e tendo em vista alguns resultados promissores descritos na literatura, confirmando a atividade bloqueadora destes ácidos frente a ensaios com modelos enzimáticos (LÖSER *et al.*, 2000; MELZIG *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005; TANAKA *et al.*, 1993; ORTIZ-ANDRADE *et al.*, 2007), buscou-se esclarecer se ésteres dos ácidos fenólicos cafeico e ferúlico apresentavam também atividade inibitória sobre proteases e se o tamanho da cadeia do álcool alifático utilizado na síntese influenciaria na atividade.

1.4.1. Processos gerais de esterificação de ácidos carboxílicos

Os ácidos carboxílicos podem reagir com alcoóis originando a formação de ésteres. Esta reação de condensação é genericamente designada de esterificação (Figura 16) (SOLOMONS & FRYHLE, 2001).



Figura 16. Esquema da equação geral da reação de esterificação.

As reações de esterificação são reversíveis e ocorrem muito lentamente. Assim, para que a reação se processe de forma mais rápida, se faz necessário o uso de catalisadores. Ácidos fortes como o ácido sulfúrico e ácido clorídrico, são catalisadores muito utilizados para promover essas reações. A esterificação catalisada por ácido ocorre de acordo com o mecanismo típico de substituição nucleofílica, conforme disposto na Figura 17.

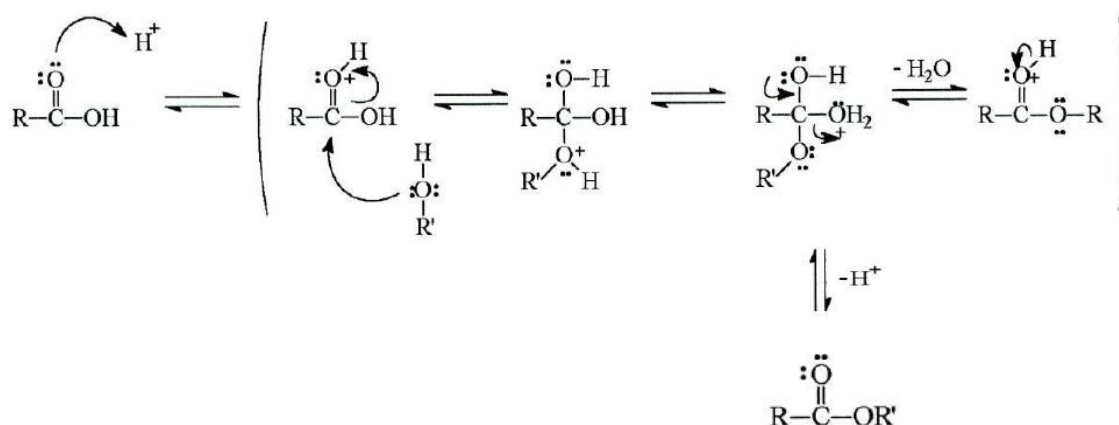


Figura 17. Esquema do mecanismo de reação de esterificação com catálise ácida

1.4.2. Obtenção de ésteres de ácidos *trans*-cinâmicos

O nome sistemático do ácido cinâmico, de acordo com as regras da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) é ácido 3-fenil-2-propenóico (Figura 18). Uma das propriedades características dos ácidos cinâmicos é a possibilidade de existência de isomerismo *cis/trans*. Para compostos com estas características pode ser utilizada a nomenclatura *Z* e *E*, desta forma, o ácido *trans*-cinâmico, representado na Figura 18, também é designado por (*E*)-3-fenil-2-propenóico.

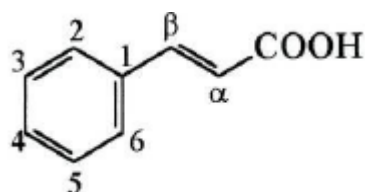


Figura 18. Estrutura do ácido cinâmico

A denominação genérica de ácidos cinâmicos engloba os compostos que possuem a estrutura geral do ácido cinâmico e substituintes em diferentes posições. Os ácidos cafeico e ferúlico (Figura 15) são, respectivamente, os ácidos 3-4-dihidroxicinâmico e o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico.

Os ésteres dos ácidos *trans*-cinâmicos e compostos assemelhados podem ser obtidos por diferentes métodos. Esterificação com catálise ácida, esterificação via cloretos de cinamoíla, esterificação de ácidos cinâmicos na presença de N,N-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e piridina ou 4-pirrolidina, se constituem em alguns dos métodos que podem ser utilizados com este objetivo (KUMAR & KANWAR, 2011; VERMA et al, 2009; VOISIN-CHIRET et al, 2007; ZACHARIE et al, 1995).

Neste trabalho, optou-se por se obter os ésteres mediante reação de esterificação direta de ácidos *trans*-cinâmicos (cafeico e ferúlico) catalisada por um ácido forte, o ácido sulfúrico (Figura 19), uma vez que este método envolve a montagem de equipamentos simples de refluxo com agitação e aquecimento, bem como a utilização de reagentes de fácil aquisição.

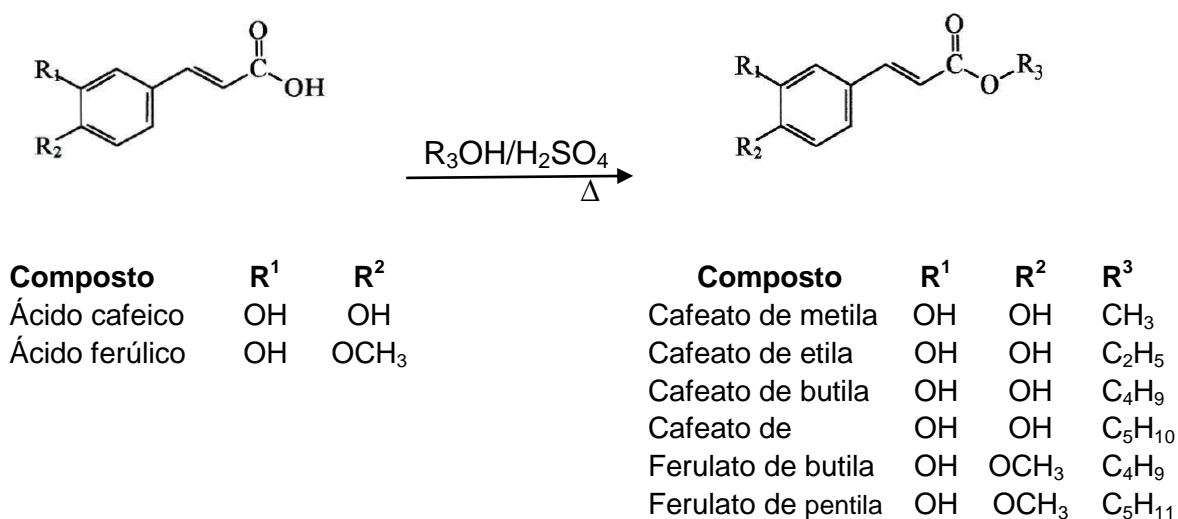


Figura 19. Esquema geral das sínteses efetuadas

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

1. Desenvolver um método rápido, simples, sensível e de baixo custo para confirmar a identidade de substâncias aromáticas isoladas de produtos naturais ou resultantes de síntese.
2. Determinar se os ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico obtidos por síntese apresentam atividade sobre proteases em consonância com os respectivos ácidos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar por espectrofluorimetria soluções de substâncias aromáticas comumente isoladas de produtos naturais.
2. Analisar por espectroscopia de absorção no UV/Vis soluções de substâncias aromáticas comumente isoladas de produtos naturais e as que foram obtidas por síntese para testes de bioatividade.
3. Realizar a PCA com as matrizes de dados obtidos nas duas técnicas espectroscópicas.
4. Realizar a calibração multivariada (PLS) com espectros de fluorescência de soluções de ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico.
5. Sintetizar ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico e elucidar suas estruturas a partir de RMN e CL-EM, bem como pelo método proposto.
6. Interpretar os dados obtidos.

3. JUSTIFICATIVA

No estudo sistemático de produtos naturais ou por ocasião de trabalhos de síntese ou semi-síntese, frequentemente se faz uso intenso de técnicas espectroscópicas, tais como Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT, COSY, TOCSY, HMBC, HMQC etc), Espectroscopia no Infravermelho e UV-Vis, Espectrometria de Massa, entre outras, para identificação estrutural de substâncias desconhecidas.

Na maioria das vezes, entretanto, o pesquisador já identifica previamente a substância através de técnicas simples, como Cromatografia em Camada Delgada Comparativa ou pelo uso de RMN de ^1H , cujo espectro pode ser obtido em 10 minutos. No entanto, para confirmação da estrutura da substância, lança-se mão de técnicas demoradas e custosas.

Justifica-se a necessidade de desenvolver um método rápido e simples para confirmação da identidade de substâncias isoladas, pois, assim sendo, otimiza-se o processo de pesquisa de forma a conseguir resultados com menor custo, maior rapidez e, por conseguinte, com maior eficiência.

O método proposto tem potencial aplicação para uso na confirmação da identidade de uma substância comparando seus espectros, obtidos através de uma ou mais técnicas espectroscópicas, com espectros da substância padrão. Particularmente, quando a técnica escolhida é a espectrofluorimetria, o método reúne as vantagens de rapidez e baixo custo da análise, aliada à sensibilidade e seletividade.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. SUBSTÂNCIAS ANALISADAS

Foram analisadas amostras de substâncias fenólicas adquiridas comercialmente ou obtidas por síntese em nosso laboratório, e identificadas por técnicas espectroscópicas (CL-EM, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT 135).

Tabela 1. Substâncias fenólicas comerciais analisadas

Substância	Procedência	CAS	Fórmula	Peso molecular	Pureza (%)
*Ácido cafeico	Acrós Organics	331-39-5	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	180.16	$\geq 99,0$
Ácido <i>m</i> -cumárico	Sigma Aldrich	588-30-7	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	164.16	$>98,0$
Ácido <i>p</i> -cumárico	Sigma Aldrich	501-98-4	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	164.16	$>98,0$
Ácido trans-ferúlico	Sigma Aldrich	537-98-4	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	194.18	$>99,0$
Ácido gálico	Merck	149-91-7	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	170.12	$\geq 99,0$
Vanilina	MP Biomedicals	121-33-5	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	152.15	$\geq 99,0$
Quercetina	Merck	117-39-5	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	302.24	$\geq 98,0$
Ácido salicílico	Merck	69-72-7	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	138.12	$>99,0$

CAS = Chemical Abstracts Service

* predominantemente isômero *trans*

Tabela 2. Reagentes utilizados na síntese dos ésteres

Substância	Procedência	CAS	Fórmula	Peso molecular	Pureza (%)
*Ácido cafeico	Acrós Organics	331-39-5	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	≥99,0
Ácido <i>trans</i> -ferúlico	Sigma Aldrich	537-98-4	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.18	>99,0
Ácido sulfúrico	Sigma Aldrich	7664-93-9	H ₂ SO ₄	98.08	95-97
Metanol	Sigma Aldrich	67-56-1	CH ₄ O	32.04	99,9
Etanol	Sigma Aldrich	64-17-5	C ₂ H ₆ O	46.07	99,9
1-Butanol	Sigma Aldrich	71-36-3	C ₄ H ₁₀ O	74.12	99,9
1-Pentanol(álcool n-amílico)	Sigma Aldrich	71-41-0	C ₅ H ₁₂ O	88.15	99,9

CAS = Chemical Abstracts Service

Tabela 3. Outros reagentes utilizados

Substância	Procedência	CAS	Fórmula	Peso molecular	Pureza (%)
Acetato de etila	Sigma Aldrich	141-78-6	C ₄ H ₈ O ₂	88.11	99,0
Hidrogenocarbonato de sódio	Sigma Aldrich	144-55-8	NaHCO ₃	84.01	99,9

CAS = Chemical Abstracts Service

Tabela 4. Ésteres *trans*-cinâmicos sintetizados

Substância	Formula molecular	Peso molecular
Cafeato de metila	$C_{10}H_{10}O_4$	194.19
Cafeato de etila	$C_{11}H_{12}O_4$	208.22
Cafeato de butila	$C_{13}H_{16}O_4$	236.27
Cafeato de pentila	$C_{14}H_{18}O_4$	250.31
Ferulato de butila	$C_{14}H_{18}O_4$	250.30
Ferulato de pentila	$C_{15}H_{20}O_4$	264.32

4.2. EQUIPAMENTOS

Espectrofotômetro UV/Vis: Varian modelo Cary 50.

Espectrofluorímetro: Perkin Elmer-LS55.

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear da Varian modelo Gemini 300.

Cromatógrafo Líquido com detector de massa (CL/EM) da Shimadzu modelo LC 2010, utilizando como eluente MeOH/H₂O 9:1 e as interfaces por ionização Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI).

Rotaevaporador: marca Buchi modelos RE 120 e R-300 e Laborota, modelo 4000 – Heidolph.

Agitador magnético com aquecimento da Quimis.

Balança analítica Explorer da marca Ohaus

Aparelho digital da Microquímica modelo APF-301

4.3. METODOLOGIA

O esquema na Figura 20 mostra a metodologia geral adotada envolvendo a análise espectral das substâncias aromáticas, a esterificação dos ácidos cafeico e ferúlico, a análise espectral dos ésteres e os testes de inibição de enzimas proteolíticas.

O conjunto de dados consistiu de padrões de substâncias fenólicas adquiridas de laboratório com certificação (Tabela 1) e de ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico obtidos por síntese (Tabela 4). Os ésteres etílico e butílico do ácido cafeico foram identificados por RMN de ^1H , ^{13}C e CL/EM. Dos cafeatos de metila e pentila foram obtidos os espectros de CL/EM e IV. Dos ésteres butílico e pentílico do ácido ferúlico foram obtidos espectros de RMN de ^1H e IV. Foram determinados, quando possível, os pontos de fusão dos ésteres sintetizados.

As substâncias fenólicas, bem como os ésteres obtidos por síntese, foram analisados em quintuplicata por espectrofotometria UV/Vis e espectrofluorimetria e os espectros submetidos a análise covariante (PCA). Os ácidos cafeico, ferúlico e gálico foram selecionados para a construção de modelos de calibração multivariada por PLS.

Os ésteres obtidos por síntese foram submetidos a ensaios de bioatividade sobre proteases.

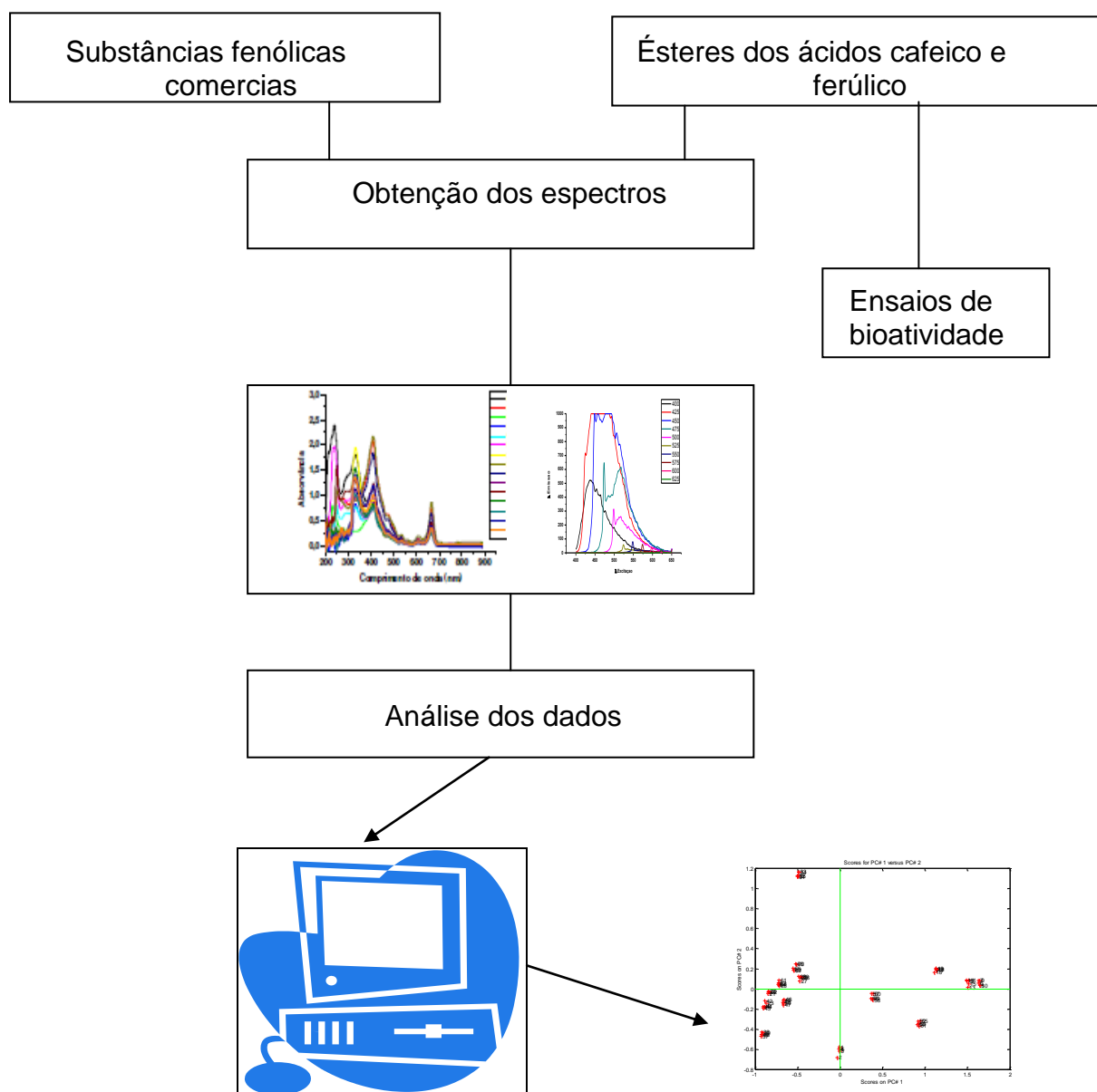


Figura 20. Esquema da metodologia geral utilizada

4.3.1. Preparação das soluções para a PCA

Foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/ml em metanol das substâncias apresentadas na Tabela 1 e das substância apresentadas na Tabela 4, sendo que foram analisadas por espectrofluorimetria as substâncias: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e

quercetina. Por espectroscopia de absorção no UV-Vis foram analisadas além destas substâncias citadas, também o ácido *m*-cumárico e ácido salicílico, bem como os ésteres obtidos por síntese.

4.3.2. Preparação das soluções para o PLS

Para a construção dos modelos PLS foram selecionadas as substâncias: ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico. As substâncias foram analisadas em solução metanólica.

Para as substâncias: ácido cafeico e ácido ferúlico foram preparadas soluções estoques, pesando-se 100mg de cada substância separadamente e dissolvendo-se cada uma em 20 ml de metanol, obtendo-se soluções individuais na concentração de 5mg/ml. A partir de cada solução estoque foram preparadas as soluções a seguir:

Solução A: Pipetar 1ml da solução estoque e completar para 5 ml com metanol. Concentração da solução A = 1 mg/ml.

Solução A1: Pipetar 2ml da solução A e completar para 4 ml com metanol. Concentração da solução A1 = 0,5 mg/ml.

Solução B: Pipetar 2ml da solução estoque e completar para 5 ml com metanol. Concentração da solução B = 2 mg/ml.

Solução C: Pipetar 2,5ml da solução estoque e completar para 5 ml com metanol. Concentração da solução C = 2,5 mg/ml

Solução D: Pipetar 3ml da solução estoque e completar para 5 ml com metanol. Concentração da solução D = 3 mg/ml

Solução D1: Pipetar 2ml da solução D e completar para 4 ml com metanol. Concentração da solução D1 = 1,5 mg/ml

Solução E: Pipetar 3,5ml da solução estoque e completar para 5 ml com metanol. Concentração da solução E = 3,5 mg/ml

Solução F: Pipetar 4ml da solução estoque e completar para 5 ml com metanol. Concentração da solução F = 4 mg/ml

4.3.3. Espectrofluorimetria e PCA

Os espectros de fluorescência das substâncias ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina, foram adquiridos em espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS55 equipado com lâmpada de xenônio de 150 W e cubetas de quartzo com 1 cm de percurso ótico e operando com o *software* PerkinElmer FL Winlab (version 4.0). A excitação foi iniciada em 400 nm com incremento de 25 nm e a emissão foi obtida na faixa de 430-650 nm com incremento de 0,5 nm. As fendas de emissão e de excitação foram de 2,5 nm e a velocidade de *scan* foi de aproximadamente 1200 nm in⁻¹. As medidas de fluorescência foram feitas em 6 replicatas para cada amostra, sendo obtidos 9 espectros de emissão para cada leitura. As matrizes e mapas foram gerados com auxílio do *software* Origin 8.0[®]. No Matlab 6.1[®] foi construída uma matriz 3D com dimensões equivalentes a 36 (número de amostras) x 442 (comprimentos de onda de emissão) x 9 (comprimentos de onda de excitação). Na sequência, a matriz 3D foi transformada em uma matriz 2D com dimensões 36 (número de amostras) x 3978 pelo comando *unfoldm* do Matlab[®] 6.1, centrada na média e submetida à análise covariante.

Após retirada das leituras anômalas ficaram 32 amostras para a PCA sendo 6 de ácido cafeico, 6 de ácido *p*-cumárico, 6 de ácido ferúlico, 6 de ácido gálico, 3 de vanilina e 5 de quercetina.

4.3.4. Espectroscopia UV-VIS e PCA

Os espectros das substâncias ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido salicílico, vanilina e quercetina, bem como dos ésteres obtidos por síntese, foram obtidos em espectrofotômetro modelo Varian modelo Cary 50, à temperatura ambiente. Esse espectrofotômetro opera na faixa de 200-800 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1.0 cm e capacidade de 4 mL.

Os espectros foram salvos como *Comma-separated values (CSV)* e exportados para o *software* OriginPro 8[®]. Na sequência os espectros foram exportados para o Matlab 6.1[®]. Duas análises de componentes principais foram feitas com os espectros no UV-vis das substâncias, sendo uma para os compostos fenólicos comerciais (ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido salicílico, vanilina e quercetina) e outra para os ésteres obtidos por síntese.

Para fazer a PCA com os compostos fenólicos comerciais os dados espectrais foram organizados em uma matriz 2D com dimensões 40 (número de amostras) x 121 (comprimentos de onda de absorção). Para a PCA dos ésteres obtidos por síntese foi formada uma matriz 2D com dimensões 30 (número de amostras) x 121 (comprimentos de onda de absorção). Cada matriz 2D foi centrada na média e submetida à análise covariante.

Na PCA com os compostos fenólicos comerciais após retirada das amostras anômalas ficaram 35 amostras sendo 4 de ácido cafeico, 5 de ácido *p*-cumárico, 5 de ácido *m*-cumárico, 4 de ácido ferúlico, 5 de ácido gálico, 4 de ácido salicílico, 3 de vanilina e 5 de quercetina.

Na PCA para os ésteres obtidos por síntese não houve registro de amostras anômalas.

4.3.5. Construção dos modelos de Calibração Multivariada

Foram desenvolvidos modelos de regressão para as substâncias: ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico. Cada modelo foi desenvolvido usando regressão por PLS através do *software* Unscrambler[®] 10.1. As matrizes espectrais de cada substância foram organizadas em uma matriz geral centrada na média em que as amostras estavam nas linhas. Na sequência por inserção de uma nova coluna para esta matriz geral foram adicionados os valores de concentração da substância. Através do *software* definiu-se a coluna

das concentrações como a variável dependente e os espectros de fluorescência como as variáveis independentes.

4.3.6. Síntese dos ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico

A esterificação dos ácidos *trans*-cinâmicos (cafeico e ferúlico) foi feita mediante catálise ácida de acordo com o método de Pearl e Beyer modificado (Li *et al.*, 2009). Para o desenvolvimento da síntese, foram adicionados em um balão de 50mL de capacidade, 50 mg do ácido *trans*-cinâmico correspondente, 10 mL do álcool devido e 4 gotas de ácido sulfúrico. A mistura solubilizada foi aquecida a uma temperatura de cerca de 43°C e agitação por cerca de 5h, tempo ao final do qual se observou por CCD, não existir produto de partida.

Após o processamento da reação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o sólido resultante dissolvido em 25 mL de acetato de etila, Esta solução orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (4x25mL). Em seguida a este procedimento, a fase orgânica resultante foi novamente submetida à lavagem, desta vez com água (2x25mL) e, em sequência, filtrada em sulfato de magnésio anidro para desidratar. Após evaporação do solvente com auxílio de pressão reduzida, o resíduo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna com gel de sílica eluída com éter de petróleo/acetato de etila (8:1, v/v), para obtenção dos ésteres dos ácidos *trans*-cinâmicos correspondentes.

Como critérios de pureza foram adotados a observação de uma única mancha na cromatografia em camada delgada e o intervalo de fusão da substância.

4.3.7. Ensaios de Bioatividade

Os ensaios de bioatividade foram realizados no Laboratório de Imunologia. A inibição da protease foi avaliada por zimografia (HEUSSEN & DOWDLE, 1980) pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida (7,5%) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), copolimerizado com 0,1% de gelatina para fracionamento da proteína sob condições não redutoras. Os ensaios de proteólise foram realizados em solução e os resultados da digestão foram visualizados em eletroforese SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada em sistema vertical de minigel (Mini Protean III, Bio-Rad) a 120 V, por aproximadamente 90 min. Para a visualização dos resultados foi utilizado o corante Coomassie 0,1% Blue R-250.

Para os ensaios com papaína, 20 μ l de solução 1,0 mg/ml de papaína foram incubados em presença de 1 μ l de soroalbumina bovina (BSA) 10%, em um sistema reacional contendo ditioneitol (DTT) 2mM em tampão citrato-fosfato pH 5.5, por 18h a 37°C. O controle negativo de hidrólise foi feito usando somente BSA. O controle positivo foi realizado com solução de papaína e BSA. O controle positivo de inibição foi realizado com o inibidor de cisteína protease E-64 ou N-(N-(L-3-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil)agmatina (20 μ M). Os ensaios com os ésteres foram realizados sob as mesmas condições, utilizando-se 30 μ l de solução 1mM de cada substância teste.

Os testes com tripsina foram realizados de forma semelhante aos ensaios com papaína. Paratanto, utilizou-se 100 μ l de solução 4,0mg/ml de tripsina, 1,0 μ l de solução 10% de BSA em tampão Tris-HCl pH7.5 por 18h a 37°. O controle negativo de hidrólise foi feito usando somente BSA. O controle positivo de inibição foi realizado com o inibidor de serina protease, PMSF ou Fluoreto de Fenilmetilsulfonill (100mM). Os ensaios com os ésteres foram realizados sob as mesmas condições, utilizando-se 30 μ l de solução 1mM de cada substância teste.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PCA DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

5.1.1. Mapas de fluorescência

A Figura 21 mostra os mapas de contorno de espectrofluorimetria dos compostos fenólicos comerciais analisados: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina.

A substância menos fluorescente é a vanilina e sua banda de fluorescência está centrada em 400 nm de excitação e 450 nm de emissão. Provavelmente fluoresce quando excitada em comprimentos inferiores a 400 nm.

Os ácidos cafeico, ferúlico e cumárico possuem mapas de contornos na mesma região do espectro. O pico máximo de fluorescência provavelmente está situado abaixo de 400 nm de excitação e não foi detectado na análise

O ácido gálico fluoresce quase que completamente na faixa do visível do espectro, com pico máximo de fluorescência em 425 nm de excitação e em 450-500 nm de emissão.

Como esperado, em virtude de possuir 2 anéis aromáticos a quercetina é a substância mais fluorescente e sua banda de fluorescência situa-se totalmente na região visível do espectro. Seu pico de fluorescência situa-se em 450 nm de excitação e em 475-500 nm de emissão.

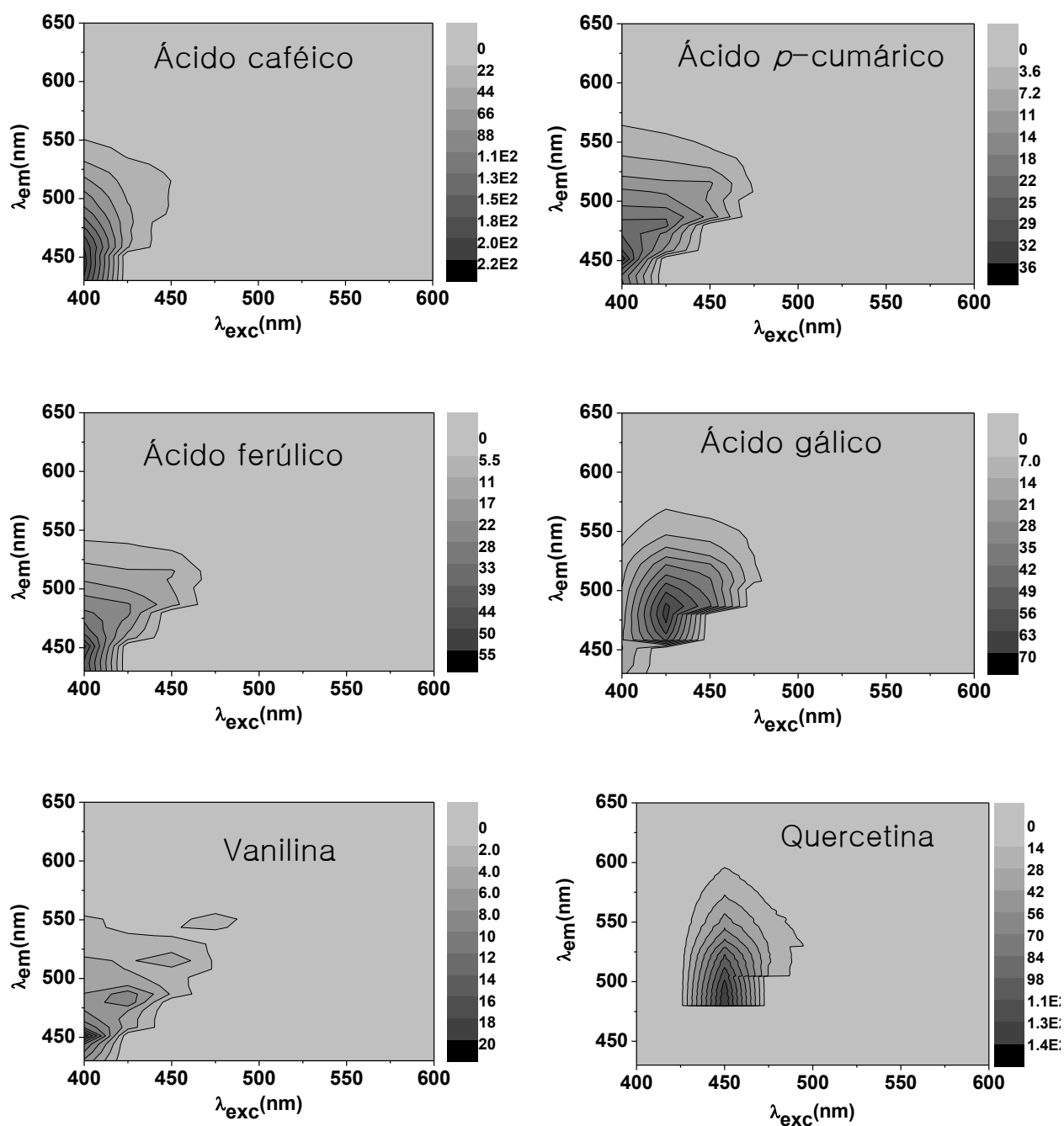


Figura 21. Mapas de fluorescência dos compostos fenólicos analisados

5.1.2. PCA dos espectros das substâncias fenólicas comerciais

Na PCA obtida com os espectros de fluorescência das substâncias ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina verificou-se que com apenas 3 componentes principais foi possível explicar 99,87 % da variância dos dados, sendo 74,42 % para PC1 e 20,48% para PC2 e 4,98% para PC3 (Tabela 5). A Figura 22 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é possível selecionar apenas os três primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

A Figura 23 mostra o gráfico dos escores de PC1xPC2xPC3 para as matrizes dos espectros de fluorescência centradas na média. Analisando a distribuição das amostras no gráfico de PC1xPC2 (Figura 24), pode-se observar que na segunda componente principal as amostras de quercetina apresentam os valores mais negativos separando-se das demais, enquanto que as amostras de ácido cafeico apresentam os valores mais negativos na primeira componente principal, se afastando também das demais. Já em PC1xPC3 (Figura 25) verifica-se que as amostras de ácido gálico apresentam os escores mais negativos em PC3 e se separam das demais. As amostras de ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e vanilina se apresentaram bastante próximas.

Nos gráficos de *loadings* os comprimentos de onda que mais influenciaram foram 400nm de excitação e 448 nm de emissão para PC1 (Figura 26), 450 nm de excitação e 487,5 nm de emissão para PC2 (Figura 27) e 425 nm de excitação e 476 nm de emissão para PC3 (Figura 28). Com base nestes dados para separar ácido cafeico das demais substâncias o melhor comprimento de onda de excitação é o de 400 nm de excitação e 448 nm o melhor comprimento de onda de emissão, pois estes são os comprimentos de onda que mais influenciaram no gráfico de *loadings* para PC1.

Do mesmo modo para separar quercetina das demais substâncias o melhor comprimento de onda de excitação é o de 450 nm e o melhor comprimento de onda de emissão é o de 487,5 nm, pois estes são os

comprimentos de onda que mais influenciaram no gráfico de *loadings* para PC2.

Na PCA obtida apenas com os espectros de fluorescência dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico e da vanilina verificou-se que com apenas 3 componentes principais foi possível explicar 99.94 % da variância dos dados, sendo 91,42 % para PC1, 8,40% para PC2 e 0,12% para PC3 (Tabela 6). A Figura 29 mostra o gráfico dos escores de PC1xPC2xPC3 para as matrizes dos espectros de fluorescência centradas na média. Analisando a distribuição das amostras no gráfico de PC1xPC2 (Figura 30), pode-se observar que na segunda componente principal as amostras de ácido gálico apresentam os valores mais positivos separando-se das demais, enquanto que as amostras de vanilina apresentam os valores mais negativos, se afastando também das demais. Na PC1 as amostras de ácido cafeico também se separam das demais por apresentarem os valores de scores mais negativos na PC1 e próximo a zero na PC2. As amostras dos ácidos cumárico e ferúlico se apresentaram muito próximas no gráfico de PC1XPC2. No entanto, a componente principal PC3 permitiu a diferenciação entre estes ácidos desde quando as suas amostras se afastaram bastante no gráfico de PC1XPC3 (Figura 31) sendo que as amostras de ácido cumárico apresentaram escores mais positivos e as amostras de ácido ferúlico apresentaram escores mais negativos para PC3.

Para os compostos fenólicos simples, os *loadings* que mais influenciaram PC1 foram correspondentes aos comprimentos de onda de 400 nm de excitação e 442 nm de emissão (Figura 32). Para PC2 os comprimentos de onda de excitação que mais influenciaram foram 425 nm e 450 nm. E os comprimentos de onda de emissão que mais influenciaram PC2 foram 476 nm e 486,5 nm (Figura 33). Em PC3, 400 nm de excitação e 508 nm de emissão foram os comprimentos de onda que mais influenciaram (Figura 34).

Com base nestes dados para separar ácido cafeico dos demais compostos fenólicos simples analisados os melhores comprimentos de onda são 400 nm de excitação e 442 nm de emissão. Para separar ácido gálico dos demais compostos fenólicos simples analisados, os melhores comprimentos de onda de excitação são 425 nm e 450 nm e os melhores comprimentos de onda

de emissão são 476 nm e 486,5 nm. Do mesmo modo para separar ácido p-cumárico dos demais compostos fenólicos simples analisados, os melhores comprimentos de onda são 400 nm de excitação e 508 nm de emissão. E para separar ácido ferúlico dos demais compostos fenólicos pode-se usar os comprimentos de onda de 450 nm de excitação e 480 nm de emissão.

Tabela 5. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA

PC	Autovalor	% de variância capturada com este PC	% total de variância capturada
1	6,05e+005	74,42	74,42
2	1,66e+005	20,48	94,89
3	4,04e+004	4,98	99,87
4	6,90e+002	0,08	99,96
5	1,07e+002	0,01	99,97
6	3,36e+001	0,00	99,97
7	2,62e+001	0,00	99,98
8	2,57e+001	0,00	99,98
9	1,66e+001	0,00	99,98
10	1,54e+001	0,00	99,98

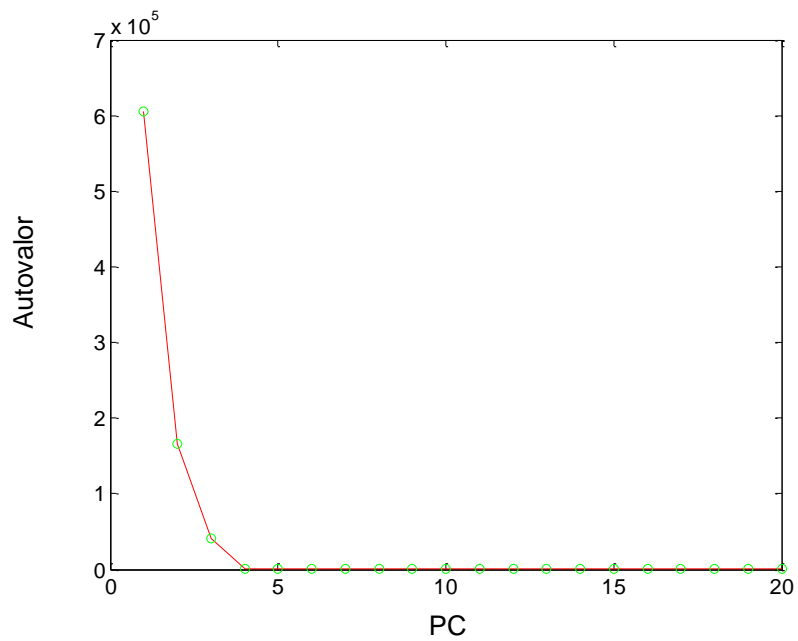


Figura 22. Gráfico de Autovalor x PC

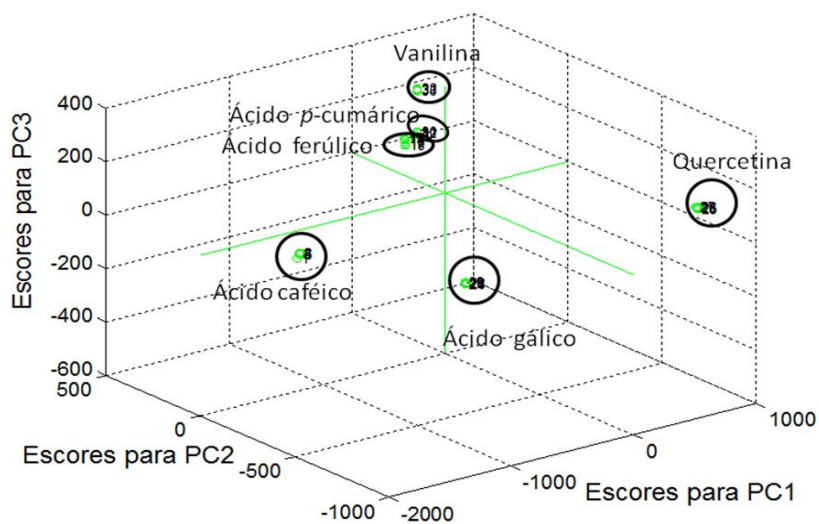


Figura 23. PC1 x PC2 x PC3 dos espectros de fluorescência da quercetina, vanilina e dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e gálico

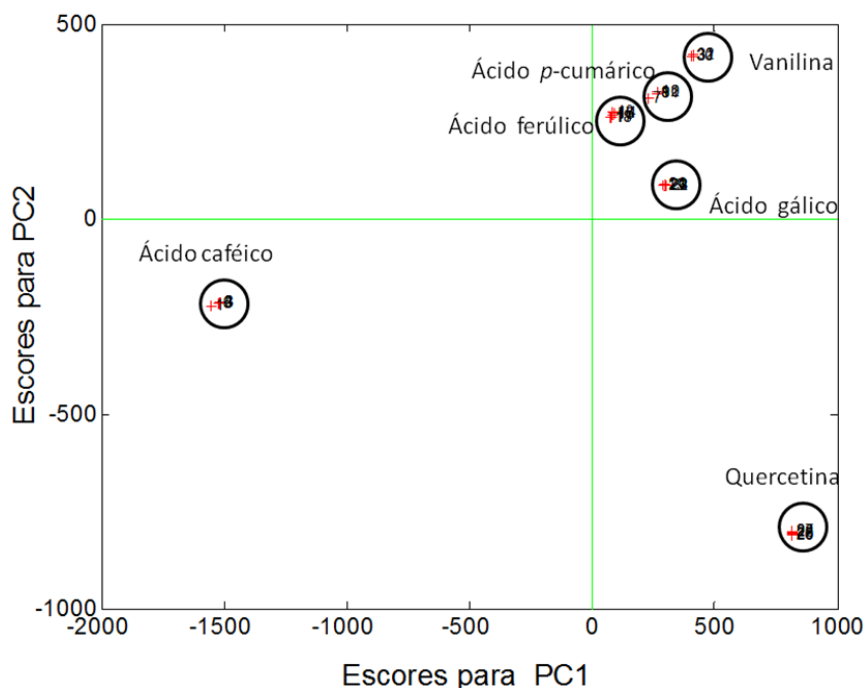


Figura 24. PC1 x PC2 dos espectros de fluorescência da quercetina, vanilina e dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e gálico

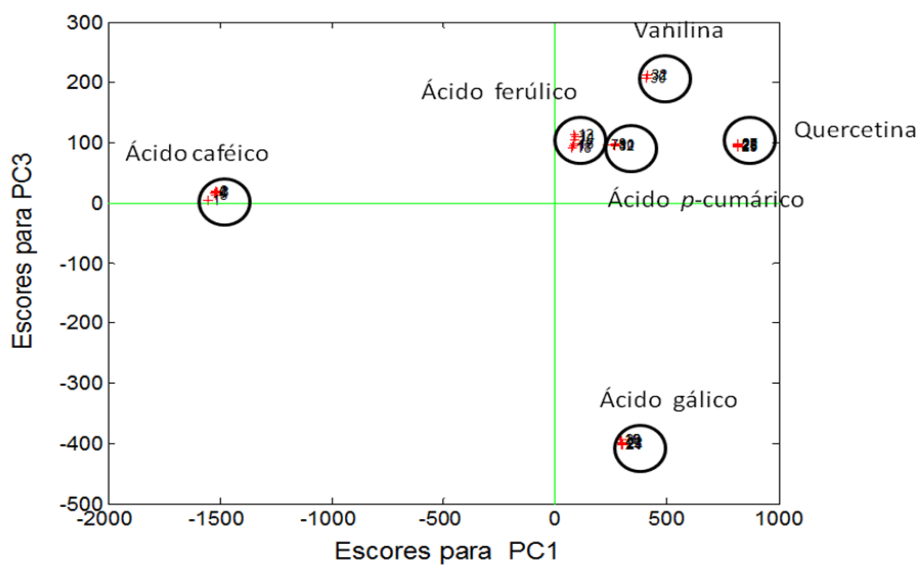
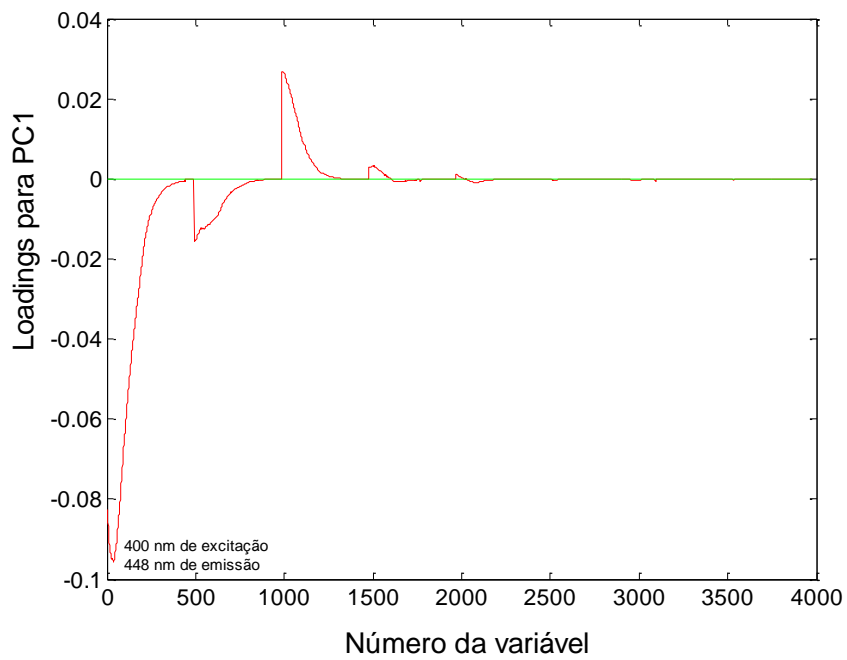
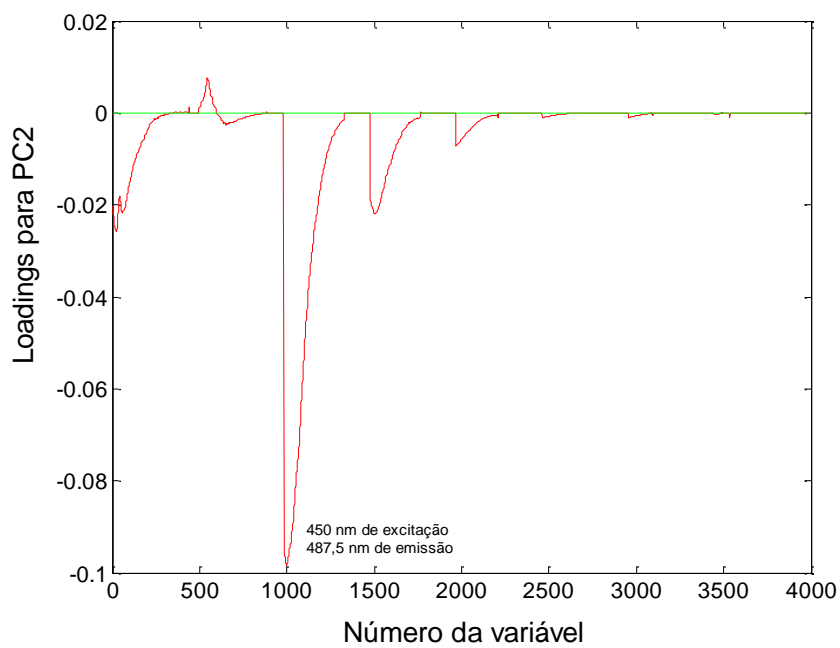


Figura 25. PC1 x PC3 dos espectros de fluorescência da quercetina, vanilina e dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e gálico

Figura 26. *Loadings* para PC1Figura 27. *Loadings* para PC2

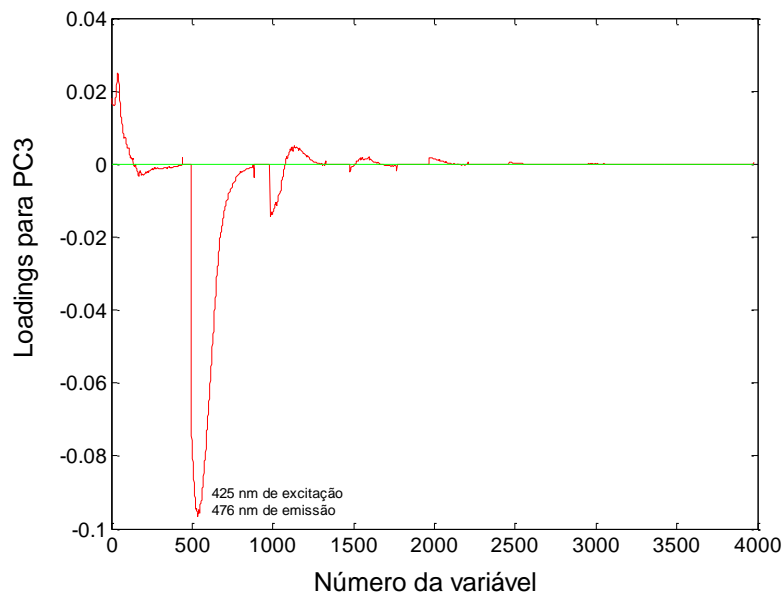


Figura 28. Loadings para PC3

Tabela 6. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA

PC	Autovalor	% de variância capturada com este PC	% total de variância capturada
1	6,10e+005	91,42	91,42
2	5,61e+004	8,40	99,82
3	8,28e+002	0,12	99,94
4	1,28e+002	0,02	99,96
5	4,06e+001	0,01	99,97
6	3,11e+001	0,00	99,97
7	3,07e+001	0,00	99,98
8	1,96e+001	0,00	99,98
9	1,84e+001	0,00	99,98
10	1,61e+001	0,00	99,98

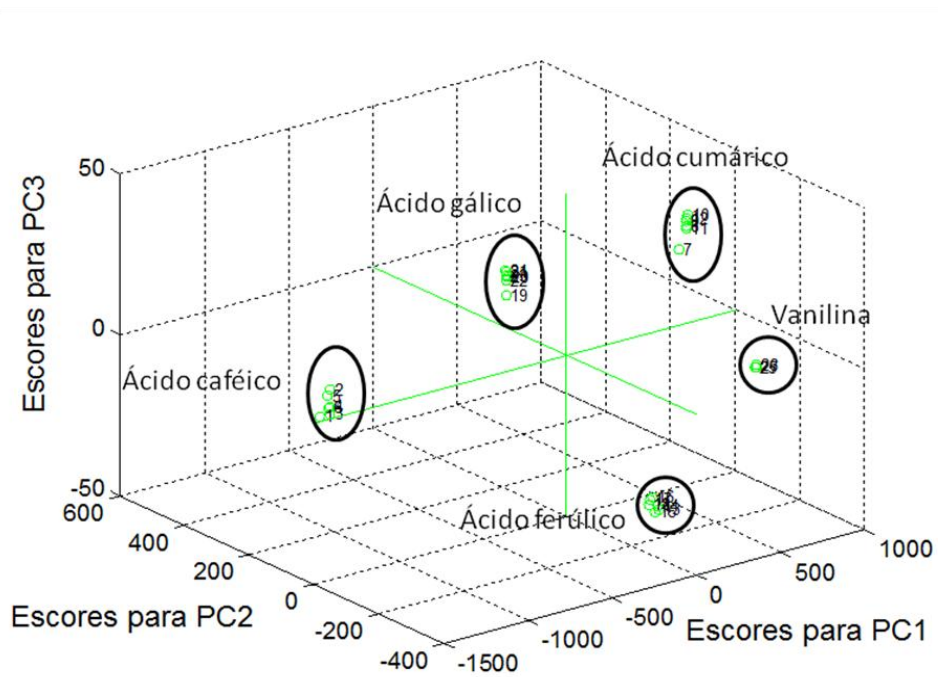


Figura 29. PC1 x PC2 x PC3 dos espectros de fluorescência da vanilina e dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e gálico

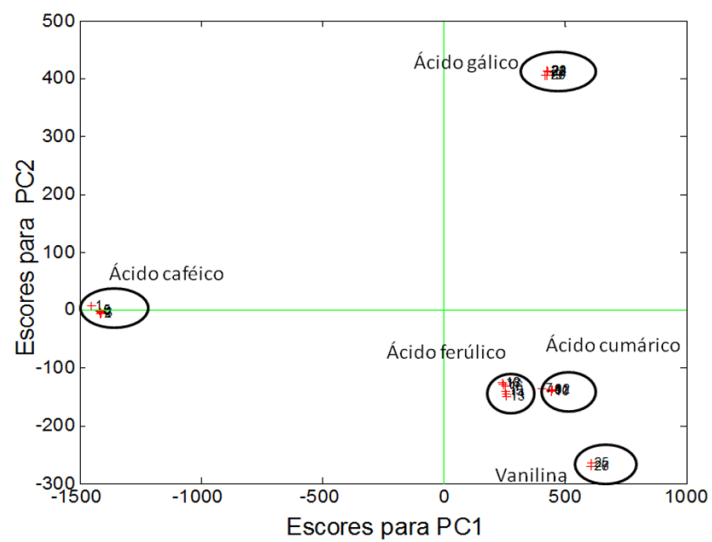


Figura 30. PC1 x PC2 de espectros de fluorescência da vanilina e dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e gálico

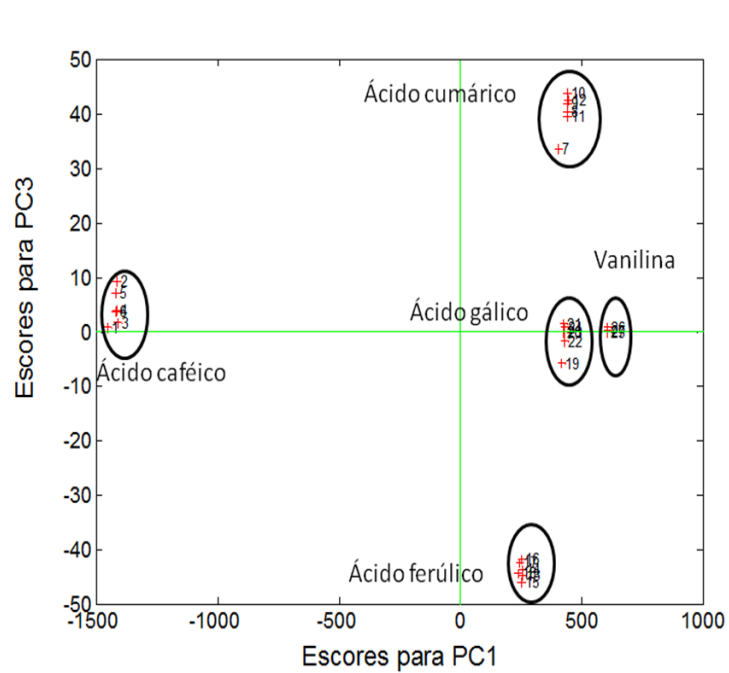


Figura 31. PC1 x PC3 de espectros de fluorescência da vanilina e dos ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e gálico

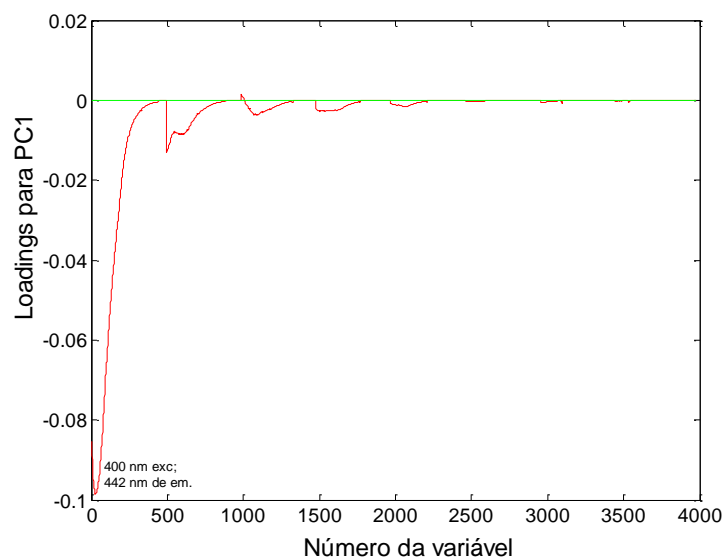


Figura 32. *Loadings* para PC1 x número da variável

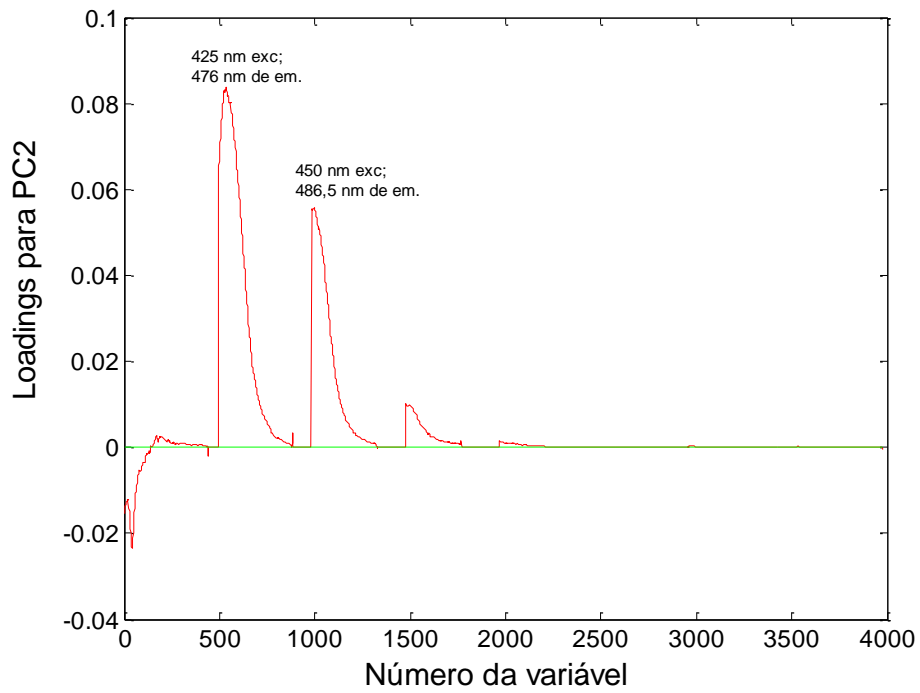


Figura 33. *Loadings* para PC2 x número da variável

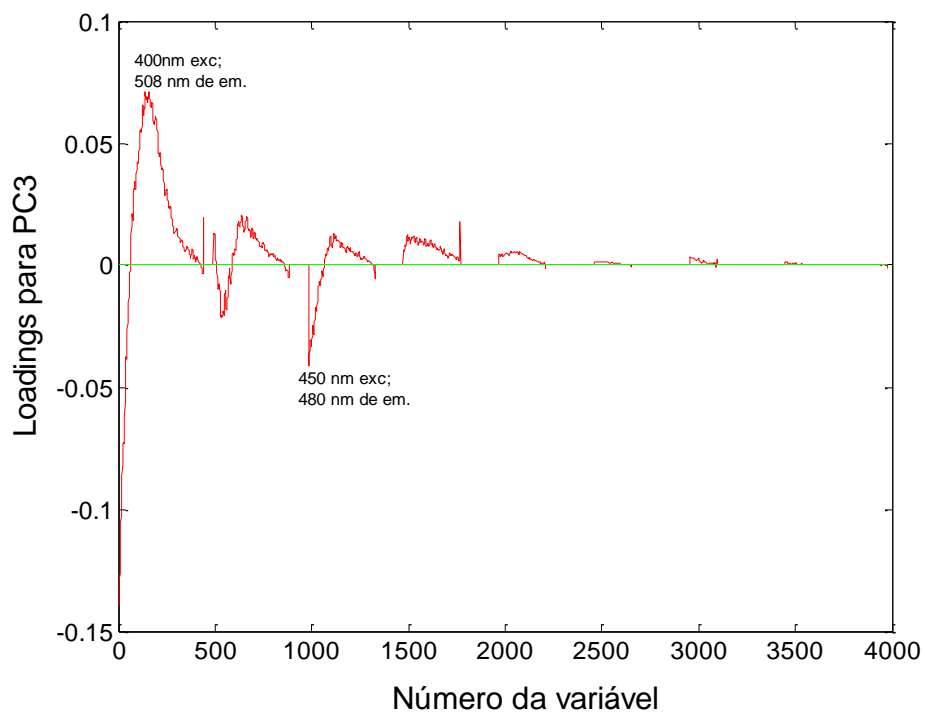


Figura 34. *Loadings* para PC3 x número da variável

5.2. PCA DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VISÍVEL

5.2.1. PCA dos espectros das substâncias fenólicas comerciais

Na PCA obtida com os espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico e salicílico, verificou-se que foram necessários 6 componentes principais para explicar 98,42% da variância dos dados (Tabela 7). A Figura 35 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é necessário selecionar os seis primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

Analisando a distribuição das amostras no gráfico de PC1xPC2 (Figura 36), pode-se observar que na primeira componente principal as amostras de ácido cafeico e de ácido ferúlico apresentam os valores mais negativos separando-se das demais, enquanto que as amostras de ácido gálico apresentam os escores mais positivos em PC2 e as amostras de quercetina apresentam os escores mais negativos e se separam das demais. As demais amostras encontram-se próximas umas das outras nestas duas componentes. As amostras de ácido *p*-cumárico possuem escores mais negativos em PC3 (Figura 37) e se separam das demais substâncias. Através de PC4 (Figura 38) é possível a separação de ácido salicílico, pois esta substância apresenta escores mais negativos nesta componente. A quinta componente (Figura 39) principal separa ácido *m*-cumárico das demais substâncias e através de PC6 (Figura 40) é possível separar vanilina dos outros compostos.

Os gráficos de *loadings* (Figuras 41-46) apresentam os comprimentos de onda que mais influenciam cada componente principal.

Tabela 7. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA

PC	Autovalor	% de variância capturada com este PC	% total de variância capturada
1	3.94e+000	37.60	37.60
2	2.84e+000	27.12	64.72
3	1.90e+000	18.18	82.90
4	1.11e+000	10.59	93.49
5	3.25e-001	3.10	96.60
6	1.91e-001	1.82	98.42
7	7.65e-002	0.73	99.15
8	3.65e-002	0.35	99.50
9	1.49e-002	0.14	99.64
10	1.12e-002	0.11	99.75

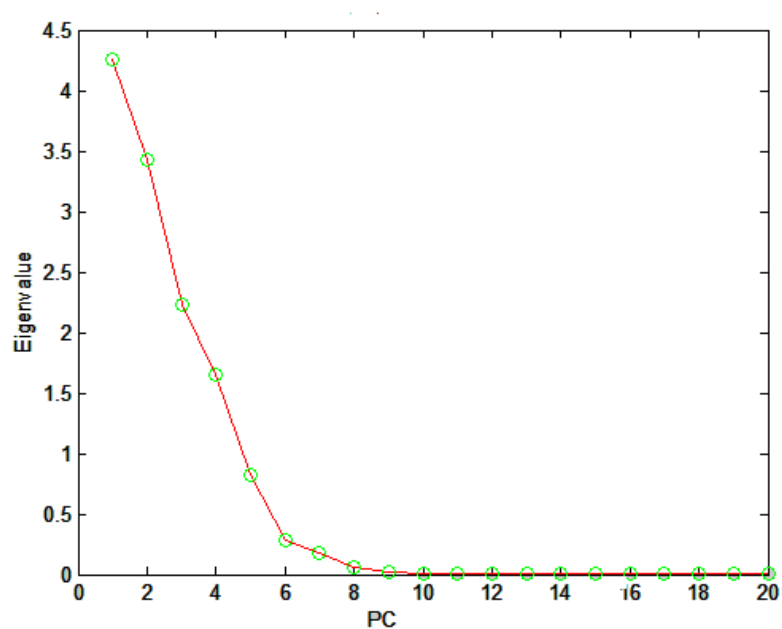


Figura 35. Gráfico de Autovalor x PC

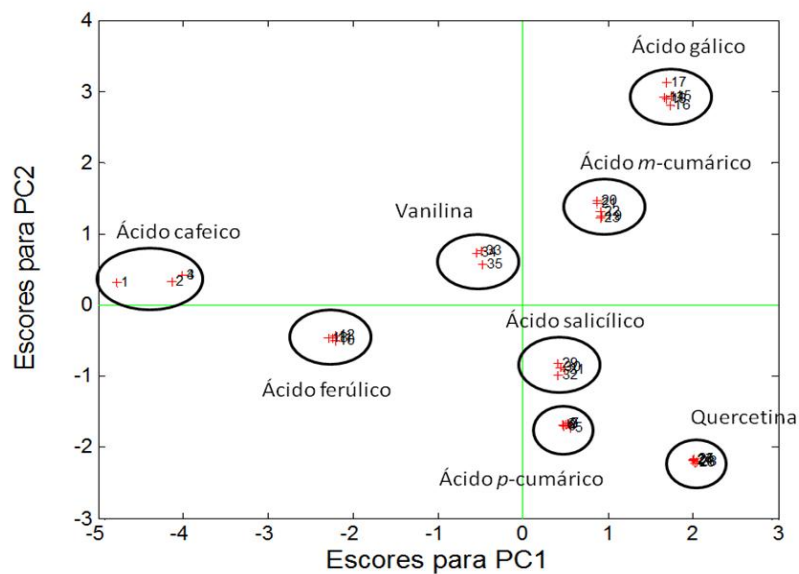


Figura 36. PC1xPC2 dos espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico e salicílico

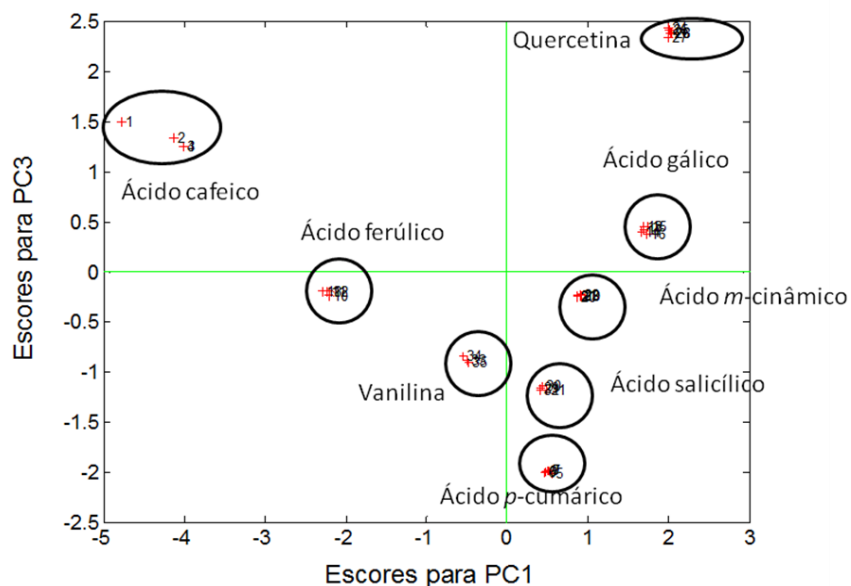


Figura 37. PC1xPC3 dos espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico e salicílico

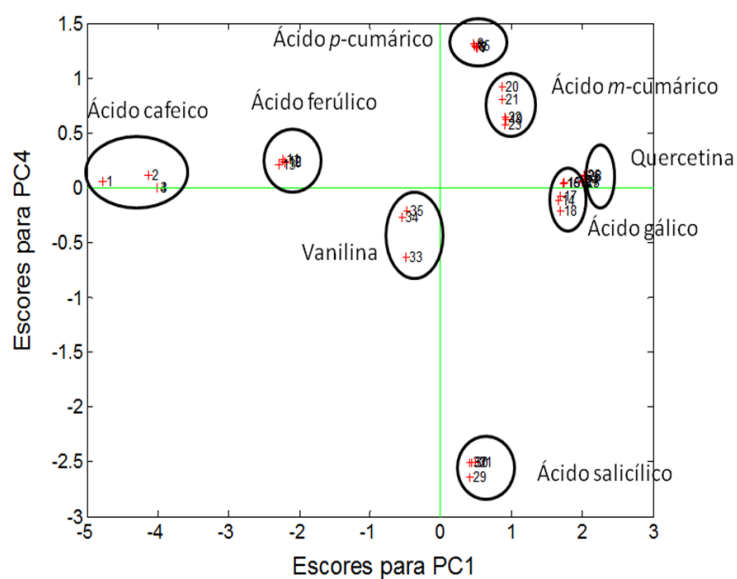


Figura 38. PC1xPC4 dos espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico e salicílico

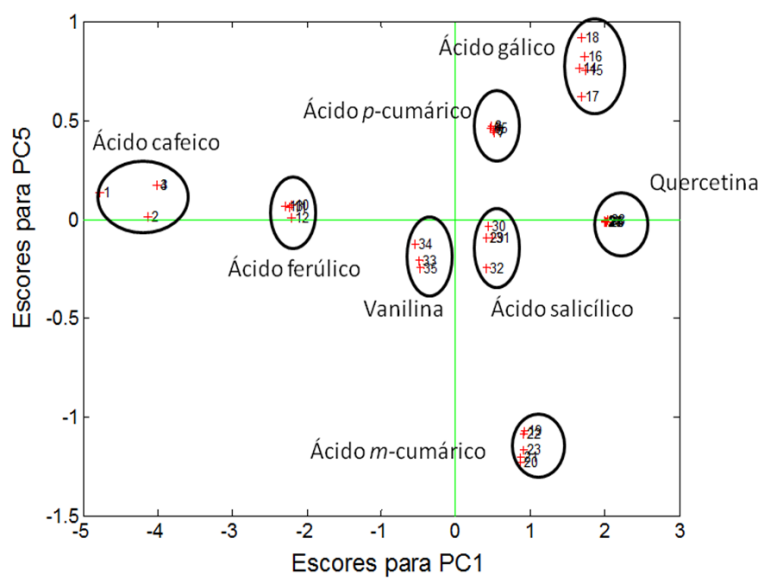


Figura 39. PC1xPC5 dos espectros de absorção no UV/Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico e salicílico

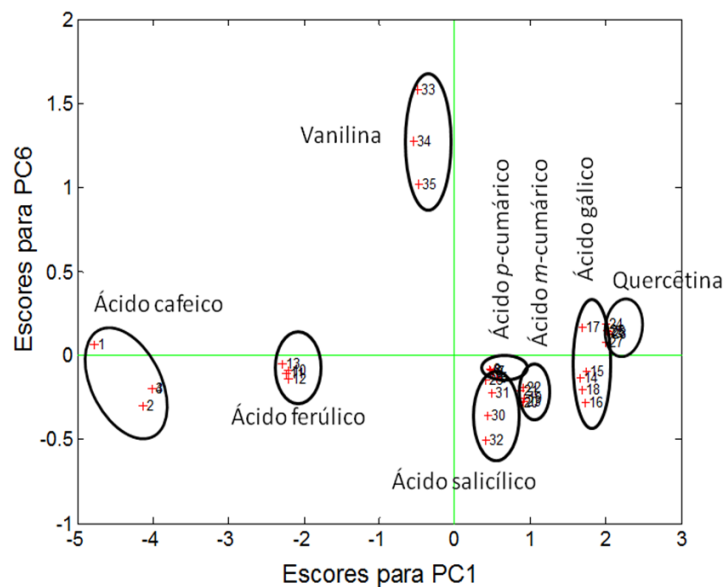


Figura 40. PC1xPC6 dos espectros de absorção no UV-Vis da vanilina, quercetina e dos ácidos cafeico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico e salicílico

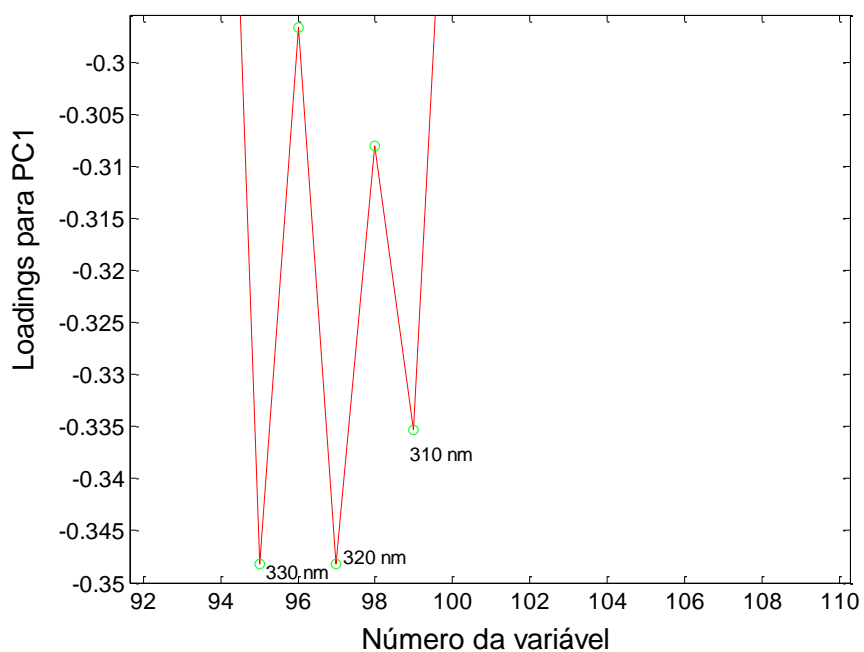


Figura 41. Loadings para PC1

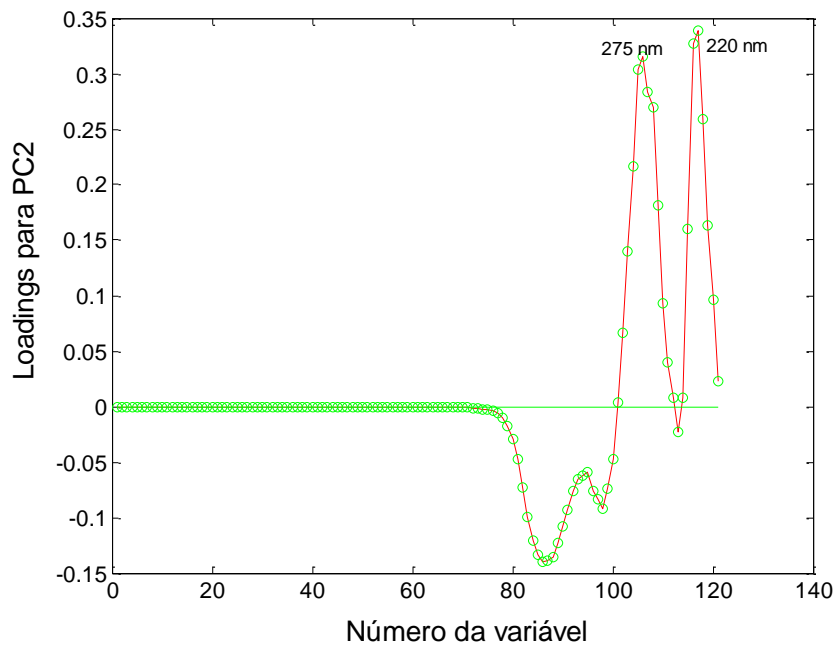


Figura 42. Loadins para PC2

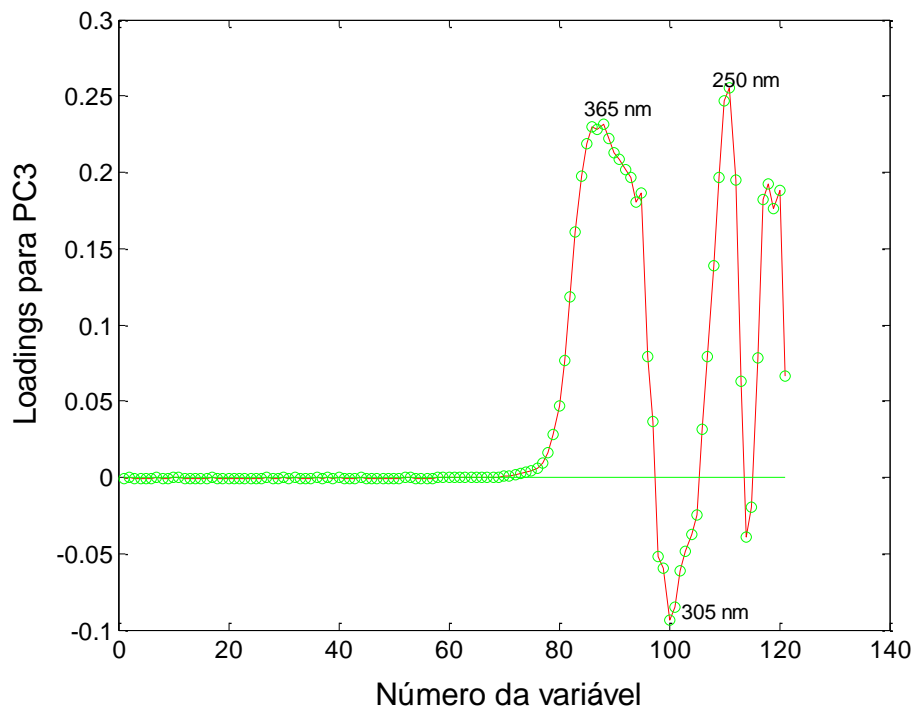


Figura 43. Loadins para PC3

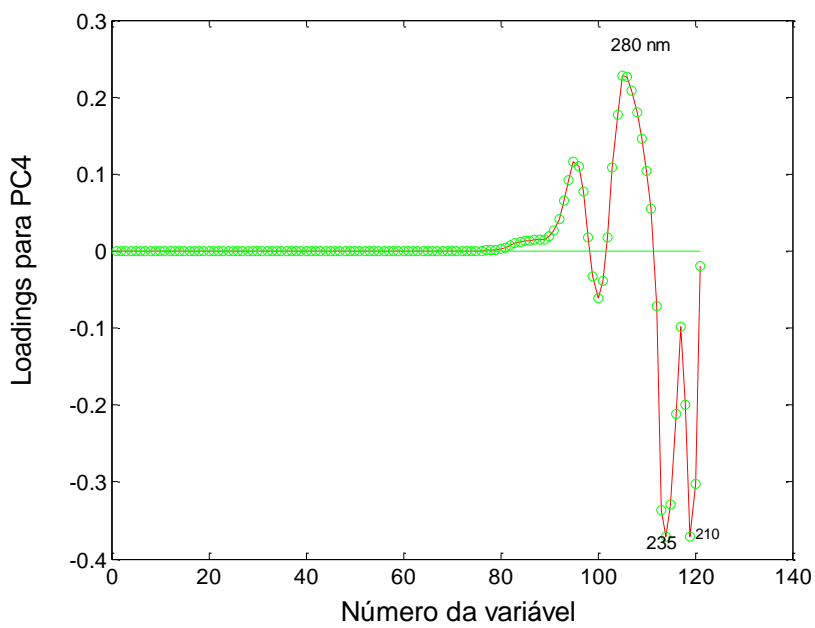


Figura 44. Loadins para PC4

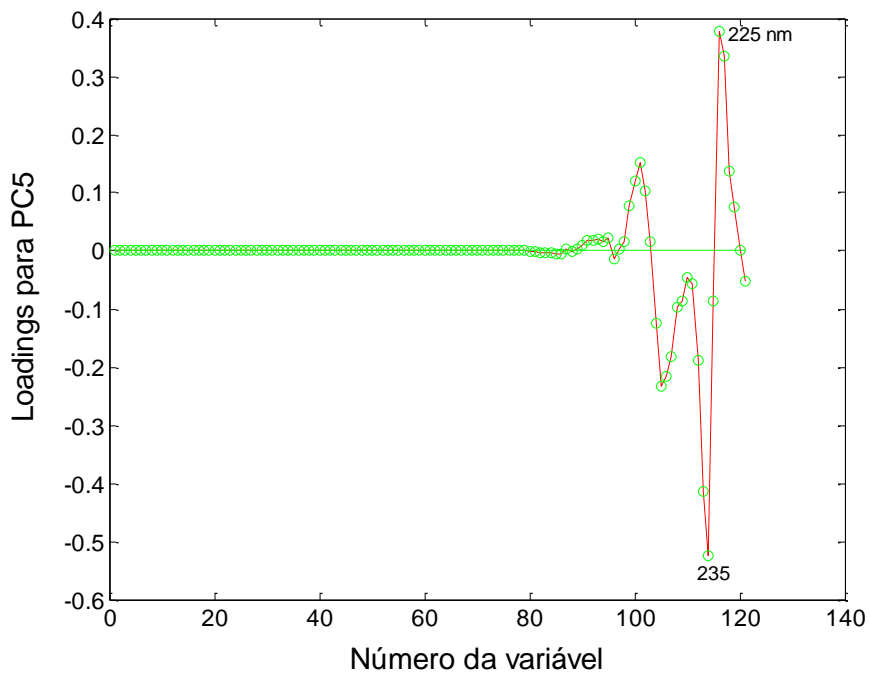


Figura 45. Loadins para PC5

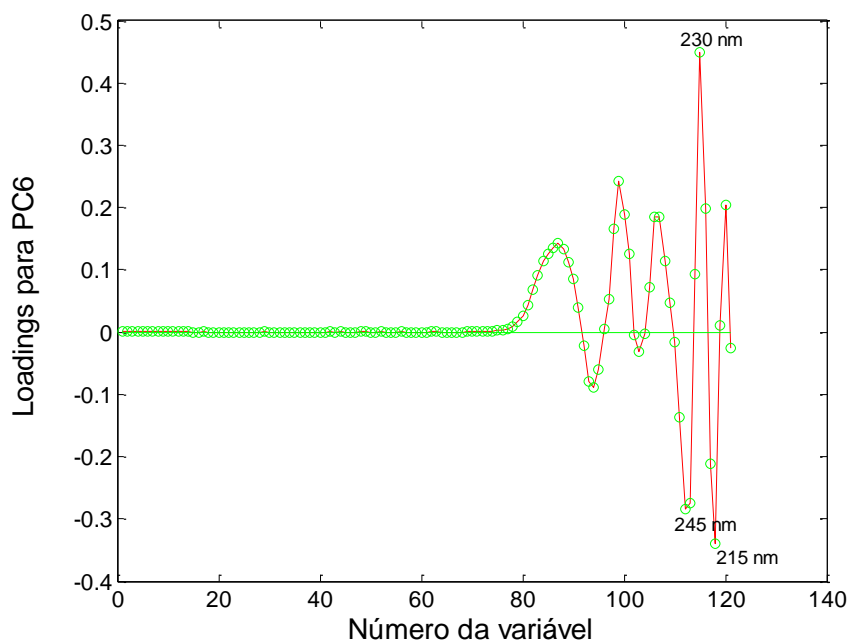


Figura 46. Loadins para PC6

5.2.2. PCA dos espectros dos ésteres obtidos por síntese juntamente com ácido cafeico e ácido ferúlico

Na PCA obtida com os espectros de absorção no UV-Vis das substâncias ácido cafeico, ácido ferúlico e dos ésteres cafeato de metila, cafeato de etila, cafeato de butila e cafeato de pentila obtidos por síntese, verificou-se que com apenas 3 componentes principais foi possível explicar 99,42 % da variância dos dados, sendo 94,65 % para PC1 e 3,71% para PC2 e 1,06% para PC3 (Tabela 8). A Figura 47 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é possível selecionar apenas os três primeiros componentes principais, uma vez que a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

Analisando a distribuição das amostras no gráfico de PC1xPC2 (Figura 48), pode-se observar que na primeira componente principal as amostras de

ácido cafeico e de ácido ferúlico apresentam os valores mais negativos separando-se das demais, enquanto que as amostras de cafeato de etila e de butila apresentam os escores mais positivos em PC2 e as amostras de cafeato de metila e cafeato de pentila apresentam os escores mais negativos e se separam das demais. Os ésteres do ácido ferúlico encontram-se próximos nestas duas componentes.

Em PC1xPC3 (Figura 49) as amostras de ácido cafeico apresentam os valores mais positivos e as amostras de ácido ferúlico os valores mais negativos, ambos se apresentam bem separados das demais substâncias. Neste gráfico, com relação aos ésteres, só é possível perceber a separação das amostras dos cafeatos de metila e pentila, bem como do ferulato de pentila; os demais se apresentam muito próximos dificultando esta percepção.

Nos gráficos de *loadings* (Figuras 50 a 52) pode-se identificar os comprimentos de onda que mais influenciam cada componente principal.

Tabela 8. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA

PC	Autovalor	% de variância capturada com este PC	% total de variância capturada
1	6.24e+000	94.65	94.65
2	2.44e+001	3.71	98.36
3	6.99e+002	1.06	99.42
4	1.46e+002	0.22	99.64
5	9,36e-003	0.14	99.78
6	4.67e-003	0.07	99.85
7	3.02e-003	0.05	99.89
8	2.12e-003	0.03	99.93
9	1.50e-003	0.02	99.95
10	1.25e-003	0.02	99.97

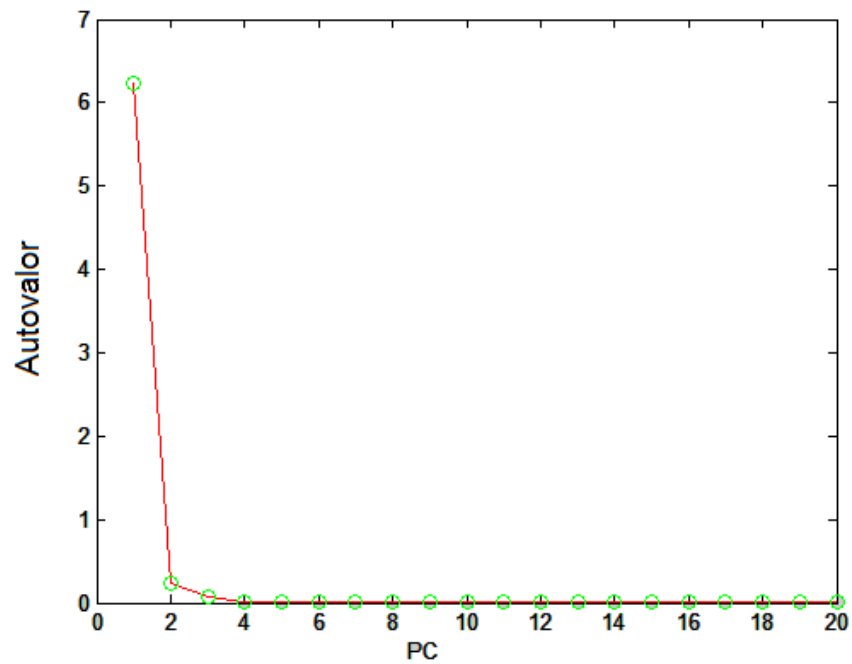


Figura 47. Gráfico de autovalor x PC

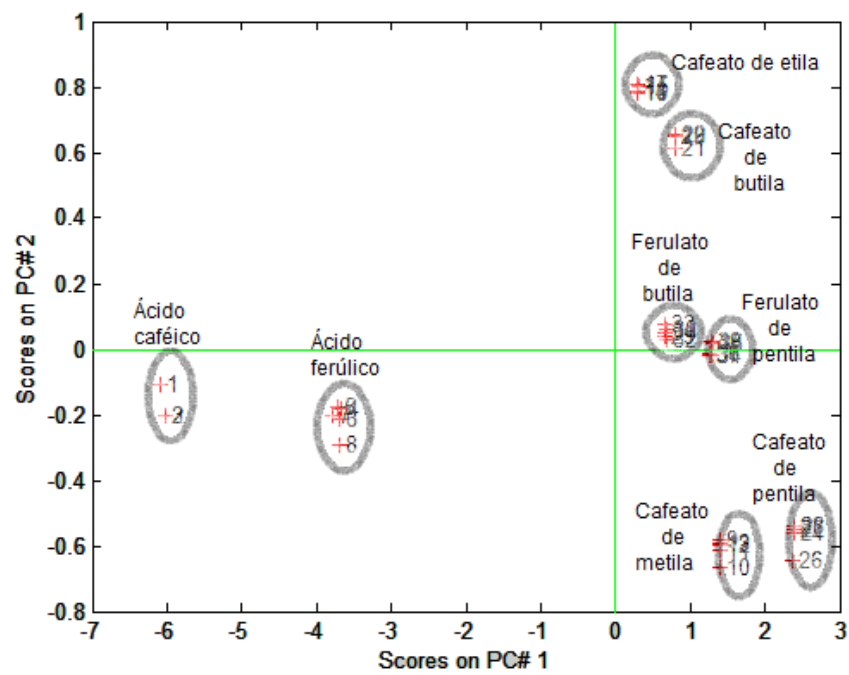


Figura 48. PC1xPC2 de espectros de absorção no UV-Vis para os ácidos caféico e ferúlico e seus ésteres

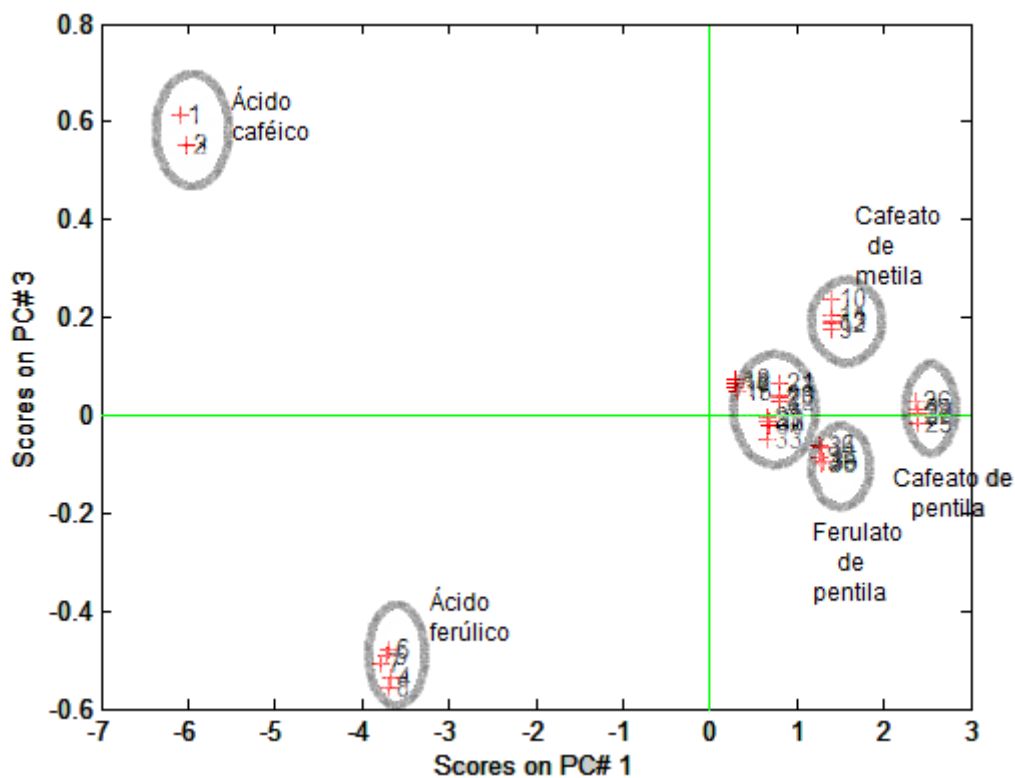


Figura 49. PC1xPC3 de espectros de absorção no UV-Vis para os ácidos cafeico e ferúlico e seus ésteres

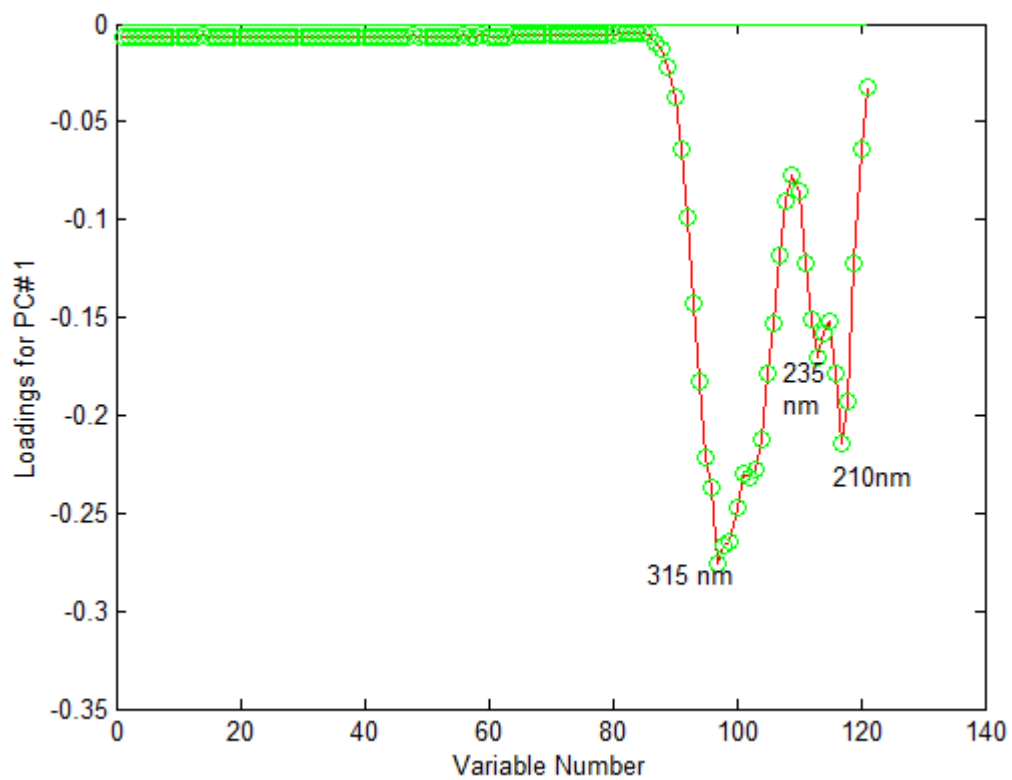


Figura 50. Loadings para PC1

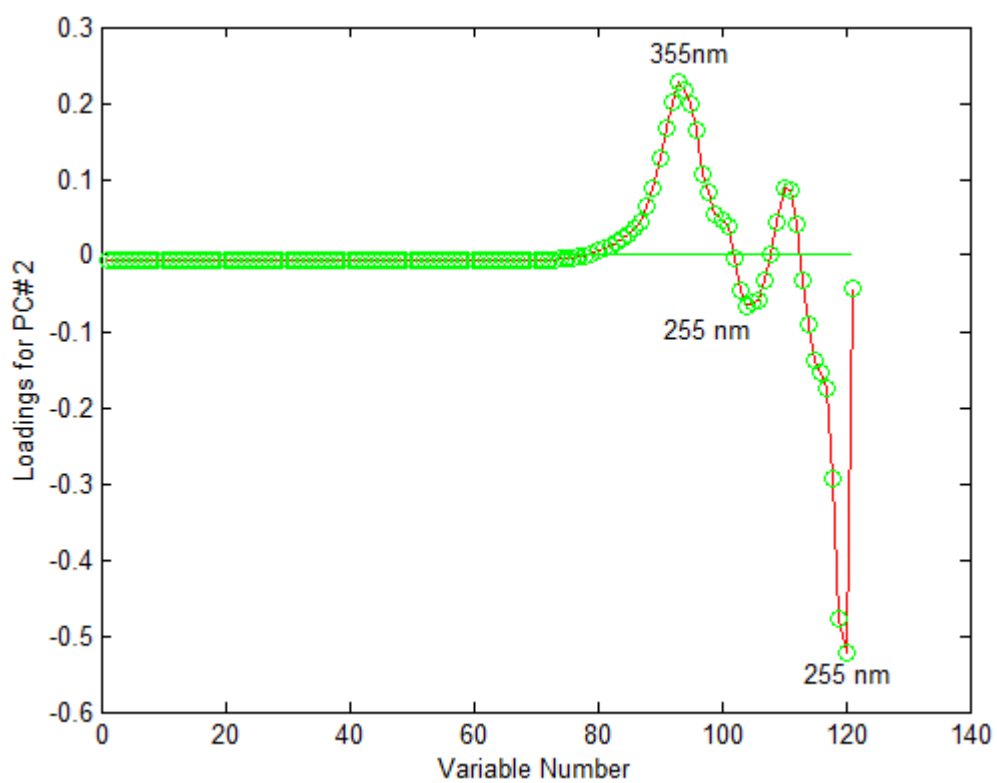


Figura 51. *Loadings para PC2*

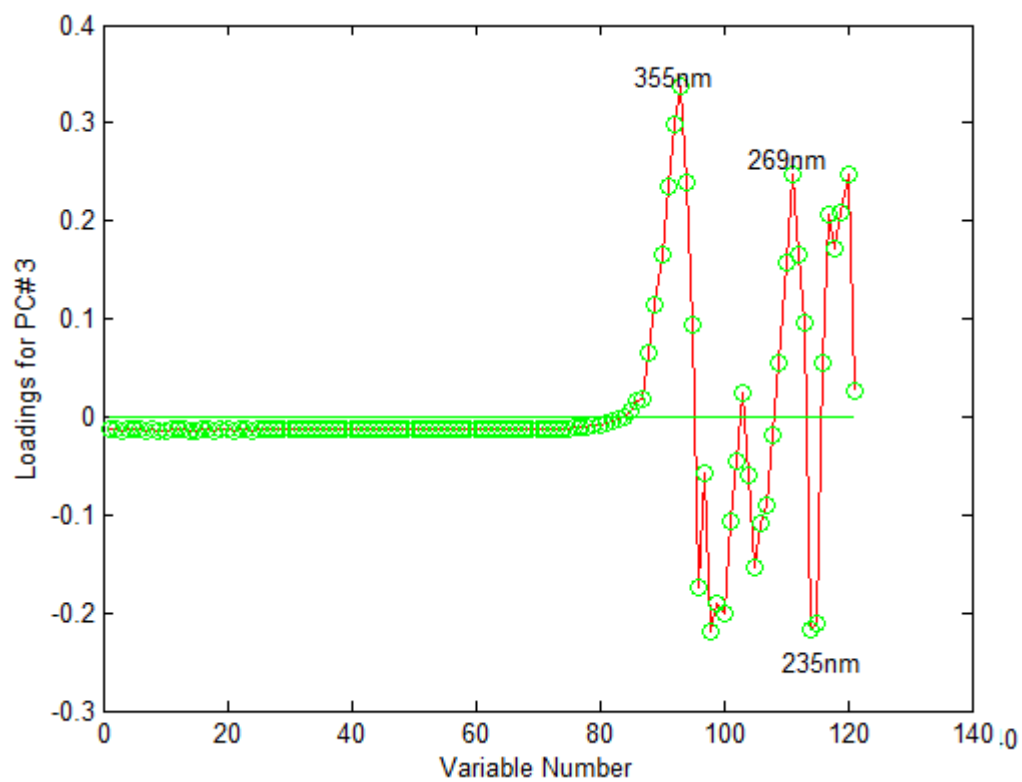


Figura 52. *Loadings para PC2*

5.2.3. PCA dos espectros dos ésteres obtidos por síntese

Na PCA obtida com os espectros de absorção no UV-Vis dos ésteres obtidos por síntese (cafeato de metila, cafeato de etila, cafeato de butila, cafeato de pentila, ferulato de butila e ferulato de pentila), verificou-se que com apenas 3 componentes principais foi possível explicar 99,26 % da variância dos dados, sendo 88,27 % para PC1 e 9,09% para PC2 e 1,90% para PC3 (Tabela 9). A Figura 53 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é possível selecionar apenas os três primeiros componentes principais, uma vez que a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

Analisando a distribuição das amostras no gráfico de PC1xPC2 (Figura 54), pode-se observar que na primeira componente principal as amostras de cafeato de etila apresentam os escores mais positivos em PC1 enquanto as amostras de cafeato de pentila apresentam escores mais negativos. Já na segunda componente principal as amostras de cafeato de metila se separam das demais porque são as que apresentam escores mais negativos. As amostras de cafeato de butila se separam das demais por apresentarem escores mais positivos em PC1 e PC2.

Em PC1xPC3 (Figura 55) as amostras de ferulato de pentila e ferulato de butila apresentam os valores mais positivos em PC3 e se separam das demais. As amostras de ferulato de pentila se separam das amostras de ferulato de butila por apresentarem escores mais positivos em PC3. Já as amostras de cafeato de metila apresentam escores mais negativos em PC3 e se separam também das demais. Na primeira componente principal as amostras de cafeato de pentila apresentam escores mais negativos enquanto as amostras de cafeato de etila apresentam escores mais positivos e se separam das demais.

Nos gráficos de *loadings* (Figuras 56 a 58) pode-se identificar os comprimentos de onda que mais influenciam cada componente principal.

Tabela 9. Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA

PC	Autovalor	% de variância capturada com este PC	% total de variância capturada
1	6.99e-001	88.27	88.27
2	7.20e-002	9.09	97.36
3	1.51e-002	1.90	99.26
4	2.38e-003	0.30	99.57
5	1.46e-003	0.19	99.75
6	5.66e-004	0.07	99.82
7	2.97e-004	0.04	99.86
8	2.12e-004	0.03	99.89
9	1.57e-004	0.02	99.91
10	1.54e-004	0.02	99.93

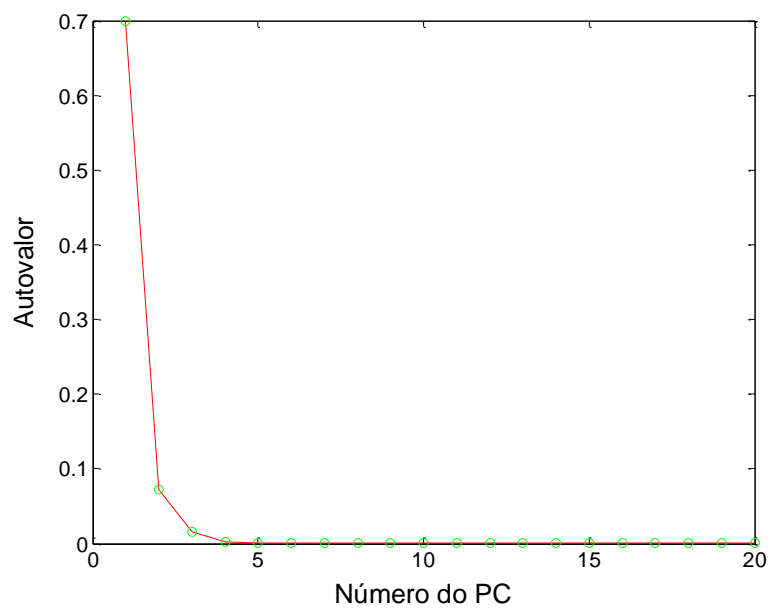


Figura 53. Gráfico de Autovalor x PC

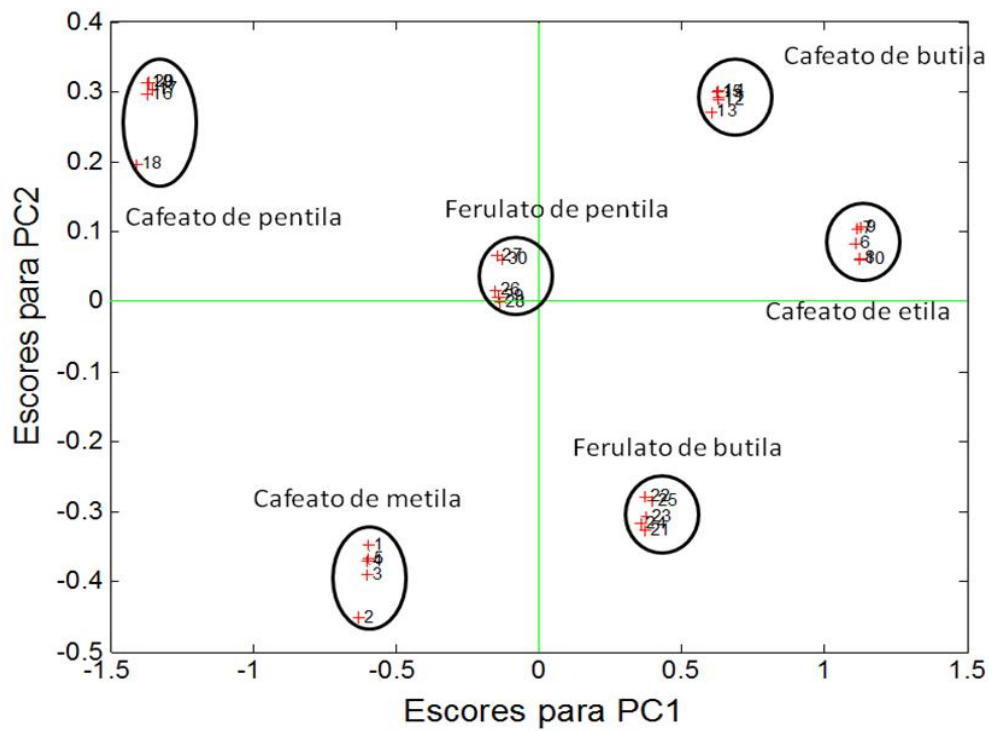


Figura 54. PC1xPC2 de espectros de absorção no UV/Vis dos ácidos cafeico e ferúlico e seus ésteres

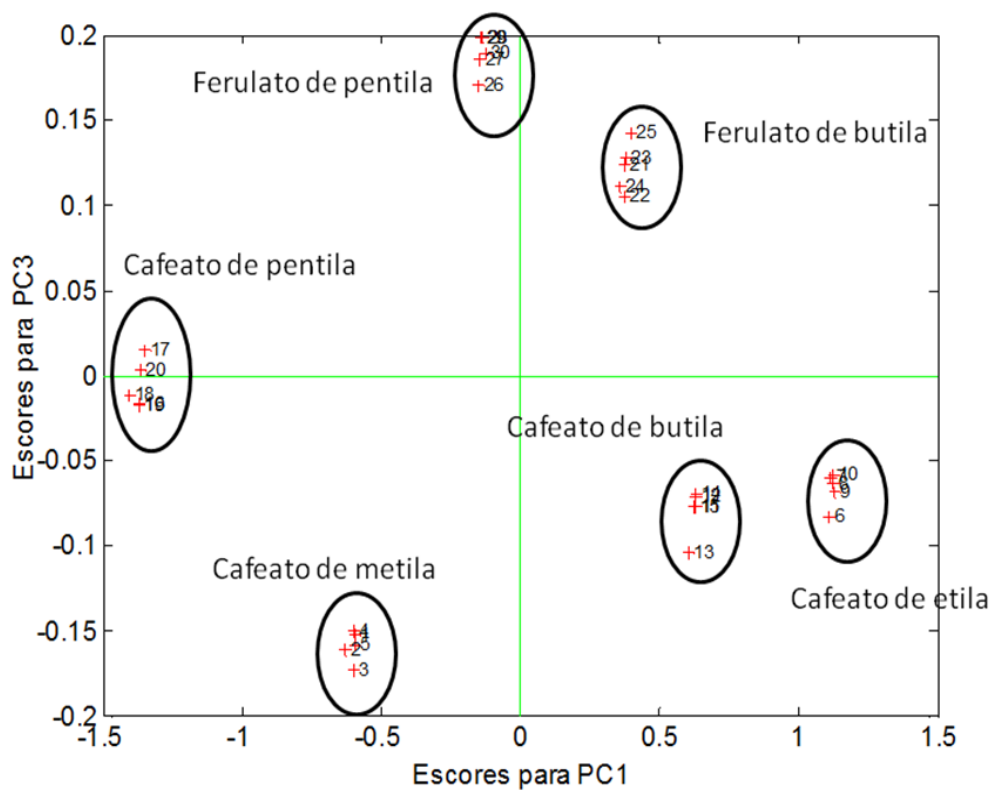
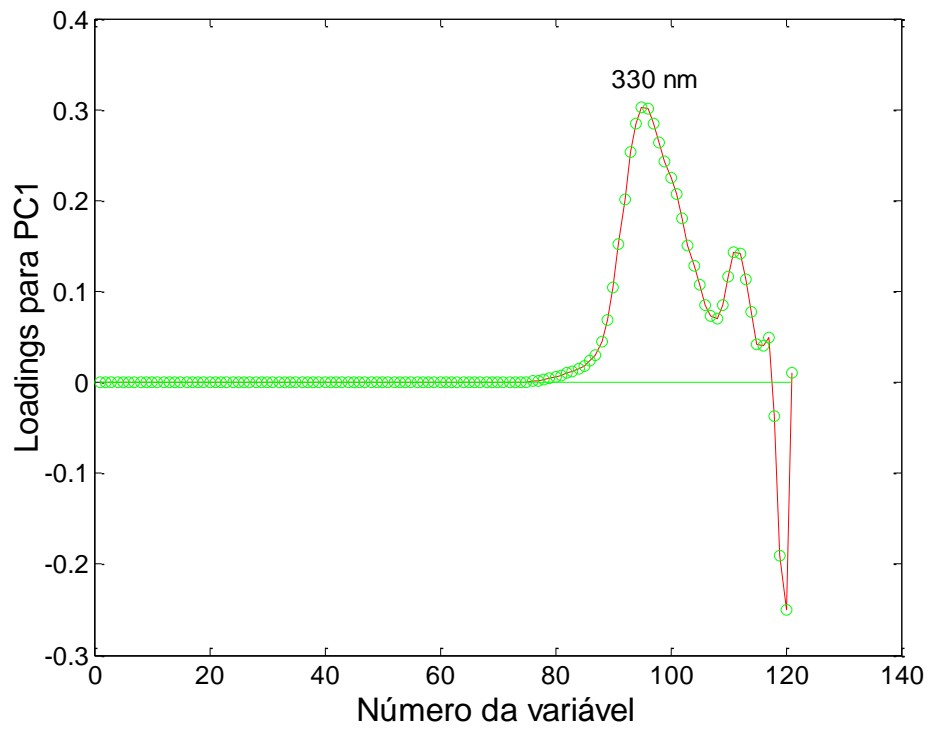
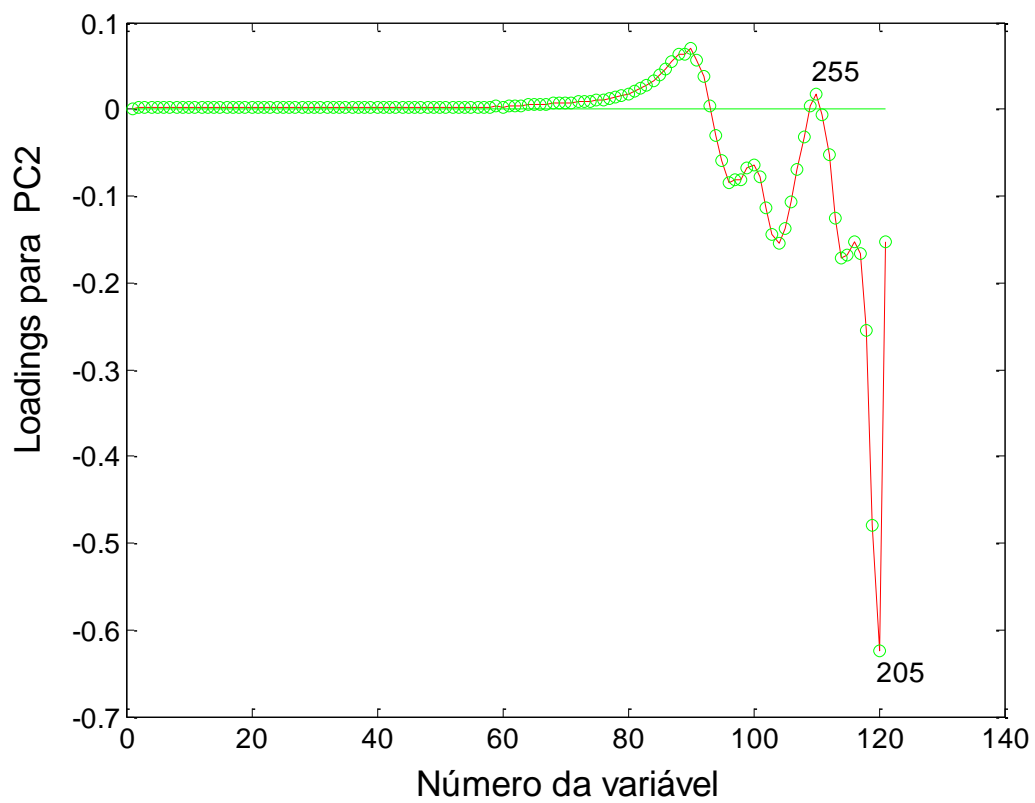
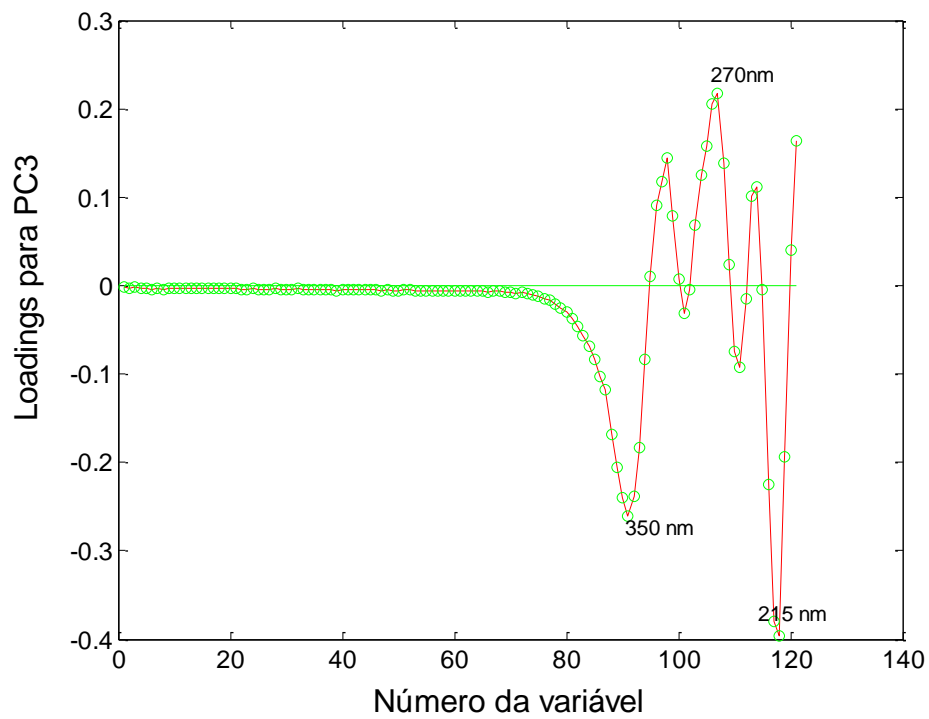


Figura 55. PC1xPC3 de espectros de absorção no UV-Vis dos ácidos cafeico e ferúlico e seus ésteres

Figura 56. *Loadings* para PC1Figura 57. *Loadings* para PC2

Figura 58. *Loadings* para PC3

5.3. MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR PLS

Através do *software* Unscrambler® 10.1 foram construídos os modelos PLS relacionando os espectros de fluorescência com os valores de concentração. As concentrações dos ácidos usadas para a construção dos PLS estão indicadas na Tabela 10 (ácidos cafeico e ferúlico) e na Tabela 11 (ácido gálico). O PLS consiste de dois passos, denominados de calibração e validação. No passo de calibração o *software* estima a relação entre os espectros e as concentrações do conjunto de amostras padrões. No passo de validação o *software* avalia a capacidade do modelo de realizar determinações, isto é, a sua capacidade preditiva.

As Figuras 59-61 apresentam as curvas dos modelos PLS para as substâncias: ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido gálico.

Tabela 10. Concentrações usadas de ácido cafeico e de ácido ferúlico para construção do PLS

Amostra	Concentração (mg/ml)
1	0,5
2	1
3	1,5
4	2
5	2,5
6	3
7	3,5
8	4
9	5

Tabela 11. Concentrações usadas de ácido gálico para construção do PLS

Amostra	Concentração (mg/ml)
1	2
2	2,5
3	3
4	3,5
5	5

Cada gráfico mostra para cada substância os valores preditos *versus* valores de referência das concentrações.

Existem várias medidas estatísticas que fornecem informações sobre o modelo PLS. As mais usadas são o coeficiente de correlação (R), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente angular e coeficiente linear.

O coeficiente de correlação linear (R) mede a grandeza da correlação linear entre variáveis intituladas. O valor da correlação varia entre +1 e -1. Uma correlação próxima a zero indica que não há correlação entre as duas variáveis. Uma correlação positiva indica que as duas variáveis movem juntas, ou seja, quando uma cresce a outra também cresce e a relação é forte quanto mais o valor do coeficiente de correlação se aproxima de +1. Uma correlação negativa indica que as duas variáveis movem-se em direções opostas, ou seja, quando uma variável aumenta, a outra diminui e que a relação também fica mais forte quanto mais próxima de -1. Os coeficientes de correlação próximos a 1, nos modelos das Figuras 59-61, respectivamente de 0,992507, 0,9940584, 0,9911911, mostram a forte correlação entre os dados da análise espectrofluorimétrica e os dados das concentrações e indica que as variáveis dependentes e independentes estão perfeitamente correlacionadas positivamente movendo-se essencialmente em perfeita proporção na mesma direção.

O coeficiente de determinação (R^2) indica o grau de ajuste da reta aos dados. Utiliza-se o símbolo R^2 porque é o quadrado do coeficiente de

correlação amostral entre as duas variáveis. Os parâmetros da regressão são sempre estimados com algum ruído, em função de que todo dado é medido com erro. O R-quadrado (R^2) mede a proporção da variabilidade em Y que é explicada por X. É uma função direta da correlação entre as variáveis, indica a precisão da reta de regressão, isto é, o grau de ajuste da reta aos dados. Quanto mais próximo de +1 ou de -1, o valor do R^2 maior a eficiência do modelo para realizar as predições. Nos modelos das Figuras 59-61, os valores de R^2 são respectivamente de 0,98507, 0,98815, 0,98246 indicando a eficiência dos modelos para realizar as predições das concentrações a partir do espectros de fluorescência.

O coeficiente angular (slope) da reta do modelo PLS indica o grau de eficiência do modelo nas predições das propriedades consideradas. Quanto mais próximo de 1 maior a eficiência do modelo, pois o coeficiente angular indica a tangente do ângulo entre a reta e a abscissa. Um coeficiente angular de 1, indica que o ângulo entre a reta e a abscissa é de 45° ou seja que os valores preditos pelo modelo são iguais aos valores de referência. Quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente angular maior a eficiência do modelo nas predições das concentrações. Os coeficientes angulares dos modelos das Figuras 59-61, respectivamente de 0,9850701, 0,9881522 e 0,9824599, estão próximos de 1, indicando modelos eficientes.

O coeficiente linear (Offset) é a intercepção da reta no eixo das ordenadas, ou seja, o valor que Y (predito) terá quando Y(referência) é zero. Os valores dos coeficientes lineares indicam a ocorrência de erros determinados nas predições realizadas pelos modelos. Quando mais próximo de zero os valores dos coeficientes lineares menores são os erros determinados. Nos modelos das Figuras 59-61, os valores dos coeficientes lineares de 0,038, 0,030 e 0,056, estão próximos de zero, o que mostra que houve pouca ocorrência de erros determinados na predição dos modelos.

A linha vermelha mostra a validação do modelo através da validação cruzada feita pelo *software* Unscrambler. A validação consiste em testar o modelo prevendo concentrações de amostras. O *software* realiza a validação cruzada isto é, seleciona subconjuntos do conjunto de calibração que serão utilizados no cálculo do modelo. Quanto mais coincidente as retas de

calibração e validação mais eficiente o modelo PLS. Com relação ao processo de validação a linha de validação para o modelo PLS do ácido ferúlico foi pouco coincidente com a linha de calibração.

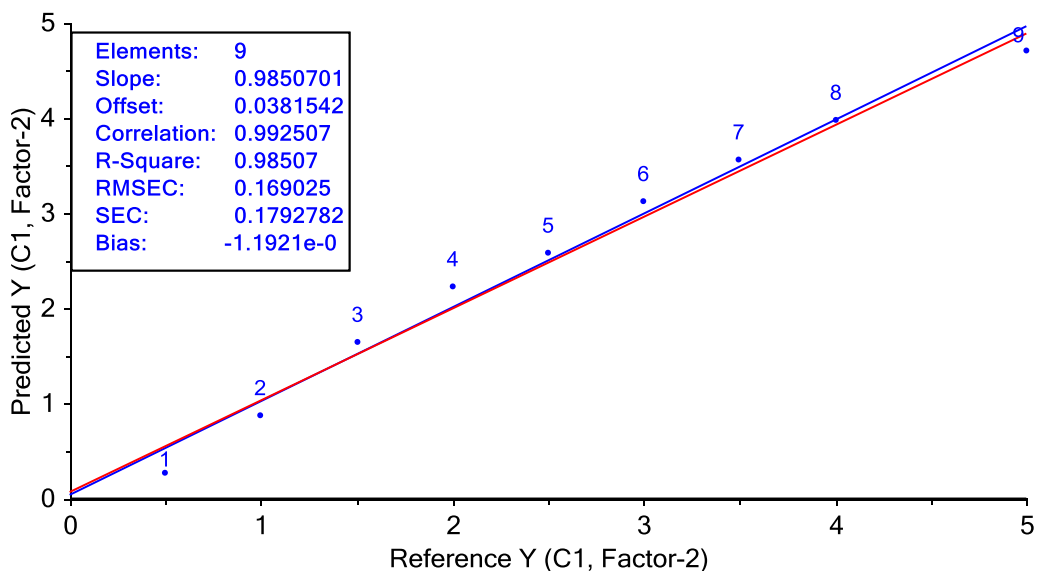


Figura 59. Modelo PLS para o ácido cafeico na faixa de 0,5-5 mg/ml

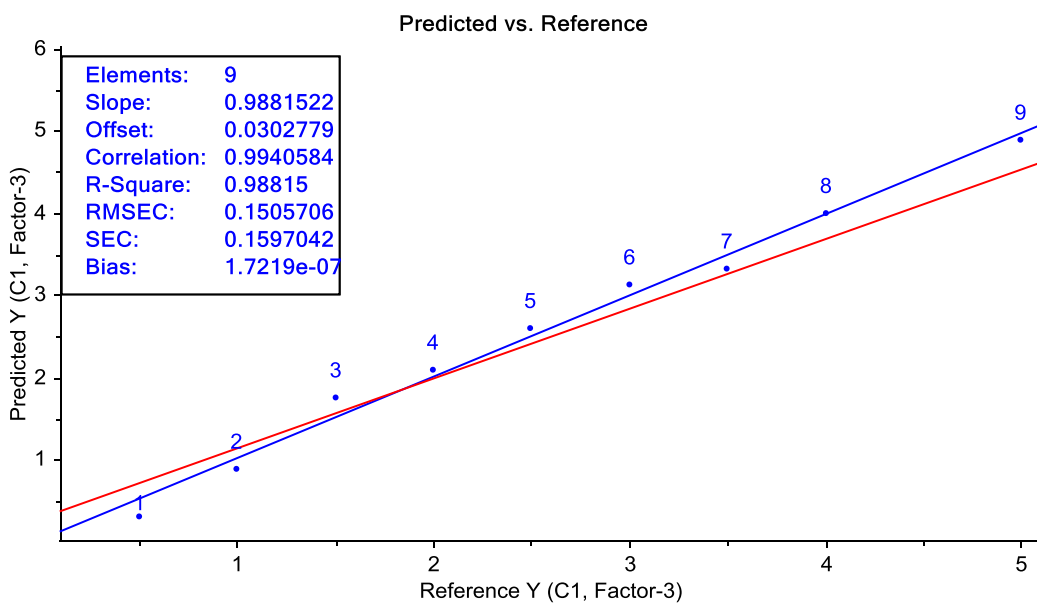


Figura 60. Modelo PLS para o ácido ferúlico na faixa de 0,5-5 mg/ml

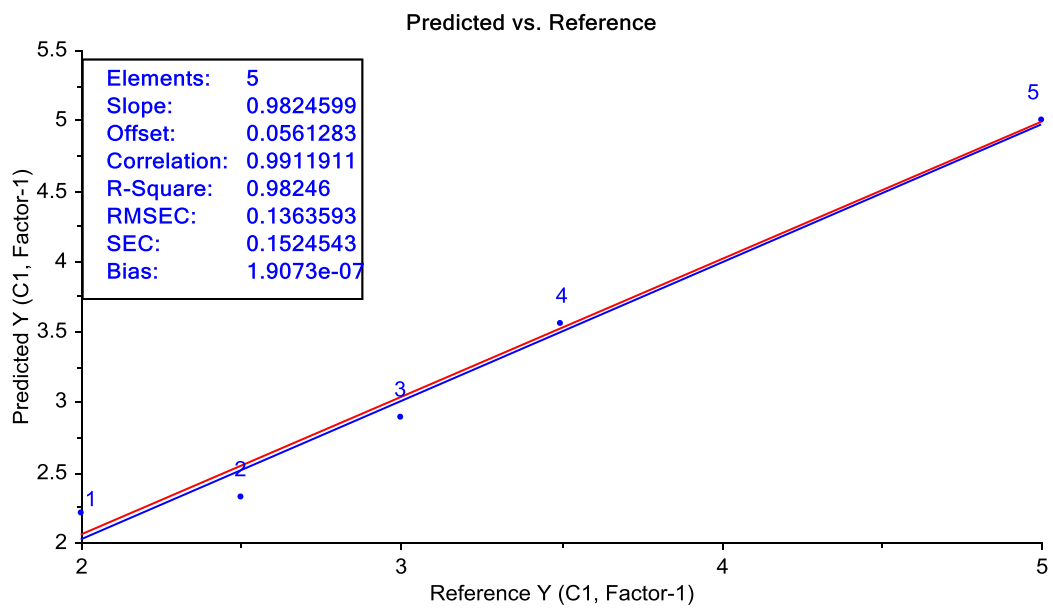


Figura 61. Modelo PLS para o ácido gálico na faixa de 2-5 mg/ml

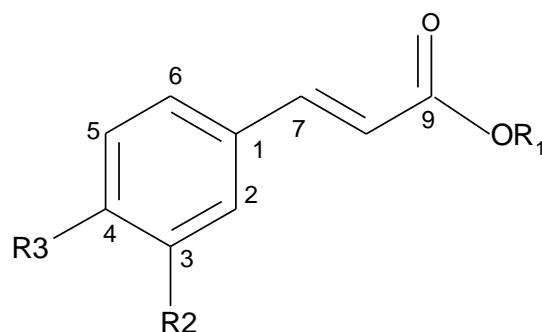
5.4. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DOS ÉSTERES SINTETIZADOS DOS ÁCIDOS CAFEICO E FERÚLICO

As estruturas dos ésteres dos ácidos *trans*-cinâmicos sintetizados (Figura 62) foram elucidadas a partir da análise de espectros de RMN ^1H e ^{13}C , CL-EM e IV.

Os dados referentes às características físicas dos compostos obtidos e o rendimento das reações de esterificação estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12. Características físicas e rendimento percentual dos ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico

Composto	Consistência/Cor	P.F °C	Peso (mg)	R %
Cafeato de metila	Sólido amorfo amarelo claro	159-161	70,2	65
Cafeato de etila	Sólido amorfo amarelo	148-150	86,3	75
Cafeato de butila	Sólido amorfo amarelo	109-111	92,0	70
Cafeato de pentila	Sólido amorfo amarelo	118-122	95,3	38
Ferulato de butila	Óleo amarelo escuro	-	77,4	60
Ferulato de pentila	Óleo amarelo escuro	-	75,0	55



Composto	R1	R2	R3
Cafeato de metila	CH ₃	OH	OH
Cafeato de etila	C ₂ H ₅	OH	OH
Cafeato de butila	C ₄ H ₉	OH	OH
Cafeato de pentila	C ₅ H ₁₁	OH	OH
Ferulato de butila	C ₄ H ₉	OCH ₃	OH
Ferulato de pentila	C ₅ H ₁₁	OCH ₃	OH

Figura 62. Ésteres sintetizados

5.4.1. Identificação dos ésteres de cafeato de etila e de butila

Estes ésteres *trans*-cinâmicos após serem submetidos à CC para purificação se apresentaram como sólidos amorfos de cor amarela (Tabela 12). Os dados obtidos de pontos de fusão estão de acordo com a literatura (ETZENHOUSER et al, 2001). Suas estruturas foram confirmadas a partir dos espectros de CL/EM (EM-APCI), RMN ¹H e ¹³C.

O espectro EM-APCI relativo ao cafeato de etila (Figura 63, Tabela 13) registrou o íon pseudo molecular m/z 207 [M-H]⁻, compatível com a fórmula molecular C₁₁H₁₂O₄. De modo semelhante o espectro referente ao cafeato de butila (Figura 64, Tabela 13) registrou o íon pseudo molecular m/z 235 [M-H]⁻, compatível com a fórmula molecular C₁₃H₁₆O₄.

Tabela.13. Dados dos espectros CL/EM dos compostos cafeato de metila (CMe), cafeato de etila (CEt), cafeato de butila (CBu) e cafeato de pentila (CPe)(Interface APCI no modo negativo)

Composto	m/z (M-H) ⁻
Cafeato de metila (CMe)	193
Cafeato de etila (CEt)	207
Cafeato de butila (CBu)	235
Cafeato de pentila (CPe)	249

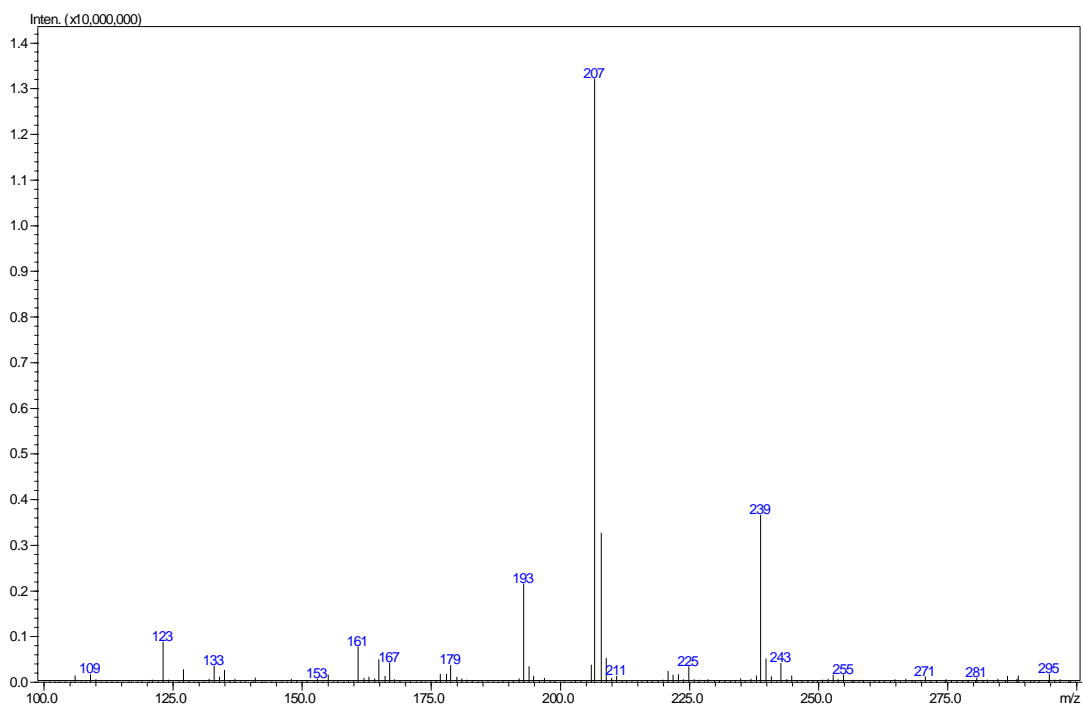


Figura 63. Espectro de massa CL/EM do cafeato de etila (interface APCI no modo negativo). Solvente MeOH.

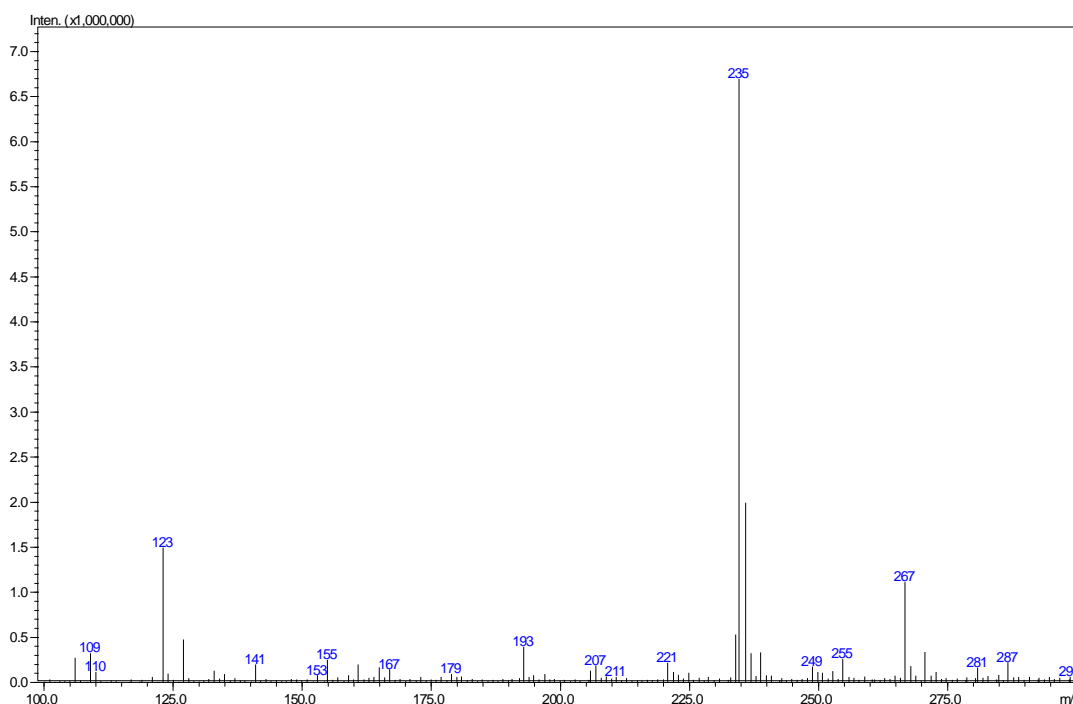


Figura 64. Espectro de massa CL/EM do cafeato de butila (interface APCI no modo negativo). Solvente MeOH.

Do conjunto de dados obtidos mediante os espectros de RMN de ^1H (Tabela 14, Figuras 65 e 66) destes ésteres devem ser destacados, em face da importância para a caracterização estrutural dos mesmos, os sinais em δ 7,56 e δ 6,28 referentes aos dois prótons olefínicos H-7 e H-8, respectivamente, cuja configuração *trans* é confirmada pela constante de acoplamento ($J = 15,6$ Hz), bem como, os sinais em δ 7,08 - δ 6,82, característicos de anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Diferenciam-se os espectros em face do quarteto em δ 4,23 (2H de OCH_2) e do tripleto em δ 1,33 (3H de CH_3) presentes no espectro do cafeato de etila, correspondentes ao grupo etoxila (OCH_2CH_3), comparados ao tripleto em δ 4,20 (2H de OCH_2), aos dois multipletos, sendo um em δ 1,69 (2H de CH_2) e outro em δ 1,46 (2H de CH_2) e ao tripleto em δ 0,98 (3H de CH_3), correspondentes ao grupo butoxila, caracterizando o cafeato de butila.

Tabela 14. Dados dos espectros de RMN de ^1H dos cafeatos de etila (CEt) e butila (CBu) [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm), J (Hz)]

H	CEt	CBu
2	7,08 (d;1,8)	7,09 (d; 1,8)
5	6,82 (d;8,4)	6,82 (d; 8,4)
6	6,96 (dd; 8,1; 1,8)	6,97 (dd; 6,0; 2,1)
7	7,56 (d; 15,6)	7,56 (d; 15,6)
8	6,28 (d; 15,6)	6,28 (d; 15,6)
(OCH_2)	4,23 (q)	4,20 (t)
H_2C	--	1,69 (m)
H_2C	--	1,46 (m)
H_3C	1,33 (t)	0,98 (t)

H= Hidrogênio

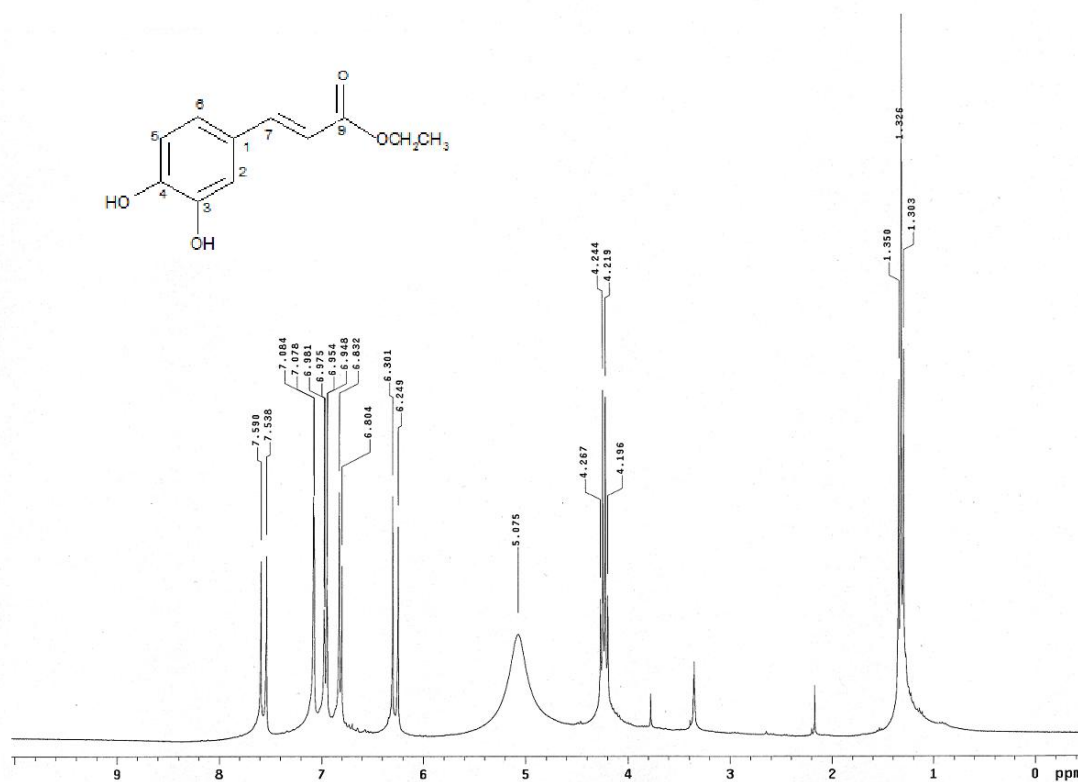


Figura 65. Espectro de RMN de ^1H do cafeato de etila em CD_3OD

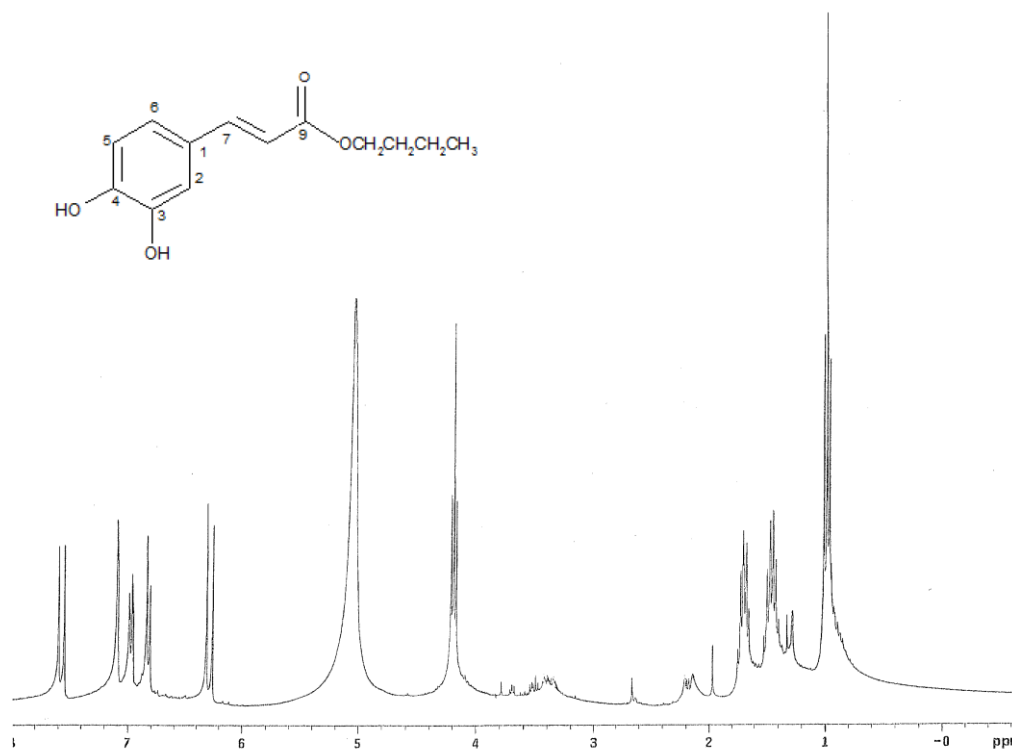


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H do cafeato de butila em CD_3OD

Todos os sinais apresentados nos espectros de RMN de ^1H de ambos foram corroborados pelos sinais apresentados nos respectivos espectros de RMN ^{13}C (Tabela 15, Figuras 67 e 68), dos quais devem ser destacados os sinais, no espectro do CEt em δ 145,6 ($\text{C}\beta$) e em 115,4 ($\text{C}\alpha$), no espectro do CBU em δ 146,7 ($\text{C}\beta$) e em 116,5 ($\text{C}\alpha$), dados em acordo com a literatura para compostos da mesma família química. Apesar de bastante semelhantes, diferenciam-se os espectros em face dos sinais em δ 31,8 e 20, 2, ausentes no espectro de CEt, correspondentes, respectivamente, aos carbonos 2' e 3' do éster butílico.

Os dados apresentados quando comparados com a literatura (MEIRA *et al.* 2008; ETZENHOUSER, 2001) permitem caracterizar os produtos de síntese como cafeato de etila e cafeato de butila.

Tabela 15. Dados dos espectros de RMN de ^{13}C dos cafeatos de etila (CEt) e butila (CBu) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)].

C	CEt	CBu
1 (C)	126,6	127,6
2 (CH)	114,0	115,0
3 (C)	145,6	146,7
4 (C)	148,4	149,5
5 (CH)	114,1	115,1
6 (CH)	121,8	122,9
7 (CH)	145,6	146,7
8 (CH)	115,4	116,5
9 (C=O)	168,3	169,4
1'(OCH ₂)	60,4	65,3
2'(CH ₂)	--	31,8
3'(CH ₂)	--	20,2
H ₃ C	13,5	14,1

C= Carbono

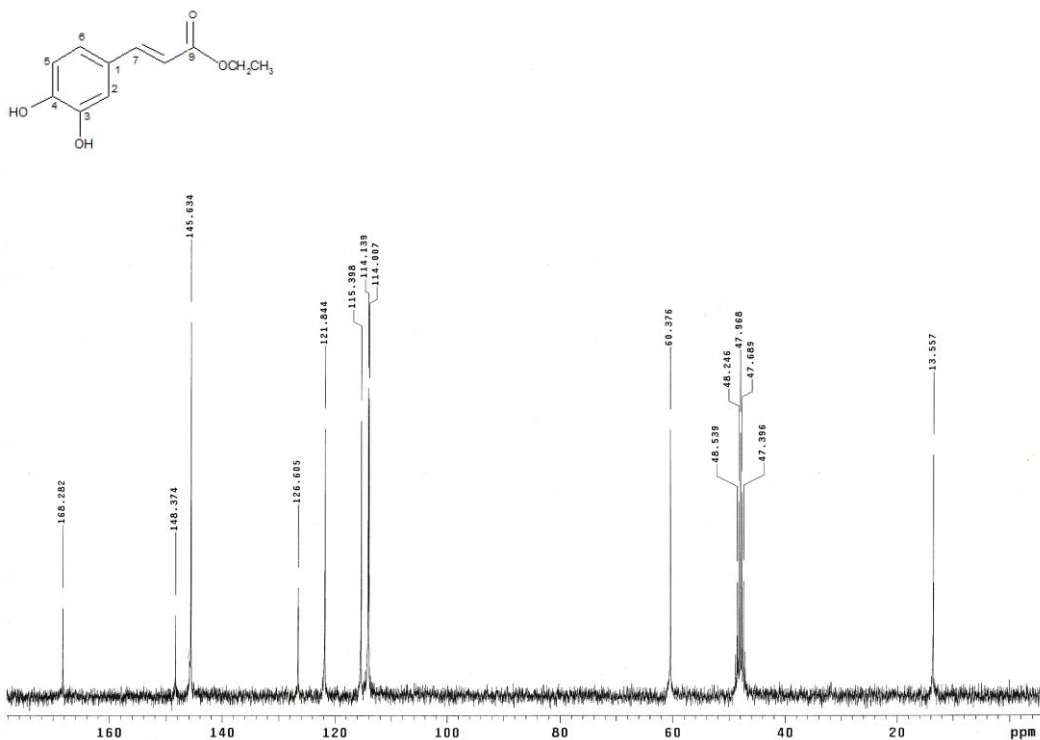


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C do cafeato de etila em CD_3OD

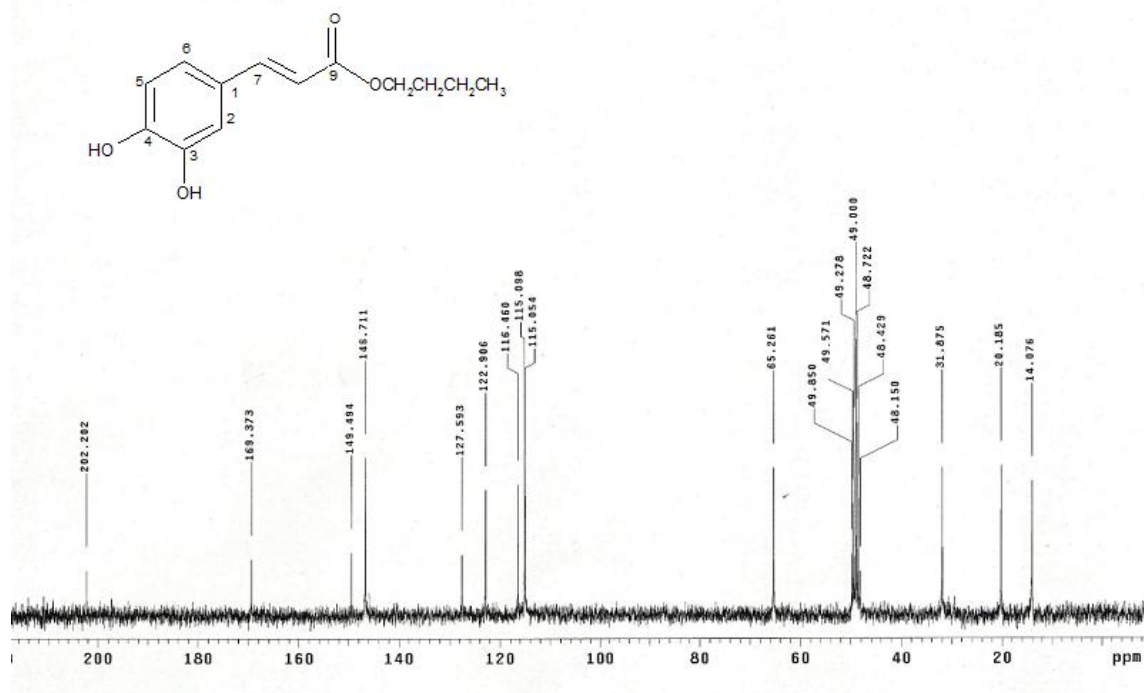


Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C do cafeato de butila em CD_3OD

5.4.2. Identificação dos ésteres de cafeato de metila e de pentila

Estes ésteres *trans*-cinâmicos após serem submetidos à CC para purificação se apresentaram como sólidos amorfos de cor amarela. Os valores dos pontos de fusão destes compostos (Tabela 12) estão em concordância com aqueles constantes na literatura (PUTRA et al, 2007).

As estruturas dos ésteres de cafeato de metila e pentila foram confirmadas a partir da análise dos espectros de massa (EM/APCI) CL/EM e IV.

O espectro EM/APCI relativo ao cafeato de metila (Figura 69, Tabela 13) registrou o íon pseudo molecular m/z 193 $[M-H]^-$, compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$. O espectro referente ao cafeato de pentila (Figura 70, Tabela 13) registrou o íon pseudo molecular m/z 249 $[M-H]^-$, compatível com a fórmula molecular $C_{14}H_{18}O_4$.

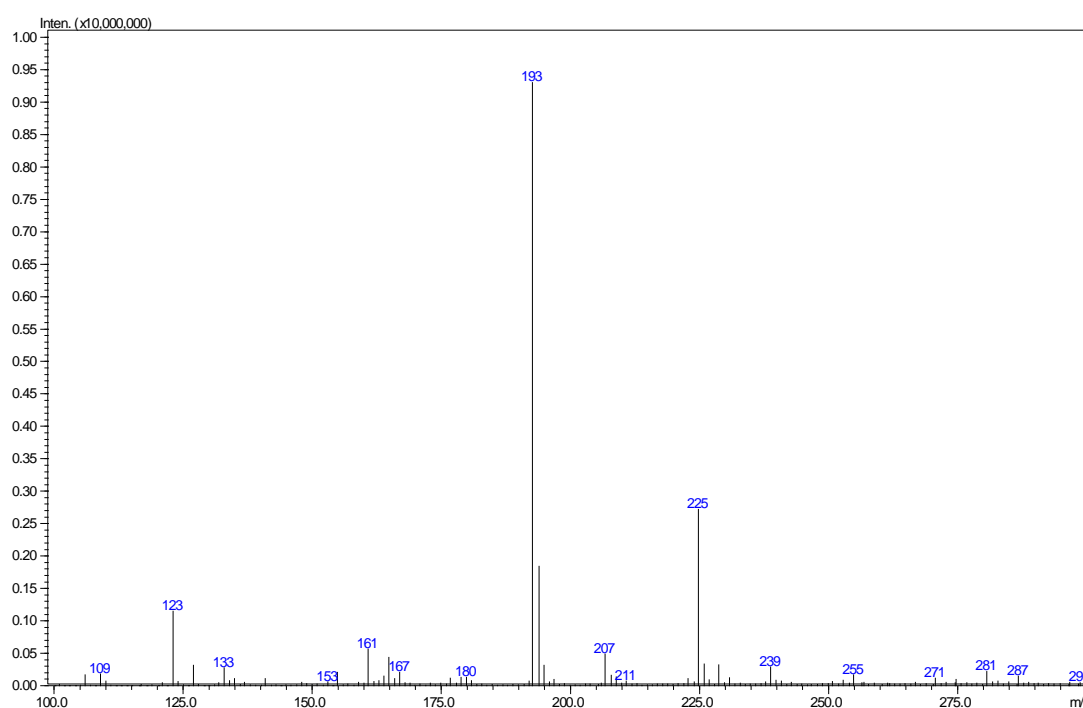


Figura 69. Espectro de massa CL/EM do cafeato de metila (interface APCI no modo negativo).

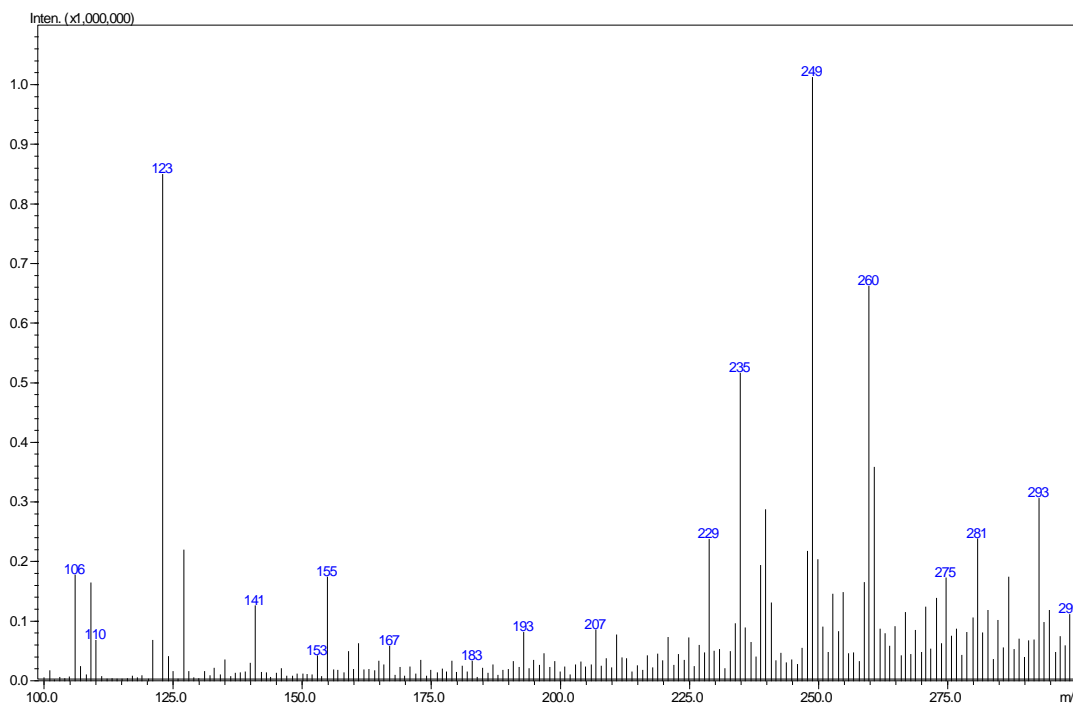


Figura 70. Espectro de massa CL/EM do cafeato de pentila (interface APCI no modo negativo)

Nos espectros de IV podem ser evidenciadas a presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido a interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular.

Do conjunto de dados obtidos mediante os espectros de IV (Tabela 16, Figuras 71 e 72) devem ser destacados os dados referentes às bandas em 1679 cm^{-1} (CMe) e em 1683 cm^{-1} (CPe) correspondentes a grupos C=O éster (estiramento), às bandas em 971 cm^{-1} (CMe) e em 975 cm^{-1} (CPe) que evidenciam o caráter aromático da substância, confirmado ao se observar na região de $1600 - 1500\text{ cm}^{-1}$, as bandas em 1606 cm^{-1} (CMe) e em 1603 cm^{-1} (CPe) correspondentes a C=C anel aromático (estiramento). As bandas em 3478 cm^{-1} (CMe) e em 3488 cm^{-1} (CPe) correspondem a grupos O-H (estiramento) e evidenciam a presença deste grupo funcional na estrutura (BARBOSA, 2007; LOPES & FACIO, 2004).

Os espectros de IV das duas substâncias são bem semelhantes e da análise dos mesmos, depreende-se que se trata de um éster aromático com

OH em sua estrutura. Estes dados aliados com os espectros de CL-EM e o ponto de fusão das substâncias são indicativos de que as substâncias são o cafeato de metila e o cafeato de pentila.

Tabela 16: Dados dos espectros de IV dos cafeatos de metila (CMe) e pentila (CPe) [IV $u_{m\acute{a}x}$ cm^{-1} KBr,].

Grupos	CMe	CPe
ν O-H	3478	3488
ν C-H de CH_2 e CH_3	2953	2954 2895
ν C=O éster	1679	1683
ν C=C anel aromático	1606	1603
δ C-H de CH_2 e CH_3	---	1470-1410
δ C-H de CH_3	1374	----
ν C-O	1191	1194
δ C=C	970	975

ν : estiramento δ : deformação

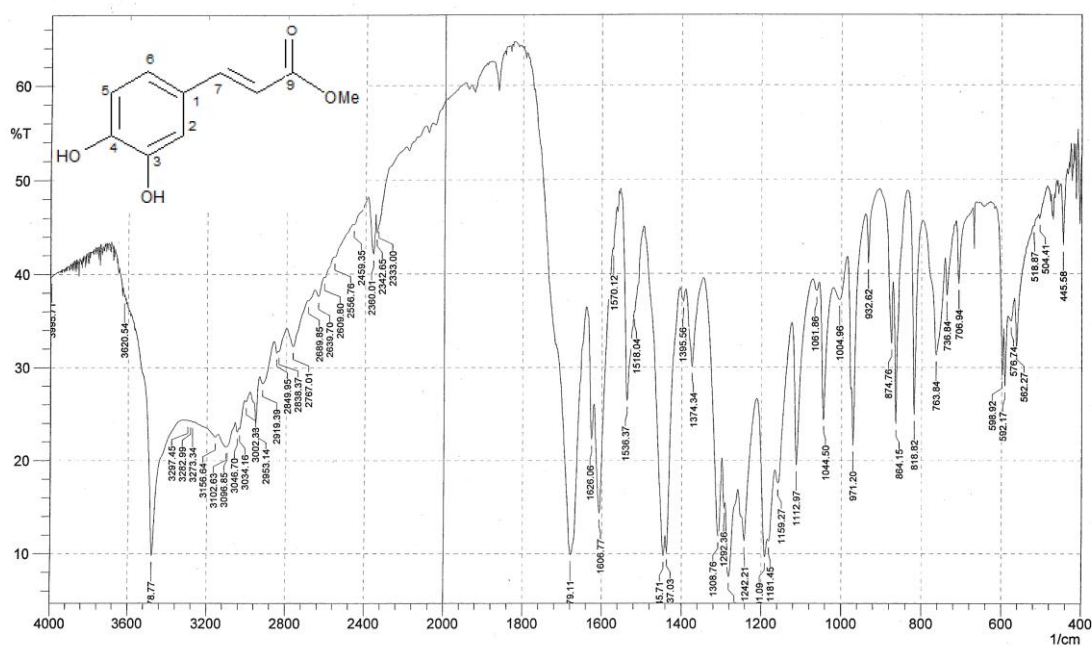


Figura 71. Espectro IV cafeato de metila (KBr)

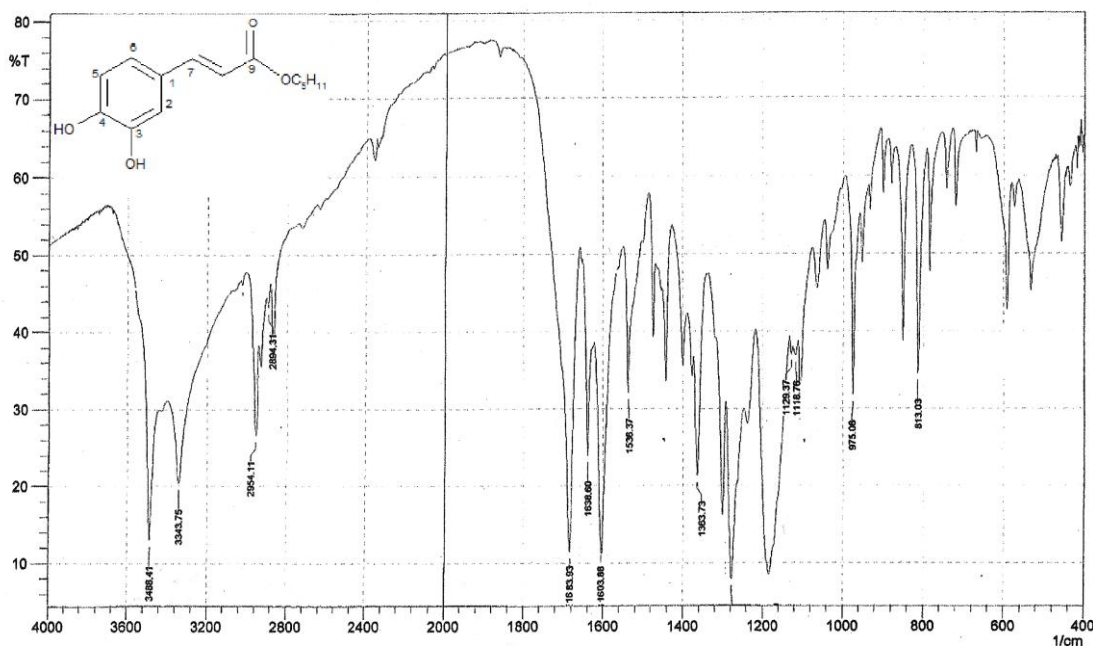


Figura 72. Espectro de IV do cafeato de pentila (KBr)

5.4.3. Identificação dos ésteres de ferulato de butila (FBu) e pentila (FPe)

Estes ésteres *trans*-cinâmicos após serem submetidos à CC para purificação se apresentaram como material oleoso de coloração marrom (Tabela 12). Para caracterização estrutural destes ésteres foram obtidos os espectros de RMN ^1H .

Do conjunto de dados obtidos mediante os espectros de RMN de ^1H (Tabela 17, Figuras 73 e 74) destes ferulatos devem ser destacados, em face da importância para a caracterização estrutural dos mesmos, os sinais em δ 7,64 e δ 6,45 no espectro do FBu e os sinais em δ 7,64 e δ 6,45 no espectro do FPe, referentes aos dois prótons olefínicos H-7 e H-8, respectivamente, cuja configuração *trans* é confirmada pela constante de acoplamento $J= 15,6$ Hz para o FBu e $J= 15,9$ Hz para o FPe, bem como os sinais em δ 7,38 - δ 6,92, em ambos, característicos de anel aromático 1,3,4-tri-substituído e os tripletos em δ 4,21 (FBu) e δ 4,19 (FPe) condizentes com os prótons presentes em OCH_2 . Os espectros ainda apresentam um singlete em δ 3,95 referente aos H do grupo OCH_3 , multipletos em δ 1,69 e δ 1,45 para o FBu e em δ 1,65 e δ 1,37 para o FPe, condizentes com os prótons de CH_2 , atribuídos aos H presentes em $\text{C}2'$

e C3' e, ainda, um tripleto em δ 0,97 (FBu) e δ 0,87 (FPe) referentes aos 3H de CH₃. Diferenciam-se os espectros destes dois ferulatos em face do multipletto em δ 1,45 presente apenas no espectro de FPe atribuído aos 2H presentes no C4' do ferulato de pentila.

Os dados dos espectros de RMN de ¹H comparados com os valores constantes na literatura (LI *et al.*, 2009, VOISIN-CHIRET *et al.*, 2007) sugerem que as substâncias em epígrafe são o ferulato de butila e o ferulato de pentila.

Tabela 17. Dados dos espectros de RMN ¹H dos ferulatos de butila (FBu) e pentila (FPe) [300 MHz, CD₃OD, δ (ppm), J (Hz)]

H	FBu	FPe
2	7,38 (d; 1,8)	7,38 (d; 1,8)
5	6,92 (d; 8,1)	6,92 (d; 8,1)
6	7,18 (dd; 8,1; 2,1)	7,18 (dd; 8,1; 2,1)
7	7,64 (d; 15,6)	7,60 (d; 15,9)
8	6,45 (d; 15,6)	6,41 (d; 15,9)
H ₃ CO	3,95 (s)	3,95 (s)
(OCH ₂)	4,21 (t)	4,19 (t)
H ₂ C	1,69 (m)	1,65 (m)
H ₂ C	1,45 (m)	1,37 (m)
H ₂ C	1,45 (m)	1,37 (m)
H ₂ C	--	0,97 (m)
H ₃ C	0,97 (t)	0,87 (t)

H= Hidrogênio

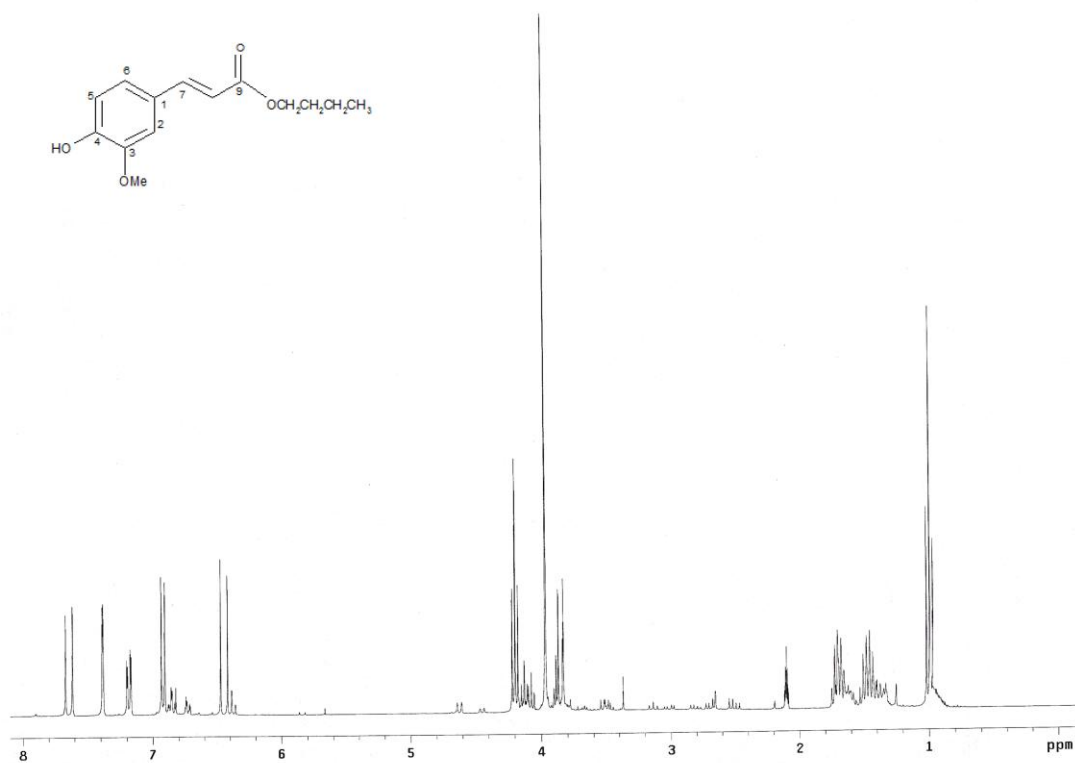


Figura 73. Espectro de RMN ¹H do ferulato de butila em CD₃OD

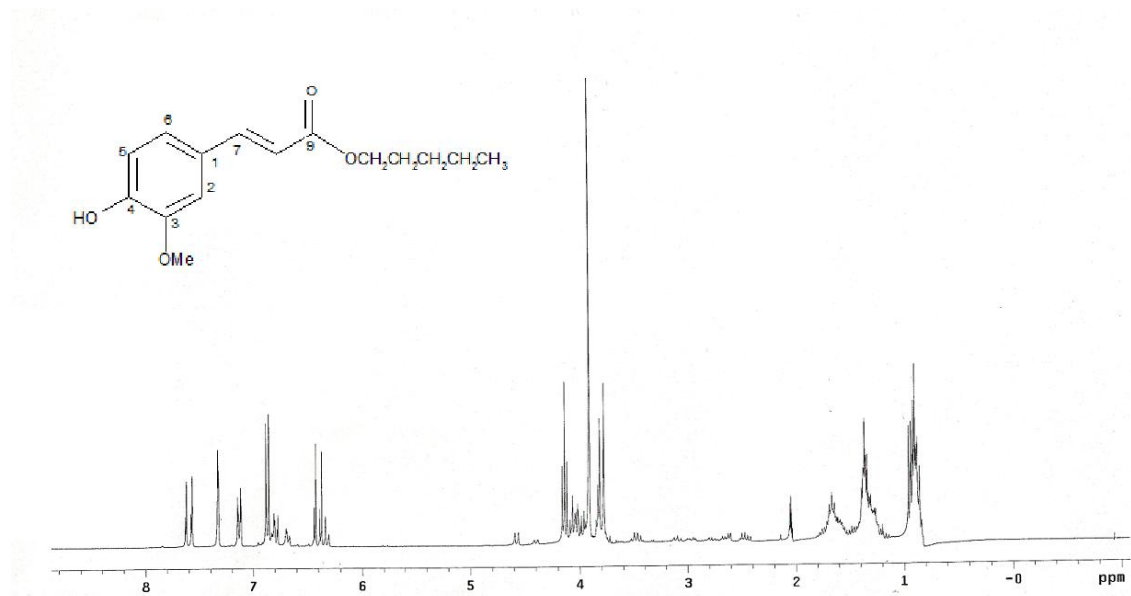


Figura 74. Espectro de RMN ¹H do ferulato de pentila em CD₃OD

5.5. ENSAIOS DE BIOATIVIDADE

Os ensaios enzimáticos foram realizados para investigar a atividade inibitória sobre proteases nos ésteres de baixo peso molecular dos ácidos cafeico e ferúlico, já referida na literatura para os ácidos cafeico e ferúlico (CHIANG et al, 2002; KAMPA et al, 2004; LEE et al, 2010; MELZIG et al, 2005; SEGUENI et al, 2011). Entretanto, mostraram ausência de atividade inibitória significativa sobre a papaína, uma cisteíno protease, e a tripsina, uma serino protease.

A análise das Figuras 75 e 76 mostra que a incubação da soroalbumina bovina com os ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico não impediram a sua digestão frente as enzimas papaína e tripsina. Pode ser evidenciado, Figuras 75 e 76, que os ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico se comportaram de forma bastante semelhante aos controles negativos, induzindo o entendimento de que essas substâncias não apresentam nenhuma ação significativa sobre a inibição de proteases. Considerando que a literatura aponta que os ácidos cafeico e ferúlico apresentam atividade inibitória de proteases, pode-se supor, com base nos resultados obtidos, que a esterificação destas substâncias determina a perda desta atividade.

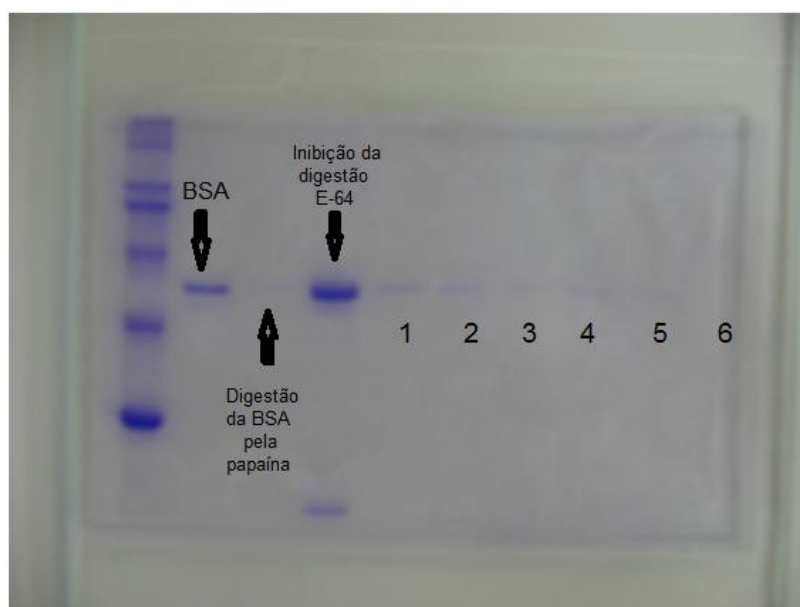


Figura 75. Eletroforese em gel de poliácridamida da BSA incubação com papaína e as substâncias testes: Cafeatos de metila (1), etila (2), butila (3), pentila (4); Ferulatos de butila (5), de pentila (6). BSA = soroalbumina bovina; E-64 = N-(N-(L-3-trans-carboxioxirano-2-carbonil)-L-leucil)agmatina.

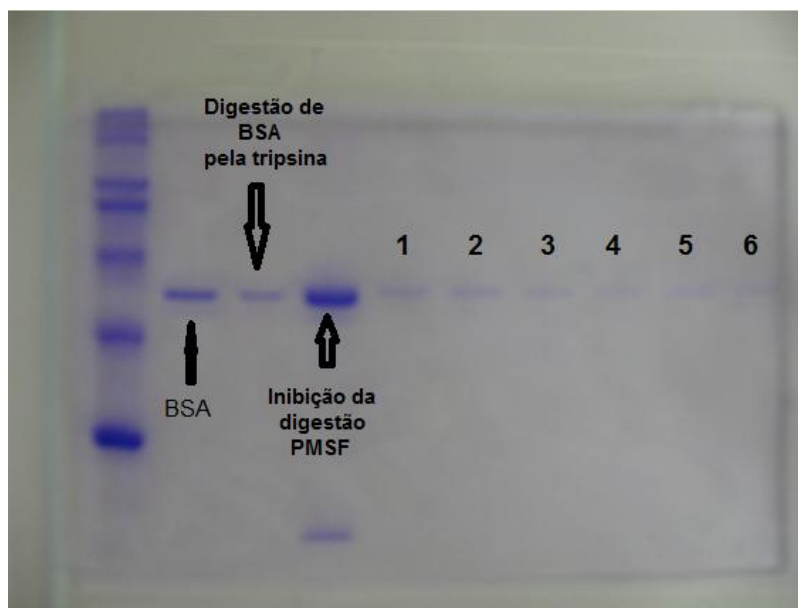


Figura 76. . Eletroforese em gel de poliacrilamida da BAS incubação com papaína e as substâncias testes: Cafeatos de metila (1), etila (2), butila (3), pentila (4); Ferulatos de butila (5), de pentila (6). BSA = soroalbumina bovina;. BSA = soroalbumina bovina; PMSF=Fluoreto de Fenilmetilsulfonill.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Faz parte da rotina nos laboratórios de pesquisa de produtos naturais o uso de técnicas espectroscópicas diversas para a elucidação estrutural de substância isoladas durante o estudo fitoquímico. A realização de todas as técnicas necessárias para elucidação estrutural de um única substância resulta geralmente em consumo de tempo dos equipamentos, bem como do especialista para a interpretação dos espectros. Tratando-se de substâncias desconhecidas é imprescindível, para a determinação de suas estruturas, a utilização de técnicas espectroscópicas avançadas e a análise integrada dos vários espectros obtidos. Entretanto, a condição mais constante é o isolamento de substâncias com estruturas já conhecidas, mas, ainda assim, na maioria dos casos, a confirmação das estruturas é feita utilizando várias técnicas sofisticadas, resultando em gastos desnecessários de tempo e elevação dos custos.

O presente trabalho mostrou que pode-se ganhar tempo e economizar recursos financeiros com o uso da espectrofluorimetria e espectroscopia no UV-Vis associadas às técnicas quimiométricas para a identificação e quantificação de substâncias aromáticas.

Na PCA obtida com os espectros de fluorescência das substâncias ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, vanilina e quercetina verificou-se que com apenas 3 componentes principais foi possível separar estas substâncias bem como, identificar pelos *loadings* os comprimentos de onda que mais influenciaram na separação.

Na PCA obtida com os espectros de absorção no UV-Vis das substâncias ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido salicílico, vanilina e quercetina verificou-se que foram necessários 6 componentes principais para separar em grupos bem definidos as substâncias, bem como, identificar pelos *loadings* os comprimentos de onda responsáveis pela separação.

Além disso, foi também possível quantificar substâncias através de técnicas de calibração multivariada tal como PLS. Foram obtidos modelos de calibração PLS a partir dos espectros de fluorescência dos ácidos cafeico, ferúlico e gálico. Através da análise do coeficiente de correlação, do R-quadrado e do coeficiente angular verificou-se que os modelos construídos foram eficientes para realizar as predições das concentrações a partir dos espectros de fluorescência.

Ficou evidenciado que através da aplicação do método proposto foi possível, de forma comparativa, identificar os ésteres sintetizados dos ácidos ferúlico e cafeico, separando-os em grupos bem definido. O método mostrou ser eficaz, de grande simplicidade e de baixo custo quando comparado às técnicas de RMN, sendo uma alternativa viável para a confirmação da identidade de substâncias previamente identificadas, por exemplo, através de técnicas simples como a cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) ou através de espectros de CL-EM.

Os ensaios de bioatividade aos quais foram submetidos os ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico obtidos por síntese, demonstraram que estas substâncias, diferentemente dos ácidos de origem, não apresentaram atividade inibitória significativa sobre proteases.

7. PRODUTOS GERADOS

David, J. P.; MEIRA, M.; Araújo, E. M. P.; Quintella, C. M. Method for identification of organic substances, pure or in formulations, through spectral analysis and chemometrics techniques.. In: IX Conferência de Inovação Tecnológica, 2011, Fortaleza. Anais da IX Conferência de Inovação Tecnológica. São Paulo : ANPEI, 2011. v. 11.

Quintella, C. M.; MEIRA, M.; Araújo, E. M. P.; David, J. P. Identificação de substâncias aromáticas puras ou em formulação por espectrofluorimetria e quimiometria. In: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ 2011), 2011, Florianópolis. 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.

Patente "Método de identificação de substâncias, puras ou em formulações, através de análise espectral e quimiometria" (protocolo número 011100001121) depositada no INPI em 23/12/2010.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, A.; BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I.; VALENTI, K. ; KADRI, M.; GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; MARIOTTE, A.; GHEDIRA, K.; LAPORTE, F.; FRANCA, M.; GHEDIRA, L. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*: Confirmation by microarray expression profiling. **Chemico-Biological Interactions**. v.165, p. 1–13, 2007.

AGARWAL, C.; TYAGI, A.; AGARWAL, R. Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells . **Molecular Cancer Therapeutics**. v. 5, p. 3294-3302, 2006

ALBARICI, T.R.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; PIRANI, J. R. **Química Nova**. v.33, p. 2130-2134, 2010.

ANGELO P.M.; JORGE N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.66, n.1, p. 1-9, 2007.

ARAÚJO, M. C. U.; SALDANHA, T. C. B.; GALVAO, R. K. H.; YONEYAMA, T.; CHAME, H. C.; VISANI, V. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 57, n. 2, p. 65–73, 2001.

ATVARS, T. D. Z. & MARTELLI, C. **Espectroscopia eletrônica de absorção**. Disponível em <http://chemkeys.com/en/2002/02/20/electronic-absorption-spectroscopy/>. Acessado em 10/03/2011.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. 1ª ed. UFV, 2007, 189p.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**. v.25, n.5, p. 856-65, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S; BRUNS, R. E. 25 anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**. v. 29, n.6, p. 1401-1406, 2006

BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Aplicação de métodos de calibração multivariada para a determinação simultânea de riboflavina (VB2), tiamina (VB1), piridoxina (VB6) e nicotinamida (VPP). **Química Nova**. v.30, n.7, p. 1638-43, 2007.

BASS, A. B. M. S. **Conceitos Fundamentais em Espectroscopia**. Disponível em <http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/article1.php?u=Y29uY2VpdG9zLWZ1bmRhWVudGFpcy1lc3BIY3Ryb3Njb3BpYQ==> Acessado em 20/12/2010.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas, **Alimentação e Nutrição**. v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. 1ª ed. John Wiley & Sons, New York, 1997.

BOOKSH, K. E KOWALSKI, B., Theory of analytical chemistry. **Analytical Chemistry**. v.66, p. 782 A – 791 A, 1994.

BORDE, V.U.; PANGRIKAR, P.P.;TEKALE, S.U. Gallic Acid in Ayurvedic Herbs and Formulations. **Recent Research in Science and Technology**. v. 3, n.7, p. 51-54, 2011.

BRERETON, R.G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**. v.125, p. 2125, 2000.

BRITO, A.R.M.S; BRITO, A.A.S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 39, n. 1, p. 53-67, 1993

CATTELL, R.D. The scree test for the number of factors. **Multivariate Behavioral Research**. v. 1, p. 245-276, 1966.

CHANG, W.C.; HSIEH, C. H.; HSIAO, M. W.; LIN, W.C.; HUNG, Y. C.; YE, J. C. Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. **Taiwan Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 49, n.4, p.419-24, 2010.

CHAVES, M.H. Plantas medicinais: importância e desafios. *Sapiência*. v.3, n. 10, 2006.

CHEN, J. H.; SHAO, Y.; HUANG, M. T.; CHIN, C. K.; HO, C. T. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. **Cancer Letters**. v. 108, p. 211–214, 1996.

CHIANG, L.C.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; NG, L.T.; LIN, C.C. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*. **Antiviral Research**. v. 55, n. 1, 53–62, 2002.

CHITARRA, M. I. F & CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças, fisiologia e manuseio**. 2ª ed., Lavras. UFLA, 2006, 786 p.

CHUNG, T. W.; MOON, S. K.; CHANG, Y. C.; KO, J. H.; LEE, Y.C.; CHO, G.; KIM, S. H.; KIM, J. G.; KIM, C.H.; Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. **The FASEB Journal** .v. 18, n. 14, p. 1670-1681, 2004

CLARK, G. S. Vanillin. **Perfumer Flavorist**. v. 15, p. 45-54, 1990.

COMBET, E.; EL MESMARI, A.; PRESTON, T.; CROZIER, A.;MCCOLL, K. E. Dietary phenolic acids and ascorbic acid: Influence on acid-catalyzed nitrosative

chemistry in the presence and absence of lipids. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 48, n. 6, p. 763-771, 2010.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 481, 2007.

ELDAHSHAN, O. A., Isolation and structure elucidation of phenolic compounds of carob leaves grow in Egypt. **Current Research Journal of Biological Sciences**. v. 3, p. 52-55, 2011.

ESHBAKOVA, K.; BAHANG, A.; AISA, H. A. Constituents of *Apocynum venctum*. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 46, n. 6, p. 974-975, 2011.

ETZENHUSER, B.; HANSCH, C.; KAPUR, S.; SELASSIE, C. D. Mechanism of Toxicity of Esters of Caffeic and Dihydrocaffeic Acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.9, n. 12, p.199-209, 2001.

FAYARD, B.; BIANCHI, F.; DEY, J.; MORENO, E.; DJAFFER, S.; HYNES, N.E.; MONARD, D. The Serine Protease Inhibitor Nexin-1 Controls Mammary Cancer Metastasis through LRP-1-Mediated MMP-9 Expression. **Cancer Research**. v. 69, n. 14, p. 5690-5698, 2009.

FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B. G.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. **Eclética Química**. v. 27, p. 77, 2002.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FIUZA, S. M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L. J.; GIRAO DA CRUZ, M.T.; CORDEIRO, M. N.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M. P. M. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 3581–3589. 2004

FOGO, J. C. Estatística Multivariada 2. Disponível em: http://www.ufscar.br/~des/docente/fogo/EMult_2/arquivos/EMult2.pdf. Acesso em: 12 jan. 2011.

FORINA, M.; LANTERI, S.; CASALE, M. Multivariate calibration. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 61-93, 2007.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C.; MARQUES, M.P.M. New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols **Medicinal Research Reviews**. v. 26, p. 747-766, 2006.

GUTIERREZ-CORONADO, M. A.; TREJO-LOPEZ, C.; LARQUE-SAAVEDRA, A. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 36, n. 8, p. 563-565, 1998.

- HAYAT, S & AHMAD, A. **Salicylic acid - A plant Hormone**. Springer. 2007, 401 p.
- HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, n. 1, p. 572-584, 2002.
- HEINKE, R.; FRANKE, K.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. A.; ALI, N. A. A., SCHMIDT, J., **Phytochemistry**, v. 72, p. 929–934, 2011.
- HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, v.102, p. 196-202. 1980.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Bookman, Porto Alegre, 2009, 1056 p.
- HOPKE, P.K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, p. 365-377, 2003.
- HOSTETTMANN, K & MARSTON, A. The Search for New Drugs from Higher Plants. **CHIMIA: International Journal for Chemistry**, v. 61, p. 322-326, 2007.
- INOUE, M.; SUZUKI, R.; SAKAGUCHI, N.; LI, Z.; TAKEDA, T.; OGIHARA, Y.; JIANG, B. Y.; CHEN, Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.18, n. 11, p.1526-1530, 1995.
- ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 4, p. 433– 446, 2001.
- ITO, J. A. Técnicas espectroscópicas em Biofísica. **Caderno de Física da UEFS**. v. 03, n. 01, p. 21-29, 2004.
- JAIKANG, C.; CHAIYASUT, C.; NARONGCHAI, P.; NIWATANANUN, K.; NARONGCHAI, S.; KUSIRISIN, W. Inhibitory effects of caffeic acid ester analogues on free radicals and human liver microsome CYP1A2 activities. **Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 99-105, 2011.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**,: 5a ed. Prentice Hall, New Jersey, 2002. 767p.
- KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; KOKEN, T.; SERTESER, M.; AKTEPE, F.; ERKASAP, S.; The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**. v. 183, n. 1-3, p. 133-142, 2003.
- KAISER, H.F., 1958. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**. v. 23, n. 3, p.187-200, 1958.
- KAMPA, M.; ALEXAKI, V. I.; NOTAS, G.; NIFIL, A. P.; NISTIKAKI, A.; HATZOGLU, A.; BAKOGEORGOU, E.; KOUIMTZOGLU, E.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. **Breast Cancer Research**. v. 6, p. R63–R74, 2004.

KANEUCHI, M.; SASAKI, M.; TANAKA, Y.; SAKURAGI, N.; FUJIMOTO, S.; DAHIYA, R. Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. **International journal of oncology**. v. 22, n. 1, p. 159-164, 2003.

KARAMAĆ, M.; BUCIŃSKI, A.; PEG, R.B.; AMAROWICZ, R. Antioxidant and Antiradical Activity of Ferulates, **Czech Journal Food Science**. v. 23, n. 2, p. 64–68, 2005.

KAUR, G.; ROBERTI, M.; RAUL, F.; PENDURTHI, U. R. Suppression of human monocyte tissue factor induction by red wine phenolics and synthetic derivatives of resveratrol. **Thrombosis Research**. v. 119, n. 2, p. 247-256, 2007.

KENEDYN, A. R. Chemopreventive Agents: Protease Inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 78, n. 3, p. 167-209. 1998.

KESSLER, M.; UBEAUD, G.; JUNG, L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 55, n. 1, p.131-142, 2003.

KIM, H.Y.; PARK, J.; LEE, K.H.; LEE, D.U.; KWAK, J.H.; KIM, Y.S.; LEE, S. M. Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. **Toxicology**. v. 282, n. 3, p. 104–111, 2011.

KIRIACHEK, S. G.; AZEVEDO, L. C. B.; PERES, L. E. P.; LAMBAIS, M. R. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 33, n. 1, p. 1-16. 2009.

KROES, B. H.; BERG, A. J. J. VAN DER; UFFORD, H. C. Q. VAN; DIJK, H. VAN; LABADIE, R. P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Médica**. v. 58, n. 6, p. 499-504, 1992.

KROOW, P. e WILLIAMSON, G. Polyphenols: dietary components with established benefits to health? **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 85, n. 8, p. 1239–1240, 2005.

KUMAR, A. & KANWAR, S. S. Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 2162–2167, 2011.

LEAL, E. S.; OKADA, F. M.; ZAMORA, P. P. Caracterização físico-química de queijo prato por espectroscopia no infravermelho e regressão de mínimos quadrados parciais. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1621-1625, 2008.

LEE, J.; KIM, N. H.; NAM, J. W.; LEE, Y. M.; JANG, D. S.; KIM, Y. S.; NAM, S. H.; SEO, E-K.; YANG, M. S.; KIM J. S. **Archives of Pharmacal Research**. v. 33, p. 1317-1323, 2010.

LEE, Y. J.; LIAO, P. H.; CHEN, W. K.; YANG, C. Y. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. **Cancer Letters**. v. 153, p. 51–56, 2000.

LEE, Y. S.; KANG, I. J.; WON, M. H.; LEE, J.Y.; KIM, J. K.; LIM, S. S. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1beta by hispidin derivatives isolated from the fruiting body of *Phellinus linteus*. **Natural Product Communications**. v. 5, n. 12, p.1927-1930, 2010.

LEMOES, V.S; FREITAS, M.R.; MULLER. B; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.; CORTES, S.F: Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. **European Journal of Pharmacology**. v.386, n. 1, p. 41-46, 1999.

LI, N. G.; SHI, Z.H.; TANG, Y. P.; LI, B. Q.; DUAN, J.A. Highly Efficient Esterification of Ferulic Acid Under Microwave Irradiation. **Molecules**. v. 14, p. 2118-2126, 2009.

LIN, S.Y.; TSAI, S.J.; WANG, L. H.; WU, M. F.; LEE, H. Protection by quercetin against cooking oil fumes-induced DM damage in human lung adenocarcinoma CL-3 cells: role of C. **Nutrition and cancer**. v. 44, p. 95-101, 2002.

LO, H. H.; CHUNG, J. G. The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora. **Anticancer Research**. v. 19, n. 1A, p. 133-139, 1999.

LÖSER, B.; KRUSE, S. O.; MELZIG, M. F.; NAHRSTEDT, A. Inhibition of Neutrophil Elastase Activity by Cinnamic Acid Derivatives from *Cimicifuga racemosa*, **Planta Medica**. v. 66, n. 8, p. 751-753, 2000.

LOPES, W. A. & FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**. v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MA, C.M.; ABE, T.; KOMIYAMA, T.; WANG, W.; HATTORI, M.; DANESH TALAB, M. Synthesis, anti-fungal and 1,3-β-D-glucan synthase inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 19, p. 7009-14, 2010.

MAAS, M.; PETEREIT, F.; HENSEL, A. **Molecules**. v. 14, p. 36-45, 2009.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**. v. 27, n. 1-2, p. 33-39, 2008.

MAHAJAN, A.; PAI, N. **Journal Chemical and Pharmaceutical Research**. v. 2, p. 97-103, 2010.

MAHMOUD, NAJJIA. N.; CAROTHERS, A. M.; GRUNBERGER, D.; BILINSKI, R. T.; CHURCHILL, C. M.; NEWMARK, H. L.; BERTAGNOLLI, M. M. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. **Carcinogenesis**. v. 21, p. 921-92, 2000.

MANACH, C.; MAZUR, A. e SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**. v.16, n. 1, p. 77-84, 2005.

- MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. **Multivariate analysis**. London: Academic, 1979.
- MARTENS, H. & NAES, T. **Multivariate Calibration**. John Willey & Sons, Ltd, Chichester, 1996, 438p.
- MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M.A.Z. Análise exploratória em química analítica com o emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**. n. 06, p. 38-50, 2003
- MEIRA, M.; DAVID, J.M; DAVID, J.P.; ARAÚJO, S.V.; REGIS, T.L.; GIULIETTI, A.M.; QUEIRÓZ, L.P. Constituintes químicos de *Ipomoea subincana* Meisn. (Convolvulaceae). **Química Nova**. v. 31, n. 4, p. 751-754, 2008.
- MELZIG, M. F; TRAN, G.D.; HENKE, K.; SELASSIE, C.D.; VERMA, R.P. Inhibition of neutrophil elastase and thrombin activity by caffeic acid esters. **Pharmazie**, v.60, n. 11, p. 869-73, 2005.
- MENNEN, L. I.; WALKER, R.; BENNETAU-PELISSERO, C. e SCALBERT, A. Risks and safety of polyphenol consumption. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 8, n. 1, p. 326S-329S, 2005.
- MIRZOEVA, O. K.; YAQOUB, P.; KNOX, K. A.; CALDER, P. C. Inhibition of ICE-family cysteine proteases rescues murine lymphocytes from lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis. **FEBS Letters**. v. 396, p. 266-270, 1996.
- MOLINSKI, T. F. Nanomole-scale natural products discovery. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**. v. 12, n. 2, p. 197-206, 2009.
- MOLINSKI, T. F. Microscale methodology for structure elucidation of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 21, n. 6, p. 819-826, 2010a.
- MOLINSKI, T. F. NMR of natural products at the 'nanomole-scale'. **Natural Product Reports**. v. 27, n. 3, p. 321-329, 2010b.
- MOREIRA, A. V. B. & MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**. v. 17, n. 4, p. 411-424. 2004.
- MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRAO, M. F.; FERREIRA, M. M. C.. Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química Nova**. v. 30:2, p. 346-50, 2007.
- MOURA, M. C. S.; LOPES, A. N. C.; MOITA, G. C.; MOITA NETO, J. M.. Estudo Multivariado de Solos Urbanos da Cidade de Teresina. **Química Nova**. v. 29, n. 3, p. 429-435, 2006.
- MOYER, R.A.; HUMMER, K.E.; FINN, C.E.; FREI, C.E.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus and Ribes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, n. 3, p. 519-525, 2002.

NACZK, M. & SHAHIDI, F. Extration and analysis of phenolics in food. **Journal of Cromatography A**. v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NADAL, S. R.; CALORE, E. E.; MANZIONE, C. R.; ASSAKAWA, M. A.; FELIX, L. M.; HORTA, S. H. C. Incidência de Neoplasias Intraepiteliais Anais em Doentes HIV-Positivos Portadores de Condilomas Acuminados, Comparando Período Anterior e Posterior aos Inibidores da Protease. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. v. 25, n.3, p. 217-222. 2005.

NIWA, T.; DOI, U.; KATO, Y.; OSAWA, T. Antioxidative Properties of Phenolic Antioxidants Isolated from Corn Steep Liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n. 1, p. 177-182, 2001.

ORTIZ-ANDRADE, R.R.; GARCIA-JIMENEZ, S.; CASTILLO-ESPANA, P.; RAMÍREZ-AVILA, G.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; ESTRADA-SOTO, S. α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An antihyperglycemic agent. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, n.1, p. 48-53, 2007.

ORTOBOTANICO. Serre delle piante utili. Disponível em http://www.ortobotanico.unina.it/p_aree_espositive/SerrePianteUtili.htm. Acesso em dez. 2010.

PANERO, F. S.; DA SILVA, H. E. B. Application of exploratory data analysis for the characterization of tubular wells of the North of Brazil. **Microchemical Journal**. v. 88, n. 2, p. 194, 2008.

PARK, W. H.; KIM, S. H.; KIM, C. H. A New Matrix Metalloproteinase-9 Inhibitor 3,4-Dihydroxycinnamic Acid (Caffeic Acid) from Methanol Extract of *Euonymus alatus*: Isolation and Structure Determination. **Toxicology**, v. 207, n. 3, p. 383-390, 2005.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 1ª ed. Cengagel Learning. 2010, p. 716.

PEARSON, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. **Philosophical Magazine**, v. 2, n. 6. P. 559-572, 1901.

PELEG, H., BODINE, K.K., NOBLE, A.C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PIGNATELLI P.; PULCINELLI, F.M.; CELESTINI, A.; LENTI, L.; GHISELLI, A.; GAZZANIGA, P. P.; VIOLI, F. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, p. 1150-1155, 2000.

PIMENTEL, M. F.; GALVAO, R. K. H.; ARAUJO, M. C. U. Recomendações para calibração em Química Analítica parte 2: calibração multianalito. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 462-467, 2008.

PINTO, M. R.; TAKAHATA, Y.; ATVARIS, T. D. Z. Photophysical properties of 2,5-diphenylthiazolo[5,4]thiazole. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 143, n. 2-3, p. 119-127, 2001

POWERS, J.C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. **Chemical Reviews**. v. 102, n. 12, p. 4639-4750, 2002.

PUNITHAVATHI, V.R.; PRINCE, P.S.; KUMAR, R.; SELVAKUMARI, J. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 650, n. 1, 465-471, 2011.

PUTRA, D. P.; ROZA, R.; DACHRIYANUS, D; ALLEN, Y.; ARBAIN, D. Cinnamic Acid Derivate From the Bark of *Lerchea bracteata* Val. **Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi**. v.12, n. 2, p. 96-99, 2007.

RAGHAVENDRA, M.P; KUMAR, P.R.; PRAKASH, V. Mechanism of inhibition of rice bran lipase by polyphenols: a case study with chlorogenic acid and caffeic acid. **Journal of Food Science**. v. 72, n. 8, p. E412-9, 2007.

RAMIREZ-LÓPEZ, L.; DEMATTÊ, J. A. M.; TERRA, F. S.; BORTOLETTO. Sensoriamento remoto no mapeamento digital da fertilidade do solo: solucionando um grande inconveniente em agricultura de precisão. In: **XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR**, Natal-RN. INPE, p. 363-370, 2009.

RAO, C.V.; DESAI, D.; RIVENSON, A.; SIMI, B.; AMIN, S.; REDDY, B. S.; Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. **Cancer Research**. v. 55, p. 2310–2315, 1995.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPAND, V. V. . Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

REINHECKEL, T.; GOCHEVA, V.; PETERS, C.; JOYCE, J.A. Roles of Cysteine Proteases in Tumor Progression: Analysis of Cysteine Cathepsin Knockout Mice in Cancer Models in **The Cancer Degradome: Proteases and Cancer Biology**. Springer New York. p. 281-304. 2008. 926p.

RIBEIRO, J. M.; FLORÊNCIO, L. P. Bloqueio farmacológico do sistema reninaangiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 7, n. 3, 293-302, 2000.

RIBEREAU-GAYON, P. **Les Composés Phénoliques des Vegetaux**. Paris: Dunod, 1968, 254p.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, metallic effects, and safety. **Annual review of nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; TROMBETTA, D.; PROTEGGENTE, A.; DE PASQUALE, A.; UCCELLA N.; BONINA, F. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79, n. 3, p. 476-480, 1999.

SALDANHA, T.C.B; ARAÚJO, M. C. ; BARROS NETO, B. Simultaneous multicomponent analysis by UV-Vis spectrophotometry. **Química Nova**. v. 22, n.6, p. 847-53, 1999.

SAMISTRARO, G.; MUNIZ, G.I.B.; PERALTA-ZAMORA, P; CORDEIRO, G. A.; Previsão das Propriedades Físicas do Papel *Kraft* por Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais. **Química Nova**. v. 32, n. 6, 1422-1425, 2009.

SANTOS, S. C. O.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; LÓPEZ, J. A.; ZACHARIAS, F.; GUEDES, M. T. B.; LIMA, F. W. M. Inhibition of *Haemonchus contortus* hemoglobinolytic activities by N-alkyl ferulates from *Maproumea guianensis*. **Abstracts / Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 128, p. 211–347, 2009.

SANTOS, G. L. & PEREIRA, J. A. Utilização da Análise de Componentes Principais em Termografia. **Revista Saber Acadêmico / União das Instituições Educacionais do Estado de São Paulo**. v. 10, p. 15-23, 2010.

SCREMIN, M. A. A. **Método para a Seleção do Número de Componentes Principais com Base na Lógica Difusa**. Florianópolis, 2003, 124p. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção Universidade Federal de Santa Catarina.

SEGUENI, N.; ALABDUL, MAGID A.; DECARME, M.; RHOUATI, S.; LAHOUEL, M.; ANTONICELLI, F.; LAVAUD, C.; HORNEBECK, W. Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from a propolis sample from algeria. **Planta Medica** v. 77, n. 10, p. 999-1004, 2011.

SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos. **Química Nova**. v. 23, n. 4, p. 547-556, 2000.

SIERRA, M. M. S.; GIOVANELA, M.; DONARD, O. F. X. ; BELIN, C. A utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: evolução e perspectivas. **Química Nova**. v. 19, n. 3, p. 294-301, 1996.

SILVA, K. R. B. **Optodos para determinação de SO₂ e O₂**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Departamento de Química. 2007, 107p.

SILVA-LOPEZ, R. E.; Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**. v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª. ed., Editora LTC, Rio de Janeiro, 2006, 508p.

SHELTON, S. B.; KRISHNAMURTHY, P.; JOHNSON, G. V. W. Effects of cyclin-dependent kinase-5 activity on apoptosis and tau phosphorylation in immortalized mouse brain cortical cells. **Journal Neuroscience. Research.**, v. 76, n. 1, p. 110-120, 2004.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v. 40, n. 2, p. 92-100, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIENAM, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Tradução: Ignez Caracelli *et al.* 5ª ed. Bookman: Porto Alegre, 2002, 1024p.

SMITH, A. F. M. & VERDINELLI, I. Uma nota sobre Designs Bayes para Inferência utilizando um modelo hierárquico linear. **Biometrika**. 67, 613-619, 1980.

SOLOMONS, T. W. G. & FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9ª ed. John Wiley Sons Inc. 2007, 1280p.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? **Comptes Rendus Biologies**. v. 327, p. 649-662, 2004.

SOUZA, A. M. **Monitoração e ajuste de realimentação em processos produtivos multivariados**. Tese. Doutorado Engenharia de Produção – Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

SOUZA, M. M.; OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, M.; FURLONG, E. B.. Avaliação da Atividade antifúngica de Extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, n. 3, p. 680-685, 2010.

STANIFORTH, V.; HUANG, W.C.; ARAVINDARAM, K.; YANG, N. S. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry**. article in press, 2011.

TANAKA, T.; KOJIMA, T.; KAWAMORI, T.; WANG, A.; SUZUI, M.; OKAMOTO, K.; MORI, H. Inhibition of 4-Nitroquinoline-1-Oxide-Induced Rat Tongue Carcinogenesis by the Naturally Occurring Plant Phenolics Caffeic, Ellagic, Chlorogenic and Ferulic Acids. **Carcinogenesis**. v. 14, n. 7, p. 1321-1325, 1993.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; BA, G. N.; MATHÉ, G. "Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?" **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 56, n. 4, p. 200-207, 2002.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 5, n. 9, p. 785-799, 2006.

VERMA, M. L.; AZMI, M.; KANWAR, S. S. Synthesis of ethyl acetate employing celite immobilized lipase of *Bacillus cereus* MTCC-8372. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. v. 56, p. 229–242, 2009

VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. UFSM, CCNE, 2005. 215p.

VILLANUEVA-COUOH, E.; ALCÁNTAR-GONZÁLEZ, G. ; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; SORIA-FREGOSO, M.; LARQUE-SAAVEDRA, A. Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de [*Chrysanthemum morifolium*(Ramat) Kitamura] en Yucatán. **Revista Chapingo Serie Horticultura**. v. 15, n. 2. p. 25-31, 2009.

VINADÉ, M. E. C.; VINADÉ, E. R. C., **Métodos espectroscópicos de análise quantitativa**. 1ª ed. UFSM. 2005. 272p.

VOISIN-CHIRET, A.S.; BAZIN, M.A.; LANCELOT, J.C.; RAULT, S. Synthesis of new L-ascorbic ferulic acid hybrids. **Molecules**. v.12, p. 2533-2545, 2007.

WANG, F.; YANG, L.; HUANG, K.; LI, X.; HAO, X.; STÖCKIGT, J.; ZHAO, Y. Preparation of ferulic acid derivatives and evaluation of their xanthine oxidase inhibition activity. **Natural Product Research**. v. 21, n. 3, p. 196-202, 2007.

ZACHARIE B., CONNOLLY T.P., PENNEY C.L. A Simple one-step Conversion of Carboxylic Acids to Esters Using EEDQ. **Journal of Organic Chemistry**. v. 60, n. 21, p. 7072-7074, 1995.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**. v.109, p. 691–702, 2008.