

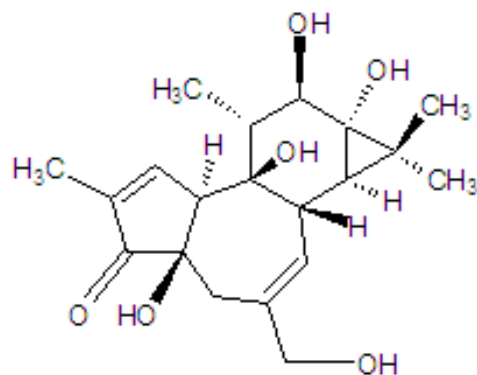


FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

Avaliação do teor de ésteres de *phorbol* nas sementes das variedades híbridas de *Jatropha curcas* L.



Autor: Muianga, Egídio

Maputo, Abril de 2017

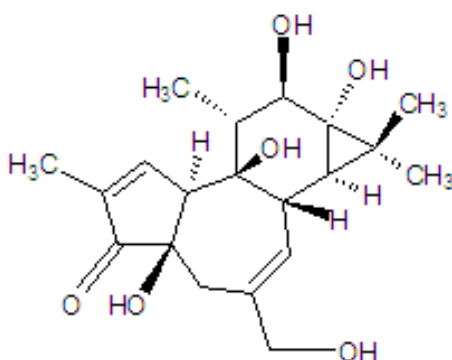


FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

Avaliação do teor de ésteres de *phorbol* nas sementes das variedades híbridas de *Jatropha curcas* L.



Autor: Muianga, Egídio

Supervisores: Professor Doutor Victor Skripets

dr. Jaime Mandlate

dr. Hercílio Zimila

Maputo, Abril de 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Amélia António Muianga e Amad António Mussagy

Pela educação, amor, paciência e companheirismo durante a minha escolaridade

Aos meus irmãos

Célia Aldora Muianga

Gabriel Augusto Nguambe

Paloma Francisco Madeira

AmadMussagy

Said Mussagy

MariamoMussagy

Fátima Mussagy

Pela atenção e encorajamento que me proporcionaram

A todos os parentes e amigos que, directa ou indirectamente, apoiaram para materialização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao altíssimo Deus pelo dom da vida, pela saúde, protecção e acima de tudo, pelo direccionamento que me tem proporcionado até á concretização deste sonho.

Um especial agradecimento vai aos meus supervisores Professor Doutor Victor Skripets, dr. Hercílio Zimila e dr. Jaime Mandlate pela dedicação, ensinamento, paciência e todo o apoio prestado para a realização deste trabalho.

O meu muito obrigado aos professores Motoyuki Nakao e Yoko Ishihara pelos conhecimentos que me transmitiram que foram cruciais na realização deste trabalho.

Ao Eng^oErcídio Nhachengo, pela ajuda e apoio em todos os momentos e disponibilidade imediata.

Às coordenadoras Aiko Yamashita e Higashi Marika da Agência Japonesa de Cooperação Internacional (JICA) pela disponibilização do laboratório para análise das amostras e pelo fornecimento de alguns materiais que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Sr. João Macuácuva o meu muito obrigado pela companhia, ajuda e pela consideração para comigo.

Aos colegas, dr. Alberto Nhatave, dr. Agnaldo Luís, dr. Isménio Nhaca, Sérgio Chilengue, António Elija, dr. Erasmo Domingos, Tercina Ngovene, José Machava, João Sambo e dr. Rogério Chivodze, vai o meu muito obrigado pela amizade proporcionada e pela partilha de conhecimentos durante o período de formação.

A todos os funcionários do Departamento de Química e a todos que não foram mencionados neste trabalho que directa ou indirectamente contribuíram para a minha formação.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Egídio Muianga, declaro por minha honra que o presente trabalho foi da minha autoria e que, para a sua realização, servi-me dos conhecimentos adquiridos ao longo dos anos de formação e de consultas das bibliografias citadas ao longo do trabalho.

O autor

(Egídio Muianga)

RESUMO

A expansão da cadeia de produção da *Jatropha curcas* L. demanda o desenvolvimento de genótipos com características que atendam às necessidades dos sectores produtivos, social, ambiental e tecnológico no país. A presença dos ésteres de *phorbol* em diferentes partes da planta levanta preocupações profissionais e ecotoxicológicas devido á sua toxicidade. Considerando o exposto, neste trabalho avaliou-se o teor de ésteres de *phorbol* no albúmen e na casca interna das variedades híbridas de *Jatropha*.

A extracção dos ésteres de *phorbol* foi feita por maceração com metanol sob agitação em Vortex a 1800 rpm e magnética a 600 rpm durante 15 minutos, para a casca interna e albúmen, respectivamente. Os extractos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com o detector de Ultravioleta Visível (UV-Vis) a 282 nm.

O teor de ésteres de *phorbol* na casca interna varia de 2.14-2.91mg/g nas variedades fêmeas, 1.73-2.82 mg/g nas variedades híbridas e 0.60-1.54 mg/g nas variedades machos. No albúmen, os teores de ésteres de *phorbol* variam entre 0.46-1.22 mg/g nas variedades fêmeas, 0.29-1.04 mg/g nas variedades híbridas e 0.28-0.96 mg/g variedades machos.

Os resultados mostraram que os teores dos ésteres de *phorbol* nas variedades híbridas na casca interna e no albúmen tendem à média aritmética do teor dos seus genitores masculino e feminino, o teste ANOVA unimodal ilustra um valor de $p < 0.05$ na casca interna e no albúmen. Portanto, aceita-se a hipótese alternativa que afirma haver diferenças significativas entre as médias nas variedades estudo.

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS	ii
DECLARAÇÃO DE HONRA	iii
RESUMO.....	iv
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Relevância do Estudo.....	2
II. OBJECTIVOS	3
2.1. Objectivo geral.....	3
2.2. Objectivos específicos	3
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Localização e caracterização do distrito de Boane (local de amostragem)	4
3.2. Descrição botânica de <i>Jatropha curcas</i> L.....	5
3.2.1. Usos de <i>Jatropha curcas</i> L.	6
3.3. Melhoramento genético de espécies de <i>Jatropha curcas</i> L. por hibridização.....	7
3.4. Toxicidade das sementes.....	8
3.4.1. Factores antinutricionais	8
3.4.2. Factores tóxicos	9
3.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	11
3.5.1. Análise qualitativa	15
3.5.2. Análise quantitativa	16
3.5.3. Validação do método analítico.....	16

IV. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Materiais	20
4.2. Equipamentos.....	20
4.3. Reagentes	21
4.4. Procedimentos experimentais	21
4.4.1. Colheita da amostra.....	21
4.4.2. Extracção de ésteres de <i>phorbol</i>	22
4.4.3. Preparação de curva de calibração	22
4.4.4. Análise dos extractos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	23
V. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	24
5.1. Linearidade	24
5.2. Limites de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD)	25
5.3. Selectividade	25
5.4. Precisão	26
5.5. Taxa de recuperação	26
5.6. Tratamento estatístico dos dados	26
5.6.1. ANOVA unimodal	27
5.7. Avaliação de teores de DHPB nas 3 variedades em estudo de <i>Jatropha curcas</i> L.....	28
5.7.1. Comparação dos teores de DHPB entre variedades progenitoras fêmeas e progenitoras machos e híbridas na casca interna e albúmen.....	30
5.7.2. Comparação das variedades híbridas em relação á razão dos frutos e DHPB na casca interna e no albúmen	32

VI. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	33
6.1. Conclusões	33
6.2. Recomendações.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXOS.....	a

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ATP	Adenosina trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DHPB	<i>2-deoxy-16-hydroxyphorbol-4'- [12',14'-butadienyl] -6'- [16',18',20'nonatrienyl] - bicyclohexane- (13-O) -2'- [carboxylate] - (16-O) -3'- [8'-butenoic-10'] ate</i>
EMAG	Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
CLAE	Cromatografia líquida de alta aficiência
IP₃	Inositol trifosfato
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
NO_x	Óxidos de Nitrogénio
ODS	Octadecilsilano
PMA	<i>phorbol-12-miristato-13-acetato</i>
PKC	Proteína cinase C
PLC	Enzima fosfolipase C
PIP₂	Fosfatidil inositol-bisfosfato
RMN	Ressonância magnética nuclear
S	Desvio padrão
SO_x	Óxidos de enxofre
RSD	Desvio padrão relativo
T_R	Tempo de retenção
\bar{x}	Média aritmética das medições

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de localização do local da amostragem no distrito de Boane.....	5
Figura 2. Partes constituintes de <i>Jatropha curcas</i> L.....	6
Figura 3. Estrutura básica de phorbol (tigliano)	10
Figura 4. Fórmulas estruturais dos ésteres de phorbol isolados a partir do óleo da semente de <i>Jatropha curcas</i> L.	11
Figura 5. Componentes de um equipamento CLAE.....	12
Figura 6. Componentes de um sistema cromatográfico.....	20
Figura 7. Campos de Boane (A); Sementes armazenadas (B).....	21
Figura 8. Divisão das três partes constituintes da semente de <i>Jatropha curcas</i> L.....	21
Figura 9. Gráfico da curva de calibração para a determinação dos ésteres de phorbol na casca interna	24
Figura 10. Gráfico da curva de calibração para a determinação dos ésteres de phorbol do albúmen	24
Figura 11. Cromatograma dos picos de factores de <i>Jatropha</i> C1-C6 (HPLC-UV, $\lambda = 280$ nm) ..	25
Figura 12. Teores DHPB nas variedades progenitoras fêmeas, machos e híbridas na casca interna	30
Figura 13. Teores DHPB nas variedades progenitoras fêmeas, machos e híbridas no albúmen...30	
Figura 14. Comparação das variedades híbridas em relação à razão dos frutos e DHPB na casca interna e no albúmen.....	32

ÍNDICE DOS ANEXOS**ANEXO A**

Figura 1. Cromatograma de linha de base para análise da curva padrão.....	a
Figura 2. Cromatograma do Padrão DHBP na concentração de 5 µg/mL.....	a
Figura 3. Cromatograma do Padrão DHBP na concentração de 10 µg/mL.....	b
Figura 4. Cromatograma do Padrão DHBP na concentração de 25 µg/mL.....	b
Figura 5. Cromatograma do Padrão DHBP na concentração de 50 µg/mL.....	c

ANEXO B

Tabela 1. Melhores variedades híbridas produzidas no Bloco D.....	c
Tabela 2. Razão entre # total de frutos e DHPB (mg/g) na casca interna e albúmen	d
Tabela 5. Resultados de cálculos de LOD e LOQ para o albúmen.....	d

ANEXO C

Figura 1. Teste de normalidade na variedade progenitora fêmea 1052AF na casca interna	e
Figura 2. Teste de normalidade na variedade progenitora fêmea 1052AF no Albúmen	e

ANEXO D

One-way ANOVA: 5DH, 7DH, 31DH para casca interna	f
One-way ANOVA: 5DH, 7DH, 31DH para seed	f

I. INTRODUÇÃO

A produção de energia sempre representou uma preocupação para investigadores assim como para políticos (Dermibas, 2009). O mundo necessita de energia barata e limpa para alimentar o crescimento socioeconómico sem prejudicar o ambiente. Actualmente a maioria da energia globalmente usada provém dos combustíveis fósseis (petróleo, carvão e gás natural), representando mais de 80% do total das fontes de energia no mundo (Dermibas, 2008).

O uso de petróleo como base da matriz energética mundial vem-se tornando um problema, uma vez que os seus jazigos estão concentrados em poucas regiões do planeta (Dermibas, 2008). Além disso, há um grave problema da emissão de gases poluentes tais como os compostos aromáticos, CO₂, NO_x, e SO_x que provocam o aquecimento global do planeta.

Em 2008 o mundo sofreu rápidos aumentos nos preços de combustíveis, os quais afectaram os preços de muitas mercadorias e nos anos posteriores os preços diminuíram e afectaram nas taxas de importação mundial face aos anos anteriores (Soetaerte Vandamme, 2011). Por essa razão é necessária a adopção de fontes alternativas para a produção de combustíveis. Tem-se verificado um elevado interesse em biocombustíveis extraídos em plantas oleaginosas, principalmente *Jatropha curcas* L. (Berenchtein, 2012).

Em 2006, o governo Moçambicano lançou a campanha de produção de biocombustíveis que culminou com a elaboração de um estudo de base para a avaliação da viabilidade técnica, socioeconómico e ambiental dos biocombustíveis incluindo a selecção das culturas aplicáveis como matéria-prima (Zilio *et al.*, 2008). Dentre as culturas identificadas como prováveis potenciais matérias-primas (coco, cana-de-açúcar, amendoim e soja) apenas *Jatropha curcas* L. (*Jatropha*) tem sido considerada a mais promissora devido á longevidade, fácil adaptação climática e pelo facto das sementes serem ricas em óleo (35-45%) não comestível mas que pode ser convertido em biodiesel de alta qualidade e esta é uma planta perene que produz por mais de 40 mil anos (Devappa *et al.*, 2012).

1.1. Relevância do Estudo

A presença de ésteres de *phorbol* nos campos de cultivo de *Jatropha curcas* L. levanta preocupação devido à sua toxicidade e exposição a perigos. Ésteres de *phorbol* são considerados os principais componentes tóxicos presentes nas sementes e a sua concentração varia de acordo com a variedade analisada. Os ésteres de *phorbol* para além de promotores de tumor, podem induzir uma elevada diversidade de efeitos biológicos, como efeitos irritantes da pele, diarreias (Goel *et al.*, 2007). Com o aumento do cultivo de *Jatropha curcas* L. e utilização de seus produtos agro-industriais e subprodutos podem aumentar a frequência de contacto das sementes com os seres humanos, animais e outros organismos tornando-se assim prejudiciais à saúde (Devappa *et al.*, 2012).

Torna-se pertinente avaliar os teores de ésteres de *phorbol* em sementes para se garantir a segurança na saúde pública durante o processo produtivo das sementes de *Jatropha curcas* L. A produtividade de *Jatropha curcas* L. varia em função da região, do método de cultivo e da variedade utilizada, bem como da regularidade pluviométrica e fertilidade do solo. O desenvolvimento de culturas com boa produtividade nas condições locais que apresentam baixos teores de ésteres de *phorbol* é um factor importante para ampliar o aproveitamento desta planta. Assim sendo, através deste estudo será possível recomendar as variedades híbridas com baixos teores de ésteres de *phorbol*, garantindo assim maior segurança na produção de biocombustíveis a partir da *Jatropha*.

II. OBJECTIVOS

2.1. Objectivo geral

- Avaliar o teor de ésteres de *phorbol* nas variedades híbridas de *Jatropha curcas* L.

2.2. Objectivos específicos

- Isolar e quantificar os ésteres de *phorbol* presentes no albúmen e na casca internada semente da *Jatropha curcas* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Comparar os teores de ésteres de *phorbol* presentes no albúmen e na casca interna;
- Verificar a influência da hibridização nos teores de ésteres de *phorbol* na casca interna e no albúmen;
- Identificar as variedades híbridas com uma boa razão entre número de frutos e teores de ésteres de *phorbol* no albúmen e na casca interna.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Localização e caracterização do distrito de Boane (local de amostragem)

O distrito de Boane (Figura 1) está localizado a sudeste da província de Maputo, sendo limitado a norte pelo distrito de Moamba, a Sul e Este pelo distrito da Namaacha, e a Oeste pela cidade da Matola e pelo distrito de Matutuíne, dista-se a 30 Km da cidade de Maputo, a uma latitude de 26° 02' 36'' Sul e longitude de 32° 19' 36'' Este. Compreende uma superfície de 815Km². O clima da região é sub-húmido e com deficiência de chuva na estação fria, caracterizado por alternância entre as condições secas, induzidas pela alta pressão subcontinental e as incursões de ventos húmidos do oceano. Vagas de frio podem trazer tempestades violentas e chuvas torrenciais de curta duração.

A temperatura média anual é de 23.7°C verificando-se que os meses mais frios são os de Junho e Julho e os mais quentes Janeiro e Fevereiro. A amplitude térmica anual é de 8.8°C. A humidade relativa média anual é de 80.5%, variando de um valor máximo de 86% em Julho a um valor mínimo de 73.5% em Novembro. A pluviosidade média anual é de 752 mm variando entre os valores médios de 563,6 mm para o período húmido e 43,6 mm no período seco. O período húmido estende-se de Novembro a Março e o período seco de Abril a Outubro (INE, 2009).

O campo de cultivo de *Jatropha* em boane esta subdivida em quatro blocos a saber:

Bloco A – apresenta 0.55 de ha (área de experincia de cruzamento de variedades de origens diferentes);

Bloco B- apresenta 0.34 de ha (área de experiencia do método de cultivo)

Bloco C – apresenta 1.35 de ha (área de experiência intercalar da *Jatropha* com outras variedades alimentares);

Bloco D- apresenta 0.42 de ha (área de cruzamento)

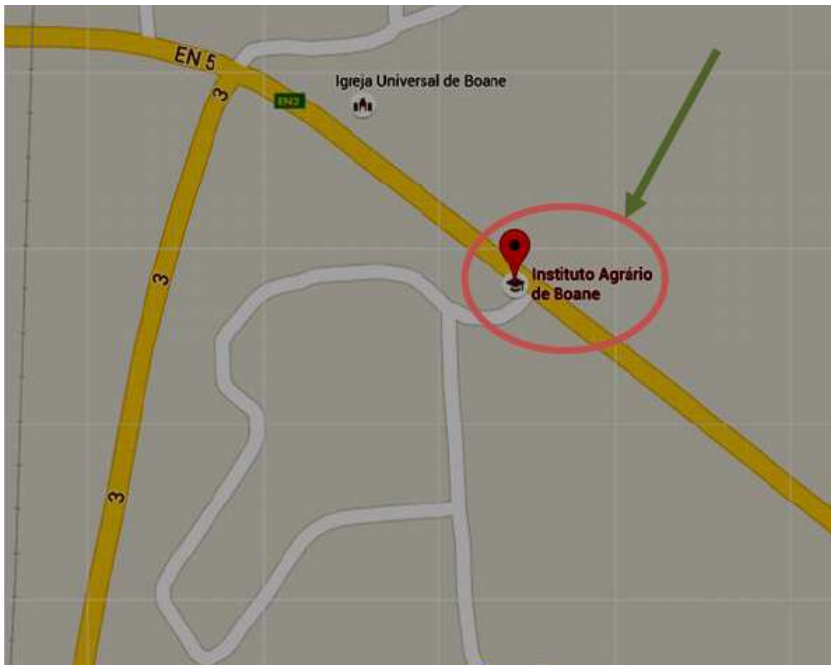


Figura 1. Mapa de localização do local da amostragem no distrito de Boane (INE, 2009)

3.2. Descrição botânica de *Jatropha curcas* L.

O género *Jatropha* é considerado nativo da América Central e do Sul, e pode ser encontrado em África e Ásia. A *Jatropha curcas* L. é uma espécie pertence à família *Euphorbiaceae*. A origem do nome *Jatropha* vem do grego *iatrós* (médico) e *trophé* (alimentos) com utilizações medicinais (Heller, 1996). A planta é popularmente conhecida como: gala-maluco (Moçambique), *physic-nut* (Inglaterra), pinhão-manso ou mundubi-assú (Brasil), *pourghère* (França), *purgeernoot* (Holanda), *Purgiernuss* (Alemanha), purgueira (Portugal), fagiola d'India (Italiano), *safedarand* (Índia), *sabudam* (Tailândia), *bagani* (Costa do Marfim), *butuje* (Nigéria), *makaen* (Tanzânia), *piñoncillo* (México), *tempate* (Costa Rica) e *piñon* (Guatemala) (Heller, 1996).

A *Jatropha curcas* L. (figura 2) é uma planta resistente à seca, capaz de crescer em terrenos marginais não cultivados, embora produza maior quantidade de biomassa sob condições ambientais favoráveis, sendo sensível a condições de frio intenso ou excesso de água. Ocorre em áreas com precipitação a partir de 250 mm por ano, mas a nível mundial é mais abundante em regiões de savana tropical e em climas de monção. A sua altura média é de 4 m, atingindo o máximo de produtividade ao final de 4-5 anos, e tendo uma vida média de 20 anos, podendo atingir 40-50 anos. As flores são pequenas e amarelo-esverdeadas unissexuadas (Semedo *et al.*, 2011).

O seu fruto é uma cápsula inicialmente verde, passando a amarelo, castanho e por fim preto quando atinge o estágio de maturação. As sementes amadurecem 3-4 meses após a floração dependendo do solo e da disponibilidade de água e pode-se obter 0.5 a 12 toneladas por cada hectare de terra de sementes durante um ano (Schubert, 2010). Os frutos contêm normalmente três sementes pretas podendo também ser encontrados 1, 2 ou 4 sementes. A semente, quando seca, possui cerca de 1.5-2cm de comprimento, e 1.0-1.5cm de largura, com tegumento rígido e quebradiço. Debaxo do tegumento existe uma película branca (casca interna) cobrindo a amêndoa (albúmen) branca e oleaginosa contendo o embrião provido de dois largos cotilédones achatados. É composta por 33.5 a 66% de casca e 34 a 67.5% de amêndoa, dependendo da variedade e das condições ecológicas (Nunes, 2007).



Figura 2. Partes constituintes de *Jatropha curcas* L. **A.** Folhas; **B.** tronco com ramos; e **C.** frutos.

3.2.1. Usos de *Jatropha curcas* L.

Várias partes da planta possuem valor medicinal. A seiva possui propriedades cicatrizantes antimicrobianas contra *Staphylococcus Echerichiocoli*. As raízes são consideradas diuréticas e antileucémicas e as folhas podem ser utilizadas para combater doenças de pele (Heller, 1996). As sementes, bem como o óleo retirado destas, são frequentemente usados como purgativo, no tratamento de infecções da pele, hidropisia, paralisia e reumatismo (SBRT, 2006).

O óleo extraído das sementes serve como combustível para máquinas a diesel (biodiesel) lubrificante e para a manufatura de sabão, velas e verniz, não emite fumaça quando queimado, pode ser utilizado para iluminação (Openshaw, 2000).

As variedades não-tóxicas são encontradas no México e podem ser usadas na alimentação animal. Heller (1996) relata que em Cabo Verde, o *Jatropha curcas* L. foi plantado em áreas áridas para controle de erosão do solo.

3.3. Melhoramento genético de espécies de *Jatropha curcas* L. por hibridização

O híbrido é o resultado do cruzamento entre dois progenitores (pais) de linhagens puras, clones, variedades em equilíbrio ou outras populações geneticamente diferentes entre si, possuindo características homogêneas entre si, mas diferentes dos pais (Sabandar, 2010). A hibridação é uma das maneiras mais eficientes de explorar a variabilidade genética existente na maioria das espécies. A Sua importância relaciona-se com a obtenção de heterose que reúne as características desejáveis de ambos os pais como, por exemplo, genes de resistência, que podem ser encontrados em progenitores diferentes (Godoy *et al.*, 2006). No cruzamento dos parentais são melhoradas as características como: área foliar, desenvolvimento do sistema radicular, altura da planta, rendimento, taxa fotossintética, metabolismo celular, tamanho da célula, tamanho do fruto, número de frutos, cor do fruto, manifestação da heterose, maior resistência à seca, pragas e doenças (Divakara *et al.*, 2010).

Todavia, a escolha dos genitores com base em características desejáveis é insuficiente para assegurar a obtenção de progênie com alto potencial genético. É necessário que os genótipos utilizados nos cruzamentos tenham capacidade combinatória em nível expressivo para produzirem, em alta frequência, recombinações favoráveis (Lorencette *et al.*, 2006).

As variedades híbridas têm vantagem de se obter delas rendimentos superiores às dos parentais, mas proporcionam desvantagem, porque os híbridos da primeira geração resultantes do cruzamento entre duas linhas puras, não são usadas para a campanha agrícola posterior, pois na geração seguinte haverá segregação e uma redução acentuada no rendimento. Assim sendo, deve-se obter novas variedades híbridas em cada época de produção, o que envolve custos (Divakara *et al.*, 2010).

3.4. Toxicidade das sementes

As sementes de *Jatropha curcas* L. possuem propriedades tóxicas devido á presença de factores tóxicos (ésteres de *phorbol*, curcina) e antinutricionais (inibidores de tripsina, taninos, saponinas, fitatos e lecitina) (Makkar *et al.*, 1997). Por essa razão, as suas fontes nutritivas para seres humanos e aos animais não são utilizáveis. A intoxicação pode ocorrer directamente pelo consumo das sementes ou indirectamente através do consumo de produtos provenientes de animais contaminados (Adolf *et al.*, 1984). Em humanos, há relatos de intoxicação aguda por ingestão ou contacto com as sementes (Devappa *et al.*, 2012). A sintomatologia inicia-se após a ingestão de pelo menos 2 ou 3 sementes, com ardência na garganta entre 30 min a 60 min após a ingestão, vômitos acentuados, dor abdominal intensa, seguida de diarreia, levando a um quadro de desidratação, o que pode provocar espasmos musculares, polidipsia, distúrbios respiratórios e hipotensão. Em casos mais graves de intoxicação severa, afectam o sistema nervoso central e a lesão renal. Não existe antídoto para a intoxicação, sendo recomendada a lavagem estomacal, caso o tratamento se dê logo após a ingestão (Mendonça, 2009).

3.4.1. Factores antinutricionais

3.4.1.1. Inibidores de tripsina

A tripsina é produzida junto com a quimiotripsina, no pâncreas. Ambas são proteases de serina que clivam as proteínas em fragmentos peptídicos mais pequenos, nos pontos específicos de lisina e arginina após a ligação da proteína para o local activo da enzima. Os inibidores de tripsina são encontrados em certos alimentos e também são produzidos por pâncreas humano e bovino, ligam-se ao centro activo da enzima, bloqueando a sua acção e resultando em aumento excessivo da concentração plasmática de colecistoquinina. E desta forma, o pâncreas é continuamente estimulado a liberar mais enzima, provocando hipertrofia pancreática (Silva e Silva, 2000; Francis *et al.*, 2001).

3.4.1.2. Lecitinas

As lectinas são glicoproteínas, capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados devido á sua capacidade específica de reconhecimento e ligação sem, entretanto, alterar a estrutura de nenhum glicosilante (Silva e Silva, 2000). São frequentemente denominadas hemaglutininas devido sua capacidade de provocar aglutinação de eritrócitos em várias espécies de animais. Possuem alta capacidade de se ligar aos carboidratos específicos, principalmente nas células do

duodeno e jejuno, causando sérios danos às paredes intestinais (Francis *et al.*, 2001). De facto, quando essa substância é ingerida em altas concentrações ocorre a destruição das células do epitélio, edema, hiperemia, hemorragia em tecidos linfáticos, degeneração gordurosa e necrose do fígado e lesões do miocárdio (Silva e Silva, 2000).

3.4.1.3. Saponinas

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Caracterizam-se pelo sabor amargo, capacidade de formar espuma em soluções aquosas e provocar hemólise. As saponinas são surfactantes naturais produzidos a partir de plantas e também por alguns animais marinhos. Os seus efeitos anti-nutricionais estão relacionados às modificações na permeabilidade da mucosa intestinal, e ainda podem retardar o crescimento e diminuir a digestibilidade das proteínas devido à inibição e o aproveitamento de alguns nutrientes. Em adição à água, apresenta efeito tóxico, resultando em danos ao epitélio respiratório das brânquias (Francis *et al.*, 2001).

3.4.1.4. Fitatos

Fitatos são compostos constituídos pelo grupo ortofosfato altamente ionizante e complexante com alguns cátions (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{3+} , Fe^{2+} e Fe^{3+}) (Makkar *et al.*, 1998). Os fitatos são constituintes de todos os cereais e farelos de oleaginosas como a soja, algodão e *Jatropha*. Os fitatos diminuem a utilidade de minerais, especialmente o cálcio e zinco, e também diminuem a digestibilidade das proteínas por formar complexos e interagir com enzimas como a tripsina e a pepsina (Makkar *et al.*, 1998).

3.4.2. Factores tóxicos

3.4.2.1. Curcina

A curcina pertence à classe das proteínas inibidoras de ribossomas (RIPs), é uma potente fitotoxina com grande potencial biotecnológico por apresentar uma série de actividades biológicas, incluindo actividade anticancerígena e morte fisiológica de célula por controlo genético (Sousa, 2011). Para a mucosa gastrointestinal é hemoaglutinante. As principais manifestações tóxicas podem ser: distúrbios gastrointestinais severos (como náuseas, vómitos, dores abdominais intensas e diarreia com evacuações sanguinolentas), desidratação acompanhada de queda da pressão arterial, choque e até morte nos casos mais graves de insuficiência renal aguda (Devappa *et al.*, 2012).

3.4.2.2. Ésteres de *phorbol*

Ésteres de *phorbol* são compostos de ocorrência natural, amplamente distribuídos nas espécies de plantas de família *Euphorbiaceae* e *Timelaeceae*. Trata-se de substâncias tóxicas que agem no organismo de forma aguda (resposta inflamatória intensa) ou crônica (indução de tumor) (Goel *et al.*, 2007).

A estrutura básica dos ésteres de *phorbol* consiste de um esqueleto diterpênico com quatro anéis designados como A, B, C, D conhecida como tigliano (**figura 3**).

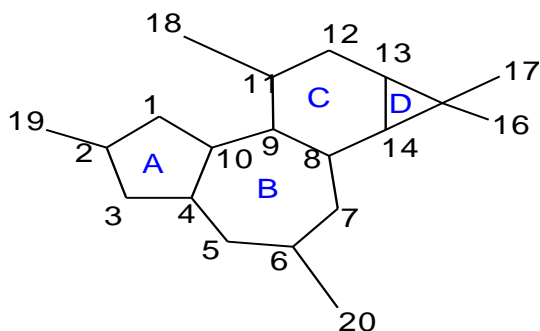
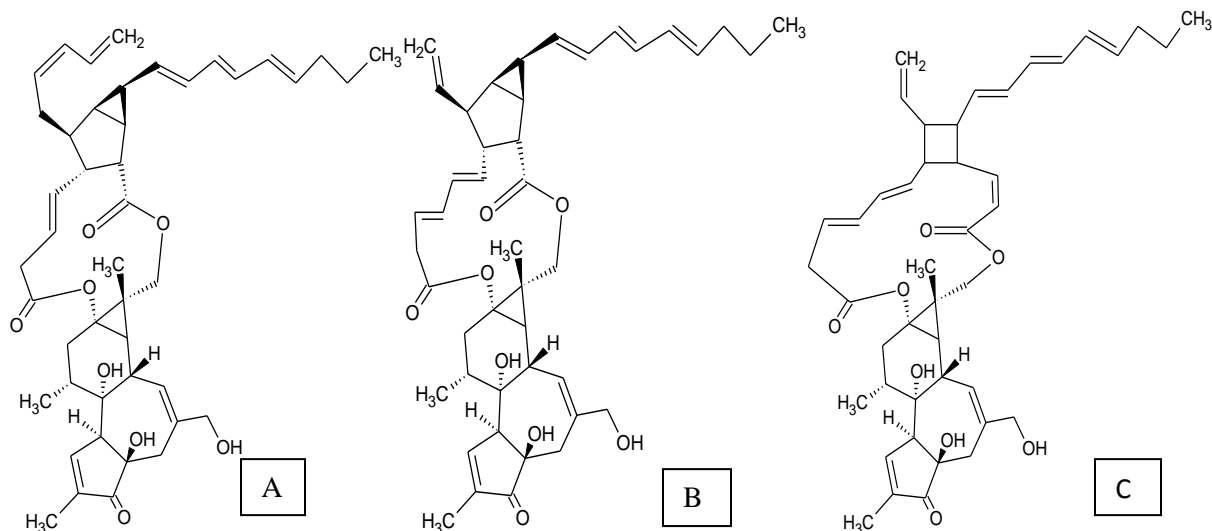


Figura 3. Estrutura básica de *phorbol* (tigliano)

O tigliano pode-se unir um ou mais substituintes hidroxilo, heteroalquilo, alcóxido, alquilo, arilalcóxi, hidroxialquilo, acilóxi, grupos aldeído ou suas combinações (Devappa *et al.*, 2012).

As seis estruturas de ésteres de *phorbol* (figura 4), todos isolados a partir do óleo da semente da *Jatropha curcas* L., possuem a mesma porção diterpeno (Haas *et al.*, 2002).



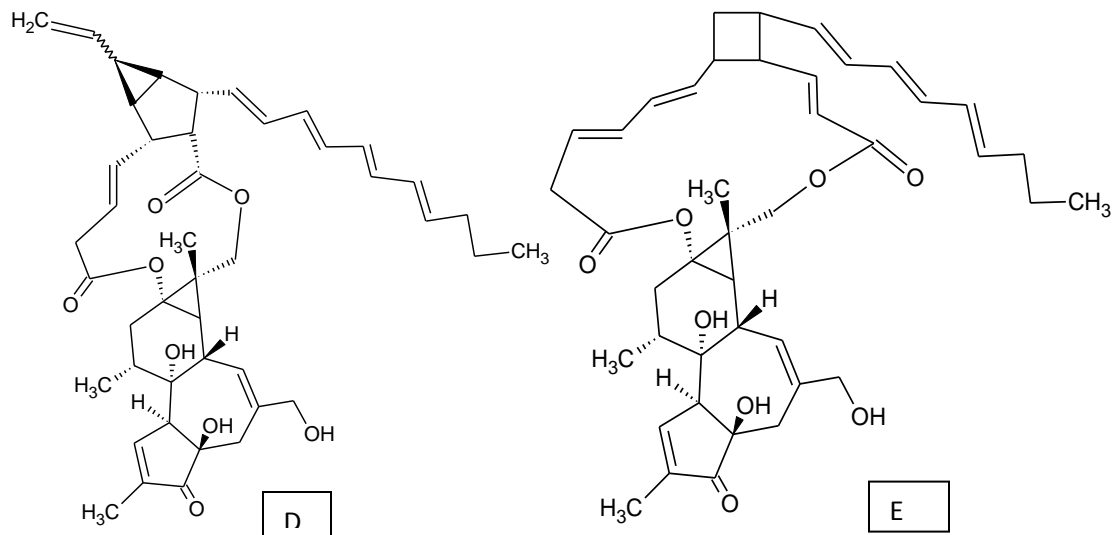


Figura 4. Fórmulas estruturais dos ésteres de phorbol isolados a partir do óleo da semente de *Jatropha curcas* L.: (A) factor de *Jatropha* C1: (12-desoxi-16-hidroxiphorbol-4'- [12',14'-butadienil] -6'- [16',18',20'-nonatrienil] -biciclo [3.1.0] hexano- (13-O) -2' [carboxilato] - (16-O) -3'- [8'-butenóico-10'] ato/DHPB) (B) factor de *Jatropha* C2 (C) factor de *Jatropha* C3 (D) factor de *Jatropha* C4 e C5 e (E) factor de *Jatropha* C6 (Fonte: Haaset *et al.*, 2002)

3.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

É um tipo de cromatografia líquida que utiliza pequenas colunas, enchidas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Valente *et al.*, 1983).

A cromatografia líquida de alta eficiência é bastante aplicada, na indústria, nomeadamente na indústria farmacêutica, e na investigação devido à sua sensibilidade (desde 10-6 ppm), fáceis adaptações para determinações quantitativas acuradas, adequabilidade à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis e, principalmente, à sua ampla aplicabilidade a uma vasta gama de substâncias (Ciola, 1998).

3.4.3.1. Constituição de um equipamento de CLAE

Um equipamento de CLAE é constituído por uma bomba, um injetor, uma coluna cromatográfica (eventualmente termostatada), um detector e um sistema de obtenção de dados (um integrador ou um registador) (figura 5).

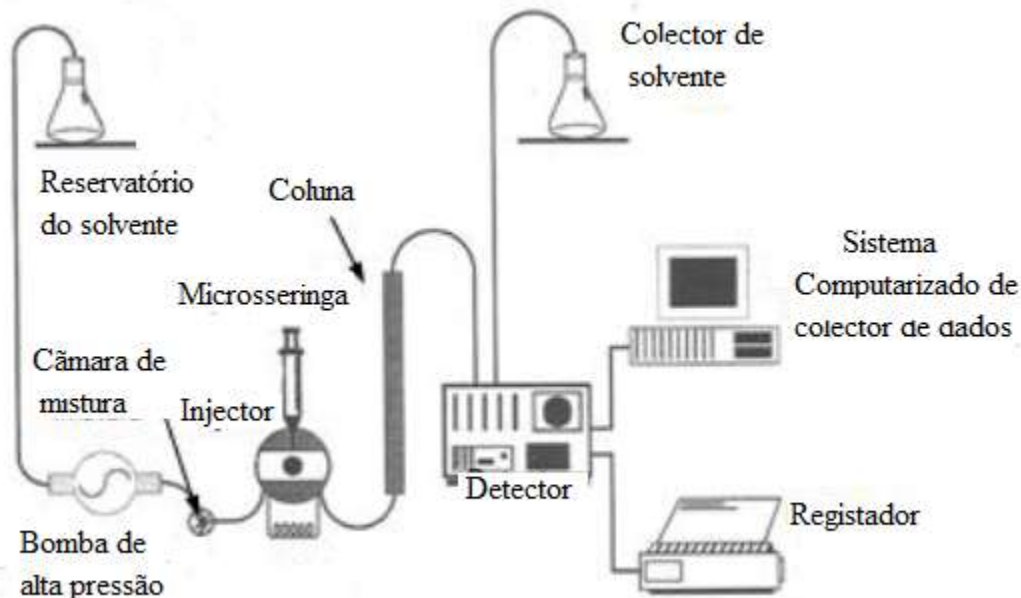


Figura 5. Componentes de um equipamento CLAE (Araújo, 2003).

✓ *Fase móvel*

Um instrumento moderno de CLAE é equipado de um ou mais reservatórios de vidro, cada um deles tendo 500 mL ou mais de um solvente. Frequentemente são tomadas medidas para a remoção de partículas sólidas e bolhas presentes nos líquidos (Meyer, 2004). Nas separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma “fase móvel” líquida. Esta é obrigada a passar através de uma “fase estacionária” imiscível fixa com objectivo de distribuir os componentes da amostra em ambas as fases com diferentes graus, garantindo, deste modo, a separação das substâncias. A fase móvel que sai de um ou vários reservatórios, circula através da coluna, em geral, a fluxo constante, chegando em seguida ao detector (Meyer, 2004). Os tipos de fases móveis são: hidrocarbonetos saturados (hexano e heptano); solventes aromáticos (tolueno e xileno); hidrocarbonetos saturados misturados (até 10%) com dioxano (metanol, etanol, clorofórmio, cloreto de metileno, água e misturas álcool-água); acetonitrilo e misturas acetonitrilo-água (Skoog *et al.*, 2002). Neste trabalho foi usada a mistura de água: acetonitrilo.

✓ *Bomba*

Tem como finalidade enviar um fluxo constante e reprodutível de fase móvel para o sistema cromatográfico. Os sistemas de bombeamento devem no mínimo possuir as seguintes condições:

vazões na faixa de 0,1 a 10 mL/min, reprodutibilidade relativa da vazão de 0,5% ou melhor e resistência à corrosão por uma grande variedade de solventes (Meyer, 2004).

De acordo com as características de funcionamento e desenho podem-se considerar basicamente dois tipos de bombas, as mecânicas e as pneumáticas. Entre as bombas mecânicas existem dois tipos diferentes, as recíprocas e tipo seringa (Skoog *et al.*, 2002).

Neste trabalho usou-se as bombas recíprocas ou de pistão, em que as válvulas bombeia fase móvel, por meio de dois pistões, de tal forma que um succiona a fase móvel e o outro expulsa o líquido para fora da bomba. Estas bombas alimentam o sistema continuamente a um fluxo constante e pode-se fazer gradiente (Meyer, 2004).

✓ **Injector**

Para se obter uma boa eficiência em análises, um factor muito importante a considerar é a maneira como se introduz a amostra na coluna. A injeção deve ser reprodutível e ter grandes variedades de volumes, assim como não deve introduzir bolhas. Duas são as formas de injeção da amostra: injeção manual e automática (microseringas e com válvula rotatória) (Jardim *et al.*, 2006). No injector manual do tipo válvula, aplicado neste trabalho a introdução da amostra é feita por um “loop” externo de diferentes tamanhos (sendo mais utilizados os de 20 a 100 μ L). Estes injectores permitem injeção de volumes precisos, sendo o excesso levado para fora do equipamento. Este sistema apresenta vantagens como: ser reprodutível e eliminar o problema de retorno da amostra (Jardim *et al.*, 2006).

✓ **Coluna**

A separação na CLAE é efectuada dentro das colunas cromatográficas. Estas devem ser constituídas de algum material inerte, de diâmetro uniforme, capaz de resistir às pressões que serão usadas. O material mais utilizado é o aço inoxidável, mas também pode ser constituída de vidro reforçado e sílica fundida, sendo esta última mais utilizada na confecção de colunas capilares. As mais usadas apresentam diâmetro interno de 4,6mm, comprimento de 250mm e são preenchidas com partículas porosas com diâmetro de 5 μ m. A escolha da coluna é feita em função da sua capacidade, que é determinada pelo tipo de material de empacotamento, comprimento e diâmetro interno (Cecchi, 2003; Jardim *et al.*, 2006).

Em geral, os sistemas cromatográficos são munidos de pré-colunas e/ou colunas de guarda, de composição similar à da coluna de separação, com função de saturar a fase móvel e reter partículas sólidas que podem entupir a coluna de separação e diminuir a sua eficiência.

Consoante a polaridade das fases estacionária e móvel, distinguem-se dois tipos de cromatografia: cromatografia em fase normal (fase estacionária polar) e cromatografia em fase reserva (fase estacionária de baixa polaridade).

A cromatografia em fase normal é utilizada quando a fase estacionária é polar e a fase móvel apolar. Neste caso os solutos mais apolares são eluídos primeiramente, enquanto que os polares são mais retidos pela fase estacionária e eluídos posteriormente (Meyer, 2004).

Neste estudo aplicou-se a cromatografia em fase reversa sendo a fase estacionária apolar (octadecilsilano) e a fase móvel polar (acetonitrilo 77%), portanto os compostos polares são eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente.

✓ **Detectores**

Tendo como função monitorar o fluxo da fase móvel na saída da coluna, o detector mede de forma contínua propriedades físicas ou físico-químicas da amostra, ou da solução que a contém e envia sinal ao registador. A interpretação desse registo produz dados qualitativos e quantitativos sobre a amostra e os seus constituintes.

O detector ideal é aquele que apresenta as seguintes características (McMaster, 1994; Skoog, 2002):

- ✓ Ter alta sensibilidade e baixo limite de detecção;
- ✓ Ser estável: insensível a variação de temperatura e de fluxo, no caso de eluições com gradiente;
- ✓ Linearidade: o sinal deve manter uma relação linear com a concentração da amostra;
- ✓ Fácil de operar e manter;
- ✓ Resposta rápida e linear a alterações das concentrações dos solutos;
- ✓ Baixo nível de ruído.
- ✓ Selectividade, exactidão e precisão.

Os detectores comuns mais usados são: Ultravioleta, Fluorescência, Índice de refração, Condutividade, Espectrometria de massas, Espalhamento de luz e Fotoionização (Skoog *et al.*, 2002).

- **Detector Ultravioleta Visível**

Neste trabalho foi usado o detector ultravioleta. O princípio do seu funcionamento baseia-se na absorção da radiação electromagnética por parte da amostra num dado comprimento de onda. E a resposta deste detector será selectiva, porque só detectará os compostos que absorvem no comprimento de onda em que opera o detector. Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta visível que são: comprimento de onda variável, que é de aplicação mais variada e sensível, cobrindo a faixa de 190 a 800nm, e o chamado fotométrico que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos, operando em comprimento de onda de 254 e de 280nm. Alguns compostos absorvem na região visível do espectro electromagnético e podem ser analisados por um detector que funciona nesta região do espectro, sendo chamado de detector de absorção no visível (Patonay, 1992).

A fase móvel utilizada deve ser cuidadosamente seleccionada porque a intensidade de absorção depende totalmente do meio em que se encontra a amostra (McMaster, 1994). O detector ultravioleta possui muitas vantagens como: alta sensibilidade, não é destrutiva, permite trabalhar com gradiente, responde a larga faixa de concentração, é relativamente insensível a variação de temperatura e vazão da fase móvel. Possui a desvantagem de detectar somente substâncias que absorvem no UV-Vis.

3.4.4. Análise qualitativa

A análise qualitativa é baseada na velocidade com que cada componente da mistura atrevesa a coluna, utilizando-se o parâmetro tempo de retenção (T_R). Assim, se a amostra não produz um pico no mesmo tempo de retenção que um determinado padrão usado em condições idênticas, pode-se considerar que o composto a ser avaliado está ausente (ou a sua presença ocorre em nível de concentração abaixo do limite de detecção do procedimento). Um simples cromatograma não indica o número total dos compostos existentes na amostra. A análise deve ser repetida com outras fases móveis e em outras colunas, a fim de se conseguir o maior número de picos e mesmo assim deve-se tomar cuidado com o detector utilizado (Skoog *et al.*, 2002).

3.4.5. Análise quantitativa

A cromatografia quantitativa em coluna está baseada na comparação da altura ou da área do pico do anólito com a de um ou mais padrões. As áreas dos picos são independentes dos efeitos de alargamento, portanto, as áreas constituem uma variável analítica mais satisfatória do que as alturas dos picos. Se as condições forem controladas apropriadamente, estes parâmetros variam linearmente com a concentração. As variáveis que devem ser bem controladas são a temperatura da coluna, a velocidade de fluxo do eluente e a velocidade de injeção da amostra (Collins *et al.*, 1997). A maioria dos instrumentos cromatográficos modernos está equipada com integradores electrónicos digitais que permitem o cálculo preciso das áreas dos picos (Ciola, 1998).

O método mais directo para análises cromatográficas quantitativas envolve a preparação de uma série de soluções e padrão de composições próximas da solução desconhecida. Os cromatogramas dos padrões são então obtidos e as alturas ou as áreas dos picos lançadas em gráfico em função da concentração. A curva obtida com esses dados deve ser uma recta. As análises serão realizadas considerando esta curva. Para maior exactidão, a padronização deve ser refeita com frequência (Skoog *et al.*, 2002).

A maior precisão em cromatografia quantitativa é obtida com o uso de padrões internos porque são evitadas as incertezas produzidas na injeção da amostra. Neste procedimento, uma quantidade de padrão interno é introduzida em cada padrão e na amostra. A razão entre as áreas (ou as alturas) do pico do anólito e do pico do padrão interno (ou alturas) funciona como parâmetro analítico. Com um padrão interno adequado, precisões relativas melhores do que 1% podem ser obtidas (Ciola, 1998).

3.4.6. Validação do método analítico

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada de validação. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (Inmetro, 2003).

A validação de um método que utiliza técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico e todas as variáveis de um

método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (Lanças, 2004).

Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para validação são: selectividade, linearidade e intervalo dinâmico, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exactidão (Ribani *et al.*, 2004).

✓ **Selectividade**

A selectividade avalia a capacidade de um método analítico medir a substância a analisar na presença de componentes como impurezas, produtos de degradação, ou outros compostos que possam estar presentes na matriz da amostra. A selectividade é fortemente influenciada pela proporção e pelo tipo do solvente polar utilizado na fase móvel. Uma forma de avaliar a selectividade num método analítico de CLAE é construir duas curvas analíticas, uma com as soluções de trabalho mistas adicionadas à matriz e a outra sem a presença da matriz, compara-se então as duas curvas analíticas, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferências de outros compostos da matriz na determinação da substância de interesse, portanto, o método é selectivo (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005). Para os métodos cromatográficos, a selectividade pode ser determinada através da seguinte equação:

$$\alpha = \frac{T_{R2} - T_{R0}}{T_{R1} - T_{R0}} (1)$$

Onde: T_{R0} -tempo de retenção morto; T_{R1} - tempo de retenção um e T_{R2} - tempo de retenção dois.

✓ **Linearidade**

A linearidade de um procedimento analítico de CLAE corresponde à capacidade de fornecer resultados instrumentais, proporcionais à concentração da substância a analisar na amostra através de uma relação linear. A linearidade é avaliada num gráfico onde se representam os sinais de resposta (área dos picos) em função da concentração da substância a analisar em solução padrão. Os parâmetros da regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados (o declive, a ordenada na origem e o coeficiente de correlação) traduzem a relação linear dos dados experimentais, permitindo extrair informação sobre o método analítico. Um coeficiente de correlação (r) determinada

apartirdaequação dois (2) maior que 0.999 é considerado um ajuste ideal dos dados na regressão linear (Meyer, 2004).

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2)(\sum(y_i - \bar{y})^2)}} \quad (2)$$

✓ **Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)**

O limite de detecção é a concentração mínima da substância a analisar que pode ser detectada pelo método com precisão e exactidão adequadas. A expressão seguinte permite determinar o limite de detecção (Ribani *et al.*, 2004):

$$LOD = 3.3 \times \left(\frac{S}{m}\right) \quad (3)$$

Onde: **S** é o desvio padrão da resposta, que pode ser o desvio padrão do branco, da ordenada na origem da equação da recta ou da equação da recta da regressão linear; **m** é o declive ou coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LOQ ou LQ) é a menor concentração da substância a analisar que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exactidão. É calculado usando os mesmos parâmetros definidos no cálculo do limite de detecção (Ribani *et al.*, 2004):

$$LOQ = 10 \times \left(\frac{S}{m}\right) \quad (4)$$

Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exactidão e precisão obtidas são satisfatórias (Ribani *et al.*, 2004; Emer e Miller, 2005).

Observa-se também que tanto o LOD e o LOQ são influenciados directamente pelas condições cromatográficas, devendo então ser asseguradas, através da conformidade do sistema, as melhores condições cromatográficas possíveis e também qualidade e tempo de uso da coluna cromatográfica (Ribani *et al.*, 2004; Lanças, 2004).

✓ **Precisão**

A precisão avalia a dispersão de resultados de uma série de medições repetidas a uma mesma amostra, a amostras semelhantes ou a uma solução padrão, em condições definidas. É normalmente avaliada usando o valor do desvio padrão relativo (RSD%), também conhecido como coeficiente de

variação (CV%) em circunstâncias específicas de medição, como a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade (Ribani *et al.*, 2004).

$$\text{RSD (\%)} = 100 \times \frac{S}{\bar{X}} \quad (5)$$

Onde, **S** é o desvio padrão absoluto e \bar{X} é a média aritmética das medições.

✓ Ensaio de recuperação

A recuperação (ou factor de recuperação) é definida como a relação da quantidade da substância a analisar que é extraída e passível de ser quantificada em função da quantidade presente ou adicionada (valor conhecido).

No processo de adição, em geral, usa-se uma solução padrão da substância a analisar que é adicionada à matriz similar à amostra (branco). Este método tem a vantagem de proporcionar maior exactidão, precisão e fiabilidade dos resultados analíticos assim como menor dependência do operador (Ribani *et al.*, 2004).

A recuperação é calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\text{R (\%)} = \frac{C_1 + 100}{C_2} \quad (6)$$

Onde: **R (%)** - taxa de recuperação; **C₁** - Área do padrão interno na amostra
C₂ - Área do padrão interno puro

Segundo a *Association of Official Analytical Chemists International* AOAC (2002) os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com desvio padrão relativo até 20%. Porém, dependendo da complexidade do método analítico e da matriz da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com desvio padrão relativo até 15%.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

- Luvas plásticas
- Alicates
- Pinças metálicas e espátula metálica
- Tubos polipropileno 15mL e 50mL com tampa
- Provetas de 25 mL, 50 mL e 1 L
- Almofariz e pistilo
- Copos de Béquer de 100 mL
- Funil de vidro
- Micropipetas 50 μ L, 200 μ L e 1000 μ L
- Papéis de filtro (ADANTEC 5A)

4.2. Equipamentos

- Aparelho cromatográfico (Figura 6): marca Shimadzu constituído por uma bomba de modelo LC-20A, Detector de UV- Vis modelo SPD-20A, Termostato, CTO-20A, Controlador, SCL-10 A e um Injetor manual de 20 μ L.

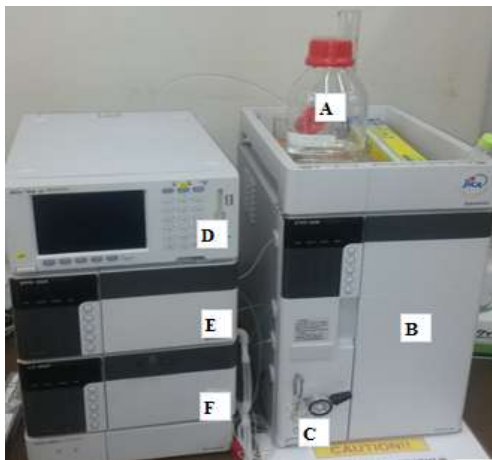


Figura 6. Componentes de um sistema cromatográfico: (A) reservatório de fase móvel; (B) Termostato (C) Injetor (D) Controlador (E) Detector (F) Bomba

- Balança analítica (AND BM-20 Max= 22g)
- Agitador Magnético (AGM/5AQ, 0 – 1600 rpm; 0-350 °C) e Vortex (ThermoScientific, 0-3200rpm)
- Temporizador

4.3. Reagentes

A Solução stock de DHPB (2500ng/ μ L) fornecido pela *Kurume University* do Japão

Os reagentes a seguir foram fornecidos pela Sigma-Aldrich: Acetonitrilo (grau CLAE), Metanol (grau CLAE) e Água destilada (grau CLAE)

4.4. Procedimentos experimentais

4.4.1. Colheita da amostra

As sementes da *Jatropha curcas* L. (figura 7) foram colhidas no dia 29 de Agosto de 2015 no distrito de Boane, província de Maputo. Foram colhidas 17 amostras de 20 sementes cada, armazenadas em sacos plásticos transparentes e posteriormente transportadas para o laboratório de Departamento de Química e conservadas em lugares secos e frescos a 25°C.



Figura 7. Campos de Boane (A); Sementes armazenadas (B)

4.4.1.1. Preparação da amostra

As sementes de *Jatropha curcas* L. foram divididas em três partes (figura 8), a saber: casca preta (*outerskin*), casca interna (*inner skin*) e albúmen (*seed*).

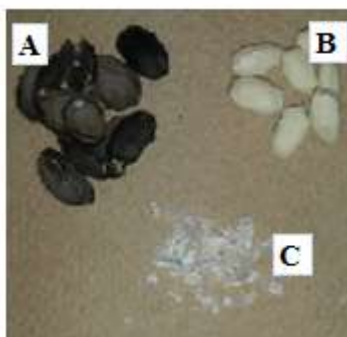


Figura 8. Divisão das três partes constituintes da semente de *Jatropha curcas* L. A- casca preta, B- albúmen e C-casca interna.

- a) Triturou-se separadamente as amostras do albúmen e da casca interna em almofariz usando um pistilo;
- b) Armazenou-se as amostras no frigorífico abaixo de 0°C até á extracção dos ésteres de *phorbol*.

4.4.2. Extracção de ésteres de *phorbol*

Os procedimentos de extracção dos ésteres de *phorbol* do albúmen e casca interna foram optimizados e validados por Chivodze e colaboradores (2016).

4.4.2.1. Extracção triplicada de ésteres de *phorbol* no albúmen (seed)

- a) Pesou-se cerca de 200 mg de amostra para um copo Béquer de 100 mL e adicionou-se 10 mL de metanol;
- b) Agitou-se a mistura em agitador magnético a 600 rpm durante 15 min;
- c) Filtrou-se por gravidade para um tubo Vial de 15 mL;
- d) Transferiu-se o resíduo do sólido para o copo Béquer e adicionou-se 10 mL de metanol e procedeu-se como em b) e c);
- e) Colectou-se os filtrados em tubo Vial de 50 mL e analisou-se em CLAE-UV.

4.4.2.2. Extracção triplicada de ésteres de *phorbol* na casca interna (inner skin)

- a) Pesou-se cerca de 20 mg de amostra para um tubo Vial de 15 mL;
- b) Adicionou-se 1mL de metanol e agitou-se a solução, em Vortex a 1200 rpm por 15min;
- c) Filtrou-se a solução por gravidade para um tubo Vial de 15 mL;
- d) Transferiu-seo resíduo do sólido para o tubo vial de 15 mL e procedeu-se como em b) e c);
- e) Colectou-se os filtrados um tubo Vial de 15 mL e analisou-se em CLAE-UV.

4.4.3. Preparação de curva de calibração

As soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução *stock* de DHPB (2500 ng/ μ L) para se obter concentrações corespondentes a 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50 ng μ L⁻¹. Todas as soluções preparadas foram diluidas com metanol grau HPLC.

Da primeira diluição da solução *Stock* de DHPB 2500 ng μL^{-1} foi tomada uma alíquota de 10 μL e diluiu-se com 490 μL de metanol, perfazendo um volume final de 500 μL com uma concentração de 50 ng μL^{-1} .

Da solução padrão de 50 ng μL^{-1} foi tomada uma alíquota de 100 μL e diluiu-se com 100 μL de metanol, perfazendo um volume final de 200 μL com a concentração de 25 ng μL^{-1} .

Da solução padrão de 25 ng μL^{-1} foi tomada uma alíquota de 100 μL e diluiu-se com 150 μL de metanol, perfazendo um volume final de 250 μL com a concentração de 10 ng μL^{-1} .

Da solução padrão de 10 ng μL^{-1} foi tomada uma alíquota de 100 μL e diluiu-se com 100 μL de metanol, perfazendo um volume final de 200 μL com a concentração de 5 ng μL^{-1} .

Da solução padrão de 5 ng μL^{-1} foi tomada uma alíquota de 100 μL e diluiu-se com 100 μL de metanol, perfazendo um volume final de 200 μL com a concentração de 2,5 ng μL^{-1} .

Os cromatogramas de análise foram apresentados em anexo A

4.4.4. Análise dos extractos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extractos foram analisados por CLAE nas seguintes condições:

- Cromatógrafo Shimadzu com injetor de 40 μL ;
- Coluna: InertsilODS (octadecilsilano) 4.5 μm , 4.6mm x 150 mm;
- Coluna de guarda: Inertsil ODS (octadecilsilano) 4.5 μm , 4,0 mm x 10 mm;
- Fase móvel: acetonitrilo e água (77:23);
- Vazão da fase móvel: 1 mL/min;
- Comprimento de onda: 282nm;
- Temperatura de análise: 40 $^{\circ}\text{C}$;
- Tempo de retenção dos ésteres de *phorbol*: 8-15 min.

V. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada calculando o coeficiente de correlação (r) do gráfico das curvas de calibração representada nas figuras 9 e 10.

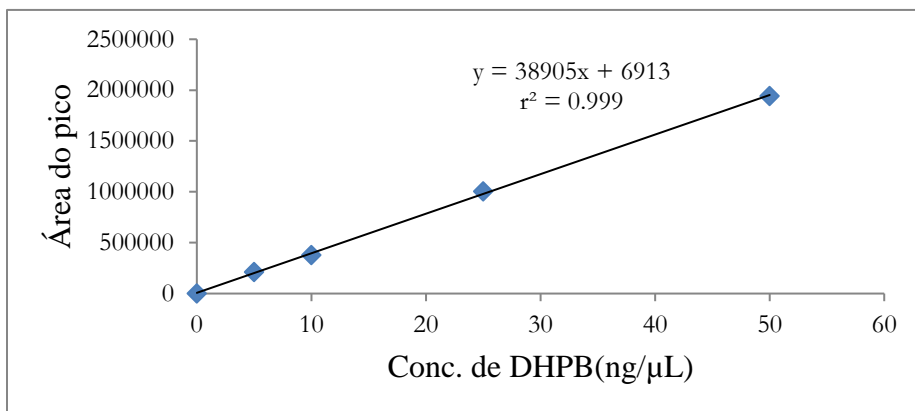


Figura 9. Gráfico da curva de calibração para a determinação dos ésteres de *phorbol* na casca interna

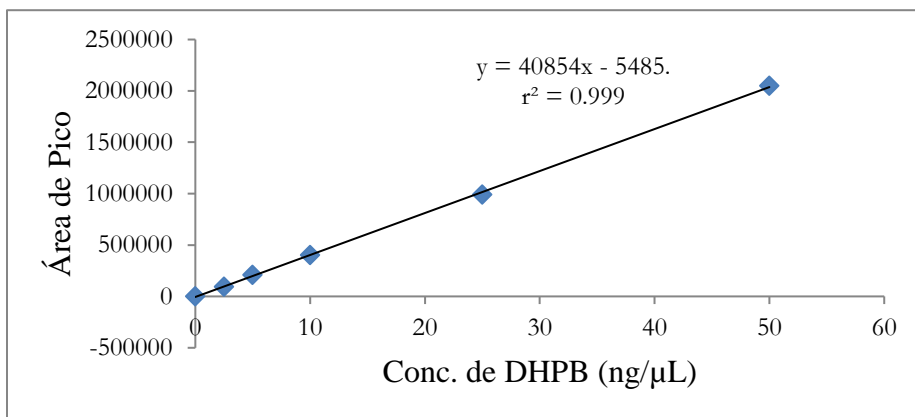


Figura 10. Gráfico da curva de calibração para a determinação dos ésteres de *phorbol* do albúmen

Os gráficos das curvas de calibração dos ésteres de *phorbol*, apresentados nas figuras 9 e 10, mostram uma correlação positiva entre a área do pico e a concentração de DHPB, com coeficientes de correlação linear fortes ($r = 0.999$ para a curva de calibração do albúmen e $r = 0.997$, para a curva de calibração da casca interna).

5.2. Limites de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD)

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados empregando-se o método baseado nas curvas analíticas apresentadas nas figuras 9 e 10.

Neste método, os limites de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados através das equações apresentadas nas tabelas 3 e 4 no anexo B. Os limites de detecção (LOD) e (LOQ) experimentais foram de 1.77ng/μL e 5.49ng/μL para a casca interna. No albúmen o limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) experimental foram de 1.22ng/μL e 3.13ng/μL.

5.3. Selectividade

A figura 11 representa cromatogramas dos picos de factores de *Jatropha* C1-C6 dos ésteres de *phorbol* da *Jatropha*.

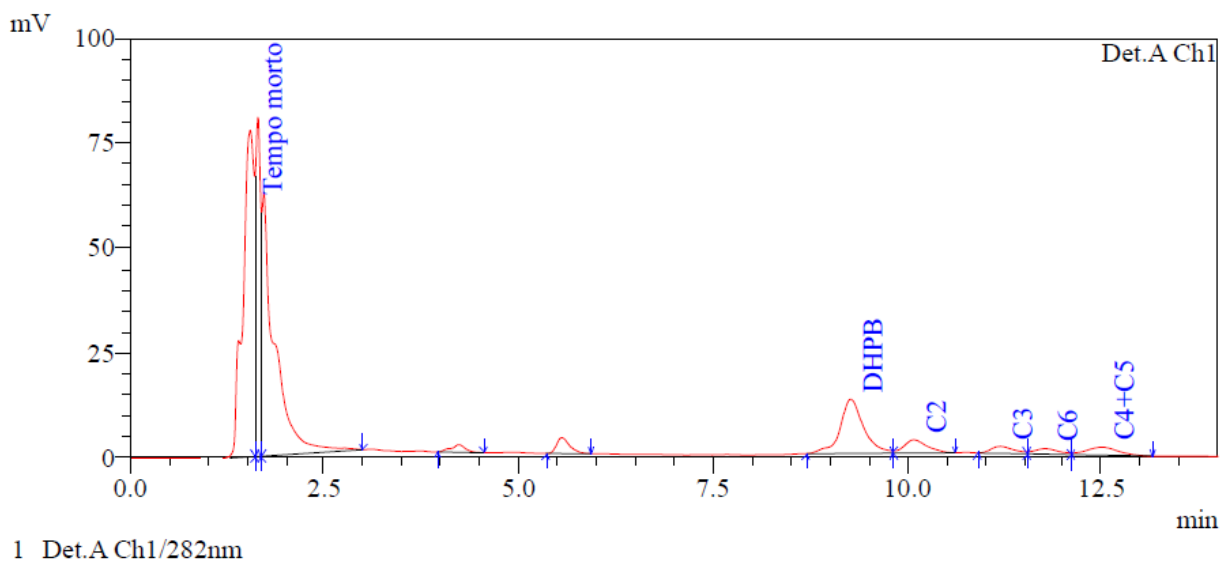


Figura 11. Cromatograma dos picos de factores de *Jatropha* C1-C6 (HPLC-UV, $\lambda = 280$ nm).

A selectividade foi avaliada mediante o cálculo de factor de selectividade através da equação 1, Com base no cromatograma da figura 11, obteve-se o tempo morto (T_{R0}) 1.540 min, tempo de retenção do pico C₂ (T_{R2}) 10.08 min e tempo de retenção do pico C₁ (T_{R1}) 9.267 min, foi calculado o factor de selectividade (α) e obteve-se 1.105. com este resultado observou-se que o factor de selectividade calculado é maior que 1. Portanto o método apresenta uma boa selectividade.

5.4. Precisão

A precisão foi avaliada pela dispersão de resultados entre ensaios repetidos da solução amostra em 2 réplicas de soluções preparadas. Nas tabelas 1 e 2 foram representadas os baixos valores de desvio padrão relativo (RSD%) que confirmam a precisão do método analítico para quantificação de teor de ésteres de *phorbol* por cromatografia líquida. Segundo a AOAC, (2002) em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD% até 15%, portanto os métodos adoptados para a determinação e extracção de ésteres de *phorbol* da semente de *Jatropha curcas* L apresentam boa exactidão.

5.5. Taxa de recuperação

A taxa de recuperação analítica foi determinada por Chivodze e colaboradores (2016) para o albúmen e casca interna, o teste de recuperação consistiu na adição de quantidades conhecidas de solução padrão em alíquotas de amostras, foram obtidos 93.00 e 96.62 % para o albúmen e casca interna respectivamente. Portanto os métodos adoptados para a determinação e extracção de ésteres de *phorbol* da semente de *Jatropha curcas* L. apresentam boa taxa de recuperação.

5.6. Tratamento estatístico dos dados

O tratamento estatístico dos dados consistiu na aplicação do software Minitab17, uma ferramenta para análise estatística dos dados. Antes da aplicação dos testes de significância das diferenças entre as médias testou-se a normalidade dos dados usando o teste de normalidade Anderson-Darling de modo a seleccionar os testes apropriados para comparação das médias.

Os testes t (*t-test*) e ANOVA unimodal (one-way ANOVA) são aplicados para dados normais ($p > 0.05$). No caso de dados anormais ($p < 0.05$) pode-se aplicar o teste Wilcoxon Signed Rank como alternativo e o teste Kruskal-Wallis como alternativo da ANOVA unimodal. A normalidade dos dados é aceite se o teste de normalidade Anderson-Darling apresenta um valor de p (p-value) superior a 0.05 para um nível de confiança de 95%. O teste de normalidade de Anderson-Darling ilustrou que todos os dados dos teores de ésteres de *phorbol* nas variedades progenitoras fêmeas, variedades progenitoras machos e dos seus híbridos no albúmen são dados normais. O valor de p em todas variedades foi de 0.227, superiores a 0.05 (anexo C). Portanto, permite-se a aplicação de Anova unimodal (anexo D) ou teste t para avaliar a significância das diferenças entre as médias dos teores de ésteres de *phorbol*.

5.6.1. ANOVA unimodal

A aplicação do teste ANOVA unimodal requer a verificação das suposições seguintes (Triola, 2005): Compara mais de três médias populacionais; usa um factor de variação para caracterizar a população; a população tem distribuição normal ou se aproxima a ela; a amostra deve ser aleatória e as amostras devem ser independentes umas das outras.

Neste estudo foram tomadas as seguintes hipóteses nas três variedades:

Hipótese nula (H_0): As médias dos dados obtidos nas variedades em estudo não diferem significativamente entre elas se: $(\bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3)$ ($p > 0.05$).

Hipótese alternativa (H_A): As médias dos dados obtidos nas variedades em estudo pelo menos uma difere das outras ($p < 0.05$). Onde: \bar{X}_1, \bar{X}_2 e \bar{X}_3 são médias dos teores de DHPB nas amostras.

Os testes de significância são usados para comparar os desvios padrão, isto é, os erros aleatórios de dois conjuntos de dados.

A comparação dos desvios-padrão ou variância faz-se usando o teste F (de Fischer), que é a razão entre duas variâncias da amostra, de acordo com a equação (Chalmer, 1987):

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} (7)$$

5.7. Avaliação de teores de DHPB nas variedades em estudo de *Jatropha curcas* L.**Tabela 1.** Determinação do teor de ésteres de *phorbol* (mg /g) na casca interna

Amostra	Réplicas	Weight (mg)	T _R (min)	DHPB (Area)	DHPB (ng/μl)	Vol (μL)	DHPB (mg/g)	\bar{x}	S	RSD (%)
31	1	20.61	11.09	534411	14.03	3000	2.04	2.05	0.01	0.30
	2	20.04	11.11	521662	13.71	3000	2.05			
110	1	20.06	11.10	646937	16.87	3000	2.52	2.59	0.07	2.93
	2	20.09	11.10	683127	17.78	3000	2.66			
7	1	20.30	11.08	634598	16.56	3000	2.45	2.49	0.05	2.08
	2	20.12	11.08	647914	16.89	3000	2.52			
1013	1	20.44	11.10	393558	10.48	3000	1.54	1.54	0.01	0.36
	2	20.66	11.05	395816	10.53	3000	1.53			
1020	1	20.24	11.10	308305	8.33	3000	1.23	1.28	0.07	5.71
	2	20.50	11.09	339227	9.11	3000	1.33			
624	1	20.07	11.11	720071	18.71	3000	2.80	2.84	0.05	1.88
	2	20.23	11.10	745586	19.36	3000	2.87			
1039	1	20.15	11.11	140582	4.10	3000	0.61	0.60	0.02	4.16
	2	20.51	11.11	134636	3.95	3000	0.58			
1052	1	20.89	11.11	572083	14.98	3000	2.15	2.14	0.01	0.68
	2	20.83	11.11	564865	14.80	3000	2.13			
5	1	20.07	11.11	717433	18.65	3000	2.79	2.82	0.03	1.23
	2	20.02	10.78	728315	18.92	3000	2.84			
221	1	20.12	10.24	277845	7.56	3000	1.13	1.12	0.02	2.04
	2	20.50	10.24	274987	7.49	3000	1.10			
100	1	20.46	11.11	442073	11.70	3000	1.72	1.73	0.02	1.17
	2	20.16	10.25	442862	11.72	3000	1.74			
988	1	20.27	10.26	784132	20.33	3000	3.01	2.91	0.05	1.88
	2	20.59	10.25	743213	19.30	3000	2.81			
144	1	20.50	10.25	514360	13.53	3000	1.98	1.92	0.09	1.89
	2	20.89	10.42	488599	12.88	3000	1.85			
323	1	20.63	10.41	530760	13.94	3000	2.03	2.03	0.01	0.16
	2	20.79	10.41	536182	14.08	3000	2.03			
343	1	20.75	10.42	617633	16.13	3000	2.33	2.30	0.04	1.89
	2	20.69	10.41	599435	15.67	3000	2.27			
1044	1	20.89	10.41	335964	9.02	3000	1.30	1.31	0.02	1.46
	2	20.93	10.42	343775	9.22	3000	1.32			
1042	1	20.52	10.42	720243	18.72	3000	2.74	2.79	0.08	2.77
	2	20.39	10.90	744488	19.33	3000	2.84			

Tabela 2. Determinação do teor de ésteres de *phorbol*(mg /g) no albúmen

Amostra	Réplicas	Massa (mg)	T _R (min)	DHPB (Area)	DHPB (ng/ µl)	Vol (µL)	DHPB (mg/g)	\bar{x}	S	RSD (%)
1044	1	200.55	9.32	84026	2.19	30000	0.33	0.33	0.01	0.44
	2	200.39	9.83	83405	2.18	30000	0.33			
1020	1	200.38	9.83	79448	2.08	30000	0.31	0.31	0.01	1.18
	2	200.93	9.83	78276	2.05	30000	0.31			
1013	1	200.58	9.61	237055	5.94	30000	0.89	0.96	0.10	10.50
	2	200.45	9.93	275728	6.88	30000	1.03			
624	1	200.40	9.60	172084	4.35	30000	0.65	0.66	0.02	1.35
	2	200.38	9.61	175481	4.43	30000	0.66			
100	1	200.51	11.47	124695	3.19	30000	0.48	0.49	0.01	2.00
	2	200.45	9.55	128381	3.28	30000	0.49			
5	1	200.86	9.93	254300	6.36	30000	0.95	0.94	0.02	1.68
	2	200.63	9.94	247927	6.20	30000	0.93			
323	1	200.38	9.95	185810	4.68	30000	0.70	0.72	0.03	3.89
	2	200.15	9.94	196392	4.94	30000	0.74			
31	1	200.65	9.94	69774	1.84	30000	0.28	0.29	0.01	3.65
	2	200.38	9.93	73656	1.94	30000	0.29			
343	1	200.40	9.93	92308	2.39	30000	0.36	0.35	0.02	4.74
	2	200.43	9.95	85974	2.24	30000	0.34			
144	1	200.56	9.95	203479	5.11	30000	0.77	0.75	0.03	3.40
	2	200.55	9.94	193670	4.87	30000	0.73			
7	1	200.58	10.03	295249	7.36	30000	1.10	1.04	0.09	9.07
	2	200.66	10.04	259120	6.48	30000	0.97			
110	1	200.34	10.03	92834	2.41	30000	0.36	0.35	0.02	5.08
	2	200.29	10.03	85999	2.24	30000	0.34			
988	1	200.73	9.83	185340	4.67	30000	0.70	0.66	0.06	8.95
	2	200.03	9.55	162041	4.10	30000	0.61			
1042	1	200.51	9.32	117382	3.01	30000	0.45	0.46	0.02	1.03
	2	200.54	9.31	119211	3.05	30000	0.46			
1052	1	200.05	10.05	325940	8.11	30000	1.22	1.22	0.01	0.44
	2	200.63	9.84	328986	8.19	30000	1.22			
1039	1	200.67	9.49	72399	1.91	30000	0.29	0.28	0.02	5.84
	2	200.20	9.49	66052	1.75	30000	0.26			
221	1	200.46	9.61	85734	2.23	30000	0.33	0.33	0.01	0.08
	2	200.52	9.49	85864	2.24	30000	0.33			

5.7.1. Comparação do teor de DHPBnas variedades progenitoras fêmeas, machos e seus híbridos na casca interna e no albúmen

Nas figuras 12 e 13 são ilustrados graficamente os teores de DHPB nas variedades progenitoras fêmeas, machos e seus híbridos na casca interna e no albúmen respectivamente.

Os resultados mostraram que os teores dos ésteres *dephorbol* nas variedades híbridasna casca interna e no albúmen tendem à média aritmética do teor dos seus genitores masculino e feminino.

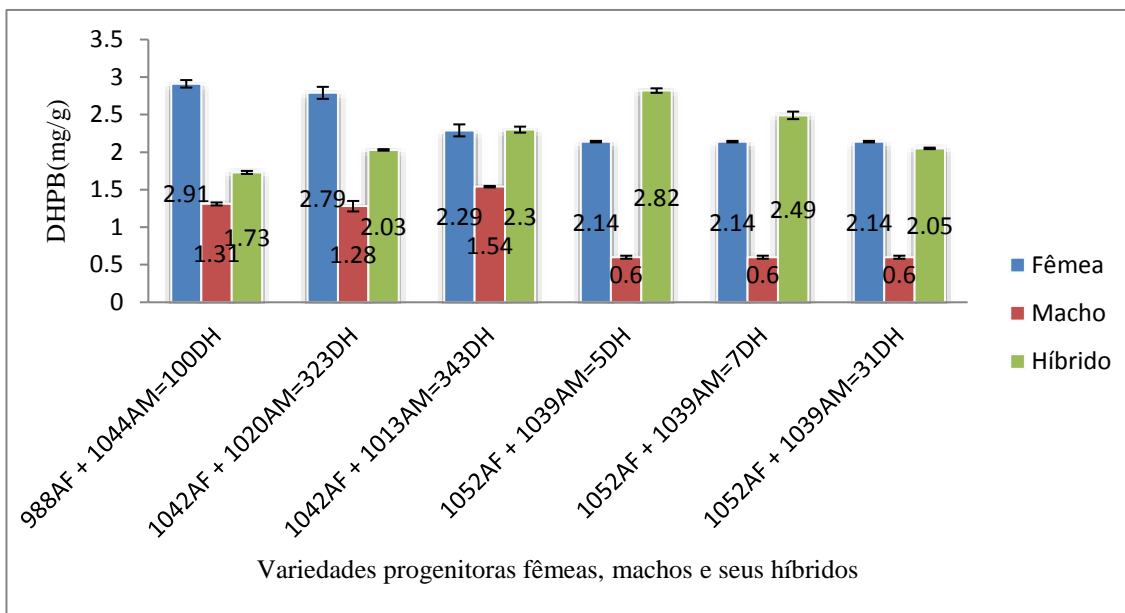


Figura 12. Teores DHPB nas variedades progenitoras fêmeas, machos e híbridas na casca interna

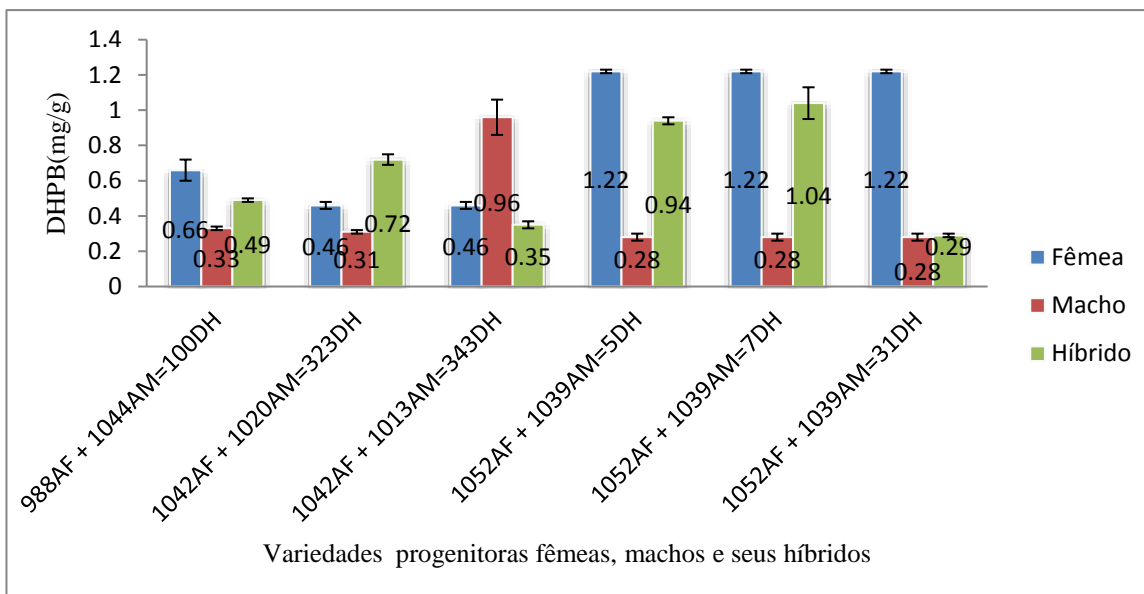


Figura 13. Teores DHPB nas variedades progenitoras fêmeas, machos e híbridas no albúmen

De acordo com as figuras 12 e 13 observou-se que os teores de DHPB na casca interna são superiores em relação ao albúmen. Segundo o estudo realizado por Devappa *et al.*, (2012), os resultados mostram que 85.72% dos teores de ésteres de *phorbol* estão presentes na região da casca interna, proporcionando um ambiente de defesa para o embrião em desenvolvimento durante a germinação. Isto ocorre porque os ésteres de *phorbol* são parte dos metabólitos secundários, que aparentemente não influenciam directamente no desenvolvimento da planta mas são produzidos para a protecção das plantas contra herbívoros, microrganismos, agentes patógenos e outros invasores (Devappa *et al.*, 2012).

Ainda nestas figuras pode-se considerar que as variedades híbridas possuem maiores tendências de adquirir valores de teores de ésteres de *phorbol* mais próximos das variedades fêmeas do que às variedades progenitoras machos. Há relatos de ocorrência de apomixia em *Jatropha*, ou seja, fecundação sem intervenção do macho e os híbridos tendem a ter características do genitor feminino. Juhász e colaboradores (2009) estudaram a apomixia em plantas de *Jatropha curcas* L. e obtiveram 5% da apomixia, provavelmente este processo tenha acontecido nas variedades em estudo.

Para as variedades híbridas 5DH, 31DH, 7DH oriundas dos mesmos progenitores, o teste ANOVA unimodal ilustra um valor de $p < 0.05$ na casca interna e no albúmen. Portanto, aceita-se a hipótese alternativa que afirma haver diferenças significativas entre as médias para as três variedades em estudo. Isto poderá ter ocorrido devido as pequenas mutações de genes envolvidos na rota biossintética dos ésteres de *phorbol* (Juhász *et al.*, 2009). Outros factores que poderão ter influenciado os resultados são: ambientais (baixa pluviosidade que pode afectar a translocação dos nutrientes, baixa radiação solar que afecta a fotossíntese entre outros) e a polinização.

5.7.2. Comparação das variedades híbridas em relação á razão dos frutos e DHPB na casca interna e no albúmen

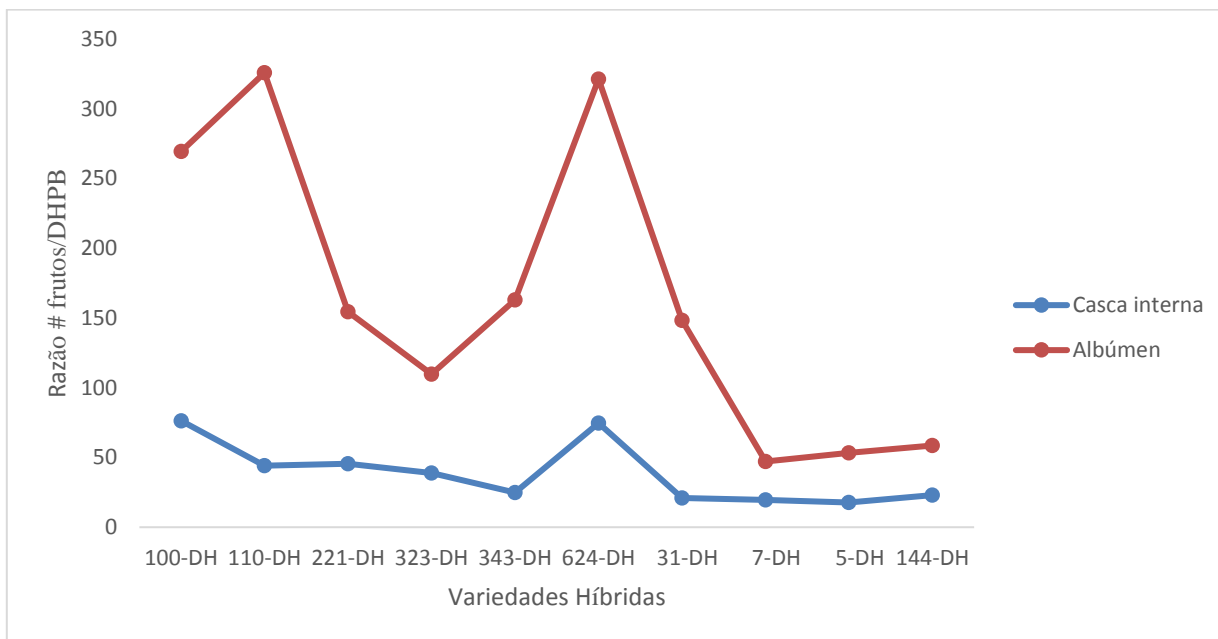


Figura 14. Comparação das variedades híbridas em relação á razão dos frutos e DHPB na casca interna e no albúmen.

A figura 14 ilustra graficamente a comparação de variedades híbridas em relação á razão dos frutos e DHPB na casca interna e albúmen. A tabela 1 no anexo B apresenta as melhores variedades híbridas produzidas no bloco D com respectivo número total de frutos. A variedade 100DH apresentou maior razão entre frutos e DHPB na casca interna e as variedades 110DH e 100DH apresentaram maior razão entre frutos e DHPB no albúmen conforme a tabela 2 no Anexo B; provavelmente podem ser consideradas mais promissoras, devido ao maior número de frutos que estas apresentam e baixos teores de ésteres de *phorbol*.

Os teores de DHPB na casca interna e no albúmen demonstraram que não existe uma dependência linear entre os teores de ésteres de *phorbol* e o número de frutos de *Jatropha curcas* L.

VI. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

6.1. Conclusões

- ❖ Neste trabalho foi possível extrair e quantificar os ésteres de *phorbol* presentes no albúmen e na casca interna da semente da *Jatropha curcas* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), este método mostrou-se selectivo, linear e com os LOD e LOQ aceites, resultando em um método simples e confiável. Os teores de ésteres de *phorbol* na casca interna e no albúmen em todas as variedades analisadas variaram entre 0.63-2.83mg/g.
- ❖ A casca interna apresenta maiores valores de ésteres de *phorbol* nas variedades progenitoras fêmeas, machos e híbridos no intervalo de 0.60-2.91mg/g em comparação ao albúmen 0.23-1.22mg/g.
- ❖ As variedades híbridas 100 DH e 110 DH no albúmen assim como na casca interna apresentaram uma boa razão entre número de frutos e teores de ésteres de *phorbol* o que leva a serem consideradas as mais promissoras.

6.2. Recomendações

Recomenda-se:

- ✚ A realização de estudo similar quantificando o óleo existente nas variedades híbridas mais produtivas e com baixo teor de ésteres de *phorbol*;
- ✚ A realização de mais estudos em relação às variedades consideradas promissoras;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adolf, W., Opferkuch, H., e Hecker, E. (1984). Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. *Phytochemistry*.**23**: 129-132.
2. Araújo, J. M. A. (2003). *Química de Alimentos: teoria e prática*. 3ª edição. Editora UFV. 416pp.
3. Association of Official Analytical Chemists International-AOAC. (2002). *Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary, supplements and botanicals*. 38 pp.
4. Baldini, M., Ferfuaia, C., Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Pascali, J. e Piasentier, E. (2014). Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Industrial Crops and Products*. **59**: 268-276.
5. Berenchtein, B. (2012). *Avaliação do farelo de pinhão (*Jatropha curcas* L.) detoxicado na dieta de suínos*. Tese de Doutorado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-Brasil, 93 pp.
6. Cecchi, H. M. (2003). *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2ª edição. Rev. Editora da Unicamp. Campinas. 207pp.
7. Chivodze, R., Mandlate, J., Skripets, V., Zimila, H. (2016). *Optimização das condições de extração dos ésteres de phorbol nas sementes de *Jatropha curcas* L.* Trabalho de Licenciatura, Faculdade de Ciências, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo. 99 pp.
8. Ciola, R. (1998). *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho*. 1ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. 179 pp.

9. Collins, C. H. (1997). Princípios básicos de cromatografia. In: *Introdução a métodos cromatográficos*. 7ª edição. Editora da UNICAMP. Campinas. 11-27 pp.
10. Chalmer, B. J. (1987). Understanding statistics: *Statipalusers manual and disk for the IBM PC and compatibles include*. Editora da New York and Basel. 161 – 174. pp
11. Dermibas, A. (2008). *Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines*. Springer-Verlag, London, UK. 144 pp.
12. Dermibas, A. (2009). *Biofuels: Securing the Planet's Future Energy Needs*. Springer-Verlag, London, UK. **50**: 2239-2249 pp.
13. Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., Becker, K. (2012). *Isolation, characterization and potential agropharmaceutical applications of phorbol esters from Jatropha curcas oil*. Doctoral thesis, Faculty of Agricultural Sciences at the University of Hohenheim. Stuttgart, Germany. 232 pp.
14. Divakara, B. N., Upadhyaya, H.D., Wani, S.P., Laxmipathi C.L. (2010) Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L. *Applied Energy*. July; 87: p. 11.
15. Zílio, J., Liddell, D., Muendane, C., Nogueira, A (2008). *Avaliação dos Biocombustíveis em Moçambique*. Econergy International Corporation. Relatório Final, Junho, 515 pp.
16. Emer, J. e Miller, J.H.M. (2005). *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*. WILEY-VCH VerlagGmbH & Co. KGaA. Weinheim, ISBN: 3-527-31255-2. 411pp.
17. Francis, G., Makkar, H. P.S., Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*. **199**: 197 – 227.

18. Godoy, M.C., Godoy, A.R., Cardoso, A.I. (2006). Influência do estágio de maturação da flor na produção de sementes de pimentão com polinização manual. *Bragantia*. 5pp.
19. Goel, G., Makkar, H. P. S., Francis, G., Becker, K. (2007). Phorbol esters: Structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology*. **26**: 279-288.
20. Haas, W., Sterk, H., Mittelbach, M. (2002). Novel 12- deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. *Journal of Natural Products*, **65**: 1434-1440.
21. Heller, J. (1996). *Physic Nut. Jatropha curcas L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. 1. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 66 pp.
22. Instituto Nacional de Estatística (INE) (2009). *Retrato da província de Maputo*. 2ª edição, DPINE, Matola.
23. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) (2003). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008.36 pp.
24. Jardim, I. C., Guimarães, L. F. L., Collins, C. H (2006). Cromatografia líquida de alta eficiência. In: *Fundamentos de cromatografia*. editora UNICAMP. Campinas. 453pp.
25. Juhász, A. C. P., Pimenta, S, Soares, B. L., Morais, D. L. B., Rabello, H.O (2009). Biologia floral e polinização artificial de pinhão-mansão no norte de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **44**: 1073-1077.
26. Lanças, F. M. (2004). *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*. Editora RiMa.62pp.

27. Lorencetti, C., Carvalho, F.I., Oliveira, A. C., Valério, I. P., Benin, G., Zimmer, P.D., Vieira, E.A. (2006). Distância genética e sua associação com a heterose e desempenho de híbridos em aveia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasil. 8pp.
28. Makkar, H.P.S., Aderibigbe, A.O., Becker, K. (1998). Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chemistry*. **62**: 207-15.
29. McMaster, M.C. (1994). *HPLC: A practical user's guide*. New York: VCH. 211 pp.
30. Mendonça, S e Laviola, B. G. (2009). Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-manso. Comunicado técnico, 001. *Embrapa Agroenergia*. Brasília. 8 pp.
31. Meyer, V. R. (2004). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 4ª edição, John Wiley & Sons Ltd., Switzerland. 369 pp.
32. Nunes, C. F. (2007). *Caracterização de Frutos, Sementes e Plântulas e Cultivo de Embriões de Pinhão-manso (Jatropha curcas L.)*. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia. Universidade Federal de Lavras. 78 pp.
33. Openshaw, K. A. (2000). Review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy*. **19**:1-15.
34. Patonay, G. (1992). *HPLC Detection: Newer methods*. New York: VCH. 236pp.
35. Ribani, M., Bottoli, C. B., Collins, C. H. e Jardim, I. C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. **27**: 771-780.
36. Sabandar, C.W. (2010) *Review: Secondary Metabolite Compounds from Jatropha species*. Available in: <http://carlasabandar.wordpress>. Access in november, 2016.
37. SBRT – Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Ministério da Ciência e Tecnologia. Disponível em: <http://sbrt.ibict.br>. 2005. Acesso em outubro de 2016.

38. Schubert, R. (2010). *Future Bioenergy and Sustainable Land Use*. Earthscan, UK. 137 pp.
39. Semedo, E.S., Justino, A.C.O, Lapa, N. (2011). *Utilização de semente de Jatropha curcas L. provenientes de Cabo Verde para a produção de biodiesel*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. 127 pp.
40. Silva, M. R. e Silva, M. A. A. P. (2000). *Factores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas*. Campinas, jan. /Abr. 7pp.
41. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (2002). *Princípios de análise instrumental*. 5ª edição. Porto Alegre: Bookman (SBQ). 598-676pp.
42. Soetaert, W e Vandamme, E. (2011). *Biofuels*. John Wiley & Sons. 256 pp.
43. Sousa, E. K. S., Feitosa, V. A., Silveira, J. A. G. (2011). *Optimização do protocolo de purificação da curcina (uma RNA-N-glicosidase) da torta residual de sementes de Jatropha curcas L.* XXX Encontro de Iniciação Científica. 5pp.
44. Triola, M. F. (2005). *Introdução à estatística*. 9ª edição. Editora LTC. Rio de Janeiro. 698 pp.
45. Valente, A. L. P., Collins, C. H., Manfredi, J.E. (1983). *Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência*. *Química Nova*, São Paulo. 103-109 pp.

ANEXOS

Anexo A

a) Cromatogramas obtidos na determinação de curva de calibração por CLAE

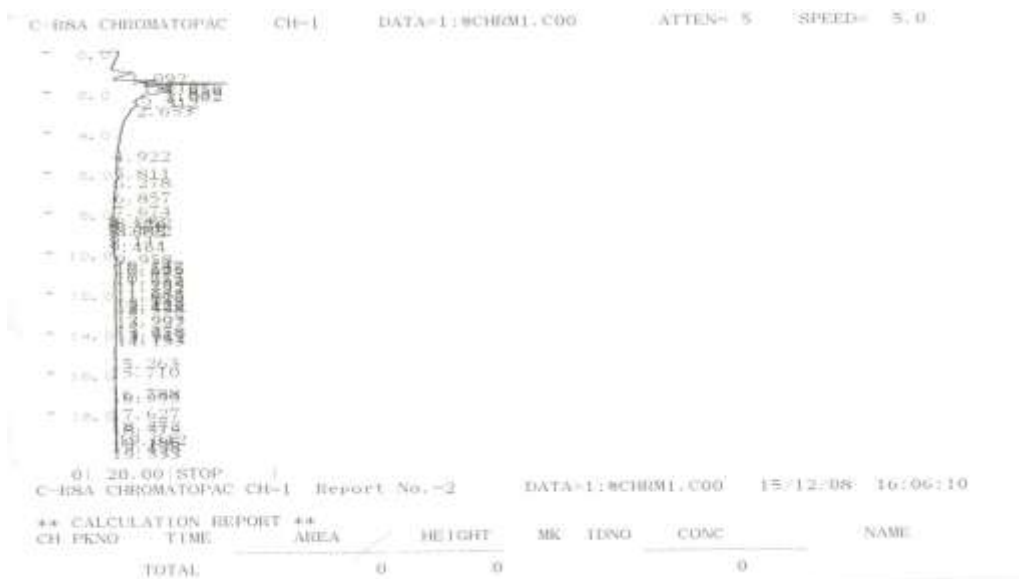


Figura1. Cromatograma de linha de base para análise da curva padrão

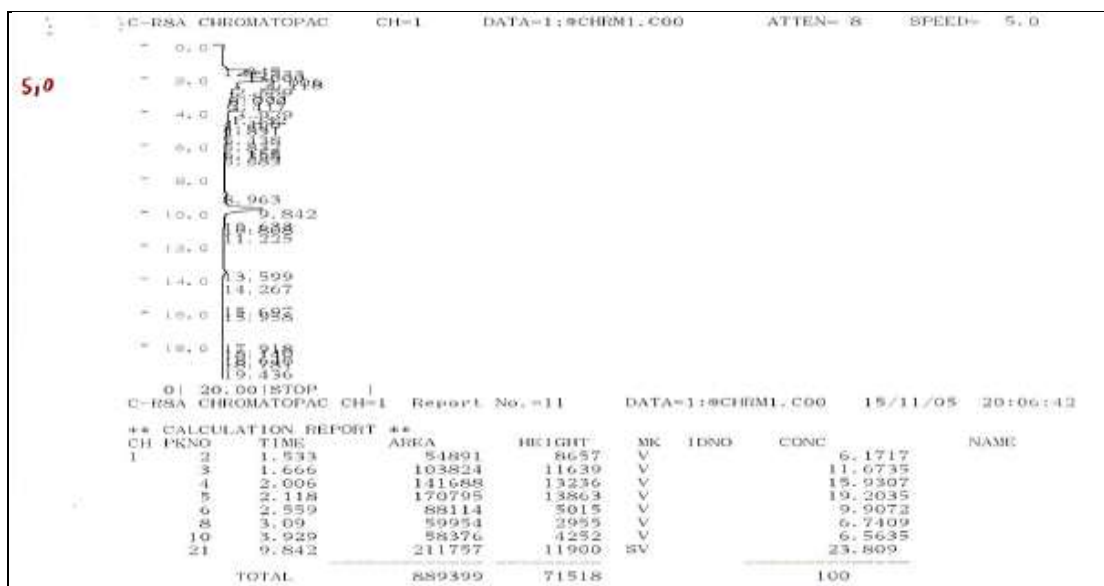


Figura2. Cromatograma do Padrão DHBP na concentração de 5 µg/mL

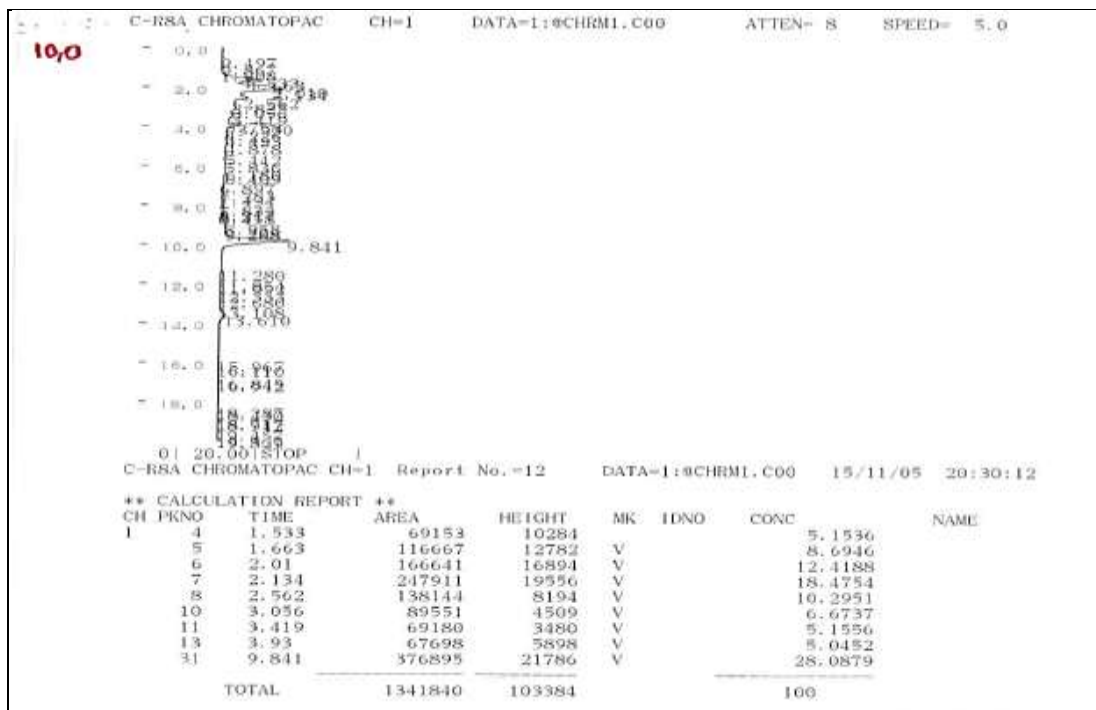


Figura3.Cromatograma do Padrão DHBP na concentração de 10 µg/mL

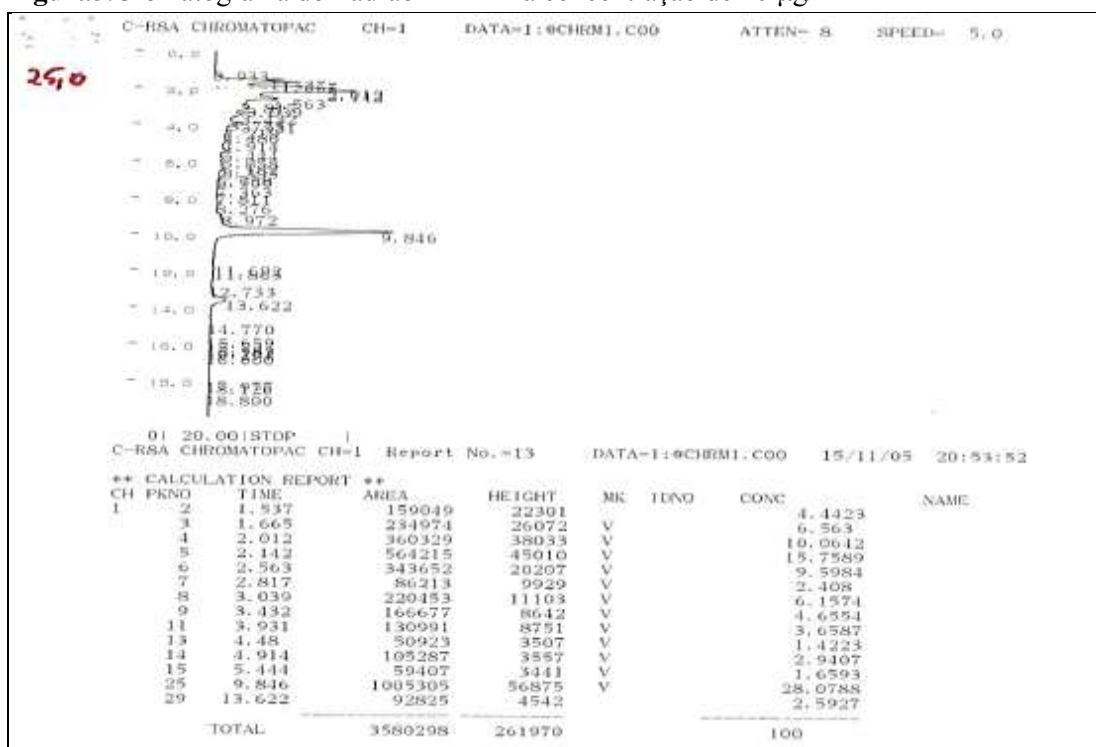


Figura4.Cromatograma do Padrão DHBP na concentração de 25 µg/mL

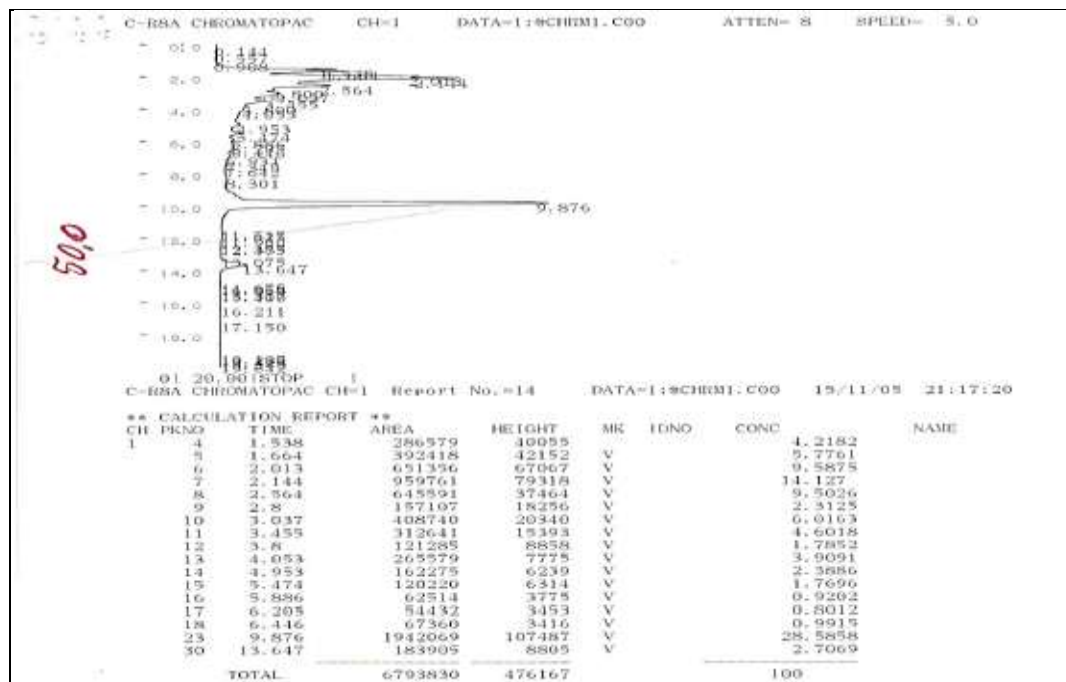


Figura 5. Cromatograma do Padrão DHPB na concentração de 50 µg/mL

Anexo B

Tabela 1. Melhores variedades híbridas produzidas no Bloco D

Variedades Híbridas	Variedades Fêmeas	Variedades Machos	#Total de Frutos
100-DH	988-AF	1044-AM	132
323-DH	1042-AF	1020-AM	79
343-DH	1042-AF	1013-AM	57
5-DH	1052-AF	1039-AM	50
7-DH	1052-AF	1039-AM	49
31-DH	1052-AF	1039-AM	43

Onde: DH- Corresponde as variedades híbridas produzidas no Bloco D, AF- Corresponde as variedades Fêmeas produzidas no Bloco A e AM- Corresponde as variedades Machos produzidas no Bloco A.

Tabela 2. Razão entre # total de frutos e DHPB(mg/g) na casca interna e albúmen

Variedades Híbridas	#Total de Frutos	DHPB (mg/g)	#Frutos/DHPB (Casca interna)	DHPB (mg/g)	#Frutos/DHPB (Albúmen)
100-DH	132	1.73	76.30	0.49	269.39
110-DH	114	2.59	44.02	0.35	325.71
221-DH	51	1.12	45.54	0.33	154.55
323-DH	79	2.03	38.92	0.72	109.72
343-DH	57	2.3	24.78	0.35	162.86
624-DH	212	2.84	74.65	0.66	321.21
31-DH	43	2.05	20.98	0.29	148.28
7-DH	49	2.49	19.68	1.04	47.12
5-DH	50	2.82	17.73	0.94	53.19
144-DH	44	1.92	22.92	0.75	58.67

Tabela 3. Resultados de cálculos de LOD e LOQ para o albúmen

x(conc) ng/μL	y(area do pico)	$\hat{y}(\hat{y}=40854X - 5485)$	y- \hat{y}	(y- \hat{y}) ²
0	0	-5485	5485	30085225
2.5	95389	96650	-1261	1590121
5	207982	199785	9197	84584809
10	403410	403055	355	126025
25	990153	1015865	-25712	661106944
50	2049129	2037215	11914	141943396

Usando as equações 3 e 4 obteve-se para LOD 1.22 ng L⁻¹ e LOQ 3.13 ng L⁻¹.

Tabela 4. Resultados dos cálculos de LOD e LOQ para casca interna

x(ng/μL)	y(area do pico)	$\hat{y}(\hat{y}=38905x + 6913)$	y- \hat{y}	(y- \hat{y}) ²
0	0	6913	-6913	47789569
5	211757	201438	10319	106481761
10	376895	395963	-19068	363588624
25	1005305	979538	25767	663938289
50	1942069	1952163	-10094	101888836

Usando as equações 3 e 4 obteve-se para LOD 1.77 ng L⁻¹ e LOQ 5.49 ng L⁻¹.

Anexo C

Exemplo de aplicação do teste de normalidade nas réplicas de albúmen e casca interna

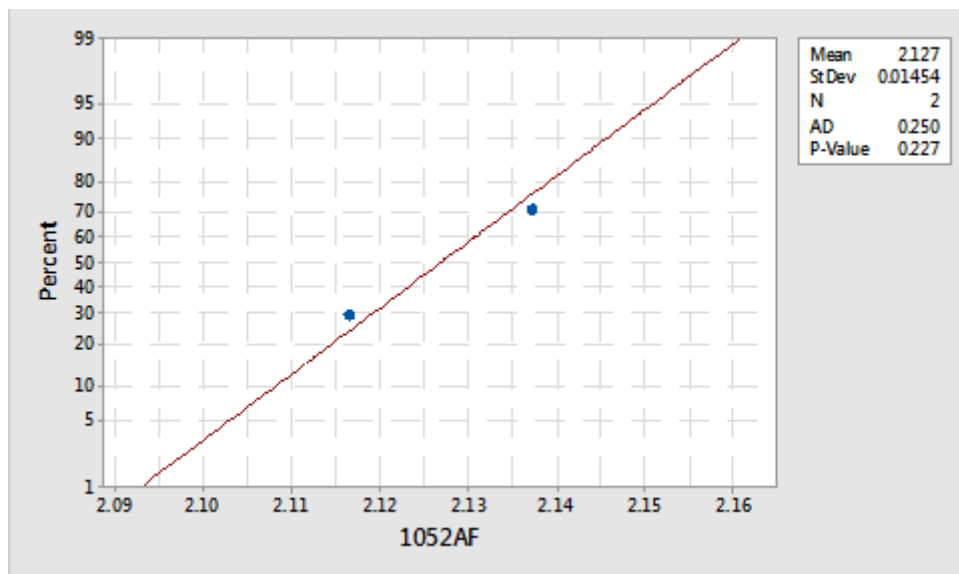


Figura 1. Teste de normalidade na variedade progenitora fêmea 1052AF na casca interna

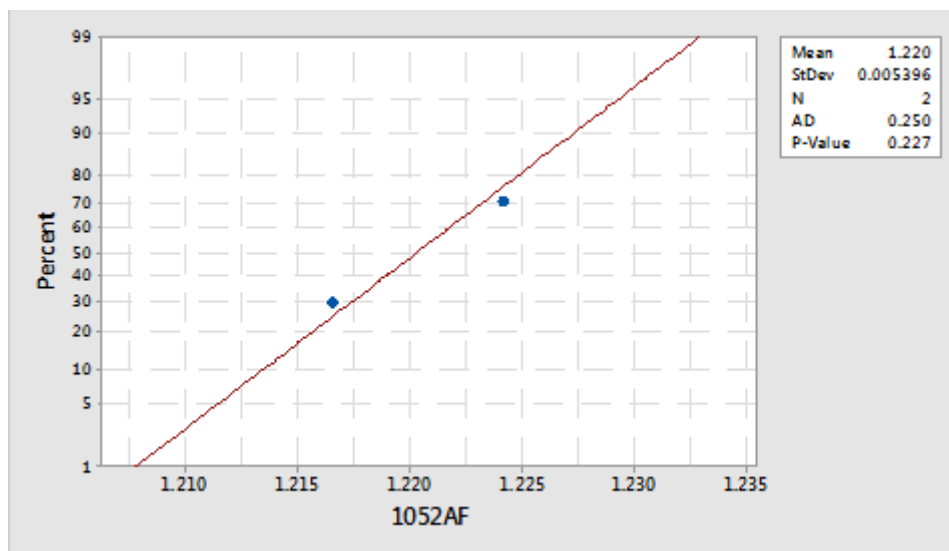


Figura 2. Teste de normalidade na variedade progenitora fêmea 1052AF no Albúmen

Anexo D**Exemplo de aplicação do teste estatístico Anova unimodal para casca interna e albúmen usando teste de comparação Fischer.****ANOV Aunimodal: 5DH, 7DH, 31DH para casca interna**

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	2	0.609025	0.304513	235.27	0.001
Error	3	0.003883	0.001294		
Total	5	0.612908			

Fisher Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Fisher LSD Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
5DH	2	2.8074	A
7DH	2	2.4732	B
31DH	2	2.02960	C

Means that do not share a letter are significantly different.

ANOVAunimodal: 5DH, 7DH, 31DH para seed

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	2	0.669888	0.334944	109.79	0.002
Error	3	0.009152	0.003051		
Total	5	0.679041			

Fisher Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Fisher LSD Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
7DH	2	1.0347	A
5DH	2	0.9386	A
31DH	2	0.28273	B

Means that do not share a letter are significantly different.