



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

**Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química**

**USO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E  
OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS  
PARA ANÁLISE DE CHÁS COMERCIAIS DE *CAMELLIA  
SINENSIS***

**Aline Alves de Almeida**

**Dissertação de Mestrado em Química dos Recursos Naturais**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ieda Spacino Scarminio**

---

Londrina  
Fevereiro 2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Aline Alves de Almeida**

**USO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E OTIMIZAÇÃO DAS  
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA ANÁLISE DE CHÁS  
COMERCIAIS DE *CAMELLIA SINENSIS***

**Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em  
Química dos Recursos Naturais, da Universidade  
Estadual de Londrina, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre.**

**Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ieda Spacino Scarminio**

Londrina - 2006

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

A447u Almeida, Aline Alves de.

Uso de métodos quimiométricos e otimização das condições experimentais para análise de chás comerciais de *Camellia sinensis* / Aline Alves de Almeida. – Londrina, 2006.  
65f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, 2006.

Bibliografia: f. 62-65.

1. Química analítica – Teses. 2. *Camellia sinensis* – Teses. 3. Chá – Análise – Teses. 4. Quimiometria – Teses. 5. Extração por solventes – Teses. 6. Espectroscopia de infravermelho – Teses. 7. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 8. Análise de componentes principais – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 543.4

**PROGRAMA DE MESTRADO EM QUÍMICA DOS RECURSOS NATURAIS**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**

**USO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E OTIMIZAÇÃO DAS  
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA ANÁLISE DE CHÁS  
COMERCIAIS DE *CAMELLIA SINENSIS***

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ieda Spacino Scarminio (Orientadora)**

**Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Isabel Craveiro Moreira**

**Londrina, de fevereiro de 2006**

*A minha mãe maravilhosa, por todo amor despendido, pelo apoio incondicional, pelos esforços desmedidos, incentivo, paciência, confiança e por ser a razão de eu ter galgado toda esta trajetória.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me suprido com toda sabedoria e força em todos os momentos desta trajetória.

À Professora Dra Ieda Spacino Scarminio, pela sabedoria e entusiasmo transmitidos, pela orientação, pela confiança, incentivo e principalmente pela amizade e carinho despendido.

À Professora Dra Isabel Craveiro Moreira pela ajuda na interpretação dos espectros do FTIR.

À Patrícia Kaori Soares pelo apoio, carinho e companheirismo transmitidos em todos os momentos.

À amiga Vanessa Pulita Cayres pelo ombro amigo, por todo apoio, carinho e pelas constantes trocas de idéias nestes anos de convivência.

Ao Lucas Mariano da Cunha e Silva e Paulo Henrique Março por toda contribuição que deram a este trabalho.

Ao Rafael Borrasca Gati por todo apoio, carinho, compreensão, companheirismo e paciência transmitidos ao longo deste trabalho.

A minha família: pai, mãe, Dani, Neto e Caique por todo amor e carinho, que me proporcionaram força e razão para continuar.

Ao meu tio José Carlos de Almeida e tia Alair de Almeida Teixeira por todo apoio, confiança e carinho despendidos.

As minhas amigas Natália e Ana Lúcia pela amizade, carinho e compreensão.

A todos os colegas de sala, que compartilharam comigo nestes anos.

Aos professores por seus ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

À Professora Dra. Maria Cristina Solci pelo empréstimo da válvula de amostragem do Cromatógrafo Líquido.

Ao Jurandir Pereira Pinto pelo auxílio no uso do Cromatógrafo Líquido

A Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Departamento de Química, que possibilitou esta oportunidade de amadurecimento intelectual e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) pela bolsa concedida.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para este trabalho.

## Resumo

A influência de diferentes solventes na extração e a composição da fase móvel em HPLC-FR foram investigadas por métodos estatísticos para otimização de solventes dos extratos de plantas medicinais na busca de impressão digital. Para o modelo, o número de picos e o fator de separação foram usados como uma medida de informação. A composição ótima de solventes para extrair as substâncias químicas do chá verde, *Camellia sinensis*, e para a fase móvel foi acetato de etila:etanol:diclorometano (20:5:75)% v/v e metanol:acetonitrila:água (7,5:57:35) %v/v, respectivamente. O sistema resultou a informação de 26 picos cromatográficos.

Estes resultados mostraram que a escolha incorreta de solventes para a composição da fase móvel e do solvente de extração leva a uma pobre detecção do número picos e perfil cromatográfico. Dez amostras de chás comerciais originárias da China, Japão, Inglaterra e Brasil foram investigadas por HPLC-FR, infravermelho próximo (FTIR) e análise de componentes principais (ACP). Com a ajuda da ACP foi possível diferenciar as quatro diferentes origens.



## Abstract

The influence of different solvents on the extraction medium and the RP-HPLC mobile phase composition was investigated by statistical mixture designs to optimize solvent proportions to prepare the fingerprint of a medicinal herbal extract. For modeling, the number of peaks was used as a measure of fingerprint information. The optimum compositions of solvent to extract chemical substances from green tea and for mobile phase chromatographic analysis were ethyl acetate:ethanol:dichloromethane (20:5:75) %v/v and MeOH:ACN:water (7.5:57.5:35) %v/v, respectively. This system results in 26 peaks in the chromatographic fingerprint. These results show that an incorrect choice of modifiers for mobile phase composition and solvent extraction hampers the detection of a maximum number of peak and produces poor chromatographic fingerprint.

Ten commercial tea samples of Chinese, Japanese, English and Brazilian origins were investigate by RP-HPLC, middle infrared (FTIR) and Principal Component Analysis (PCA). With the help of the PCA it was possible to differentiate from four different origins.



*Capítulo I*

*Introdução  
e  
Objetivos*

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Nos últimos anos, houve um crescimento significativo do mercado de fitoterápicos e plantas medicinais no Brasil, o que acarretou a busca de validação analítica dos produtos comercializados<sup>(1)</sup>.

A má qualidade destes produtos no Brasil, no entanto, é um fato conhecido, e recentemente o Ministério da Saúde (MS) elaborou uma portaria regulamentando os procedimentos para a produção destes medicamentos. Por outro lado, a atividade de farmacovigilância no País é incipiente, sendo praticamente inexistente para fitoterápicos<sup>(2)</sup>.

As plantas medicinais vêm se mostrando como alternativa na substituição de drogas sintéticas, prevenção e tratamento de algumas doenças crônicas e moderadas, provando serem adequadas qualitativamente quando usadas corretamente. Muitos fatores influenciam a qualidade das ervas, incluindo as variações das espécies, condições ambientais, época de colheita, estocagem e processamento. Em adição, extratos de ervas podem ser acrescentados com outras plantas isentas ou esgotadas de constituintes ativos. Por estas razões, o controle de qualidade da padronização de extratos de ervas é parte essencial de algumas pesquisas envolvendo segurança, eficácia e reprodutibilidade terapêutica. O controle de qualidade não é fácil, porque os extratos medicinais são misturas complexas de diferentes compostos e freqüentemente estas identidades são somente parcialmente conhecidas<sup>(3)</sup>.

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem-se uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal<sup>(4)</sup>.

Como resultado, torna-se difícil ou impossível em muitos casos identificar a maior parte dos componentes por meio de abordagens comuns<sup>(5)</sup>. Em geral, poucos marcadores ou componentes farmacologicamente ativos são empregados para avaliar a qualidade e autenticidade de uma planta medicinal.

Várias técnicas experimentais e métodos cromatográficos são recomendados para determinar a impressão digital destes produtos. Neste perfil cromatográfico um número e/ou concentrações de constituintes quimicamente característicos não devem ser similares em diferentes amostras. Como resultado, para obter uma impressão digital cromatográfica (IDC) quimicamente fidedigna não é um trabalho trivial. A performance de uma IDC é rigorosamente dependente do grau de separação cromatográfico e da distribuição de todos os componentes químicos da planta medicinal investigada.

No desenvolvimento do método analítico para análise de planta medicinal, o passo mais importante é a preparação da amostra <sup>(6)</sup>. Diferentes métodos de extração e diferentes condições podem muitas vezes ser necessários para a extração de compostos marcadores de diferentes materiais da planta, diferentes condições de operação, tais como uso do solvente e temperatura.

As técnicas de separação analítica, CLAE e ou CG/EM estão entre os métodos mais populares usados para o controle da qualidade do material bruto e produto acabado.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método mais popular para análise de ervas medicinais porque é de fácil operação e não limitado pela volatilidade ou estabilidade dos componentes da amostra como a cromatografia gasosa (CG). Em geral, a CLAE pode ser usada para analisar quase todos os componentes de ervas medicinais. Assim, durante as últimas décadas, a CLAE recebeu aplicação mais extensa na análise de ervas medicinais. Colunas de fase-reversa (FR) são as colunas mais utilizadas na separação analítica de ervas medicinais. <sup>(7)</sup>

É necessário notar que a condição ótima de separação para a CLAE envolve muitos fatores, como as diferentes composições das fases móveis, o ajuste de pH, pressões da bomba, etc. Assim para obter um bom resultado do experimento é necessária uma ótima separação. <sup>(7)</sup>

Na CLAE-FR, a separação dos componentes de uma amostra é governada pela composição da fase móvel <sup>(8)</sup>. Embora basicamente a fase móvel seja uma mistura de água e um ou mais solventes orgânicos, a obtenção da composição exata é complicada pela forte influência do tipo de solventes orgânicos e sua influência relativa sobre a seletividade.

A aplicação da espectroscopia do infravermelho (IV), na análise de plantas é muito limitada comparada a sua aplicação nas outras áreas. Inicialmente o uso do método de espectroscopia no infravermelho (IV) era restrito somente para elucidação de estruturas de substâncias isoladas de matrizes de plantas medicinais. É também usado em estudos fitoquímicos como dispositivo de 'impressão digital', para comparação de amostra natural e sintética. A inerente complexidade do espectro de IV faz com que a interpretação pode ser difícil e a operação requer muita experiência. Certamente, as ligeiras diferenças nos espectros das plantas dentro da mesma espécie não são óbvias e geralmente não são visíveis a olho nú. Assim, a aplicação da espectroscopia IV à análise de ervas é ainda muito limitada comparada as suas aplicações em outras áreas (indústria de alimento e de bebida, microbiologia, farmacêutica, etc.) <sup>(9)</sup>.

O chá da planta, *Camellia Sinensis* (L.), Figura 1, originalmente do sul-leste da China, foi gradualmente expandido para Índia, Sri Lanka e então em muitos países tropicais e subtropicais <sup>(10)</sup>. Desde então, a medicina tradicional chinesa tem recomendado esta planta para dores de cabeça, dores no corpo, digestão, depressão,

desintoxicação, como energizante, e em geral, para prolongar a vida. O chá contém óleos voláteis, vitaminas, minerais, purinas, polifenóis (particularmente catequinas) <sup>(11)</sup>. Também contém diferentes compostos possuindo propriedades biológicas e farmacêuticas que são boas para a saúde. Estas propriedades são mostradas por vários estudos in vivo e in vitro. Estes compostos mostram várias ações: antialérgicas, antioxidantes, anti-mutagênica e anticancerígenos, anti-arterosclerose e anti-bacterial <sup>(10)</sup>, hipocolesterêmica e outras atividades clinicamente relevantes <sup>(11)</sup>.

A *Camellia sinensis* pode ser um arbusto ou uma árvore que pode chegar até 16m de altura. Os três tipos de chá produzidos são: verde, oolong e preto, mas todos são da mesma planta. O chá verde é preparado de folhas frescas, os brotos são compactados e em seguida enrolados e secos. O oolong é feito por secagem das folhas frescas ao sol, sendo que depois elas são levemente moídas e parcialmente fermentadas. O chá preto é feito por fermentação e em seguida uma ligeira secagem das folhas. <sup>(11)</sup>

Considerando o exposto acima, este trabalho teve como objetivos:

1. Ampliar o uso da espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) como uma ferramenta rápida para o controle de qualidade de materiais vegetais.
2. Ampliar o uso da espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) como uma ferramenta rápida para o controle de qualidade de materiais vegetais.
3. Aplicar métodos quimiométricos de planejamento para otimizar o sistema de extração, bem como da fase móvel em CLAE-FR, na análise de diferentes marcas de chá verde, *Camellia sinensis*.
4. Aplicar métodos quimiométricos de análise multivariada para extrair informações químicas relevantes dos dados obtidos em FTIR e CLAE, de diferentes marcas de chás de *Camellia sinensis*.

Para este estudo foram analisadas 10 marcas de chás comerciais, sendo, quatro marcas nacionais, quatro da China, uma da Inglaterra e uma do Japão.



Figura 1 – Foto da *Camellia sinensis* <sup>(12)</sup>



*Capítulo II*

*Métodos  
Quimiométricos*

## 2. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

A Quimiometria pode ser definida como a disciplina química que utiliza métodos matemáticos e de estatística multivariada para definir ou selecionar as condições ótimas de medição e experiência, e extrair de dados químicos o máximo de informações. O termo só apareceu na década de 70, na química analítica, como decorrência dos grandes progressos da instrumentação e da chegada dos microcomputadores nos laboratórios. Hoje a quimiometria pode ser vista como um conjunto de métodos para formular, ajustar, validar e usar modelos empíricos, em geral, com aplicação em todos os ramos da química. Uma de suas contribuições foi apresentar aos químicos o modo de pensar multivariado. Isso se aplica não somente aos dados da química analítica instrumental, que são por natureza multivariados, mas também ao planejamento de experimentos, tradicionalmente dominado pela mentalidade de variar um fator de cada vez<sup>(13)</sup>.

A seqüência básica da análise exploratória de dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 2.

Antes de proceder à análise exploratória dos dados é feita uma inspeção visual para verificar problemas de variação da linha de base, sobreposição de bandas e ruídos. Os dados são convertidos na forma de uma matriz (tabela de dados), a qual representaremos por  $X$ . As  $N$  linhas da matriz representam as amostras (ou objetos), onde cada valor corresponde a uma propriedade medida para uma amostra específica, enquanto que as  $p$  colunas são variáveis que correspondem a uma propriedade medida para cada amostra.



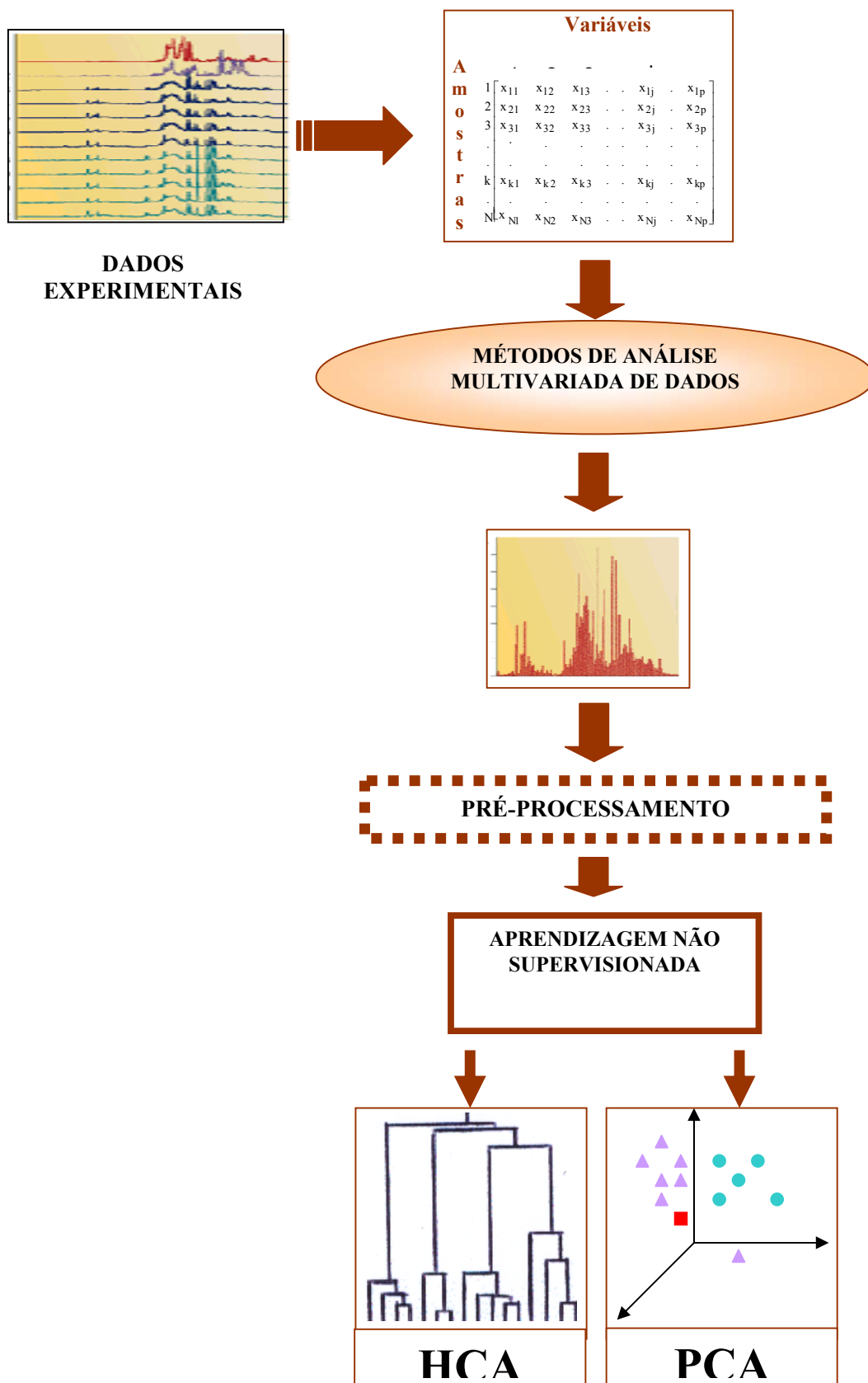


Figura 2 – Esquema da seqüência usada na análise exploratória dos dados experimentais.

Em seguida é realizada uma pré-seleção das variáveis quando necessário para definir a região do espectro ou cromatograma que contém a informação que será utilizada no cálculo.

O pré-processamento é uma etapa importante da análise, pois os dados de uma forma geral contêm fontes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos ou unidades diferentes. Ele é definido como qualquer manipulação matemática nos dados com o objetivo de remover ou reduzir estas fontes irrelevantes de variação <sup>(14,15)</sup>. Pode ser dividido em dois tipos básicos, dependendo se são operados nos valores relacionados às amostras ou às variáveis, e a sua escolha vai depender do conjunto de dados e do objetivo <sup>(15)</sup>.

Nas equações foram empregados às notações padrões de álgebra linear onde, as matrizes são indicadas por letras maiúsculas em negrito e os sub-índices são usados para notação da linha e coluna. Os vetores são representados e m letras minúsculas em negrito <sup>(16)</sup>.

## **2.1 Normalização**

A normalização nas amostras é feita dividindo cada variável por uma constante. Os dois tipos mais comuns são: a normalização por área unitária ou por comprimento do vetor unitário.

### **2.1.1 Normalização por área unitária**

Esta normalização é feita dividindo cada valor original pela soma de todos os valores absolutos das medidas, Equação 1. Este procedimento para os dados cromatográficos tem a finalidade de corrigir a variação do volume da amostra injetado no cromatógrafo, sem destruir a proporcionalidade das substâncias orgânicas <sup>(14)</sup>,

$$x'_{ij} = x_{ij} / \sum_{j=1}^p |x_j| \quad (1)$$

onde  $x'_{ij}$  refere-se aos dados normalizados, da amostra  $i$  e variável  $j$ .

### 2.1.2 Normalização por comprimento do vetor

Esta normalização é feita dividindo cada valor original pela soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha, Equação 2. A finalidade é remover a variação sistemática, normalmente associada com a quantidade total da amostra <sup>(14)</sup>.

$$x' = x_{ij} / \sqrt{\sum_{j=1}^p x_{ij}^2} \quad (2)$$

## 2.2 Análise de componentes principais (PCA)

Embora a análise de componentes principais tenha sido primeiramente aplicada para ciências sociais nos anos 40, atualmente tem sido muito usada em problemas químicos e físicos, incluindo análise de espectros de infravermelho; deslocamentos químicos no espectro de ressonância magnética nuclear; deconvolução de bandas e determinação de componentes em misturas <sup>(14)</sup>.

PCA é um termo genérico usado para descrever uma classe de métodos utilizados para analisar as inter-relações dentro de um conjunto de variáveis (altura de picos cromatográficos, valores de absorvâncias, etc.) ou objetos (amostras, compostos químicos, espectros, etc.) <sup>(16)</sup>.

O principal objetivo da PCA é a redução do número de variáveis originais. A PCA gera uma nova representação destas variáveis através das componentes principais, que são combinações lineares das variáveis originais<sup>(16)</sup>.

A PCA transforma a matriz de dados originais  $X_{n \times p}$ , formada por  $n$  objetos e  $p$  variáveis, no produto de duas matrizes menores, conforme mostra a Equação 3,

$$\mathbf{X}_{n \times p} = \mathbf{T}_{(n \times q)} \mathbf{P}_{(q \times p)}^t + \mathbf{E}_{(n \times p)} \quad (3)$$

onde  $\mathbf{T}$  é a matriz dos escores,  $\mathbf{P}$  é a matriz dos pesos,  $\mathbf{E}$  é a matriz dos resíduos e  $q$  é o número de componentes principais incluídas na análise. Como  $q$  normalmente é menor do que  $p$  ou  $n$ , uma matriz maior é transformada em duas matrizes menores tornando a análise da matriz  $\mathbf{X}$  mais simples.

Existem dois métodos de análise das componentes principais o chamado tipo-R, o qual se refere ao estudo da relação entre as variáveis e, o chamado tipo-Q, onde se estuda a relação entre os objetos. Neste trabalho foi usado o método tipo-Q.

### 2.2.1 Análise de Componentes do tipo-Q<sup>(16,17,18)</sup>

A análise das componentes do tipo-Q, Figura 3, é o termo usado para descrever um número de métodos designados para analisar inter-relações dentro de um conjunto de amostras (objetos). De certa forma, os escores obtidos pela análise do tipo-R proporcionam um meio de descrever relações entre os objetos. Entretanto, estas associações não são usualmente baseadas em uma medida adequada da similaridade entre os objetos, isto é, a covariância ou correlação pode não ser o melhor critério para julgar o grau de similaridade entre dois objetos<sup>(16)</sup>.

O ponto fundamental da análise tipo-Q é a construção de uma matriz nxn contendo o grau de similaridade entre todos os possíveis pares de objetos. Construída a matriz, o procedimento segue passos semelhantes aos da análise tipo-R <sup>(16)</sup>.

O método de Imbrie define a similaridade das amostras considerando as proporções dos componentes. O objetivo é encontrar o número de membros terminais q. Esse número é determinado pela aproximação da matriz de dados por uma matriz de ordem menor, definindo um número de vetores linha que são linearmente independentes, bem como a dimensionalidade do sistema. O método procura, na matriz de associação, aqueles membros terminais que são as amostras que apresentam as composições mais divergentes quando comparados com as demais amostras.

A contribuição de cada membro terminal é obtida pelo uso da análise de autovetores. Esta análise é feita sobre uma matriz real e simétrica, obtida da matriz de dados.

O método de Imbrie usa o coeficiente  $\cos \theta$  como medida do grau de similaridade entre os objetos. Para dois objetos n e m, que são os vetores linha de uma matriz de dados  $\mathbf{X}$ , esse coeficiente é definido por:

$$\cos \theta_{nm} = \frac{\sum_{j=1}^p x_{nj}x_{mj}}{\sqrt{\sum_{j=1}^p x_{nj}^2 \sum_{j=1}^p x_{mj}^2}} \quad (4)$$

onde  $x_{nj}$  representa a j-ésima variável do n-ésimo objeto e p o número de variáveis.

O coeficiente  $\cos \theta_{nm}$  é o cosseno do ângulo entre dois vetores no espaço p-dimensional. Geometricamente, quando  $\cos \theta = 1,0$ , existe identidade entre os dois objetos.

Após a determinação dos valores do coeficiente  $\cos \theta_{nm}$  para cada par de objetos, esses valores podem ser arranjados em uma matriz de associação  $\mathbf{H}$ . Esta operação pode ser efetuada de duas maneiras.

Inicialmente define-se:

$$W_{nj} = \frac{x_{nj}}{\sqrt{\sum_{j=1}^p x_{nj}^2}} \quad (5)$$

Esta operação corresponde a dividir cada elemento de uma linha pela raiz quadrada da soma dos quadrados dos elementos da linha, normalizando a matriz de dados tal que:

$$\sum_{j=1}^p W_{nj}^2 = 1 \quad \text{para } n= 1, 2, \dots, N.$$

onde  $N$  é o número total de amostras.

$$\text{Dessa forma, } \cos \theta_{nm} = \sum_{j=1}^p W_{nj} W_{mj}$$

Na forma matricial:

$$\mathbf{W} = \mathbf{D}^{1/2} \mathbf{X}, \quad (6)$$

onde  $\mathbf{D}$  é uma matriz diagonal  $N \times N$  contendo a soma dos quadrados das linhas de  $\mathbf{A}$ .

Logo, a matriz de associação  $\mathbf{H}$  é dada por:

$$\mathbf{H} = \mathbf{W}\mathbf{W}^t \quad (7)$$

ou

$$\mathbf{H} = \mathbf{D}^{1/2} \mathbf{X}\mathbf{X}^t \mathbf{D}^{1/2} \quad (8)$$

A normalização da linha não afeta a relação de proporcionalidade entre as variáveis, mas remove os efeitos dos diferentes tamanhos dos objetos. A matriz de associação  $\mathbf{H}$  contém a separação angular de todos os objetos (vetores linha) conforme eles estão situados no espaço p-dimensional.

Diagonalizando a matriz  $\mathbf{H}$ , obtém-se os autovalores e autovetores como no tipo-R. Neste caso, a componente é definida por:

$$\mathbf{P} = \mathbf{U}_q \mathbf{\Lambda}_q^{1/2} \quad (9)$$

onde  $\mathbf{P}$  é a matriz  $n \times q$ ,  $\mathbf{U}$  uma matriz  $n \times q$  e  $\mathbf{\Lambda}$  é uma matriz  $q \times q$ , onde  $q$  é determinado pelo número de autovalores significativos, e a matriz de escores pode ser definida como:

$$\mathbf{T} = \mathbf{W}^t \mathbf{P} \mathbf{\Lambda}^{-1} \quad (10)$$

onde  $\mathbf{T}$  é uma matriz  $p \times q$ ,  $\mathbf{W}^t$  é uma matriz  $p \times n$ ,  $\mathbf{P}$  é uma matriz  $n \times q$  e  $\mathbf{\Lambda}$  é uma matriz  $q \times q$ .

Até agora se enfatizou a idéia conceitual da análise do tipo-Q. Na prática, quando o número de objetos,  $N$ , for muito maior que o número de variáveis,  $p$ , computacionalmente é mais eficiente usar o seguinte procedimento:

- I) Calcular a matriz de associação  $\mathbf{H}$  como  $\mathbf{W}^t\mathbf{W}$  ao invés de  $\mathbf{W}^t\mathbf{W}$ ;
- II) Calcular os autovalores  $\mathbf{\Lambda}$  e os autovetores correspondentes  $\mathbf{U}$ ;
- III) A matriz dos escores é idêntica a  $\mathbf{U}_q$ , isto é:  $\mathbf{T} = \mathbf{U}_q$ ;
- IV) A matriz dos pesos pode ser calculada por:  $\mathbf{P} = \mathbf{W}\mathbf{T}$ .

Caso esse procedimento seja seguido, nenhuma normalização é necessária nas colunas  $\mathbf{T}$  e

$\mathbf{P}$ .



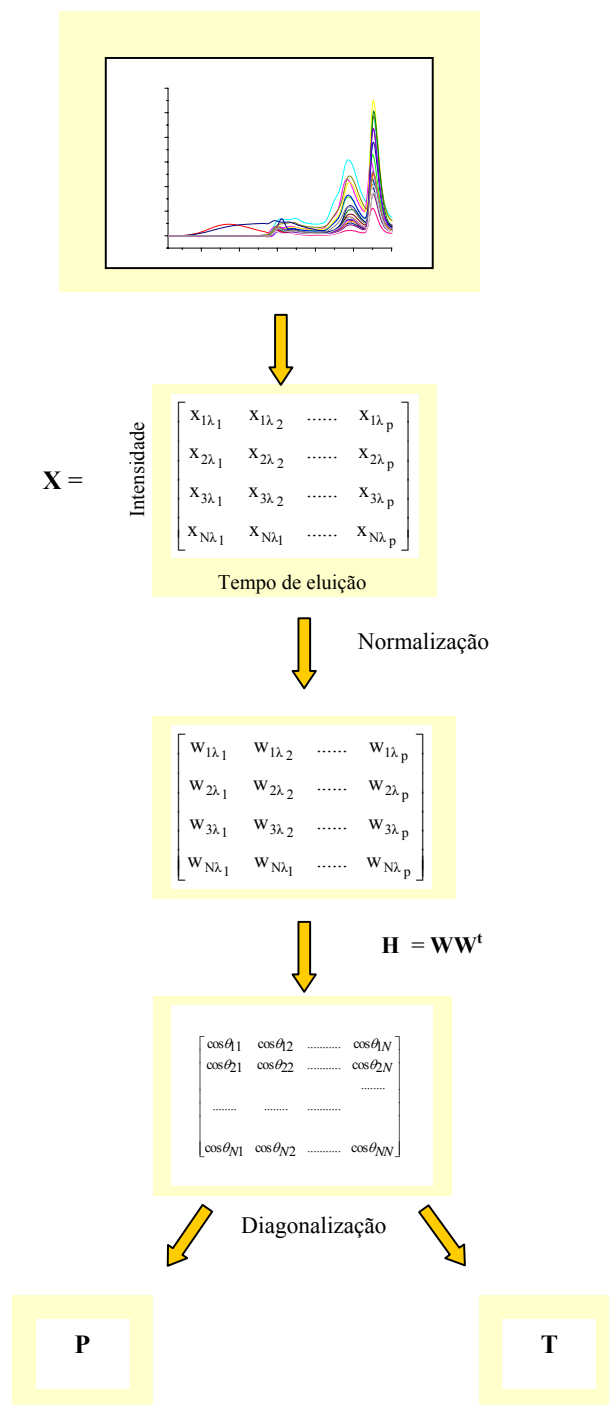


Figura 3- Sequência da análise de fatores do tipo-Q de Imbric.



*Capítulo III*

*Descrição  
Experimental*

### **3. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Preparo do sistema extrator**

O sistema extrator foi escolhido seguindo um planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex modificado, representado por um triângulo equilátero, Figura 4. Os vértices correspondem aos solventes puros, (1) acetato de etila, (2) etanol e (3) diclorometano, as arestas (4, 5 e 6) misturas binárias e o ponto central (7) uma mistura ternária de volumes iguais dos respectivos solventes. Foram adicionadas mais três misturas (8, 9 e 10) nas proporções 4:1:1, 1:4:1 e 1:1:4 (V/V), respectivamente, totalizando 10 composições diferentes de solventes.

#### **3.2 Preparo dos extratos para CLAE e FTIR**

Para o preparo de cada extrato do planejamento foram pesados 5,00g de folhas secas de chá verde (amostra comercial japonesa) e adicionados 60 mL dos solventes previstos pelo planejamento experimental. Cada solução ficou em repouso por 24 horas. Sendo submetidos à extração por turbólise por dez vezes.

Após a otimização do solvente extrator foram preparados extratos de dez marcas de chás comerciais, sendo quatro nacionais e 6 internacionais ( quatro da China, uma da Inglaterra e uma do Japão). Para o preparo dos extratos na condição otimizada foram pesados 4,00 g de cada amostra comercial (em duplicatas) adicionando 60 mL da mistura de solventes otimizada. Esta mistura foi deixada em repouso por vinte e quatro horas. Os extratos foram filtrados em algodão e levados a evaporação em um evaporador rotatório, numa temperatura em torno de 80°C.

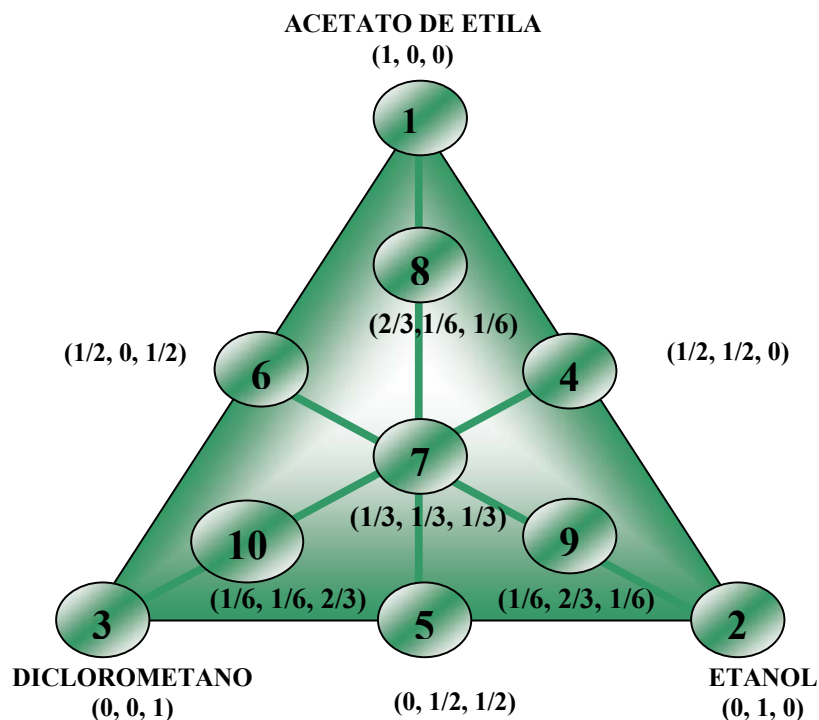


Figura 4 – Planejamento experimental Centróide-Simplex modificado para escolha do solvente extrator.

Após a evaporação, a mistura de solventes foi novamente acrescentada ao resíduo de chá verde ficando em repouso por mais vinte e quatro horas. O procedimento foi repetido por seis vezes, com o objetivo de conseguir extrair a maior quantidade de substâncias da planta.

Para as amostras de chás comerciais foram pesados apenas 4,00 gramas porque algumas marcas analisadas não tinham quantidade suficiente em suas embalagens para fazer duplicatas das amostras com 5,00g e ainda ter um excedente para que fossem feitos novos extratos caso houvesse algum problema no experimento.

A quantidade de solvente adicionado permaneceu a mesma (60 mL), porque cada amostra de chá comercial tinha um formato, algumas em folha, outras em pó e para todas amostras ficarem submersas no solvente ou mistura de solventes, 48 mL que seria proporcional as 4,00 g não seriam suficientes. Logo 60 mL foi a quantidade ideal para que todas amostras ficassem submersas.

### 3.3 Planejamento experimental para escolha da fase móvel

A separação perfeita de misturas empregando-se a cromatografia a líquido, somente terá sucesso se for possível acoplar uma fase móvel correta e uma fase estacionária conveniente<sup>(19)</sup>. A seleção do solvente ou mistura de solventes para ser utilizado como fase móvel deve ser feita de forma cuidadosa, pois terá um papel fundamental na separação de misturas. Em geral, observa-se que uma pequena variação na composição da fase móvel leva a grandes alterações nos resultados<sup>(20)</sup>.

Neste estudo, a composição da fase móvel foi escolhida seguindo um planejamento experimental<sup>(21)</sup> Centróide Simplex apresentado na Figura 5, representado por um triângulo equilátero. Os eluentes escolhidos foram: metanol 100% (MeOH), acetonitrila 100% (ACN) e água:metanol:acetonitrila (70%:15%:15%).

### 3.4 Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Para análise, 0,6 mg de cada extrato bruto foram misturados uniformemente com 150 mg de KBr e algumas gotas de clorofórmio.

Os espectros de FTIR foram registrados na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , em resolução de 1,93  $\text{cm}^{-1}$ , usando um espectrômetro Shimadzu FTIR-8300.

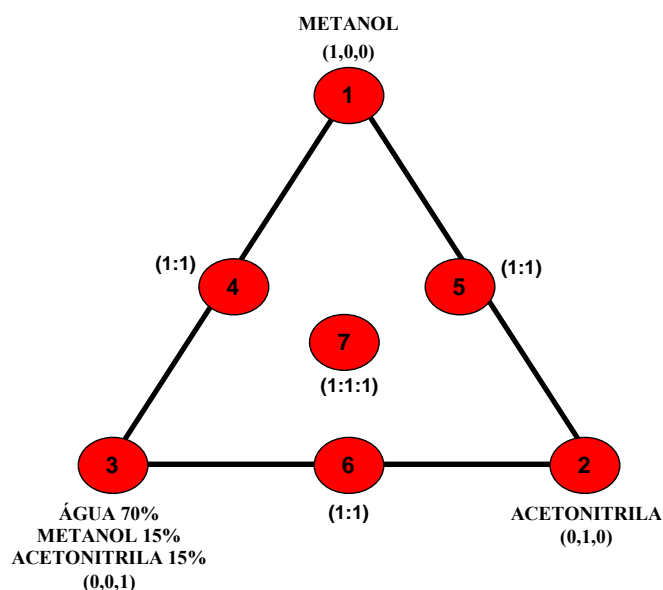


Figura 5 - Planejamento experimental Centróide-Simplex com três componentes para as fases móveis.

### 3.5 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Para análise das amostras preparadas de acordo com o planejamento, 30 mg de cada extrato bruto foi re-dissolvido em 3 mL do solvente ou mistura de solventes prevista pelo planejamento experimental, enquanto, as amostras da condição otimizada o extrato bruto foi re-dissolvido na mistura otimizada.

Todas as soluções ficaram em repouso por 1 hora e então filtradas em filtro comum. Em seguida uma alíquota de 50 $\mu$ L desta solução foi diluída em 950  $\mu$ L (1:20) do solvente extrator e/ou da mistura otimizada e depois filtrada em filtro Millipore Millex com 0,22  $\mu$ m.

As condições cromatográficas foram: coluna Metasil C18 ODS PN0380 Metachem com dimensões de 250 mm x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5  $\mu$ m, temperatura de 50°C, volume de injeção de 20  $\mu$ L, eluição monitorada nos comprimentos de onda de 210, 220, 230, 254 e 280 nm, vazão de 1 mL/ min.

Cada extrato do planejamento foi analisado em cada uma das fases móveis preparadas seguindo o planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex de acordo com a Figura 6.

As amostras preparadas na condição otimizada foram analisadas na fase móvel em que obteve a melhor relação do número de picos e tempo.

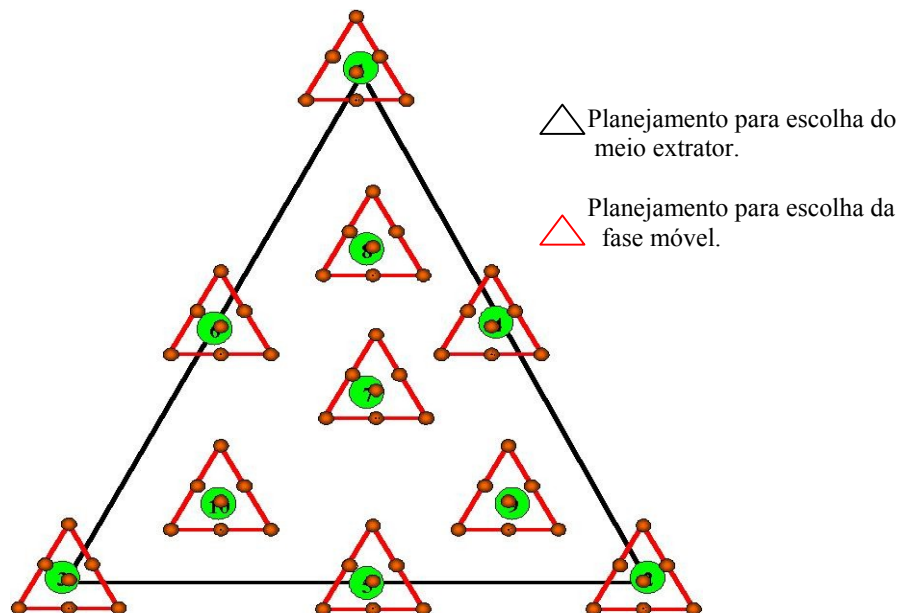


Figura 6 – Planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex com 3 componentes.

### **3.6 Reagentes**

Os reagentes utilizados foram: álcool etílico absoluto P.A. CAAL, 99,5% de pureza; acetato de etila P.A. CAAL, 99% de pureza, diclorometano P.A. Nuclear, 99,5% de pureza; KBr P.A. – A.C.S. Synth, 99% de pureza, clorofórmio P.A. – A.C.S. Synth, 99% de pureza, metanol VETEC, 99,8% grau cromatográfico, acetonitrila VETEC, 99,8% grau cromatográfico.

### **3.7 Equipamentos**

Os aparelhos utilizados foram: balança semi-analítica BOSH SAE 200, balança analítica Adventurer OHAUS, evaporador rotativo FISATOM 802; sonicador T7; cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu modelo LC-10AD com detector diodo array SPD- M10AVP e espectrômetro de infravermelho Shimadzu FTIR-8300.

### **3.8 Programa computacional**

Para a PCA e todos os métodos de pré-processamento, os programas foram desenvolvidos pela Profª. Dra. Ieda Spacino Scarminio, no Departamento de Química da UEL.



*Capítulo IV*

*Resultados  
e  
Discussão*



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa do trabalho investigamos os efeitos de três solventes: acetato de etila, etanol e diclorometano no rendimento dos extratos obtidos das folhas do chá comercial de marca nacional de *Camellia sinensis*. A matriz de planejamento, cujos elementos são as proporções utilizadas para preparar as várias misturas é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos extratos preparados com misturas de acetato de etila-etanol-diclorometano

Extratos	Solventes		
	Acetato de etila	Etanol	Diclorometano
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	0	1/2	1/2
6	1/2	0	1/2
7	1/3	1/3	1/3
8	2/3	1/6	1/6
9	1/6	2/3	1/6
10	1/6	1/6	2/3

A Figura 7 contém os valores da massa em gramas para os 10 extratos obtidos para a *Camellia sinensis*. Observa-se na Figura que o maior rendimento dos extratos está próximo ao extrator 5, ou seja, deslocado para o lado direito do triângulo do planejamento experimental Centróide - Simplex (Figura 4) modificado onde estão localizadas as amostras com maiores proporções de etanol.

Com estes resultados só podemos fazer uma análise grosseira, perdendo informações sobre o sistema estudado. Sendo assim estes efeitos foram investigados por modelos utilizando planejamento experimental de misturas. Estes experimentos multivariados permitem explorar os efeitos de várias variáveis simultaneamente e extrair o máximo de informação do sistema que está sendo investigado, de uma maneira mais eficiente quando comparado com o procedimento univariado, ou seja, uma variável por vez.

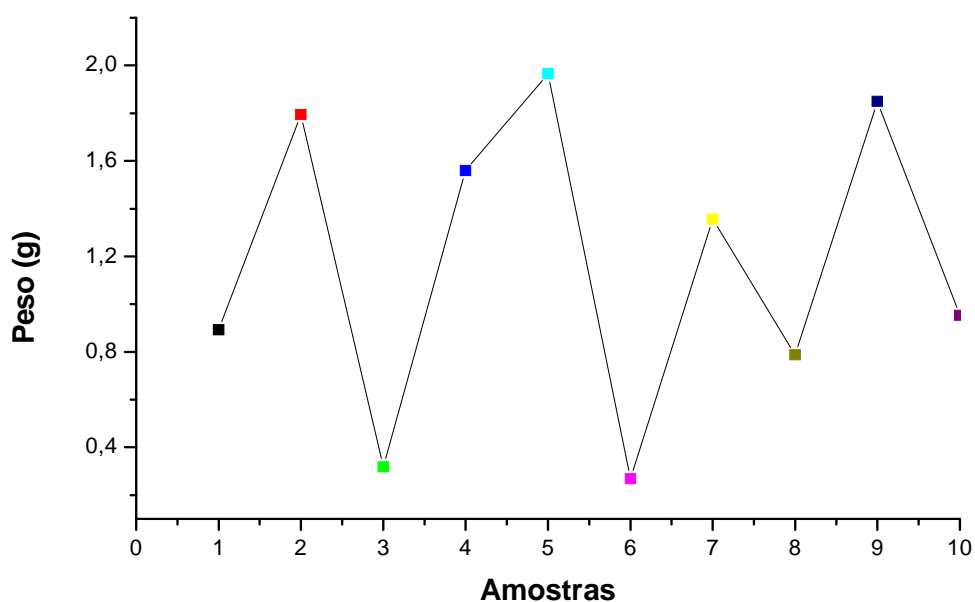


Figura 7 – Gráfico dos rendimentos obtidos usando planejamento com 3 componentes.

O modelo para prever o rendimento da *Camellia sinensis* foi calculado pelo ajuste de uma Equação polinomial de terceira ordem (modelo cúbico completo), Equação 13, que mostra os termos mais relevantes.

$$\hat{y} = 0,89\mathbf{a} + \mathbf{1,79e} + 0,31\mathbf{d} + 0,84\mathbf{ae} - 1,37\mathbf{ad} + \mathbf{3,61ed} - 0,98\mathbf{aed} \quad (13)$$

$(\pm 0,09)$     $(\pm 0,09)$     $(\pm 0,09)$     $(\pm 0,44)$     $(\pm 0,44)$     $(\pm 0,44)$     $(\pm 2,86)$

$\hat{y}$  é a resposta prevista pelo modelo, **a** = acetato de etila, **e** = etanol e **d** = diclorometano.

Os valores entre parênteses são os erros padrões dos parâmetros. Esta Equação apresenta sete termos dos quais dois são significativos (termos em negrito) estes valores indicam que o etanol tem maior poder extrator. O valor do coeficiente **ed** (3,61) sugere imediatamente uma forte interação sinérgica entre os solventes etanol/diclorometano. Isto significa que a presença dos solventes etanol e diclorometano na extração desta planta leva a um maior rendimento.

O modelo foi investigado examinando o gráfico da superfície de resposta, Figura 8. Esse gráfico mostra que os maiores rendimentos são obtidos próximo ao vértice direito, isto é, quando a mistura de solventes é mais rica em etanol e em torno da mistura binária etanol/diclorometano, confirmando o resultado da Equação 13.

A Figura 9 mostra o gráfico dos resíduos versus respostas de rendimentos previstas pelo modelo e a Figura 10 as respostas de rendimentos previstos versus rendimentos observados (resposta experimental). A distribuição dos resíduos não revela tendências e a qualidade dos ajustes é revelada pelo gráfico da Figura 10.

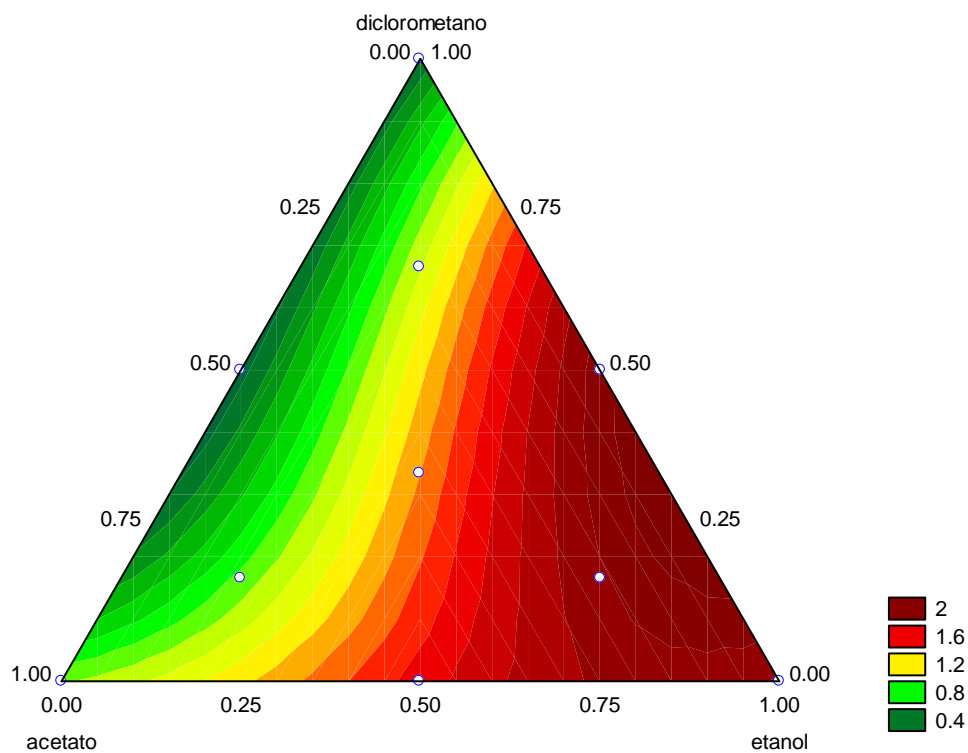


Figura 8 – Curva de nível para o rendimento dos extratos de *Camellia sinensis* usando modelo cúbico completo de mistura de três componentes.

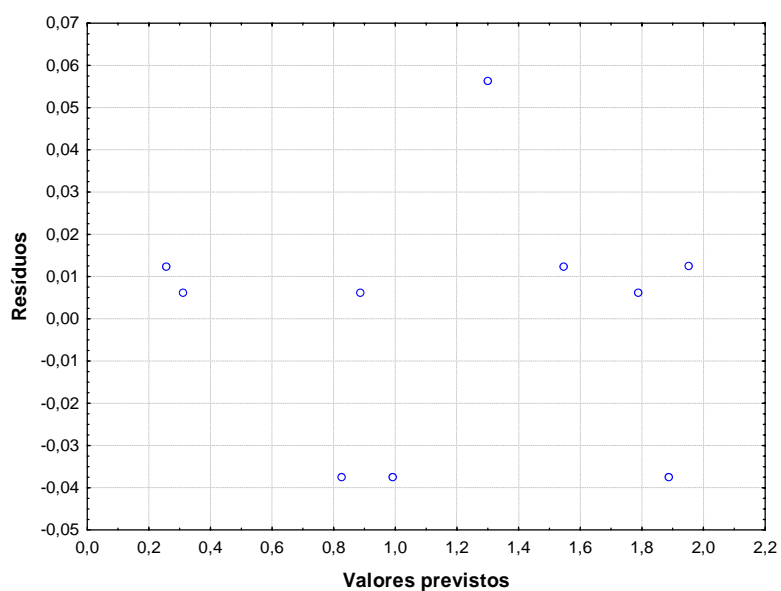


Figura 9 – Resíduos deixados pelo modelo cúbico completo no estudo do rendimento dos extratos para a *Camellia sinensis*.

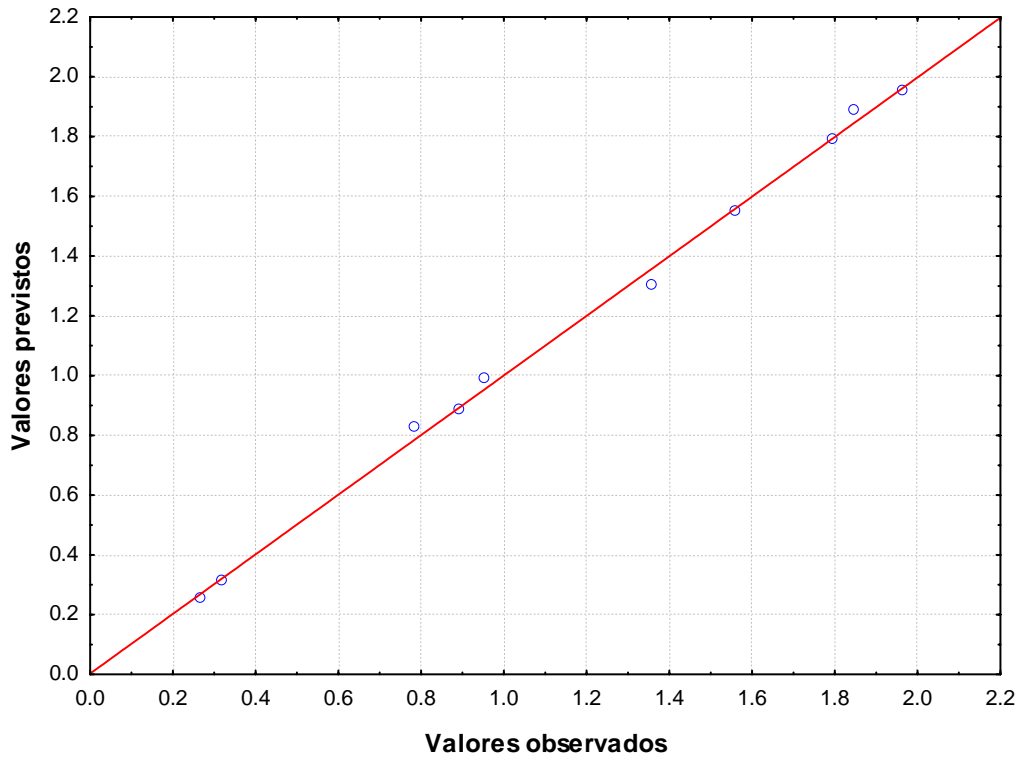


Figura 10 – Respostas previstas pelo modelo cúbico completo.

Um dos problemas que o analista pode confrontar com os métodos cromatográficos é o grande número de possíveis sistemas de separação pelo qual ele terá que fazer a escolha. O problema é como escolher de uma forma mais rápida e eficiente as condições experimentais para garantir a melhor resposta.

Nesta etapa, planejamentos experimentais foram aplicados a um sistema cromatográfico para investigar a influência da modificação da fase móvel em CLAE (fase reversa) na qualidade dos cromatogramas. A qualidade dos cromatogramas foi definida pelo número de picos e fator de separação. Para esta avaliação cada extrato foi analisado em sete diferentes fases móveis seguindo o planejamento experimental da Figura 6.

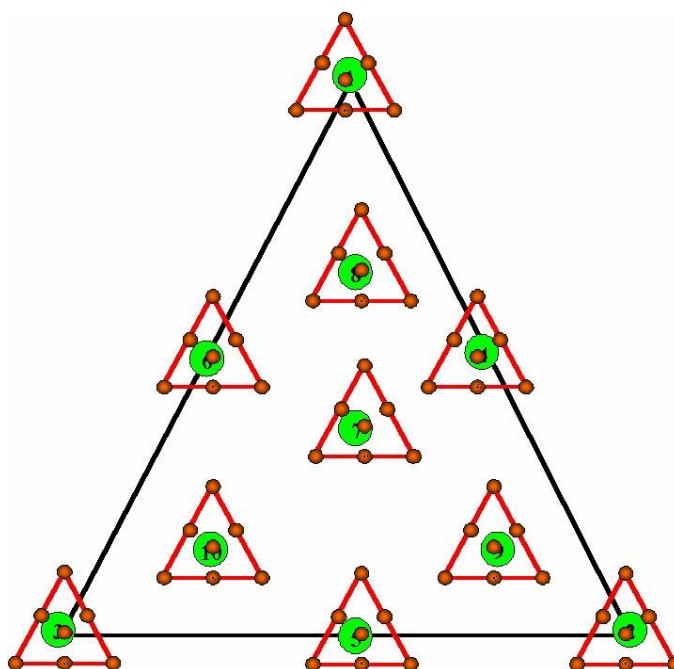


Figura 6 – Planejamento experimental para análise cromatográfica. As fases estão definidas na Figura 5.

O primeiro passo foi definir os três vértices do triângulo de solventes que corresponde à composição das fases móveis. Esta escolha foi feita seguindo o sistema de classificação de Snyder<sup>(24)</sup>, buscando solventes de três diferentes grupos.

O maior problema encontrado antes de aplicar métodos de otimização no sistema cromatográfico é decidir como será avaliada a qualidade de uma análise, bem como o critério para comparar um método com o outro. A definição exata da qualidade depende do objetivo. Na busca de impressão digital cromatográfica ou biomarcadores taxonômicos, por exemplo, quanto mais informação no cromatograma melhor, ou seja, neste caso a resposta é o número de picos. No desenvolvimento de metodologia analítica, uma das respostas mais importantes é a resolução, e não menos importante o tempo de retenção. Muitas vezes em sistemas complexos as condições experimentais diferem de uma resposta para outra, neste caso a saída é escolher as condições intermediárias.

Para avaliar o efeito da variação da fase móvel na separação dos componentes químicos obtidos nos diferentes extratos, os dados do planejamento experimental associados ao planejamento das fases móveis, foram analisados por métodos de otimização de metodologia de superfície de resposta. O objetivo deste planejamento é auxiliar na escolha das condições experimentais, explorando o sistema cromatográfico e composição do extrato na qualidade dos cromatogramas. Este estudo é muito importante para aplicações em quimiosistemática, para fornecer subsídios na busca de impressão digital cromatográfica das espécies ou biomarcadores taxonômicos.

A primeira resposta investigada foi o número de picos. Os extratos do planejamento experimental analisados nas sete fases móveis estudadas foram avaliados em dois comprimentos de onda, em 210 nm e 254 nm. O número de picos relativo a cada extrato e comprimento de onda esta apresentado na Tabela 2.

Analisando a tabela avaliamos que o comprimento de 210 nm apresenta maior número de picos em relação ao 254 nm. A fase que apresenta maior número de picos é a fase 3 (15% metanol, 15% acetonitrila e 70% de água,) com 25 picos, mas esta fase possui um tempo de análise cromatográfica muito longo, cada extrato leva 140 minutos. Logo, levando em consideração a relação custo-benefício-tempo esta fase não seria a melhor escolha, visto que estamos buscando um método que nos dê um resultado satisfatório, mas que também seja rápido e de baixo custo.

A fase que apresenta o segundo maior número de picos é a fase 6, com 22 picos e tempo de análise de 12 minutos, ou seja, com 12 minutos temos quase toda informação que a fase 3 nos daria em 140 minutos.

A melhor composição de fase móvel levando em consideração a relação número de picos tempo foi H<sub>2</sub>O 70% - MeOH 15% - ACN 15% / ACN 100%, ponto 6 da Figura 5, com porcentagem total de 35% água, 57,5% de acetonitrila e 7,5% de metanol.

A separação das substâncias químicas dos extratos do planejamento de *Camellia sinensis* pode ser vista na Figura 11.

Tabela 2 – Número de picos para os extratos do planejamento nas sete fases móveis estudadas e nos dois comprimentos de onda analisados.

$\lambda$ (nm)	Fase 1		Fase 2		Fase 3		Fase 4		Fase 5		Fase 6		Fase 7	
	210	254	210	254	210	254	210	254	210	254	210	254	210	254
<b>Extrato 1</b>	9	2	7	2	20	16	13	8	9	3	13	14	13	14
<b>Extrato 2</b>	6	1	5	3	12	9	15	6	4	3	10	5	9	8
<b>Extrato 3</b>	6	3	4	1	4	1	6	2	6	3	12	3	9	4
<b>Extrato 4</b>	9	2	9	4	16	16	17	10	8	3	13	14	8	7
<b>Extrato 5</b>	8	3	17	5	8	7	18	10	13	4	16	11	10	5
<b>Extrato 6</b>	6	2	8	3	16	10	17	9	11	3	21	17	18	15
<b>Extrato 7</b>	7	2	11	3	25	15	19	17	7	3	15	13	18	16
<b>Extrato 8</b>	6	2	7	3	20	15	19	9	8	2	12	14	10	11
<b>Extrato 9</b>	8	2	8	4	19	14	17	14	8	4	13	11	10	8
<b>Extrato 10</b>	8	4	9	3	14	8	19	9	10	5	22	19	15	16

O polinômio ajustado para esta resposta foi de terceira ordem (cúbico completo) e é dado pela Equação 14 que revela os termos mais relevantes.

$$\hat{y} = \mathbf{13,06a} + \mathbf{10,06e} + \mathbf{12,06d} + 6,23ae + \mathbf{34,23ad} + 20,23ed - 79,27aed \quad (14)$$

$(\pm 0,83) \quad (\pm 0,83) \quad (\pm 0,83) \quad (\pm 4,07) \quad (\pm 4,07) \quad (\pm 4,07) \quad (\pm 26,69)$

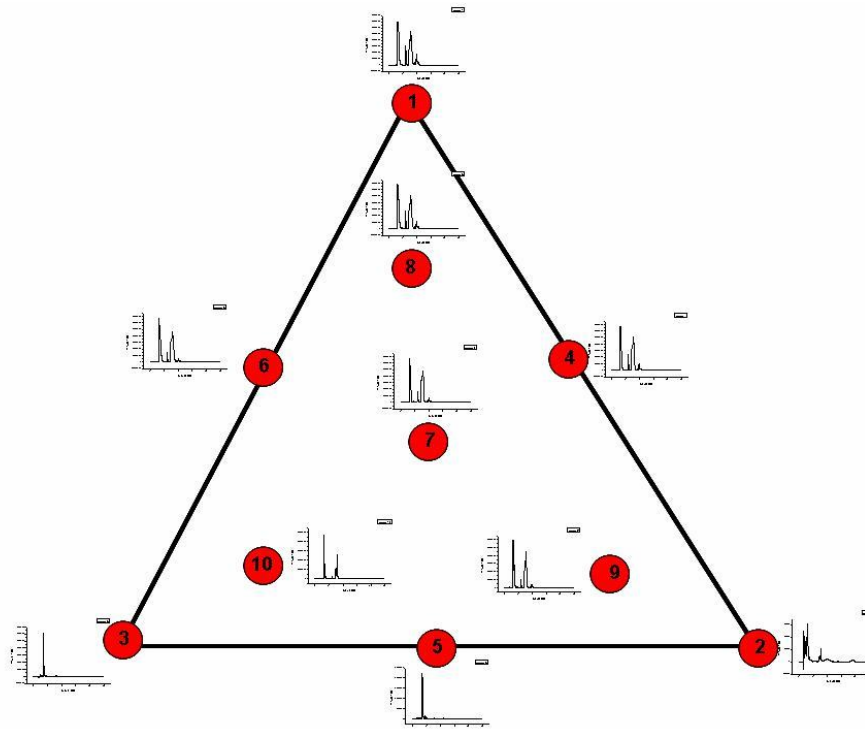


Figura 11- Separação das substâncias químicas dos dez extratos do planejamento de *Camellia sinensis* na fase 6.

Esta Equação indica que quatro termos são significativos (termos em negrito). O valor do coeficiente **ad** sugere imediatamente uma forte interação sinérgica entre os solventes acetato de etila e diclorometano. O modelo nos diz que a presença de acetato de etila e diclorometano em maiores proporções e etanol em menor proporção na mistura de extração levam à maior número de picos na CLAE. A composição ideal para o extrator é constituída de 20% de acetato de etila, 5% de etanol e 75% de diclorometano que nos mostra 26 picos.

A curva de nível correspondente à Equação 14 é mostrada na Figura 12. A Figura 13 mostra o gráfico dos resíduos versus valores previstos. Analisando este gráfico notamos uma leve tendência para valores negativos de

resíduos, mas que não influenciam nos resultados. A Figura 14 mostra o gráfico dos valores previstos versus valores observados.

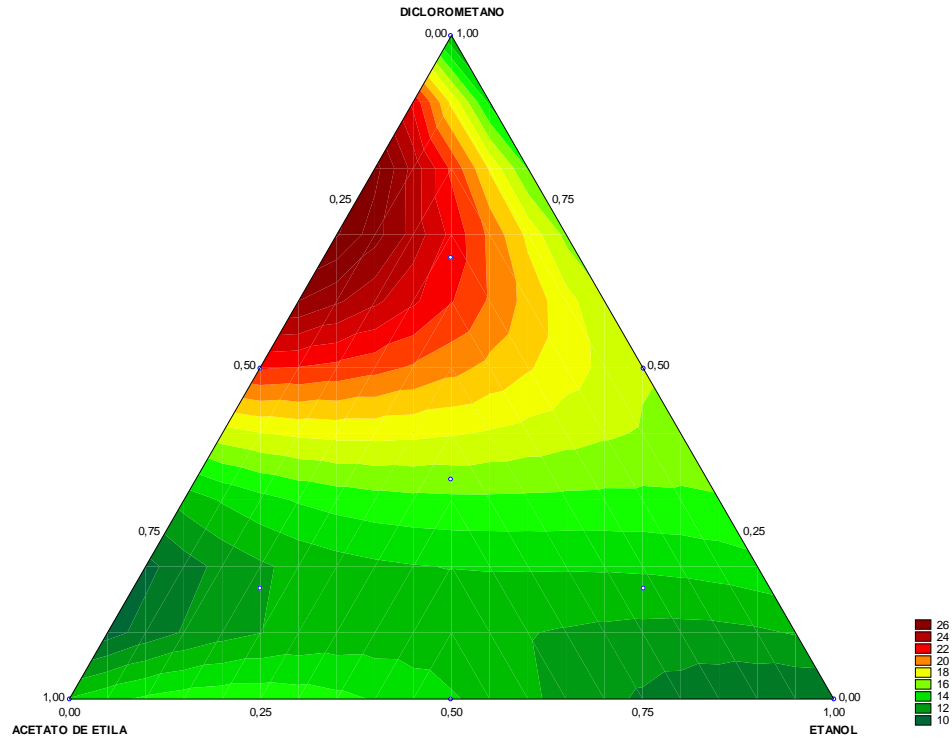


Figura 12 - Superfície de resposta para a fase móvel otimizada (35% água, 57,5% de acetonitrila e 7,5% de metanol).

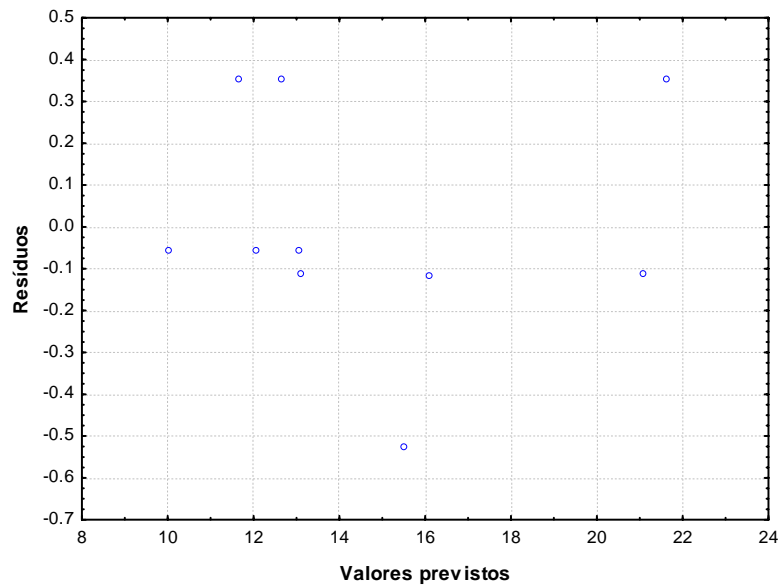


Figura 13 – Resíduos deixados pelo ajuste de um modelo cúbico completo aos valores de número de picos.



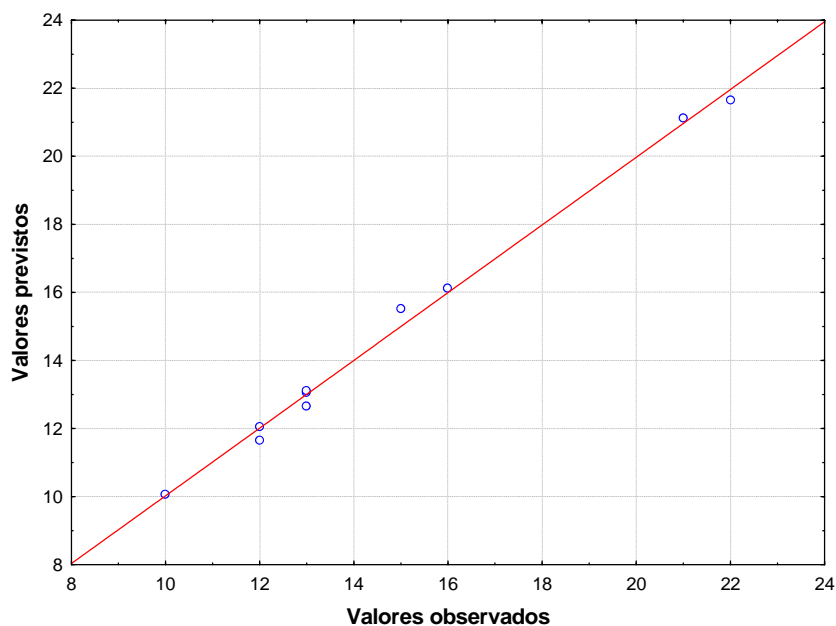


Figura 14 – Respostas previstas pelo modelo cúbico completo.

A segunda resposta investigada com a variação da fase móvel foi o fator de separação. No sistema em estudo a representação numérica da qualidade do cromatograma é complicada pela falta de padrões absolutos, os quais poderiam ser usados para medir ambos a resolução e fator de separação dos picos. Sendo assim, para cada cromatograma os diversos valores do fator de separação entre picos adjacentes foram reduzidos a um único número pela função de resposta cromatográfica (FRC)<sup>(24)</sup>, definida pela Equação 15,

$$FRC = \ln \sum_{i=1}^k (P_i) \quad (15)$$

$P_i$  é a medida de separação entre picos adjacentes em um cromatograma e  $k$  o número de pares de picos.

Os resultados da FRC para os dez cromatogramas dos extratos de *Camellia sinensis* analisados em cada fase móvel no comprimento de onda de 210 nm estão apresentados na Tabela 3.

A composição da fase móvel que permitiu melhor separação foi a mistura ternária com 15% metanol, 15% acetonitrila e 70% de água, fase 3, mas como já vimos esta fase possui um tempo muito grande de análise e a relação custo-benefício-tempo não seria satisfatória.

A fase 4 (57,5% de metanol, 7,5% de acetonitrila e 35% água) e a fase 6 (7,5% de metanol, 57,5% de acetonitrila e 35% água) possuem FRC próximos a primeira com o valor de 4,98 e a segunda 4,44 respectivamente. Como vimos anteriormente, a fase que possui maior número de picos no cromatograma é a fase 6, a diferença nos

valores de FRC entre as fases 4 e 6 é pequena logo, levando em consideração o número de picos da fase 6 escolhemos esta como a fase móvel otimizada.

Tabela 3 - Valores da FRC para os cromatogramas dos extratos de *Camellia sinensis* nas sete fases móveis apresentadas na Figura 4 no comprimento de onda de 210 nm.

	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4	Fase 5	Fase 6	Fase 7
extrato 1	3,11	4,02	5,66	3,95	3,44	3,53	3,05
extrato 2	1,40	1,93	2,91	3,26	0,71	3,85	3,15
extrato 3	3,67	0,83	2,07	2,91	1,42	3,30	3,14
extrato 4	3,13	3,76	6,11	3,94	2,47	3,60	2,16
extrato 5	3,92	2,47	2,74	4,06	3,85	3,51	2,62
extrato 6	3,37	3,28	6,13	4,14	3,89	4,08	3,77
extrato 7	2,99	2,75	5,94	4,20	2,42	3,47	3,89
extrato 8	3,39	2,84	6,04	3,57	3,85	4,44	2,98
extrato 9	2,95	2,60	6,35	4,98	3,30	2,85	2,19
extrato 10	3,64	3,73	5,68	4,16	3,38	3,76	3,78

Este resultado é confirmado pela análise da Figura 5 em relação à força do solvente (S) e a polaridade (P), calculadas pelas seguintes equações<sup>(25)</sup>:

$$S_t = \Phi_{\text{MeOH}} S_{\text{MeOH}} + \Phi_{\text{ACN}} S_{\text{ACN}} \quad (16)$$

com  $S_{\text{MeOH}} = 2,6$ ,  $S_{\text{ACN}} = 3,1$  e  $S_{\text{H}_2\text{O}} = 0$

e

$$P_t = \Phi_{\text{MeOH}} P_{\text{MeOH}} + \Phi_{\text{ACN}} P_{\text{ACN}} + \Phi_{\text{H}_2\text{O}} P_{\text{H}_2\text{O}} \quad (17)$$

com  $P_{\text{MeOH}} = 5,1$ ,  $P_{\text{ACN}} = 5,8$  e  $P_{\text{H}_2\text{O}} = 10,2$ .

Sendo  $\Phi$  a fração do volume do solvente orgânico na fase móvel e S uma constante característica de uma dada substância.

A Figura com os valores da força do solvente e polaridade esta representada abaixo (Figura 15).

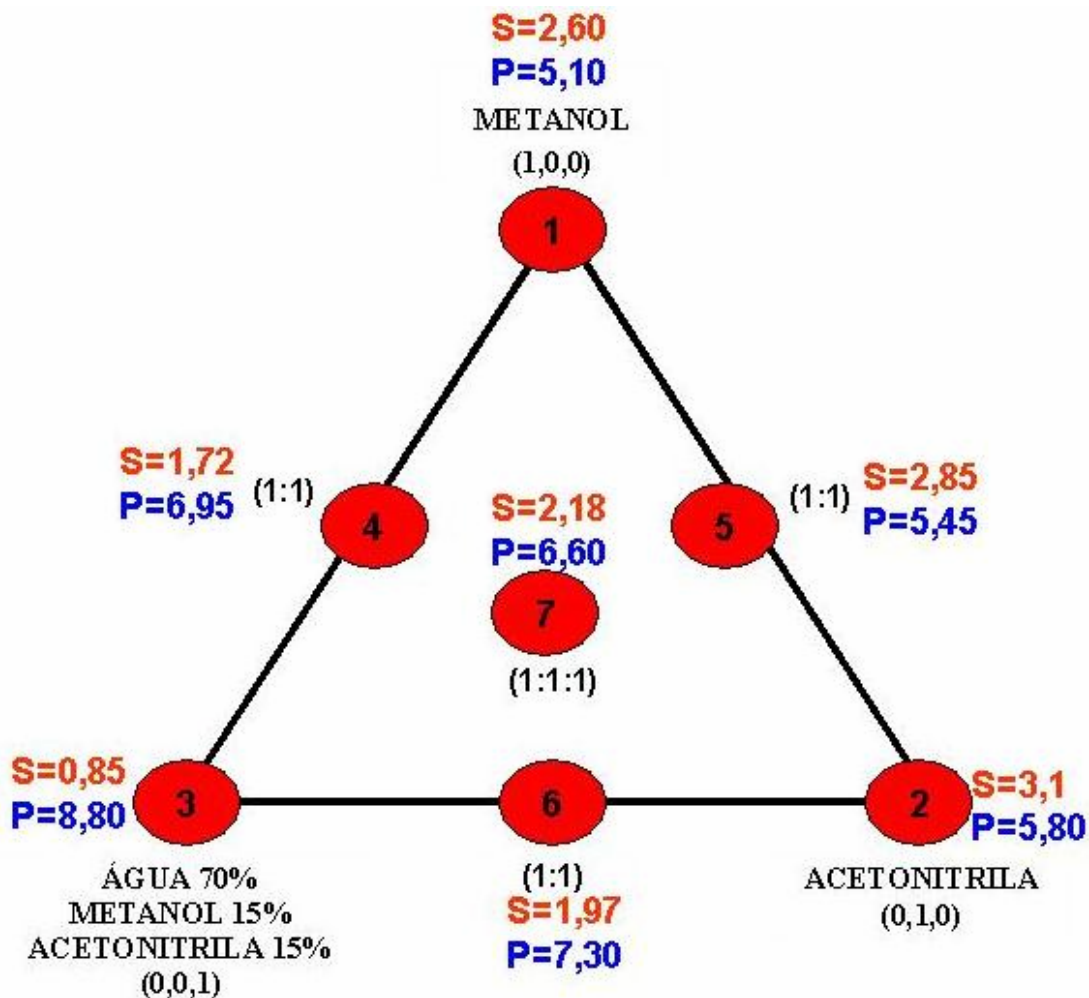


Figura 15 – Valores da força de solvente e polaridade de acordo com os solventes utilizados na preparação das fases móveis.

Analisando a Figura 15 notamos que a polaridade cresce em direção a fase 3 que contém grande quantidade de água. Assim confirmamos que a fase móvel escolhida (fase 6, Figura 5) é a que possibilita melhores resultados. Isto porque, a interação total de uma molécula de solvente com uma molécula de amostra é o resultado de quatro interações, dispersão, dipolo, ponte de hidrogênio, e interações dielétricas. A habilidade de uma amostra ou molécula de solvente de interagir em todos os quatro modos é chamada de "polaridade" da combinação. Assim solventes "polares" atraem preferencialmente e dissolvem moléculas de soluto "polares." Do mesmo modo, a força de um solvente é relacionada diretamente a sua polaridade. A força do solvente aumenta com a polaridade em uma fase normal na cromatografia líquida (CL) por partição e adsorção, enquanto que na CL em fase-reversa a força do solvente diminui com a polaridade.<sup>(25)</sup>

Os dados obtidos no planejamento experimental analisados em CLAE foram submetidos à Análise de Componentes Principais (ACP), onde cada cromatograma foi representado como um ponto no espaço p-dimensional,  $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3, x_i, x_p)$ , onde o componente  $x_i$  é a altura do pico cromatográfico nos diferentes tempos de eluição.

Para aplicação dos métodos quimiométricos 15 cromatogramas foram colocados na forma de uma matriz de 15x1000 variáveis. Para visualizar este conjunto de dados num espaço de menor dimensão foi feito um gráfico dos escores das duas primeiras componentes principais (Figura 16) que explicam em torno de 94,44% da variância total para dados pré-processados por área unitária, sem perder as informações relevantes para interpretação dos dados.

Analisando a Figura 16, observamos a formação de três grupos distintos. O grupo I contém as amostras extraídas em etanol puro, o grupo II amostras extraídas em acetato de etila puro, misturas ternárias e binárias contendo etanol e o grupo III em diclorometano puro e na mistura binária de acetato de etila/diclorometano. Isto significa que existe diferença das amostras quanto ao solvente extrator utilizado.

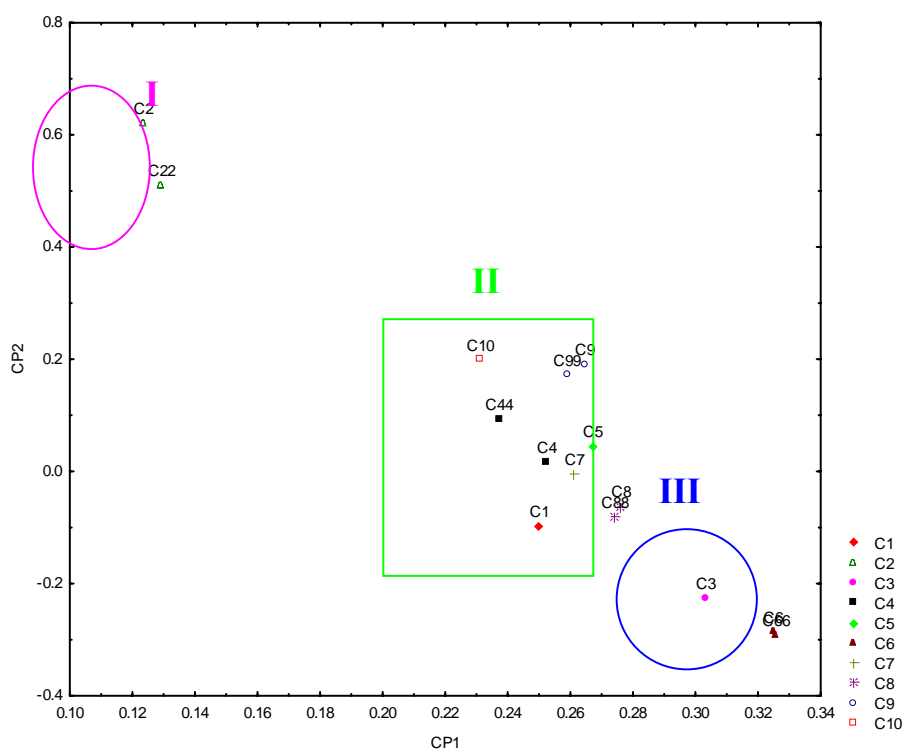


Figura 16 - Gráfico dos escores para as componentes CP1 e CP2 dos dados cromatográficos do planejamento experimental analisados na fase móvel otimizada.

Para explicar esta discriminação podemos usar o gráfico que apresenta os valores de loadings das duas primeiras componentes principais versus tempo de eluição (minutos), Figura 17. Um exame gráfico dos loadings

juntamente com o gráfico dos escores (Figura 16), e ainda com o auxílio do cromatograma (Figura 18) revela que existem determinadas regiões cromatográficas que podem explicar as diferenças encontradas na Figura 16.

Ao analisar os loadings na CP1 notamos que estes apresentam valores mais altos em torno de três minutos. Nos valores mais positivos da CP1 estão localizadas as amostras extraídas em diclorometano puro e na mistura binária acetato de etila/diclorometano (C3, C6 e C66). Isto significa que a substância e/ou grupo de substâncias que eluem em torno de três minutos está contribuindo de maneira significativa na discriminação destas amostras, ou seja, estas amostras possuem maiores quantidades destas substâncias, ao contrário das amostras extraídas em etanol puro (grupo I), que contêm menores quantidades destas substâncias, já que estão na parte menos positiva da CP1.

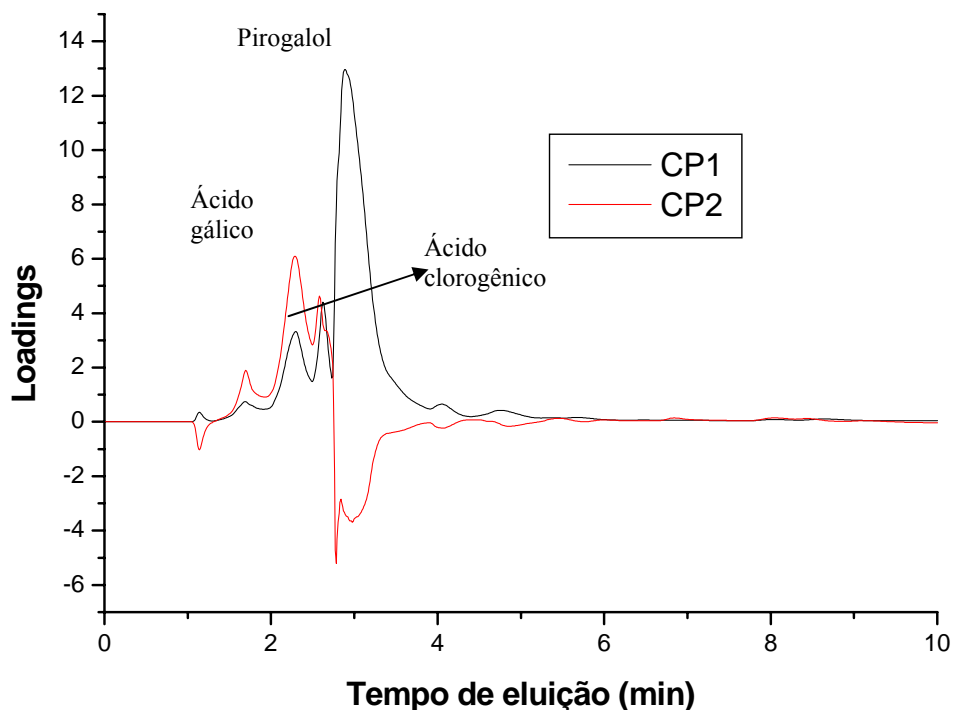


Figura 17 – Gráfico dos loadings das duas primeiras componentes principais para as amostras do planejamento.

Com o auxílio do cromatograma da Figura 18 e da referência 11 podemos inferir que o pico 3 do cromatograma corresponde ao Pirogalol (Figura 19). Isto significa que a substância que está discriminando as amostras (C3, C6 e C66) extraídas em diclorometano é este composto fenólico com três hidroxilas em um anel benzênico. Alguns deslocamentos no tempo de eluição devem ser compreendidos, visto que as condições são semelhantes porém não iguais.

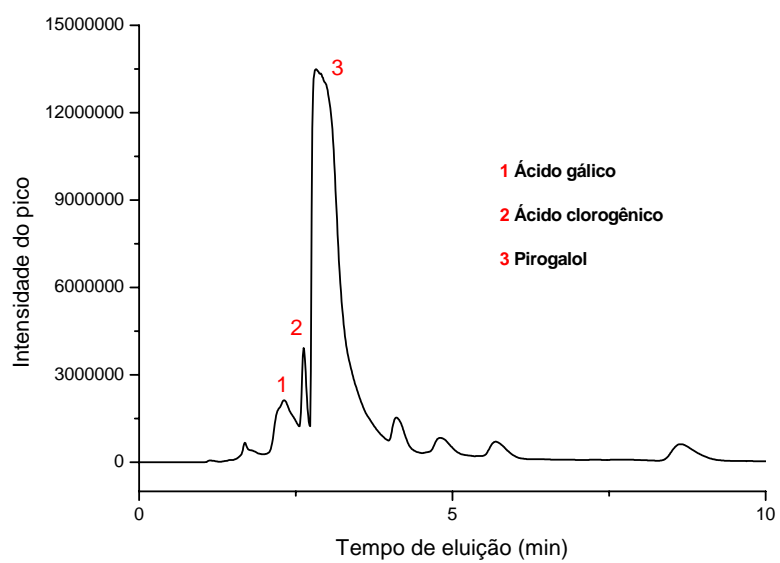


Figura 18 - Cromatograma da amostra do planejamento de *Camellia sinensis* extraída no extrator 1 (100% acetato de etila).

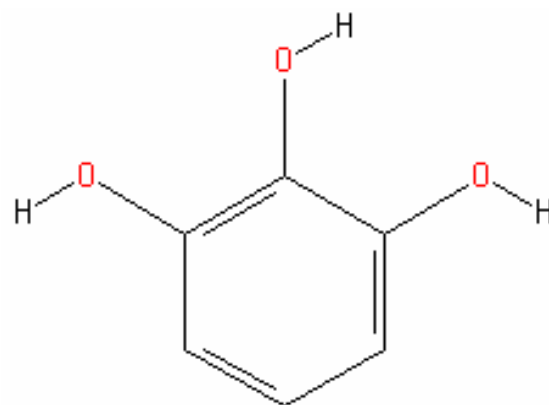


Figura 19 – Estrutura química do pirogalol.

Analisando a Figura 16 agora pela CP2 notamos que os grupos I e III estão em lados opostos, ou seja, o grupo I está localizado na parte mais positiva da CP2 enquanto o grupo III na parte negativa. Logo a interpretação em relação a um dos grupos será a oposta para o outro grupo.

Se observarmos os loadings da Figura 17, a parte positiva mais expressiva na CP2 encontra-se em torno de 2,57, 2,27 e 1,69 minutos o que indica que as amostras extraídas em etanol possuem maior concentração destas substâncias. Ao analisar estes loadings com auxílio da referência 13, podemos inferir que o pico em 2,27 minutos corresponde ao ácido gálico, pico 1, (Figura 20) e em 2,57 minutos ao ácido clorogênico, pico 2, (Figura 21). Isto significa que o extrato etanólico foi discriminado pela quantidade de ácidos extraídos.

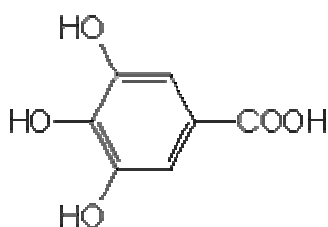


Figura 20 – Estrutura química do ácido gálico.

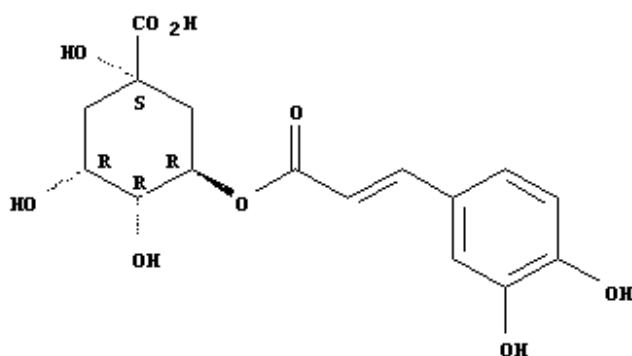


Figura 21 – Estrutura química do ácido clorogênico

Após a otimização das condições de extração e análise cromatográfica, foram analisadas 10 marcas de chás comerciais em duplicatas, totalizando 20 extratos.

Todos cromatogramas (Figura 22) das amostras de chás comerciais apresentaram um pico muito intenso em torno do tempo de eluição de três minutos. Este pico, como vimos anteriormente caracteriza a substância pirogalol, e está presente com alta intensidade em todas as dez marcas de chás comerciais analisadas. Logo este pico estava mascarando os resultados da análise de componentes principais (ACP) já que os outros picos ficavam muito pequenos em relação a este e não influenciavam na separação das amostras.

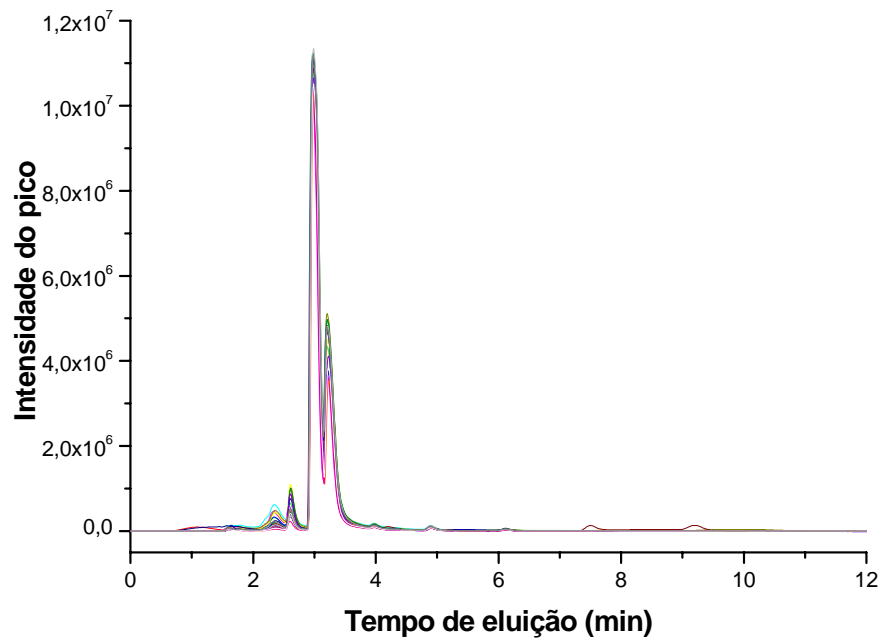


Figura 22 – Cromatogramas das 10 marcas de chás analisadas em duplicatas

Diante deste problema resolvemos fazer a análise de componentes principais (ACP) tirando o pico em três minutos. A análise foi feita até 2,8 minutos (Figura 23) e colocada na forma de uma matriz de 20X263 variáveis.



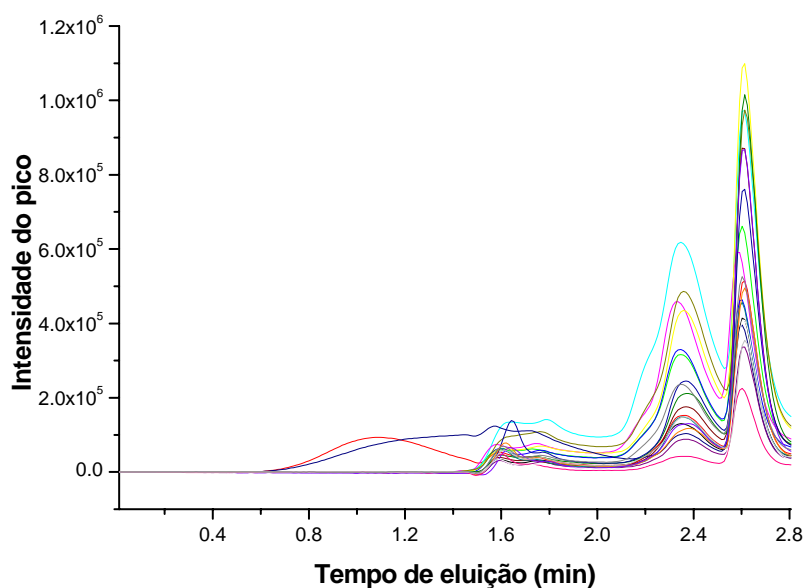


Figura 23 – Cromatogramas das 10 marcas de chás analisadas em duplicatas até 2,8 minutos.

A Figura 24 mostra o gráfico dos escores das duas primeiras componentes principais (CP1XCP2) que explicam 98,38 % da variância com dados pré-processados por área unitária. Foram analisadas quatro amostras nacionais (N) (sendo uma com matéria prima importada da Alemanha), e seis internacionais, com quatro da China (C), uma da Inglaterra (I) e uma do Japão (J).

Neste gráfico fica nítida a separação das amostras da China e da Inglaterra das amostras nacionais e do Japão. As amostras da China e da Inglaterra em relação às amostras nacionais e do Japão encontram-se em lados opostos em relação às duas componentes analisadas. Estas diferenças na composição química podem ser devidas há variações na espécie, condições ambientais, época de colheita, estocagem, processamento <sup>(3)</sup>, tempo de fermentação, região, tipo de solo entre outros fatores.

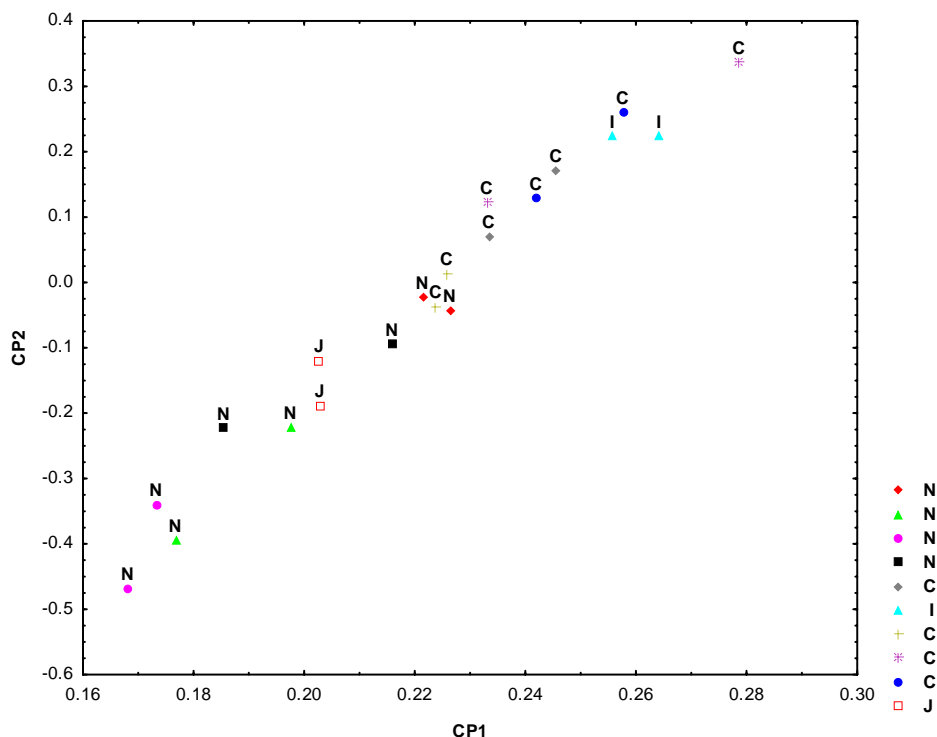


Figura 24 - Gráfico dos escores das duas primeiras componentes (CP1xCP2) dos 20 extratos obtidos das diferentes marcas de chás comerciais.

A Figura 25 mostra o gráfico dos loadings da CP1xCP2. Observa-se na CP1 que o maior valor de loadings corresponde ao tempo de 2,61 minutos (equivalente aos tempos de retenção dos ácidos) <sup>(11)</sup>. As amostras que possuem valores mais positivos de loadings são as amostras da China e da Inglaterra então podemos inferir que estas amostras possuem maior acidez que as amostras nacionais e do Japão. Esta maior acidez pode ser devido ao tempo de fermentação, quanto maior o tempo de fermentação mais ácido fica o extrato da planta.

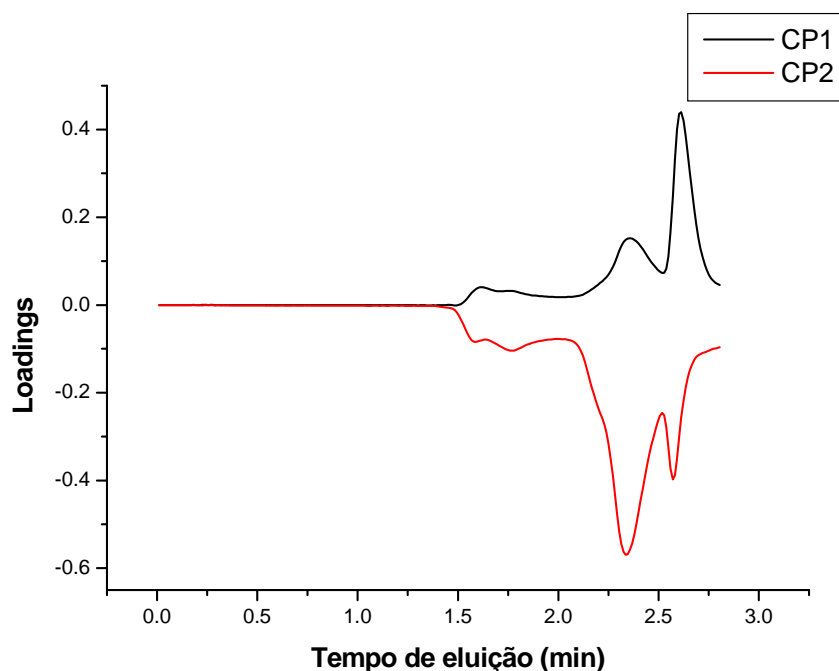


Figura 25 – Gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 2 para os 20 extratos obtidos das diferentes marcas de chás comerciais.

Para estabelecer com maior segurança a diferença entre as dez marcas de chás comerciais, os extratos preparados de acordo com o planejamento experimental Centróide-Simplex (10 extratos) também foram submetidos à análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

A Figura 26 mostra o gráfico das duas primeiras componentes principais (CP1xCP2) que explicam 99,95 % da variância com dados pré-processados por comprimento de vetor na forma de uma matriz 10X1866. Podemos observar que existem quatro grupos distintos, diferente dos dados de planejamento analisados em CLAE (Figura 16) que evidencia somente três grupos. A análise por FTIR separou melhor os constituintes dos extratos 3 e 6 e o 2 e 4 em relação a CLAE. O grupo I contém a amostra extraída em 100 % de diclorometano, o grupo II contém a amostra extraída em 50% acetato de etila e 50% diclorometano, o grupo III as amostras extraídas em 100% acetato de etila, a mistura binária (50% etanol e 50% diclorometano) e as misturas ternárias e o grupo IV as amostras extraídas em 100% etanol e a mistura binária extraída em 50% acetato de etila e 50 % etanol.

Este gráfico mostra que existe diferença dos extratos quanto ao solvente extrator utilizado e que houve uma maior discriminação do extrato preparado em diclorometano puro, com relação à quantidade de compostos dos diferentes grupos funcionais extraídos.

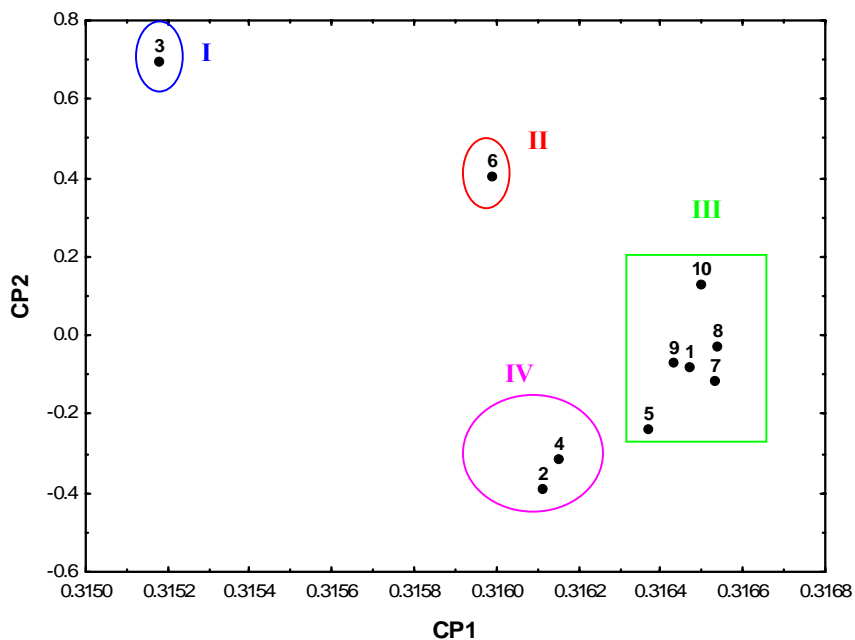


Figura 26 - Gráfico dos escores das duas primeiras componentes principais (CP1xCP2) para as 10 amostras do planejamento analisadas por FTIR.

Os loadings das variáveis CP1 e CP2 estão apresentados na Figura 27. Os loadings da CP1 apresentam valores baixos nos intervalos de  $3068\text{ cm}^{-1}$  a  $3657\text{ cm}^{-1}$  e  $1038\text{ cm}^{-1}$  a  $1754\text{ cm}^{-1}$ . Isto significa que o extrato 3, grupo I, localizado mais à esquerda (valores baixos) da CP1, contém menor concentração de substâncias com grupo funcional ou grupos funcionais que se localizam nestas regiões do espectro do infravermelho (IV), ao contrário das amostras localizadas a direita do gráfico da Figura 26.

Na CP2, a amostra do grupo I, possui valores mais positivos. Os loadings da CP2, Figura 26, que apresentam valores positivos estão localizados na região de  $3068\text{ cm}^{-1}$  a  $3657\text{ cm}^{-1}$ ,  $1000\text{ cm}^{-1}$  e  $1750\text{ cm}^{-1}$  e  $500$  a  $750\text{ cm}^{-1}$  confirmando o resultado anterior.

A região de  $1000$  a  $1750\text{ cm}^{-1}$  caracteriza moléculas com grupos funcionais com maior momento de dipolo, como exemplo  $\text{NO}_2$ , S-O, -CO-, etc. Este resultado é coerente com o diagrama de Snyder, onde o diclorometano está localizado na região de maior dipolo entre os oito grupos de solventes que cobrem o domínio do triângulo.

A região de  $3068\text{ cm}^{-1}$  a  $3657\text{ cm}^{-1}$  caracteriza moléculas com grupos funcionais de OH de ácidos carboxílicos e N-H de amidas, aminas e lactanas que podem estar sobrepostas pela banda de O-H de ácido. Isto significa que o extrator diclorometano puro extrai menores quantidades de substâncias com estes grupos funcionais.

Por outro lado, o grupo IV, extratos preparados em etanol puro e acetato de etila/etanol (50% : 50% V/V), estão localizados na parte negativa na CP2. Este grupo contém substâncias de caráter básico, tais como, amidas ou éster ( $\approx 1750\text{ cm}^{-1}$ ), e a deformação angular N-H de aminas ( $\approx 980\text{ cm}^{-1}$ ).

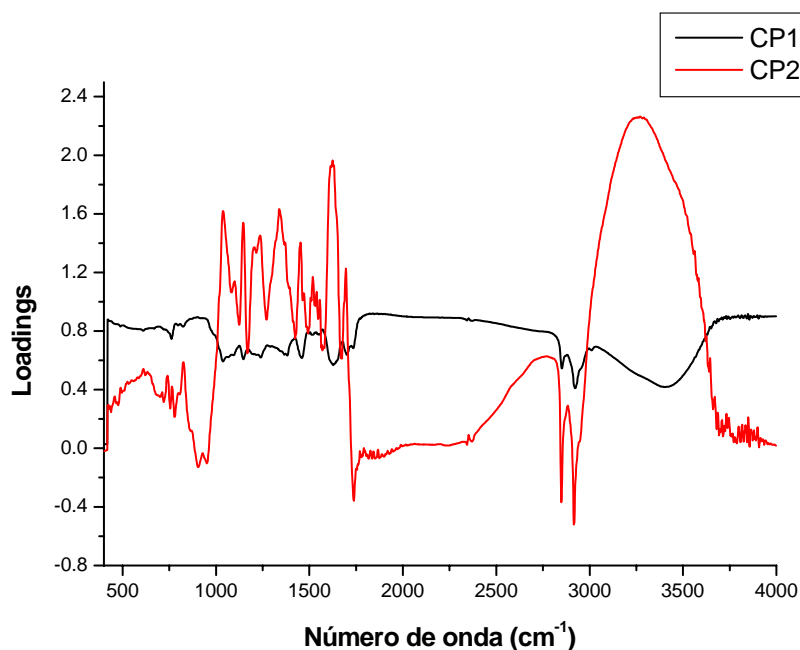


Figura 27 – Loadings das duas primeiras componentes principais para as amostras do planejamento analisadas em FTIR.

No diagrama de Snyder, estes solventes estão localizados em lados opostos. Este gráfico mostra que a separação dos extratos em diferentes grupos seguiu o modelo de Snyder usado no planejamento.

Este contraste pode ser explicado com o auxílio da Figura 28, onde é possível verificar que a amostra 3 tem um sinal de transmitância com maior intensidade nos intervalos de  $3050\text{ cm}^{-1}$  a  $3600\text{ cm}^{-1}$  e  $1050\text{ cm}^{-1}$  a  $1750\text{ cm}^{-1}$ , o que significa menor concentração, seguido pelas amostras 6, 10, 8, 1, 7, 9, 5, 4, e por último a amostra 2.

Como a absorvância é o logaritmo decimal do inverso da transmitância e proporcional à concentração, a Figura 28 confirma os resultados da Análise de Componentes Principais.

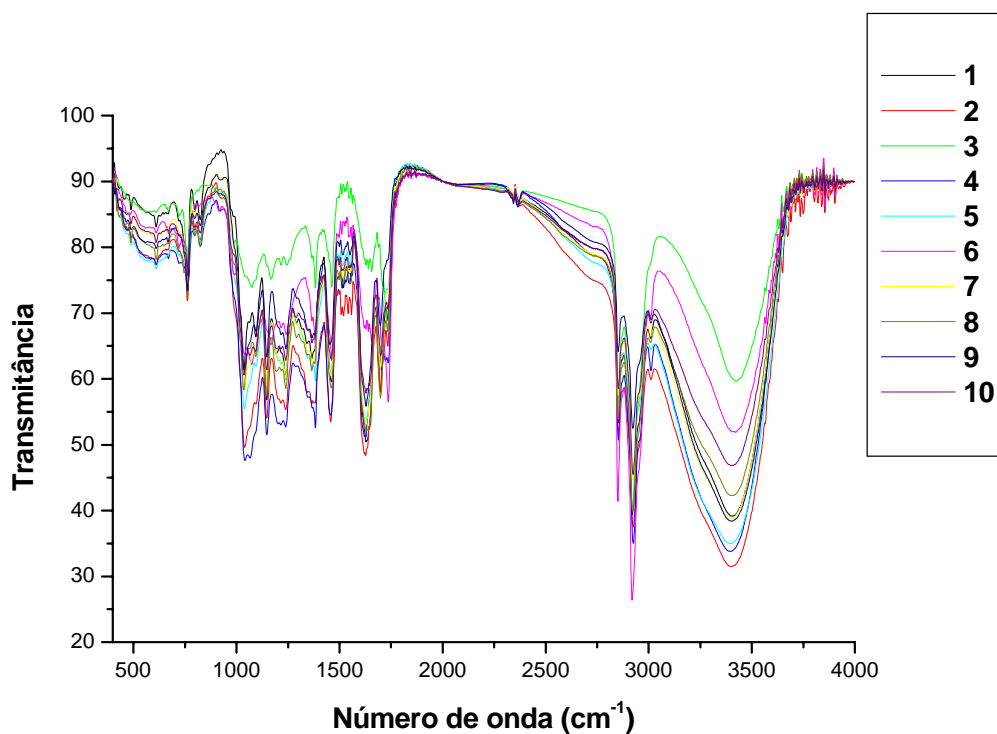


Figura 28 – Espectros de infravermelho das 10 amostras do planejamento.

A Figura 29 apresenta a análise de componentes principais das amostras do planejamento analisadas anteriormente (Figura 26), mas agora pré-processadas por vetor unitário. As duas primeiras componentes principais (CP1xCP2) explicam 99,95 % da variância total. Esta figura foi apresentada para que ficasse claro que em qualquer pré-processamento utilizado; área unitária, comprimento de vetor e vetor unitário; foram observados os quatro grupos já citados e ainda nesta figura a curiosa formação do triângulo (com vértices puros) apresentado no planejamento experimental, o Simplex Centróide modificado e semelhante ao triângulo de Snyder, confirmando o resultado anterior. Neste caso, o solvente influenciou tanto na discriminação dos grupos funcionais, quanto na concentração dos compostos extraídos.

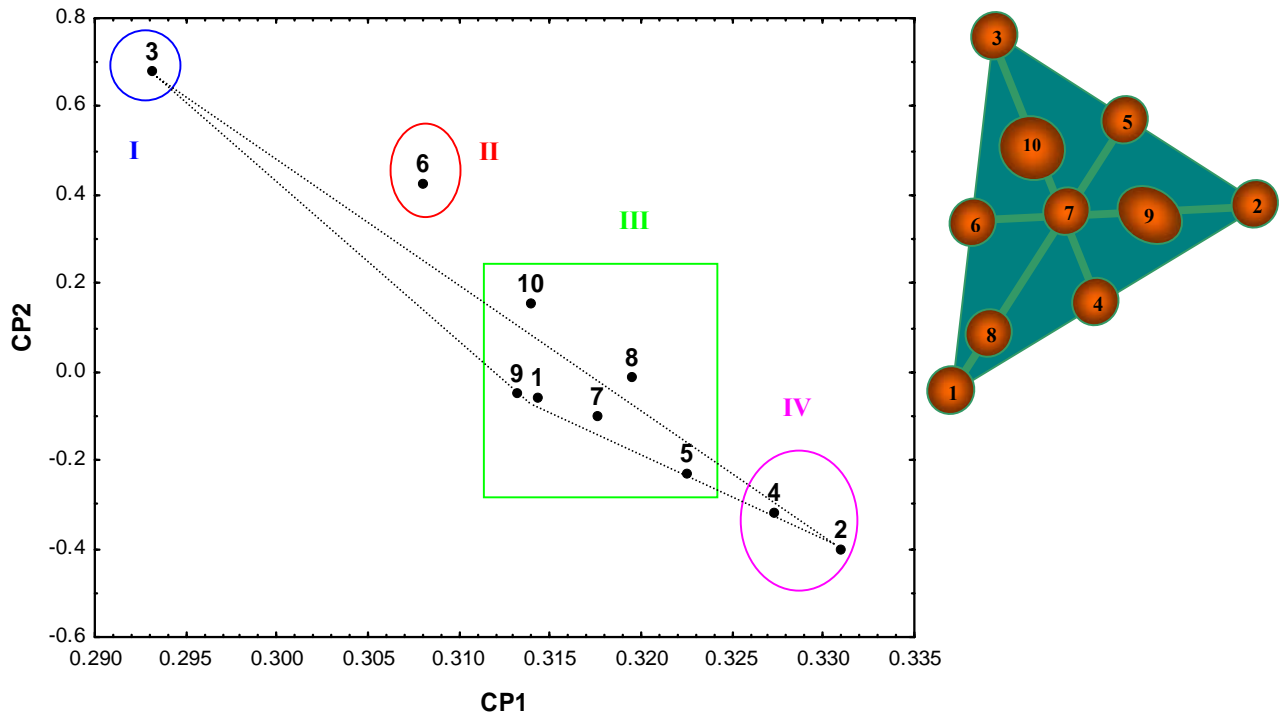


Figura 29 - Gráfico das duas primeiras componentes (CP1xCP2) para as 10 amostras do planejamento com pré-processamento por vetor unitário.

Após a análise por FTIR das 10 amostras do planejamento experimental também foram analisadas as 10 amostras de chás comerciais de *Camellia sinensis*, preparadas de acordo com a condição otimizada do extrator, de 20% de acetato de etila, 5% de etanol e 75% de diclorometano.

A Figura 30 mostra o gráfico dos escores das componentes principais (CP2XCP3). As 10 marcas de chás comerciais preparadas em duplicatas, foram analisadas na condição otimizada do extrator da CLAE, totalizando 20 amostras.

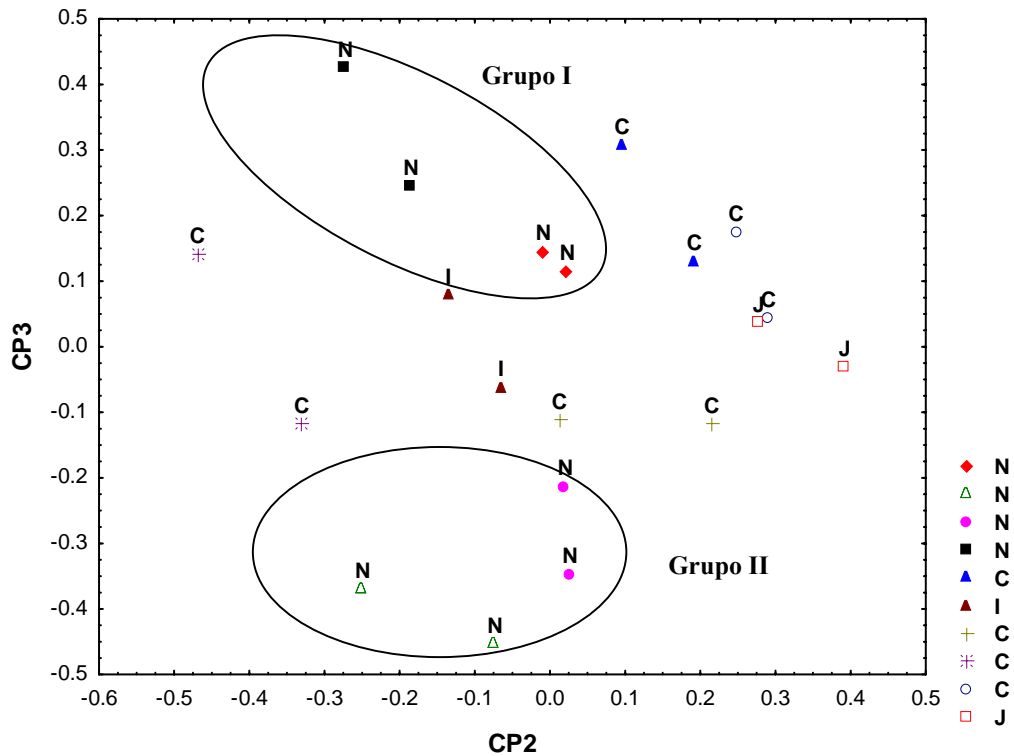


Figura 30 - Gráfico das componentes (CP2xCP3) dos 20 extratos obtidos das diferentes marcas de chás comerciais analisados em FTIR.

Diferente dos dados analisados em CLAE (Figura 16), a análise por FTIR discriminou as amostras em relação aos grupos funcionais.

Analisando o gráfico dos loadings (Figura 31) observamos que as amostras localizadas mais à direita na CP2, amostras da China e Japão, contêm menor concentração de substâncias com grupos funcionais de O-H fenólico, anidro carboxílico, amidas, aminas e ésteres, ou seja, baixa concentração de compostos fenólicos, principalmente a catequina que é o principal constituinte do chá verde.



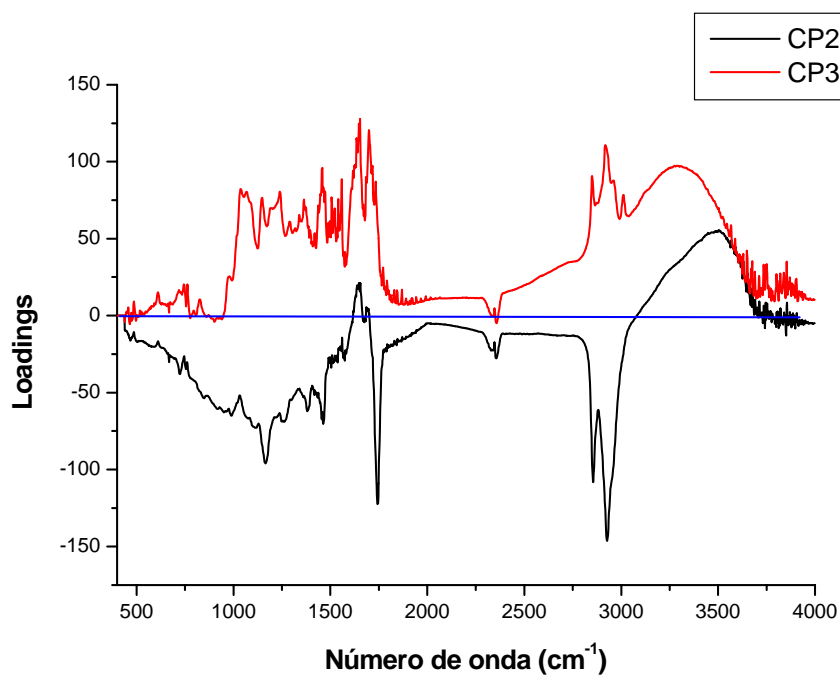


Figura 31 – Gráfico dos loadings das variáveis CP2 e CP3

A CP3 separa as amostras nacionais em dois grupos. Aqueles localizados na região positiva da CP3, o grupo I e também as amostras da China, apresentam menor quantidade de substâncias com a presença de grupos funcionais de amidas ( $3500-3200\text{ cm}^{-1}$  e  $1800-1650\text{ cm}^{-1}$ ), OH de ácidos e C=C de anel aromático ( $1600$  e  $1475\text{ cm}^{-1}$ ) ao contrário das amostras nacionais localizadas na parte negativa da CP3, grupo II.

A Figura 32 apresenta os espectros das 10 diferentes marcas de chás comerciais.

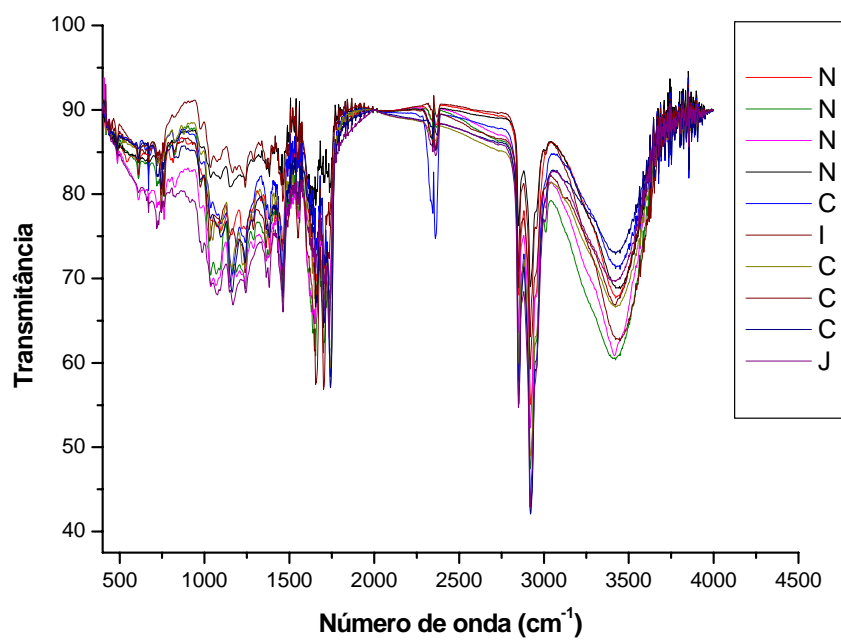


Figura 32 – Espectros das 10 diferentes marcas de chás comerciais.

De acordo com a literatura esta diferença pode ser devida a quantidade de alcalóides derivados de aminoácidos <sup>(4)</sup>.

*Capítulo V*

*Conclusão*



## 5. CONCLUSÃO

Com a utilização do planejamento e otimização experimental para o estudo de *Camellia sinensis* foi possível:

- ✓ Obter o melhor solvente para a extração, ou seja, a mistura ternária constituída de 20% de acetato de etila, 5% de etanol e 75% de diclorometano.
- ✓ Obter um modelo que descreve o rendimento em função dos solventes estudados.
- ✓ Aumentar o rendimento das substâncias químicas analisáveis no processo de extração.
- ✓ Concluir que a eficiência na extração depende da proporção dos solventes utilizados. Neste caso fica evidente a importância da aplicação de métodos de planejamento e otimização de experimentos.

A aplicação dos métodos quimiométricos aos dados cromatográficos mostrou que:

- ✓ Existe diferença na composição química das amostras com relação ao extrator, principalmente em diclorometano e etanol.
- ✓ Existe um efeito de interação sinérgica entre os solventes estudados na extração dos componentes químicos da planta.
- ✓ A melhor fase móvel levando em consideração a relação número de picos/tempo foi H<sub>2</sub>O 70% - MeOH 15% - ACN 15% / ACN 100%, com porcentagem total de 35% água, 57,5% de acetonitrila e 7,5% de metanol.
- ✓ As amostras foram classificadas em três grupos distintos de acordo com o diagrama de Snyder.
- ✓ Existe uma região no cromatograma discriminatória para as amostras de chás comerciais estudadas.
- ✓ Foi possível traçar o perfil cromatográfico das espécies, identificando qualitativamente as substâncias como o pirogalol, ácido clorogênico e ácido gálico, responsáveis pela discriminação das diferentes marcas de chás.
- ✓ As amostras de chás comerciais analisadas por CLAE foram separadas considerando a região que foi processada, sendo que as amostras preparadas na China e Inglaterra apresentaram maior concentração de ácidos em relação as amostras preparadas no Japão e no Brasil.

A aplicação dos métodos quimiométricos aos espectros de FTIR mostrou que:

- ✓ A análise por FTIR separa melhor os constituintes das amostras em relação a CLAE.
- ✓ Foi possível classificar as amostras preparadas de acordo com o planejamento em 4 grupos distintos, extratos preparados em diclorometano, acetato de etila-diclorometano, etanol e acetato de etila-etanol e misturas ternárias e a binária etanol-diclorometano.
- ✓ As amostras extraídas em etanol puro e acetato de etila –etanol extraem maior quantidade de substâncias com grupos funcionais de éster e amidas secundárias.
- ✓ O diclorometano extrai substâncias com grupos funcionais de maior dipolo, entre eles NO<sub>2</sub>, S-O, -CO-, coerente com o diagrama de Snyder.
- ✓ As amostras de chás comerciais analisadas por FTIR foram separadas em relação aos grupos funcionais.
- ✓ As amostras de chás comerciais da China e Inglaterra contêm maior concentração de grupamentos O-H de compostos fenólicos e ácidos carboxílicos e também de C=O de anidros carboxílicos em relação às preparadas no Japão e no Brasil.
- ✓ As amostras de chás comerciais analisadas por FTIR foram separadas em relação aos grupos funcionais.
- ✓ As amostras da China e Japão, contêm menor concentração de substâncias com grupos funcionais de O-H fenólico, anidro carboxílico, amidas, amins e ésteres, ou seja, baixa concentração de compostos fenólicos, principalmente a catequina que é o principal constituinte do chá verde.
- ✓ As amostras nacionais foram divididas em dois grupos.
- ✓ Um grupo nacional e as amostras da China foram discriminados pela quantidade de alcalóides derivados de aminoácido.

Com estas informações o procedimento poderá ser melhorado na busca de biomarcadores.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)