



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---

**Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química**

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL E  
MEIO EXTRATOR NA QUALIDADE DA IMPRESSÃO  
DIGITAL CROMATOGRÁFICA DA *BAUHINIA*  
*VARIEGATA* L. POR PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO**

**Fernanda Delaroza**

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

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

---

**Londrina  
Abril de 2007  
Fernanda Delaroza**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL E MEIO  
EXTRATOR NA QUALIDADE DA IMPRESSÃO DIGITAL  
CROMATOGRÁFICA DA *BAUHINIA VARIEGATA* L. POR  
PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO**

**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 - 2007**

**PROGRAMA DE MESTRADO EM QUÍMICA DOS RECURSOS NATURAIS**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL E  
MEIO EXTRATOR NA QUALIDADE DA IMPRESSÃO  
DIGITAL CROMATOGRÁFICA DA *BAUHINIA*  
*VARIEGATA* L. POR PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

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

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (UNICAMP)**

**Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara (UEL)**

**Londrina, 02 de Abril de 2007**

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

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

D339i Delaroza, Fernanda.  
Influência da composição da fase móvel e meio extrator na  
qualidade da impressão digital cromatográfica da *Bauhinia  
variegata* L. por planeja-  
mento estatístico / Fernanda Delaroza. – Londrina, 2007.  
87f. : il.

Orientador : Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) –  
Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas,  
Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais,  
2007.

Bibliografia : f. 84–87.

1. *Bauhinia variegata* L. – Teses. 2. Química analítica – Teses. 3. Plantas -  
Análise – Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 5. Quimi-  
ometria – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de  
Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós – Graduação em  
Química dos Recursos Naturais. III. Título.

CDU 543.42

## AGRADECIMENTOS

- Em especial à Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio pela excelente orientação regada sempre com muita amizade, bom humor, dedicação e disposição em acompanhar integralmente todo o trabalho.
- Aos professores Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara e Dr. João Carlos Alves pela colaboração neste trabalho.
- Aos meus pais pelo amor incondicional e por todo apoio.
- Aos meus irmãos Júlio e Flávio e cunhada Édna, conselheiros de toda hora.
- A amiga Patrícia Kaori Soares por toda sua atenção e ajuda.
- Ao Wagner Risso pelo seu grande companheirismo e ajuda.
- Aos amigos de laboratório Aline, Elaine, Raquel, Sabrina, Luciana e Crystian.
- A todos os amigos do mestrado, principalmente a turma de 2005.
- À professora Suely pela ajuda em marcar as análises do IV.
- Ao Jurandir Pereira Pinto por troca de colunas e manutenção do Cromatógrafo a Líquido.
- A todos os professores do Programa de Pós Graduação de Química dos Recursos Naturais.
- A todo Departamento de Química, professores, técnicos e funcionários.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

*A Deus por iluminar sempre meu caminho e  
colocar em minha vida pessoas maravilhosas.*

# ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO I	
1. Introdução e Objetivos	2
CAPÍTULO II	
2. Métodos Quimiométricos	9
2.1. Modelagem de Misturas	9
2.2. Análise Exploratória de Dados	15
2.2.1. Análise de Componentes Principais (ACP)	16
2.2.2. Análise Hierárquica (AH)	18
CAPÍTULO III	
3. Descrição Experimental	20
3.1. Planta	21
3.1.2. Características da planta	21
3.2. Coleta	22
3.3. Secagem	22
3.4. Moagem	22
3.5. Reagentes	23
3.6. Equipamentos	23
3.7. Extração	23
3.8. Preparação dos Extratos	24
3.9. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	26
3.9.1. Preparo da fase móvel	26
3.9.2. Preparo das amostras para análise cromatográfica	29
3.10. Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de	30

Fourier (FTIR)	
3.11 Análise por Espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-VIS)	31
3.12. Análise Exploratória dos Dados	31
CAPÍTULO IV	
4. Resultados e Discussão	33
CAPÍTULO V	
5. Conclusão	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

## FIGURAS

Figura:

- 1 Espaço experimental para processos com três fatores independentes inclui todos os pontos dentro do cubo. O espaço experimental para misturas de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo. 10
- 2 Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais. ACP (Análise de Componentes Principais), AH (Análise Hierárquica). 16
- 3 Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes. 17
- 4 Procedimento experimental empregado no estudo da influência da composição da fase móvel e do meio extrator na qualidade da impressão digital cromatográfica de material vegetal. 20
- 5 Fotografia da flor *Bauhinia variegata* L. 21
- 6 Exsicata da *Bauhinia variegata* L. depositada no herbário da UEL. 21
- 7 Seqüência do procedimento para o preparo dos extratos para a escolha do solvente extrator. 25
- 8 Planejamento experimental do tipo Centróide Simplex de três componentes com pontos axiais para a escolha do solvente extrator. 26
- 9 Triângulo de seletividade para solventes para cromatografia. 28
- 10 Triângulo dos solventes metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e água. A região estudada é determinada pelo trapézio cujos vértices estão marcados pelas letras **A, N, H, Q, B, O, I, R**. 29
- 11 Seqüência do procedimento para o preparo das amostras para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 30
- 12 Resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático no estudo do rendimento de extratos da *Bauhinia variegata* L. 35
- 13 Respostas previstas pelo modelo quadrático no estudo do rendimento de extratos da *Bauhinia variegata* L. 35
- 14 Curvas de nível para o modelo quadrático ajustado para a escolha do melhor solvente extrator da *Bauhinia variegata* L. 36
- 15 Planejamento das fases móveis. A região estudada é determinada pelo trapézio cujos vértices estão marcados pelas letras **A, N, H, Q, B, O, I,**

	<b>R.</b> do planejamento).	38
16	Planejamento para as fases móveis <b>A, Q, B, N, E, O, H, R e I</b> combinadas com o planejamento experimental do tipo Centróide Simplex dos extratos.	39
17	Planejamento experimental do tipo Centróide Simplex dos extratos com as fases móveis <b>A, Q, B, N, E, O, H, R e I</b> .	40
18	Prisma do meio extrator: (a) e (b) nas séries não isoelutrópicas (c) e (d) nas séries isoelutrópicas.	41
19	Números de picos para cada amostra em seu meio extrator eluídas nas diferentes fases móveis.	42
20	Resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático aos valores de números de picos na fase <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v).	44
21	Respostas previstas pelo modelo quadrático na fase <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v).	44
22	Curvas de nível avaliando o efeito dos solventes extratores descritos na Tabela 2 e eluídos na fase <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v).	45
23	Resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático aos valores de números de picos na fase <b>I</b> ACN:H <sub>2</sub> O (64,5:35,5 v/v).	47
24	Respostas previstas pelo modelo quadrático na fase <b>I</b> ACN:H <sub>2</sub> O (64,5:35,5 v/v).	47
25	Curvas de nível para o planejamento da fase <b>I</b> ACN:H <sub>2</sub> O (64,5:35,5 v/v).	48
26	Resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial aos valores de números de picos na <b>R</b> MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (35:35:30 v/v).	49
27	Respostas previstas pelo modelo quadrático na fase <b>R</b> MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (35:35:30 v/v).	50
28	Curvas de nível para o planejamento da fase <b>R</b> MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (35:35:30 v/v).	51
29	Resultado do número de picos de cada extrato nas fases <b>A, Q, B, N, E, O, H, R, I</b> .	52
30	Curvas de nível dos extratos de 1 a 10 descritos na Figura 8 eluídos nas fases <b>A, Q, B, N, E, O, H, R, I</b> .	53
31	Gráfico dos escores da CP6 × CP7 para os extratos 1 a 10 descritos na Figura 8 Fase <b>A</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (38,5:61,5), <b>Q</b> MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O	

	(17,5:17,5:65), <b>B</b> ACN:H <sub>2</sub> O (32:68), <b>N</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (58:42), <b>E</b> MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (16:26:58), <b>O</b> ACN:H <sub>2</sub> O (48:52), <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23), <b>R</b> MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (35:35:30) e <b>I</b> ACN:H <sub>2</sub> O (64,5:35,5) em v/v.	55
32	Gráfico dos loadings da CP6 × CP7.	56
33	Gráfico dos loadings CP6 × CP7 em função do tempo em minutos.	56
34	Cromatogramas dos extratos localizados nas extremidades dos grupos formados na Figura 31 realizadas nas seguintes condições cromatográficas descritas no item 3.9.2.	57
35	Gráfico dos escores CP2×CP4 para os extratos 1 a 10 descritos na Figura 8 eluídos na fase <b>H</b> .	59
36	Gráfico dos loadings CP2 com CP4 para os extratos 1 a 10 descritos na Figura 8 eluídos na fase <b>H</b> .	59
37	Gráfico dos cromatogramas dos extratos 1 a 10 descritos no planejamento da Figura 8 eluídos na fase <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v).	60
38	Dendrograma baseado nos dados cromatográficos dos extratos de 1 a 10 descritos na Figura 8 eluídos nas fases <b>H</b> .	60
39	Esquema dos espectros de cada pico dos cromatogramas na análise dos extratos de 1 a 10, descritos na Figura 8 eluídos na fase <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v).	61
40	Espectros de absorção no ultravioleta/visível dos extratos 1 a 10 descritos no planejamento experimental do tipo Centróide Simplex modificado com 3 componentes descrito na Figura 8.	62
41	Gráfico dos escores das componentes principais 1 e 4 dos 11 espectros UV-VIS.	63
42	Gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 4 dos 11 espectros no ultravioleta/visível.	64
43	Espectros de absorção no ultravioleta/visível dos extratos 1 a 10 descritos no planejamento experimental, Figura 8.	65
44	Espectros de absorção no ultravioleta/visível dos extratos 1 (100% diclorometano); 4 (50% diclorometano e 50% etanol), 6 (50% diclorometano e 50% acetona) e 8 ( 66,6% diclorometano, 16,7% etanol e 16,7% acetona).	65
	Dendrograma baseado nos dados dos espectros obtidos no ultravioleta	

45	para os 11 extratos descritos no planejamento experimental, Figura 8.	66
46	Gráfico dos escores CP1 e CP3 para dos 11 espectros analisados por FTIR.	67
47	Gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 3 dos 11 espectros no FTIR.	69
48	Dendrograma baseados dos dados espectroscópicos para os 11 extratos descritos no planejamento experimental do tipo Centróide Simplex modificado com 3 componentes mostrados na Figura 8.	70
49	Gráfico dos escores CP2 e CP3 para os dados cromatográficos das 33 amostras extraídas conforme planejamento da Figura 8 e eluídos nas fases móveis <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v), <b>R</b> MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (35:35:30 v/v) e <b>I</b> (ACN:H <sub>2</sub> O (64,5:35,5 v/v).	72
50	Gráfico dos loadings das componentes principais 2 e 3 das 33 amostras extraídas conforme planejamento da Figura 8 e eluídos nas fases móveis <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v), <b>R</b> MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (35:35:30 v/v) e <b>I</b> ACN:H <sub>2</sub> O (64,5:35,5 v/v).	72
51	Cromatogramas das 33 amostras extraídas conforme planejamento da Figura 8 e eluídos nas fases móveis <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v), <b>R</b> MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (35:35:30 v/v) e <b>I</b> (ACN:H <sub>2</sub> O (64,5:35,5 v/v)	73
52	Espectros de absorção no UV-VIS dos picos correspondentes aos tempos (a) 3,27min (b) 3,37 min e (c) 3,60 minutos.	73
53	Cromatogramas das amostras C1(comercial-Bauhinia não especificada), C2 (comercial-Bauhinia candicans), C3 (comercial-Bauhinia forficata Link), F1(Bauhinia forficata Link- nº FUEL 36.475); F2 (Bauhinia forficata Link- nº FUEL 36.486)e F3(Bauhinia forficata Link- nº FUEL 37.339); Vbr (Bauhinia variegata L.- nº FUEL 36.474); Vrs (Bauhinia variegata L- nº FUEL 36.473) e Vrx (Bauhinia variegata Link- nº FUEL 36.472) realizado nas condições cromatográficas descritas no item 3.9.2.	75
54	Dendrograma baseado nos dados espectroscópicos para as nove amostras de <i>Bauhinia</i> extraídas na condição otimizada de 75% acetona e 25% etanol (v/v) eluídas na fase móvel <b>H</b> MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v).	76
55	Cromatogramas das amostras comerciais 2 e 3, extraídas na condição otimizada de 75% acetona e 25% etanol (v/v) eluídas na fase <b>H</b>	

MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v) realizado nas condições cromatográficas descritas nos itens 3.9.2. 77

56 Espectros de absorção no UV extraídos de cada pico dos cromatogramas das amostras comerciais: a) C2 (*Bauhinia candicans*) e b) C3 (*Bauhinia forficata*). 77

## TABELAS

Tabela:		
1	Solventes dos grupos determinados por Snyder..	27
2	Composição dos extratos preparados com misturas diclorometano, etanol, acetona de acordo com o planejamento da Figura 8.	33
3	Planejamento para o preparo das fases móveis para análise dos extratos da <i>Bauhinia variegata</i> L.	39

## SIGLAS

<b>a</b>	acetona
<b>A</b>	Fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O (38,5:61,5 v/v)
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>ACP</b>	Análise de Componentes Principais
<b>AH</b>	Análise Hierárquica
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>B</b>	Fase móvel ACN:H <sub>2</sub> O (32:68 v/v)
<b>C1</b>	Amostra comercial de <i>Bauhinia</i> não especificada
<b>C2</b>	Amostra comercial de <i>Bauhinia candicans</i>
<b>C2</b>	Amostra comercial de <i>Bauhinia forficata</i> L.
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CP1</b>	Componente Principal 1
<b>CP2</b>	Componente Principal 2
<b>CP3</b>	Componente Principal 3
<b>CP4</b>	Componente Principal 4
<b>CP6</b>	Componente Principal 6
<b>CP7</b>	Componente Principal 7
<b>d</b>	Diclorometano
<b>DSHEA</b>	Dietary Supplement Health and Education Act
<b>e</b>	Etanol
<b>E</b>	Fase móvel MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (16:26:58 v/v)
<b>EC</b>	Eletroforese capilar
<b>F1</b>	Planta classificada como <i>Bauhinia forficata</i> Link com número de identificação 36.475
<b>F2</b>	Planta classificada como <i>Bauhinia forficata</i> Link com número de

	identificação 36.486
<b>F3</b>	Planta classificada como <i>Bauhinia forficata</i> Link com número de identificação 37.339
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FM</b>	Fase móvel
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
<b>H</b>	Fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O (77:23 v/v)
<b>I</b>	Fase móvel ACN:H <sub>2</sub> O (64,5:35,5)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>k</b>	Fator de retenção do soluto
<b>n</b>	objetos
<b>N</b>	Fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O (58:42 v/v)
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MTC</b>	Medicina tradicional chinesa
<b>O</b>	Fase móvel ACN:H <sub>2</sub> O (48:52 v/v)
<b>p</b>	Variáveis
<b>P</b>	Matriz dos escores
<b>q</b>	Número de componentes principais
<b>Q</b>	Fase móvel MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (17,5:17,5:65 v/v)
<b>R</b>	Fase móvel MeOH:ACN:H <sub>2</sub> O (35:35:30 v/v)
<b>SDA</b>	State Drug Administration
<b>t</b>	Transposta da matriz
<b>T</b>	Matriz dos loadings
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta-visível
<b>VBr</b>	Planta de flor branca classificada como <i>Bauhinia variegata</i> L com número de identificação 36.474
<b>VRs</b>	Planta de flor branca classificada como <i>Bauhinia variegata</i> L com número de identificação 36.473
<b>VRx</b>	Planta de flor branca classificada como <i>Bauhinia variegata</i> L com número de identificação 36.472

<b>X</b>	Matriz
<b>xe</b>	Parâmetro relacionado à basicidade do solvente
<b>xd</b>	Parâmetro de acidez
<b>xn</b>	Parâmetro relacionado com o momento dipolar
<b>W</b>	Resíduos
<b>WHO</b>	World Health Organization

## RESUMO

Planejamentos estatísticos de misturas foram usados para investigar a influência da composição da fase móvel e do meio extrator na qualidade da impressão digital cromatográfica da *Bauhinia variegata* L. Para a extração foram usados os solventes puros e misturas binárias e ternárias de diclorometano, etanol e acetona. A qualidade da impressão digital foi comparada pela construção de modelos estatísticos de misturas de solventes de fases móveis empregada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa usando como resposta o número de picos. A fase móvel também foi investigada por meio de planejamento estatístico usando metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) como modificadores orgânicos. As proporções calculadas para cada modificador em relação à água foram feitas de forma que, houvesse um aumento gradativo na força cromatográfica. Modelos de análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica (AH) foram aplicados aos dados dos cromatogramas dos diferentes extratos e fases móveis. As características da impressão digital cromatográfica foram muito sensíveis à mistura de extração e a força cromatográfica. A ACP e AH também foram aplicadas aos dados de infravermelho com transformada de Fourier e espectros na região ultravioleta-visível. Três fases móveis de força cromatográfica dois produziram os melhores resultados. As melhores fases móveis para produzir impressão digital informativa foram a MeOH: H<sub>2</sub>O (77:23 v/v ) com 17 picos, ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v) e MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v) com 18 e 20 picos, respectivamente. A composição ótima do solvente na extração das substâncias químicas nas três fases móveis na análise cromatográfica da *Bauhinia variegata* L. foram misturas de acetona:etanol (75:25 v/v) e diclorometano:acetona (70:30 v/v) e 100% de diclorometano, respectivamente. Modelos estatísticos de misturas, ACP e AH aplicados aos dados fornecidos pela CLAE e por espectroscopia de absorção no infravermelho e ultravioleta-visível mostraram-se uma ferramenta útil na investigação da impressão digital da *Bauhinia variegata* L. e poderá ser valiosos para o estudo de outras plantas.

## ABSTRACT

The performance of a chromatographic fingerprint obtained is closely dependent on the chromatographic separation degrees and concentration distributions of all the chemical components in herbal medicines. The purpose of this work is to investigate the influence of different solvents on the extraction medium and the mobile phase strength of reversed-phase liquid chromatography and diode arrays detection using statistical mixture designs to improve the quality of chromatographic fingerprints of the unfractionated extract of the *Bauhinia variegata* L. For modeling, the number of peaks was used as a measure of fingerprint information. Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were used as the mobile phase modifying solvents. Dichloromethane, ethanol and acetone were used as extraction solvents. The results show that the dependence of the peak numbers on the solvent composition increases with increasing mobile phase strength. Three mobile phases, each with a chromatographic strength of two, produced good results. A MeOH: H<sub>2</sub>O (77:23 v/v) mixture results in 17 peaks in the chromatographic fingerprint whereas ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v) and MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v) mixtures result in 18 and 20 peaks, respectively. The optimum solvent compositions to extract chemical substances in the three mobile phases from the chromatographic analysis of the *Bauhinia variegata* L. were acetone:ethanol (75:25 v/v) and dichloromethane:acetone (70:30 v/v) mixtures and 100% dichloromethane, respectively. Principal component analysis and hierarquical cluster analysis models were applied to chromatograms of different extracts and mobile phases, as well as on UV-VIS middle infrared (FTIR) spectral data for each extract and their models were correlated with the HPLC models. The mixture design methodology allows obtaining useful mathematical models for describing the effects of mobile phase and extraction mixture compositions on the chromatographic fingerprints.



*Capítulo I*  
*Introdução*  
*e*  
*Objetivos*

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos usadas para tratamentos patológicos e prevenção de doenças. Embora muito popular e com o mercado crescente em todo o mundo<sup>1</sup>, dados revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto a seu potencial medicinal<sup>2</sup>.

O isolamento da morfina da *Papaver somniferum* em 1803 pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner<sup>3</sup>, marcou o início do processo de extração de princípios ativos de plantas. Assim, a produção de fármacos via síntese química, o crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas e a ausência de comprovações científicas de eficácia das substâncias de origem vegetal aliada às dificuldades de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais até então utilizados, impulsionaram a substituição destes por fármacos sintéticos.

Atualmente os fitoterápicos são muito utilizados tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos. Há informações de que os produtos naturais e as preparações fitoterápicas são responsáveis por 25 % dos receituários médicos nos países desenvolvidos e cerca de 80% em subdesenvolvidos. Como exemplos disto, há estimativa feita pela WHO (World Health Organization) de que 80% da população da África dependem de plantas medicinais. No Japão, 85% dos médicos prescrevem a seus pacientes tratamentos com plantas medicinais (chamada de *Kampo*)<sup>2,4</sup>.

O uso de fitoterápicos vem ganhando muita credibilidade pela onda de propagandas que se enfocam no termo “produto natural”, garantindo a inofensividade à

saúde abstendo os riscos colaterais, usados com isso, para controle, prevenção e até curas das doenças sem prescrição médica.

Em 1994 conforme o Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA) os produtos derivados de plantas foram classificados como “suplemento alimentar” não sendo necessário submeter dados de segurança e eficácia ao *Food and Drug Administration* (FDA) para a comercialização destes produtos<sup>5</sup>.

Sabendo da não veracidade dessas propagandas, já que as plantas são extremamente complexas em suas propriedades químicas, muitos países buscam desenvolver técnicas para controlar a qualidade e autenticidade dos fitoterápicos consumidos pela população. Porém devido ao fato das plantas conterem centenas de complexos ativos do qual se tem conhecimento limitado, torna-se quase impossível identificar todas essas substâncias e realizar uma análise quantitativa<sup>1</sup>. Além disto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas.

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Contudo, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais<sup>2</sup>. O Conselho Nacional de Saúde têm dado uma maior atenção para o consumo de fitoterápicos, visando aliar os conhecimentos tradicionais ao embasamento científico. Normas têm sido elaboradas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Portaria n. 6 de 1995 RDC n. 17 de 2000, estabelecendo prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos

medicamentos fitoterápicos<sup>6</sup>, e a Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004, atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos<sup>7</sup>.

A pesquisa de plantas medicinais, bem como o controle de qualidade inclui dentre suas diversas etapas o cultivo, a identificação botânica, a coleta da planta, a extração de seus constituintes até a elaboração do medicamento final.

O uso da quimiotaxonomia para classificação das plantas medicinais é um método que tem sido restritamente desenvolvido para isolar componentes específicos<sup>8</sup>. Em geral um ou dois marcadores ativos de plantas ou misturas de plantas são empregados atualmente para avaliar a qualidade e autenticidade das plantas medicinais, esteja ela sozinha ou em mistura. Neste tipo de determinação, porém, pode levar a muitos erros, já que vários constituintes são responsáveis pela ação terapêutica, e então, estes constituintes podem agir sinergicamente, podendo não haver separação em partes ativas. Além do mais, os constituintes químicos na composição das ervas podem variar por diversos fatores, como época da colheita, região, tipo de secagem entre outros<sup>9</sup>.

Na análise metabolômica<sup>10</sup>, o objetivo é analisar tantos metabólitos quanto possíveis em uma única análise. Neste caso, o extrato geralmente não é purificado, ao contrário dos procedimentos de rotina. Estes metabólitos representam muitas classes de diferentes compostos incluindo aminoácidos, gorduras, carboidratos e ácidos orgânicos. Isto gera problemas na escolha do protocolo de extração, porque as condições de extração diferem muito para os diferentes tipos de compostos. Por exemplo, para extração de metabólitos polares são usados o etanol, metanol ou água, enquanto que para os mais lipofílicos o solvente mais comum é o clorofórmio. A escolha dos reagentes envolve um compromisso entre maximizar a eficiência da extração e garantir o maior ou menor número de metabólitos dependendo do caso em estudo<sup>11</sup>.

A impressão digital cromatográfica tem mostrado ser o método mais conveniente e efetivo para assegurar a qualidade de materiais a base de plantas, especialmente quando existe falta de padrões autênticos para identificação dos componentes ativos. Ela foi introduzida e aceita pela WHO (World Health Organization) como estratégia de identificar e avaliar qualitativamente a erva medicinal. Em 2000 a State Drug Administration (SDA) da China começou a desenvolver a impressão digital para MTC (medicina tradicional chinesa) como padrão de controle de qualidade. Desde então, aumentou-se o interesse no desenvolvimento de metodologia analítica para a obtenção da impressão digital de plantas medicinais e produtos acabados, não somente na China, mas em vários países<sup>1</sup>.

A impressão digital cromatográfica de uma planta medicinal para o controle de qualidade é um cromatograma complexo usado para comparação de perfis<sup>1</sup>. Outra definição mais geral é que a impressão digital é um tipo de método que mostra a informação química de plantas medicinais e produtos acabados com espectrogramas, cromatogramas e outros gráficos obtidos por técnicas analíticas<sup>12</sup>.

Diversas técnicas cromatográficas, tais com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar (EC) e cromatografia em camada delgada (CCD) pode ser aplicada para este tipo de análise<sup>13</sup>.

Algumas classes de compostos tais como: alcalóides, álcoois, antibióticos, aromáticos, barbitúricos, agrotóxicos clorados e vitaminas são facilmente separadas por CLAE fase reversa<sup>14</sup>.

Uma dificuldade na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a escolha da melhor fase móvel para uma dada amostra<sup>15</sup>, já que, é preciso um conhecimento muito amplo das propriedades cromatográficas dos solventes, a fim de que, se possa

otimizar a força cromatográfica e a seletividade suprindo uma retenção conveniente dos componentes de interesse da amostra e uma uniformidade dos picos dentro do cromatograma<sup>16</sup>. Por isso, na cromatografia líquida, a atenção especial é dada na otimização da fase móvel<sup>17</sup>.

. Na busca da impressão digital este é um fator de extrema importância porque os extratos não passam por fracionamento químico. Existem poucos exemplos na literatura envolvendo o uso de planejamentos estatísticos de misturas no estudo de plantas medicinais, sendo a maioria dos trabalhos do nosso grupo de pesquisa<sup>8,18-22</sup>. Considerando a importância da impressão digital como método de controle de qualidade, a falta de padrão de material vegetal, bem como a grande sinonímia entre as diferentes espécies do mesmo gênero, este trabalho teve como objetivo geral investigar a influência da composição da fase móvel e do meio extrator na qualidade da impressão digital cromatográfica da *Bauhinia variegata* L. por planejamento estatístico de misturas.

#### Objetivos específicos

- Investigar o efeito da força do solvente extrator na variação composicional da *Bauhinia variegata* L. por planejamento estatístico de misturas de três componentes.
- Investigar a influência da força cromatográfica no número de picos no cromatograma .
- Investigar a influência dos modificadores da fase móvel na qualidade dos cromatogramas.

- Aplicar métodos quimiométricos de análise multivariada associados a dados espectroscópicos para comparar com os resultados da análise cromatográfica.

As espécies do gênero *Bauhinia* vem ganhando a atenção de pesquisadores na área da saúde por serem utilizadas na medicina alternativa. O Gênero *Bauhinia* (família Leguminosae-Caesalpinioideae) compreende mais de 300 espécies distribuídas em ambientes tropicais e subtropicais. Seus nomes populares são pata de vaca, capa de bode, casco de burro, pata de boi, pata de veado, pé de boi, unha de anta, unha de boi<sup>23</sup>. O gênero *Bauhinia* é caracterizado pelo acúmulo de flavonóides livres e glicosilados sendo que de *B. forficata* são relatados na literatura a presença de  $\beta$ -sitosterol and kanferol-3,7-diramnosídeo<sup>24</sup>.

A *Bauhinia candicans*<sup>25-27</sup>, está disponível comercialmente e sua principal indicação terapêutica é a ação hipoglicemiante, auxiliando no tratamento do diabetes melitos<sup>28</sup>. Três espécies exóticas: *Bauhinia blackeana*, *Bauhinia monandra* e *Bauhinia variegata* foram introduzidas no Brasil com a finalidade ornamental, encontradas hoje nos jardins e praças de cidades. Estas espécies também recebem o nome de pata de vaca, e têm sido usadas no lugar das espécies recomendadas (*B. candicans*, *B. forficata* e *B Chulanta*).

Neste estudo foi utilizada uma espécie do gênero *Bauhinia* a *Bauhinia variegata* L. Esta espécie é cultivada no estacionamento do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina.



*Capítulo II*  
*Métodos*  
*Quimiométricos*

## 2. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

### 2.1 Modelagem de Misturas

Mistura é o ato ou efeito de associar vários ingredientes para formar um produto. O produto resultante de uma mistura tem características que dependem da natureza de seus ingredientes e das proporções relativas dos mesmos, não da quantidade total da mistura.

A soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%. Para uma mistura qualquer de  $q$  componentes, podem-se escrever:

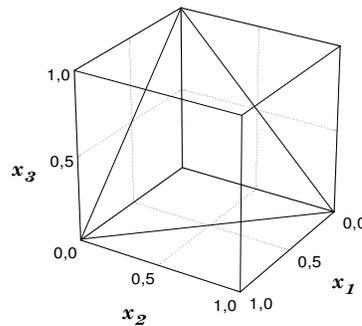
$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1, \quad (1)$$

onde  $x_i$  representa a proporção do  $i$ -ésimo componente. Esta equação retira um grau de liberdade das proporções. Para especificar a composição da mistura, só precisam fixar as proporções de  $q-1$  componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100%<sup>29</sup>.

Como resultado da restrição da Equação 1 os valores de  $x_i$  (proporção do  $i$ -ésimo ingrediente), o espaço torna-se uma região simplex. Um simplex é uma configuração espacial determinada por um número de pontos uma a mais do que o número de dimensões do espaço. Cada um dos  $q$  pontos que determinam o simplex representam uma mistura onde um dos  $q$  componentes assume a proporção 1.

Para sistemas com três fatores independentes, podem-se realizar experimentos correspondentes a qualquer ponto dentro do cubo da Figura 1. Caso o sistema seja uma mistura de três componentes, porém, terá de obedecer à restrição  $x_1 + x_2 + x_3 = 1$ , que define um triângulo equilátero inscrito no cubo, também mostrado na Figura 1.

Todas as composições possíveis da mistura ternária são representadas pelos pontos pertencentes ao triângulo. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, enquanto os pontos situados no interior do triângulo representam as misturas de três componentes.



**Figura 1**-Espaço experimental para processos com três fatores independentes inclui todos os pontos dentro do cubo. O espaço experimental para misturas de três componentes limita-se aos pontos pertencentes ao triângulo.

Além da restrição natural mostrada na equação 1, pode-se também ter restrições superiores e inferiores dos teores dos componentes na mistura, por motivos tecnológicos ou econômicos, entre outros. Obviamente a soma de todos esses limites tem de ser menor que um, senão será impossível de preparar a mistura. Tais restrições para um

caso geral de  $q$  componentes são escritas conforme a equação 2. Estes pontos são chamados os vértices do simplex.

$$0 \leq \alpha_i \leq c_i \quad \text{e} \quad \sum_{i=1}^q \alpha_i < 1, \quad i = 1, 2, \dots, q. \quad (2)$$

onde  $\alpha_i$  são os limites inferiores não-nulos.

O modelo mais simples para uma mistura é o modelo linear ou aditivo, que procura explicar o comportamento de uma propriedade apenas com os resultados obtidos com a utilização de cada componente individualmente, isto é, prever o comportamento de qualquer mistura sem realizar nenhuma mistura.

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \varepsilon_i, \quad (3)$$

onde  $y_i$  é um valor experimental da resposta de interesse,  $\beta_0$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  são os parâmetros do modelo e  $\varepsilon_i$  representa o erro aleatório associado à determinação do valor de  $y_i$ . Ajustando o modelo às observações feitas com essa finalidade, obtém-se a expressão:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3, \quad (4)$$

que permite estimar a resposta média num ponto qualquer de composição  $(x_1, x_2, x_3)$ .

O acento circunflexo é para diferenciar um valor populacional de uma estimativa.

Substituindo o termo  $b_0$  por  $b_0(x_1 + x_2 + x_3)$  e agrupando os termos em  $x_i$ ,  
obtem-se:

$$\hat{y} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3, \quad (5)$$

sendo  $b_i^* = b_0 + b_i$ , para  $i = 1, 2$  e  $3$ .

Caso o modelo linear não se mostre satisfatório, deve-se tentar ajustar um modelo quadrático. Para misturas de três componentes, a expressão geral do modelo quadrático contém dez termos:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{33} x_3^2 \\ & + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 \end{aligned} \quad (6)$$

Substituindo as relações  $1 \times b_0 = (x_1 + x_2 + x_3) \times b_0$  e  $b_{11} x_1^2 = b_{11} x_1 (1 - x_2 - x_3)$ , além de expressões análogas para  $b_{22} x_2^2$  e  $b_{33} x_3^2$ , tem-se:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_0 (x_1 + x_2 + x_3) + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 \\ & + b_{11} x_1 (1 - x_2 - x_3) + b_{22} x_2 (1 - x_1 - x_3) + b_{33} x_3 (1 - x_1 - x_2) \\ & + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 \end{aligned}$$

Agrupando os termos, obtém-se finalmente:

$$\hat{y} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{23}^* x_2 x_3 \quad (7)$$

onde  $b_i^* = b_0 + b_i + b_{ii}$  e  $b_{ij}^* = b_{ij} - b_{ii} - b_{jj}$ , com  $i \neq j$ .

Se o modelo quadrático se mostrar insuficiente, precisa acrescentar-lhe termos cúbicos.

O modelo cúbico completo para uma mistura de três componentes é dado pela equação:

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i \leq j}^3 \sum_j b_{ij} x_i x_j + \sum_{i \leq j \leq k}^3 \sum_{j \leq k}^3 \sum_k b_{ijk} x_i x_j x_k \quad (8)$$

Usando a identidade  $1 = x_1 + x_2 + x_3$  e fazendo as substituições apropriadas, pode-se chegar à expressão:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{23}^* x_2 x_3 \\ & + d_{12}^* x_1 x_2 (x_1 - x_2) + d_{13}^* x_1 x_3 (x_1 - x_3) + d_{23}^* x_2 x_3 (x_2 - x_3) \quad (9) \\ & + b_{123}^* x_1 x_2 x_3 \end{aligned}$$

Como esta equação tem dez termos, ter-se-ia de fazer no mínimo dez ensaios diferentes para determinar os valores de todos os seus coeficientes. Muitas vezes, basta

introduzir um único termo cúbico para que o modelo passe a descrever satisfatoriamente toda a região experimental. Neste caso tem-se a expressão do modelo cúbico especial, que possui apenas um termo a mais que o modelo quadrático, e portanto, só precisa de um ensaio adicional:

$$\hat{y} = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 + b_{12}^*x_1x_2 + b_{13}^*x_1x_3 + b_{23}^*x_2x_3 + b_{123}^*x_1x_2x_3 \quad (10)$$

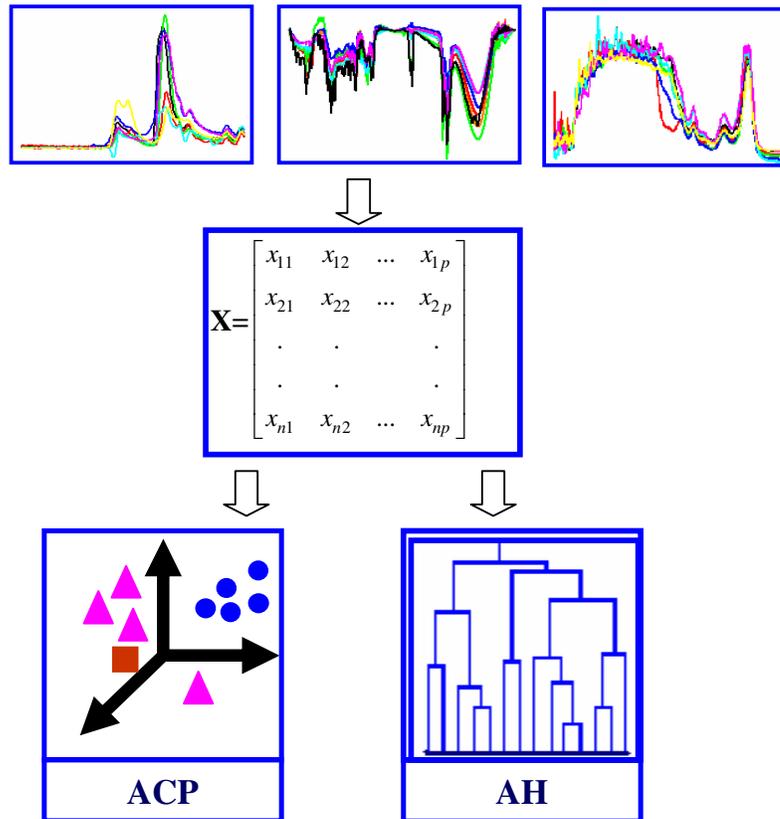
O planejamento experimental normalmente empregado para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico especial é o chamado centróide simplex, que se obtém acrescentando ao simplex em rede um ponto central correspondendo à mistura ternária em partes iguais,  $(x_1, x_2, x_3) = \left(\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}\right)$ .

## 2.2 Análise Exploratória de Dados

O objetivo da análise exploratória é extrair informações dos dados, estabelecendo relações entre objetos e variáveis. A análise exploratória não estabelece modelos à priori, mas permite que, a partir das relações observadas nos dados, sejam levantadas hipóteses e propostos modelos.

A seqüência básica da análise de dados multivariados de dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 2. Antes de proceder à análise dos dados é feita uma inspeção visual para verificar problemas de variação da linha de base, sobreposição de picos e ruídos. Os dados são convertidos na forma de uma matriz (tabela de dados), a qual será representada por  $\mathbf{X}$ . 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. 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.

A seguir, são apresentados os fundamentos dos dois principais métodos de análise exploratória.



**Figura 2**-Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP(Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).

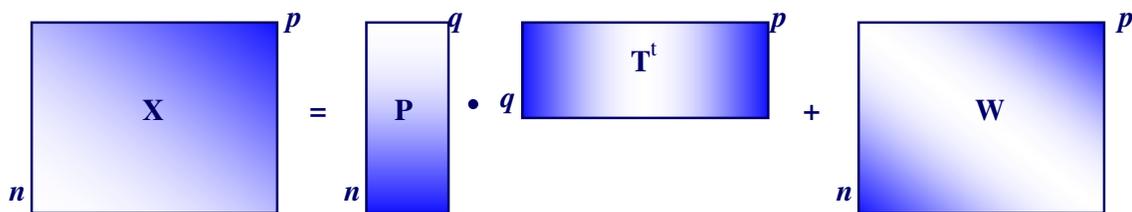
### 2.2.1. Análise de Componentes Principais (ACP)

A ACP é um método que tem por finalidade básica, a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais.

A ACP do Tipo Q define a similaridade entre objetos considerando as proporções entre eles. Na ACP do Tipo Q<sup>30</sup>, a decomposição é calculada através da diagonalização da matriz de associação ( $\mathbf{X}\mathbf{X}^t$ ). A matriz  $\mathbf{X}$  ( $n \times p$ ), formada por  $n$  objetos e  $p$  variáveis é decomposta no produto de duas matrizes menores:

$$\mathbf{X} (n \times p) = \mathbf{P} (n \times q) \times \mathbf{T}^t (q \times p) + \mathbf{W} (n \times p) \quad (11)$$

onde  $\mathbf{P}$  é a matriz dos escores das componentes principais,  $\mathbf{T}$  é a matriz “loadings” (pesos) das componentes principais,  $\mathbf{W}$  é a matriz dos resíduos. O sobrescrito t indica a transposta da matriz e  $q$  é um escalar que indica o número de componentes principais que descreve a maior parte da variância dos dados. Este procedimento está representado esquematicamente na Figura 3.



**Figura 3:** Esquema da decomposição da matriz  $\mathbf{X}$  no produto de duas matrizes.

Após os cálculos, os resultados são utilizados para interpretar a distribuição das amostras num gráfico bidimensional das componentes principais e posteriormente identificar e julgar a importância das variáveis originais escolhidas, pois, as variáveis originais com maiores valores de loadings na combinação linear das componentes principais em módulo são as mais importantes do ponto de vista estatístico.

### 2.2.2. Análise Hierárquica (AH)<sup>31</sup>

A “análise de agrupamentos” é um nome coletivo dado a uma grande variedade de técnicas que permitem a separação dos objetos ou variáveis em grupos diferentes. O método mais utilizado é a análise hierárquica de agrupamentos (AH)<sup>32</sup>.

A AH descreve a estrutura dos dados interligando as amostras por suas associações, revelando os agrupamentos naturais existentes no conjunto de dados, com base na informação das variáveis medidas. Graficamente, a hierarquia pode ser representada na forma de um gráfico bidimensional chamado de dendrograma, no qual onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas são agrupadas entre si.

Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos no espaço p-dimensional. A maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos (amostras) que estão mais próximos, usando a distância Euclidiana (Equação 12), e substituí-los por um novo ponto, localizado na metade da distância entre eles.

$$d_{ik} = \left[ \sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2} \quad (12)$$

Nesta equação,  $d_{ik}$  é a distância Euclidiana entre os pontos  $i$  e  $k$ . O procedimento descrito é repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, levando à construção do dendrograma, onde no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical a distância. A análise de agrupamentos complementa a análise de componentes principais, sendo uma outra forma de visualizar as semelhanças e diferenças na composição das amostras.

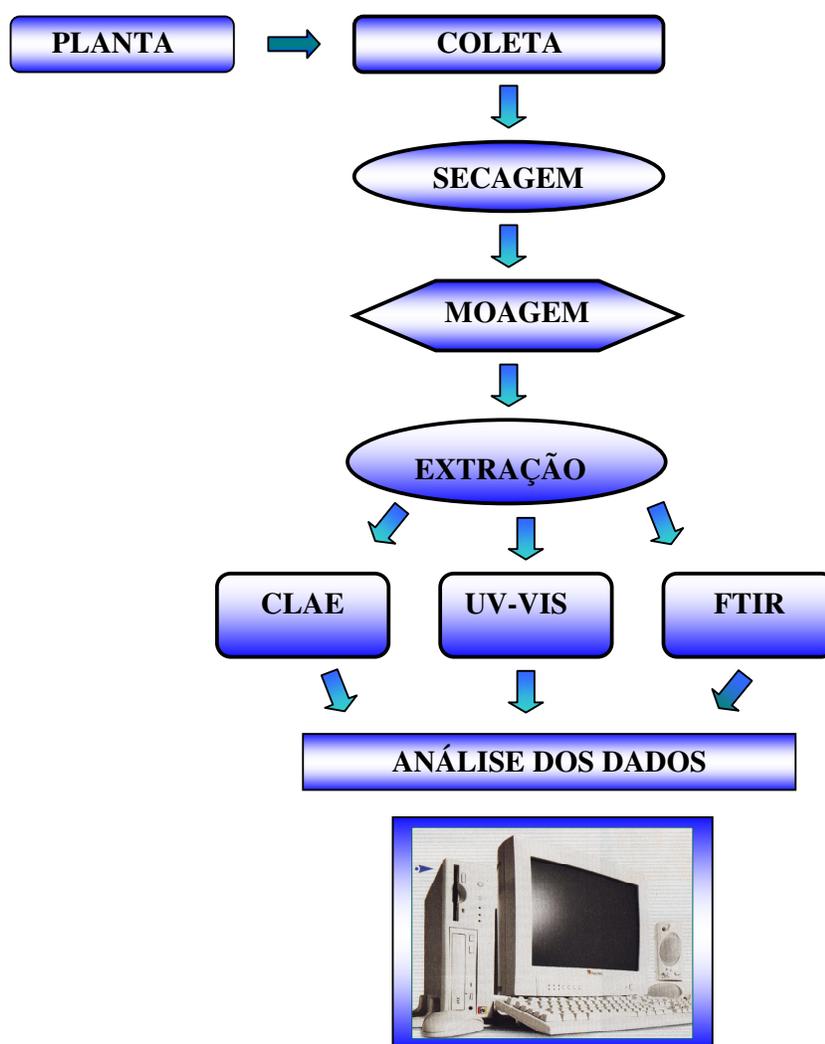


*Capítulo III*

*Descrição  
Experimental*

### 3. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão abordados os aspectos relacionados ao procedimento experimental para avaliar a influência da composição da fase móvel e do meio extrator na qualidade da impressão digital cromatográfica de material vegetal. Um resumo do procedimento experimental está apresentado na Figura 4.



**Figura 4**-Procedimento experimental empregado no estudo da influência da composição da fase móvel e do meio extrator na qualidade da impressão digital cromatográfica de material vegetal.

### 3.1-Planta

A planta utilizada foi a *Bauhinia variegata* L. de flor branca, classificada pelo taxonomista Manuel R.C. Paiva do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina.



**Figura 5-**Fotografia da flor *Bauhinia variegata* L.

### 3.1.2- Características da planta

- Nome Popular: Pata de vaca, unha de vaca.
- Família: Leguminosae
- Gênero: *Bauhinia*
- Espécie: *Bauhinia variegata* L. de flor branca

A exsicata da Figura 6 foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Londrina, registro número FUEL 36.474.



**Figura 6-**Exsicata da *Bauhinia variegata* L. depositada no herbário da UEL.

### **3.2 Coleta**

A coleta do material a ser submetido ao estudo fitoquímico deve-se proceder de forma a garantir a sua identidade botânica, sendo assim, as folhas foram coletadas nas diferentes partes da árvore, sempre no período da tarde. Folhas afetadas por doenças causadas por fungos ou bactérias foram descartadas. O local de coleta foi o estacionamento do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina nos anos de 2005 e 2007.

### **3.3 Secagem**

Após a coleta, as plantas foram fragmentadas com tesoura e secas por sete dias em lugar arejado, à temperatura ambiente e protegida da luz, umidade, ataque de fungos, insetos e roedores. Este procedimento deve ser realizado em local seco e na sombra, já que a irradiação solar pode alterar a constituição química do material.

### **3.4 Moagem**

A moagem foi realizada com o auxílio de um liquidificador e tem por finalidade reduzir, mecanicamente, o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o assim para a próxima etapa, a extração. Após a moagem, o material foi armazenado em caixa de papelão.

### **3.5 Reagentes**

Os reagentes usados para a extração das plantas *Bauhinias* e análise no UV-VIS foram diclorometano e acetona ambos p.a (99,5 %) da marca VETEC e o álcool etílico 95 % da marca DINÂMICA. Para análise por CLAE foram utilizados os modificadores orgânicos metanol e acetonitrila, ambos HPLC espectroscópico (99,8%) da marca VETEC e água purificada pelo sistema USF- ELGA. Para análise no FTIR foram usados clorofórmio P.A-ACS Synth (99,85) e KBr P.A- ACS Synth (99%).

### **3.6 Equipamentos**

Os aparelhos e equipamentos utilizados para realização deste trabalho foram: balança analítica Adventurer OHAUS, liquidificador Mallory, evaporador rotativo FISATOM 802, sonicador T7, cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10AD com detector por arranjo de diodo SPD-M10AVP, coluna Metasil C18 ODS PN0380 Metachem (250x4,6mm, 5µm), espectrofotômetro OCEAN OPTICS modelo CHEM 2000 UV-VIS e espectrômetro de infravermelho Shimadzu FTIR-8300.

### **3.7 Extração**

A extração foi feita por maceração e remaceração<sup>2</sup>. A maceração é a operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado, sem renovação do líquido

extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Para aumentar a eficiência na extração recorre-se ao método de remaceração, ou seja, a operação é repetida várias vezes utilizando o mesmo material, renovando-se apenas o líquido extrator.

### 3.8 Preparo dos Extratos

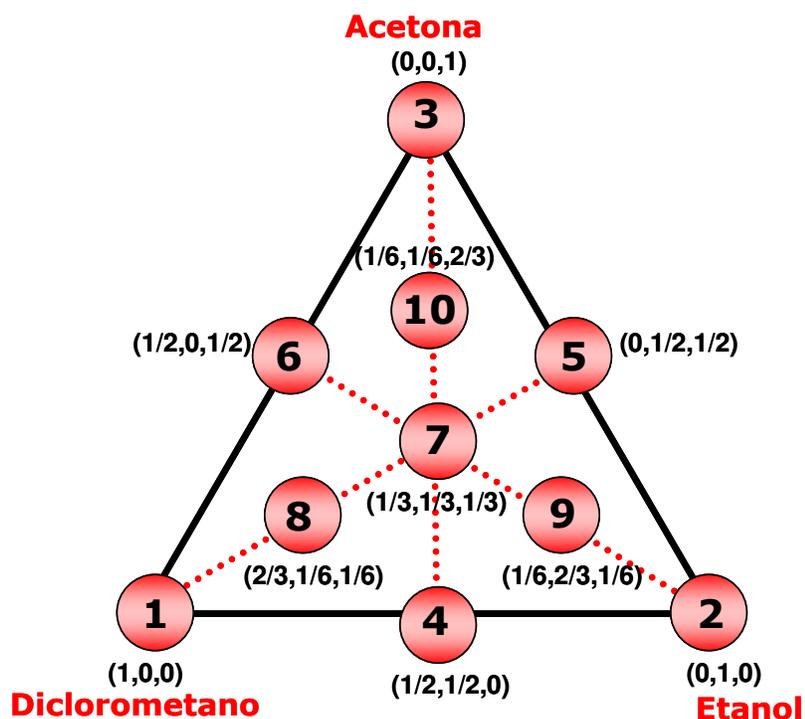
Os extratos foram preparados de acordo com a seqüência apresentada na Figura 7. As proporções dos solventes do meio extrator foram escolhidas de acordo com o planejamento de misturas de três componentes, do tipo Centróide-Simplex <sup>29</sup> com três pontos axiais, Figura 8. Este planejamento é representado por um triângulo equilátero no qual os vértices correspondem aos solventes puros, **1** diclorometano, **2** etanol e **3** acetona, as arestas **4**, **5** e **6** são as misturas binárias de mesma proporção e o ponto central, **7**, feito em duplicata, corresponde a uma mistura ternária de volumes iguais dos três solventes. Os pontos axiais **8**, **9** e **10** estão respectivamente nas proporções (2/3,1/6,1/6); (1/6,2/3,1/6) e (1/6,1/6,2/3), seguindo a ordem diclorometano, etanol e acetona.

Para o preparo de cada extrato foram pesados 3,000 g de folhas secas que foram trituradas e submetidas à extração por maceração com 60 mL do solvente ou da mistura de solventes conforme as proporções descritas no planejamento experimental da Figura 8. Estas misturas ficaram em repouso por 24 horas e em seguida foram filtradas com

algodão e submetidas à evaporação num evaporador rotativo a uma temperatura de  $(50\pm 2)$  °C. A remaceração foi realizada 5 vezes nas mesmas condições da maceração.



**Figura 7**-Seqüência do procedimento para o preparo dos extratos para a escolha do solvente extrator.



**Figura 8-**Planejamento experimental do tipo Centróide Simplex de três componentes com pontos axiais para a escolha do solvente extrator.

### 3.9 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### 3.9.1 Preparo da fase móvel (FM):

Uma alternativa para a escolha da FM é usar o triângulo de seletividade proposto por Snyder. Além do índice de polaridade ( $P'$ ) ele determinou outros três parâmetros experimentalmente,  $x_e$  (parâmetro relacionado à basicidade do solvente),  $x_d$  (parâmetro de acidez) e  $x_n$  (parâmetro relacionado com o momento dipolar). A vantagem do triângulo de Snyder é o agrupamento de solventes de acordo com o tipo de interação com os compostos de interesse. Solventes quimicamente semelhantes que possuem parâmetros de seletividade similares ( $x_e$ ,  $x_d$  e  $x_n$ ) fazem parte do mesmo grupo,

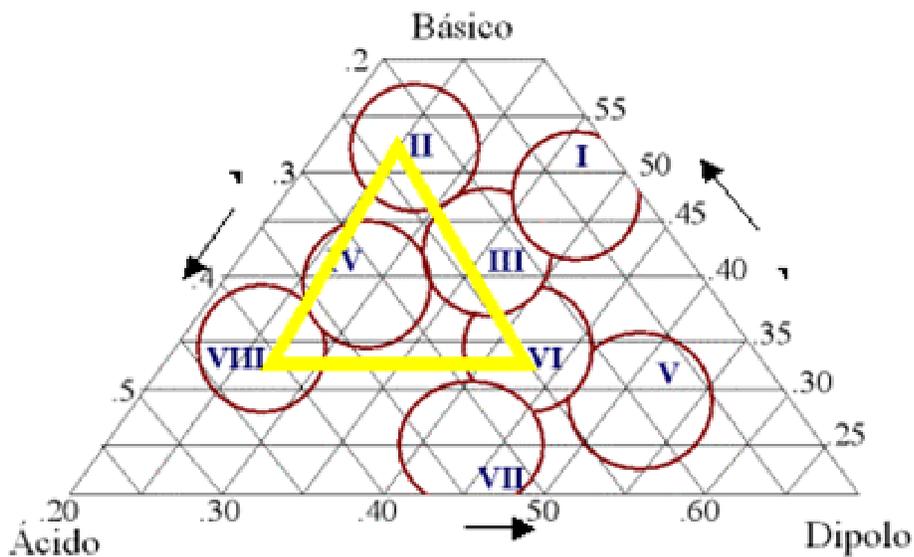
embora possam apresentar diferentes valores de polaridade. A Tabela 1 mostra a divisão desses grupos<sup>33, 34</sup>, colocando-se entre parênteses o solvente mais usado.

**Tabela 1:** Solventes dos grupos determinados por Snyder.

<b>Grupos</b>	<b>Membros</b>
<b>I</b>	Éteres alifáticos (Éter dietílico)
<b>II</b>	Álcoois alifáticos (Metanol, Etanol, Octanol, 1-Propanol)
<b>III</b>	Derivados de piridina, (tetraidrofurano), sulfóxidos
<b>IV</b>	Glicóis, ácido acético
<b>V</b>	Diclorometano
<b>VI</b>	Ésteres alifáticos, cetonas, nitrilas, dioxano (Acetonitrila)
<b>VII</b>	Hidrocarbonetos aromáticos, compostos aromáticos halogenados, éteres aromáticos, compostos nitro (Tolueno)
<b>VIII</b>	Água

Para a realização deste trabalho foram escolhidas fases móveis de grupos e parâmetros diferentes, sinalizada por um triângulo amarelo mostrado na Figura 9.

A água foi o eluente usado para todas as fases móveis (grupoVII) e como modificadores orgânicos foram empregados o metanol do grupo II e a acetonitrila do grupo VI, como mostra a Figura 9.



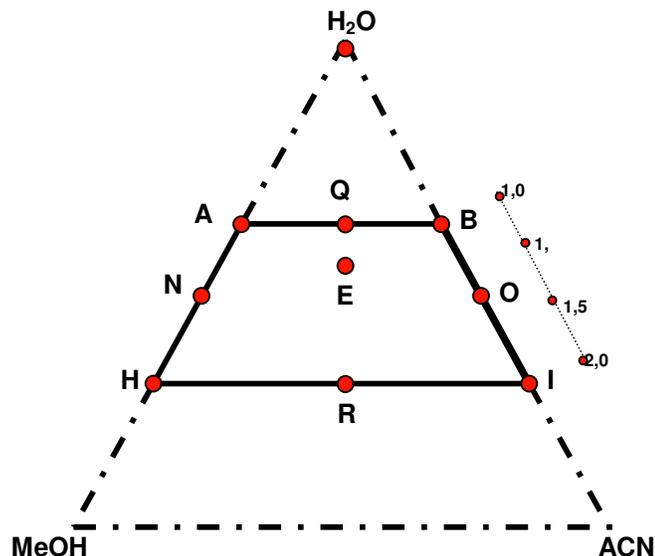
**Figura 9**-Triângulo de seletividade para solventes para cromatografia.

A preparação das diferentes fases móveis por um planejamento experimental de misturas, Figura 10, onde a força do solvente é expressa pela somatória do produto da força do solvente puro ( $S_i$ ) pela fração de volume ( $\phi_i$ ), como mostra a equação 13:

$$S = \sum S_i \phi_i \quad (13)$$

O índice de polaridade pode ser utilizado para calcular a força da fase móvel, onde os parâmetros usados para a CLAE de fase reversa são: água ( $S_i = 0$ ), metanol ( $S_i = 2,6$ ), acetonitrila ( $S_i = 3,1$ ).

Todas as fases móveis foram sonicadas por 20 minutos antes das análises, para desgaseificação, ou seja, eliminar os gases dissolvidos na fase móvel que poderiam causar instabilidade no detector.



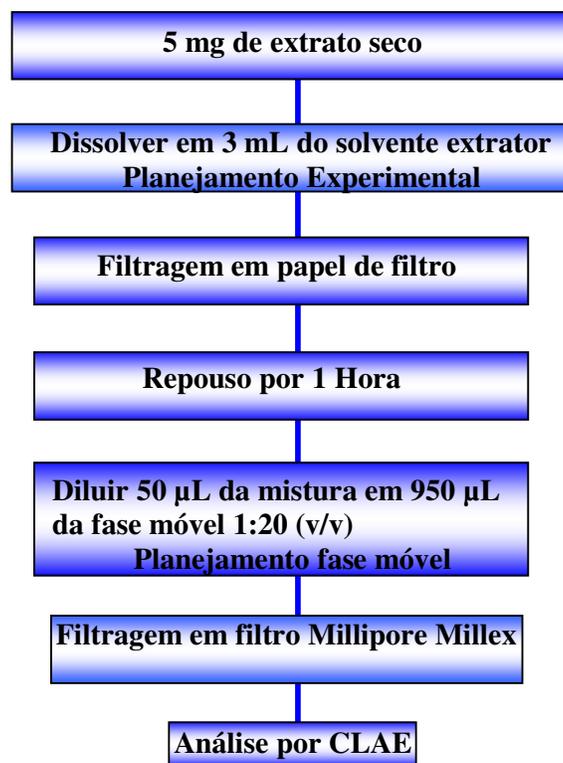
**Figura 10**-Triângulo dos solventes metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e água. A região estudada é determinada pelo trapézio cujos vértices estão marcados pelas letras A, N, H, Q, B, O, I, R.

### 3.9.2 Preparo das amostras para análise cromatográfica

As amostras para análise cromatográfica foram preparadas de acordo com a seqüência apresentada na Figura 11.

As amostras foram preparadas pesando-se 0,0050 g de cada extrato re-dissolvidos em 3,00 mL nas proporções dos solventes extratores conforme planejamento descrito na Figura 8. Após 1 hora, cada solução foi filtrada em papel de filtro. Deste filtrado foram tomadas alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  e diluídas com 950  $\mu\text{L}$  (1:20) das fases móveis conforme planejamento da Figura 10. As amostras diluídas foram filtradas mais duas vezes em filtro Milipore Millex de 0,22  $\mu\text{m}$ , colocadas em eppendorf e armazenadas em freezer até a leitura. A análise por CLAE foi realizada nas seguintes condições: temperatura do forno 50  $^{\circ}\text{C}$ , volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , vazão da fase móvel a 1  $\text{mL min}^{-1}$ , detecção monitorada no comprimento de onda de 210 nm, 220 nm

e 230 nm e tempo de análise de 30 min. O comprimento de onda usado no trabalho foi de 210 nm.



**Figura 11**-Seqüência do procedimento para o preparo das amostras para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

### **3.10 Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Para preparar as pastilhas foram pesados 0,0005 g de cada extrato e homogeneizados com 0,1500 g de KBr e algumas gotas de clorofórmio. Os espectros no

infravermelho foram registrados na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 1,93  $\text{cm}^{-1}$  e média de 40 leituras.

### **3.11 Análise por Espectrofotometria de absorção molecular no Ultravioleta-Visível (UV-VIS)**

Para a análise por espectrofotometria no UV-VIS, foram pesados 0,0050 g do extrato bruto e diluídos em 3 mL do solvente extrator de cada ponto do planejamento experimental da Figura 8. Após 1 hora estas misturas foram filtradas em papel de filtro. Deste filtrado foram tomadas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  e rediluídas com 2800  $\mu\text{L}$  do próprio solvente extrator (1:15 v/v). Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 200-890 nm.

### **3.12 Análise Exploratória dos Dados**

Para os processamentos dos dados dos cromatogramas obtidos por CLAE foram utilizados métodos quimiométricos de Análise das Componentes Principais (ACP) do tipo Q e Superfície de Resposta. O programa STATISTICA 6.0 foi utilizado para calcular os efeitos bem como para a modelagem das superfícies de resposta e o dendrograma. Os cálculos da ACP foram realizados usando o programa computacional desenvolvido pela professora Dra. Ieda Spacino Scarminio.



*Capítulo IV*  
*Resultados*  
*e*  
*Discussão*

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa deste trabalho foi avaliar o rendimento da massa extraída no processo de extração das folhas da *Bauhinia variegata* L. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2-**Composição dos extratos preparados com misturas diclorometano, etanol, acetona de acordo com o planejamento da Figura 8.

Extratos	Solventes			Rendimento (g)
	Diclorometano	Etanol	Acetona	
<b>1</b>	1	0	0	0,3243
<b>2</b>	0	1	0	0,3562
<b>3</b>	0	0	1	0,3580
<b>4</b>	1/2	1/2	0	0,4367
<b>5</b>	0	1/2	1/2	0,6204
<b>6</b>	1/2	0	1/2	0,2904
<b>7</b>	1/3	1/3	1/3	0,4566
<b>8</b>	2/3	1/6	1/6	0,3478
<b>9</b>	1/6	2/3	1/6	0,4719
<b>10</b>	1/6	1/6	2/3	0,4595

A fim de avaliar o efeito dos solventes no rendimento dos extratos apresentados na Tabela 2, foram testados diferentes modelos de misturas. Estes modelos permitem explorar os efeitos de várias variáveis simultaneamente e extrair o máximo de informação do sistema que está sendo investigado.

O primeiro modelo ajustado aos dados foi o modelo linear. Como este modelo apresentou falta de ajuste, o modelo quadrático foi ajustado aos dados. A equação polinomial de segunda ordem obtida para este modelo está apresentada na equação 15:

$$\hat{y} = + 0,321\mathbf{d} + 0,354\mathbf{e} + 0,366\mathbf{a} + 0,315\mathbf{de} - 0,25\mathbf{da} + 1,00\mathbf{ea}$$

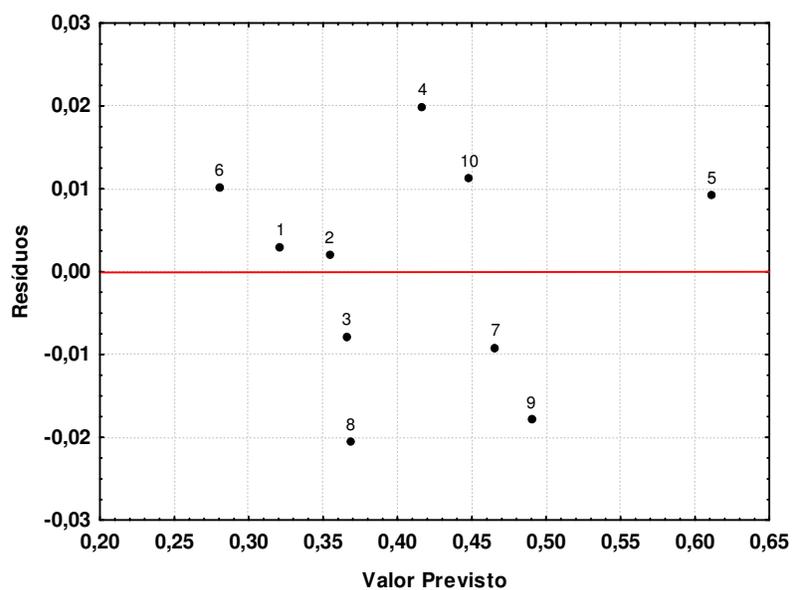
$(\pm 0,020)$        $(\pm 0,020)$        $(\pm 0,020)$        $(\pm 0,020)$        $(\pm 0,020)$        $(\pm 0,020)$

(15)

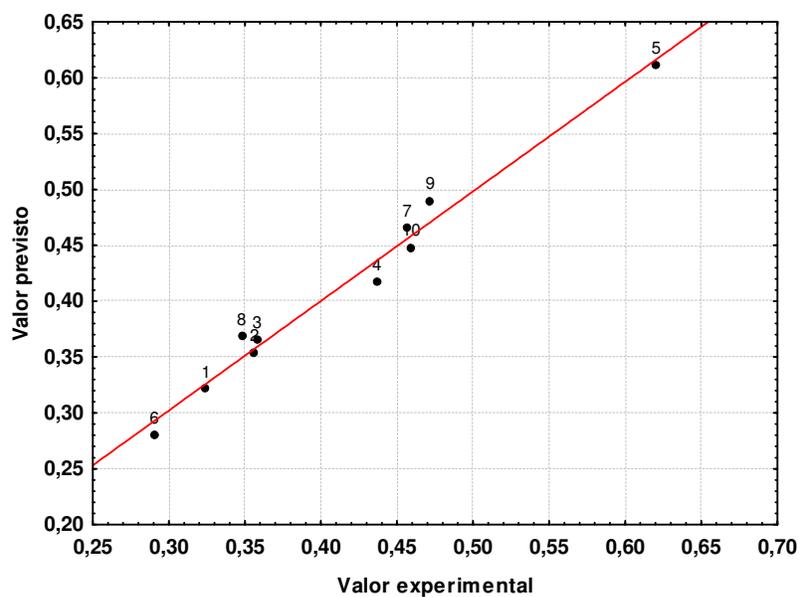
$\hat{y}$  é a resposta prevista pelo modelo, **d** = diclorometano, **e** = etanol e **a** = acetona. Os valores entre parênteses são os erros padrão dos parâmetros. Esta equação apresenta seis termos significativos representados em negrito. Analisando os coeficientes lineares pode-se concluir que eles não são muito diferentes, enquanto que os de interação indicam que há um efeito sinérgico maior entre etanol-acetona comparado ao diclorometano-etanol. A equação mostra também uma interação antagônica em relação diclorometano-acetona.

A Figura 12 mostra o gráfico dos resíduos *versus* respostas dos rendimentos previstas pelo modelo. A distribuição é aleatória, não revelando tendências. A Figura 13 mostra a qualidade do ajuste. Considerando a linearidade entre o valor previsto e o valor experimental foi construído a superfície de resposta para a otimização do rendimento. As maiores massas em gramas foram obtidas com a mistura binária etanol e acetona ou uma mistura ternária contendo um pouco de diclorometano.

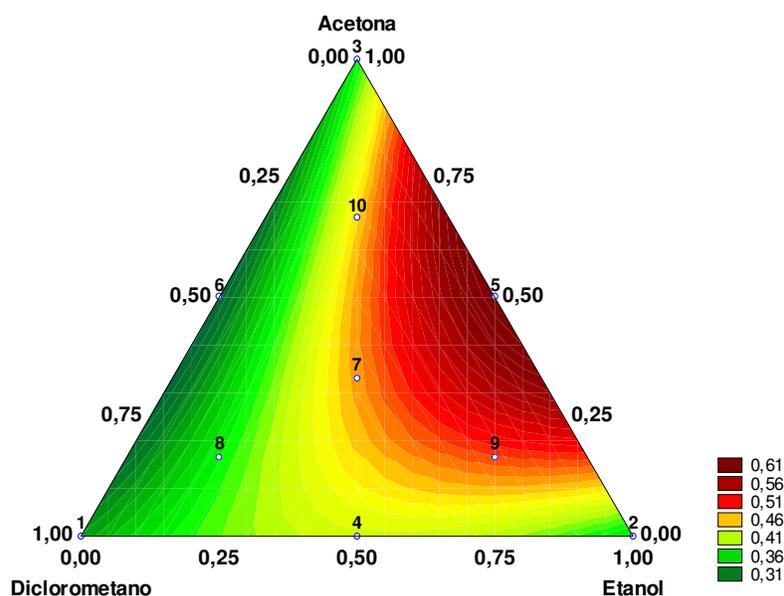
As curvas de nível para este modelo podem ser vistas na Figura 14. Pelo gráfico observa-se que a região de maior rendimento encontra-se localizada no vértice entre o etanol e a acetona, mostrando um rendimento máximo de 0,61g de extrato.



**Figura 12** – Resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático no estudo do rendimento de extratos da *Bauhinia variegata* L.



**Figura 13** – Respostas previstas pelo modelo quadrático no estudo do rendimento de extratos da *Bauhinia variegata* L.



**Figura 14**-Curvas de nível para o modelo quadrático ajustado para a escolha do melhor solvente extrator da *Bauhinia variegata* L.

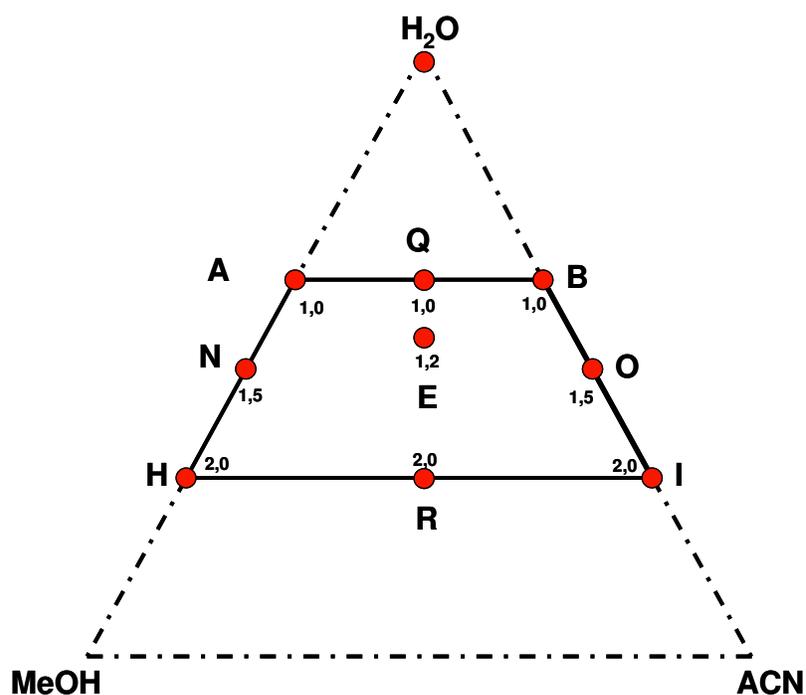
Uma das dificuldades na CLAE é encontrar a composição ótima da mistura de solventes da fase móvel para obter uma boa separação cromatográfica. A seleção das proporções apropriadas é tediosa e, além disso, consome tempo e reagente. Neste caso torna-se necessário um processo de otimização. A escolha da fase móvel é governada principalmente por duas considerações: manter o fator de retenção ( $k$ ) dentro de uma variação ótima e que todos os picos adjacentes tenham fator de separação ( $\alpha$ ) adequados. Neste trabalho não foi incluído qualquer função relacionada com a seletividade ou retenção.

A segunda etapa teve como objetivo comparar, por meio de um planejamento experimental de misturas, à influência da composição do meio extrator bem como da fase móvel, a fim de obter um perfil cromatográfico bem informativo (impressão digital). Considerando a falta de padrão para análise de material vegetal, bem

como o não fracionamento dos extratos, a resposta utilizada foi o número de picos, ou seja, uma impressão digital informativa será aquela que apresentar o maior número de picos. Em se tratando de uma cromatografia em fase reversa, a água foi utilizada em todas as fases móveis. Para testar a interação da força e polaridade no parâmetro de seletividade, foram usados como modificadores orgânicos o metanol e/ou a acetonitrila. As proporções calculadas para cada modificador em relação à água foram feitas de forma que houvesse um aumento gradativo na força do solvente e uma diminuição na polaridade.

O planejamento experimental de misturas está apresentado na Figura 15, representa a forma generalizada da seletividade da fase móvel para as diferentes composições de forças cromatográficas. A Tabela 3 apresenta as composições, as forças e polaridades das fases móveis utilizadas na análise dos extratos da *Bauhinia variegata* L.

As fases binárias (**A, N, H**) e (**B, O, I**) e as fases ternárias (**Q, E, R**) são de forças diferentes ditas fases não isoelutrópicas, Figura 15, enquanto que, no sentido horizontal do triângulo, como a seqüência **A, Q** e **B e H, R e I**, as fases são de mesma força, ditas fases isoelutrópicas.

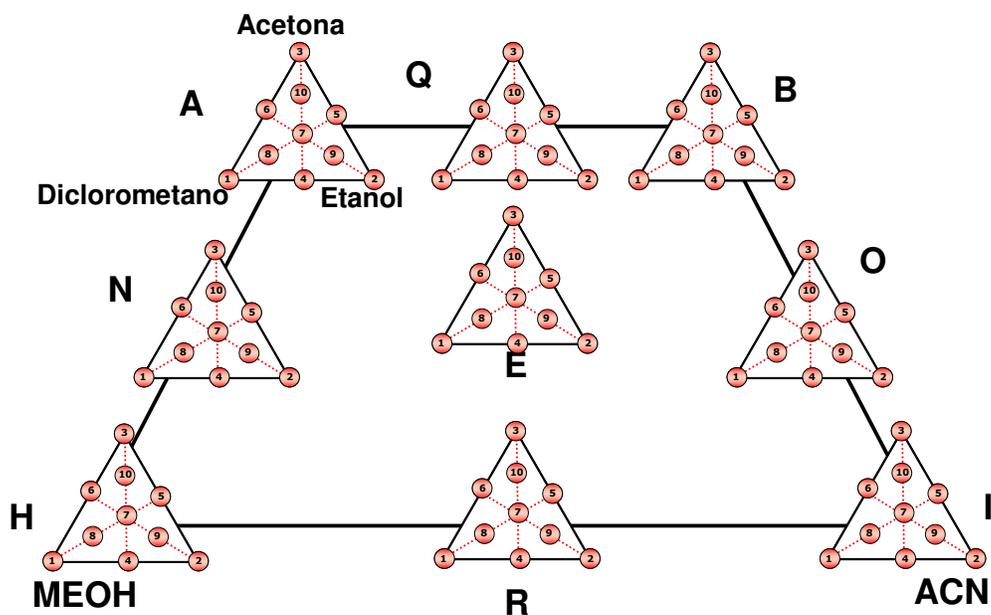


**Figura 15** - Planejamento das fases móveis. A região estudada é determinada pelo trapézio cujos vértices estão marcados pelas letras A, N, H, Q, B, O, I, R.

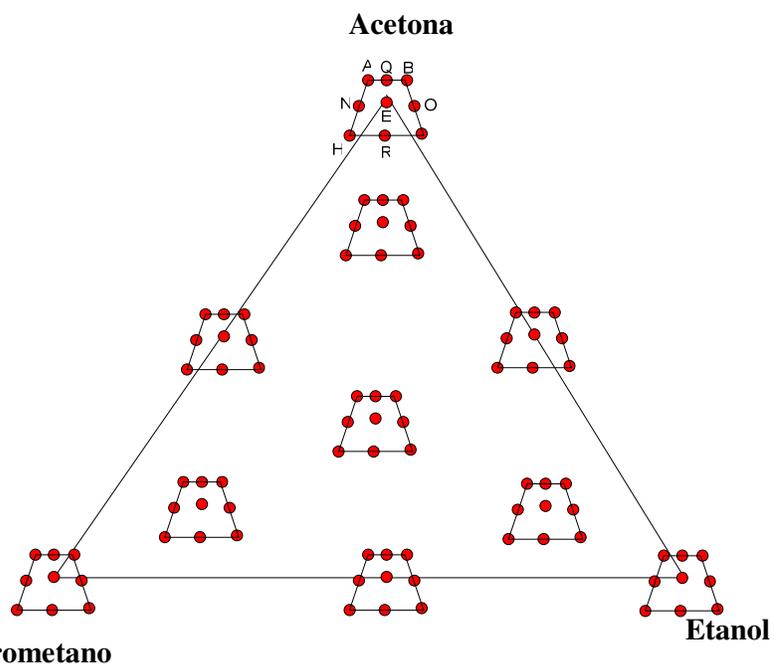
Para a análise cromatográfica dos extratos, os dois planejamentos da Figura 8 (planejamento para a extração) e da Figura 10 (planejamento da fase móvel), foram agrupados levando a uma combinação de 90 diferentes cromatogramas, como mostra a Figura 16. Este planejamento pode ser visto de duas formas: um planejamento onde se estuda a influência de cada fase móvel em diversos extratores, Figura 16, ou a variação do perfil cromatográfico de cada extrato nas nove fases móveis, Figura 17.

**Tabela 3-**Planejamento para o preparo das fases móveis para análise dos extratos da *Bauhinia variegata* L.

Ensaio	H <sub>2</sub> O	MeOH	ACN	Força do solvente
A	0,615	0,385	0	1,0
Q	0,650	0,175	0,175	1,0
B	0,680	0	0,320	1,0
E	0,580	0,160	0,260	1,2
N	0,420	0,580	0	1,5
O	0,520	0	0,480	1,5
H	0,230	0,770	0	2,0
R	0,300	0,350	0,350	2,0
I	0,355	0	0,645	2,0

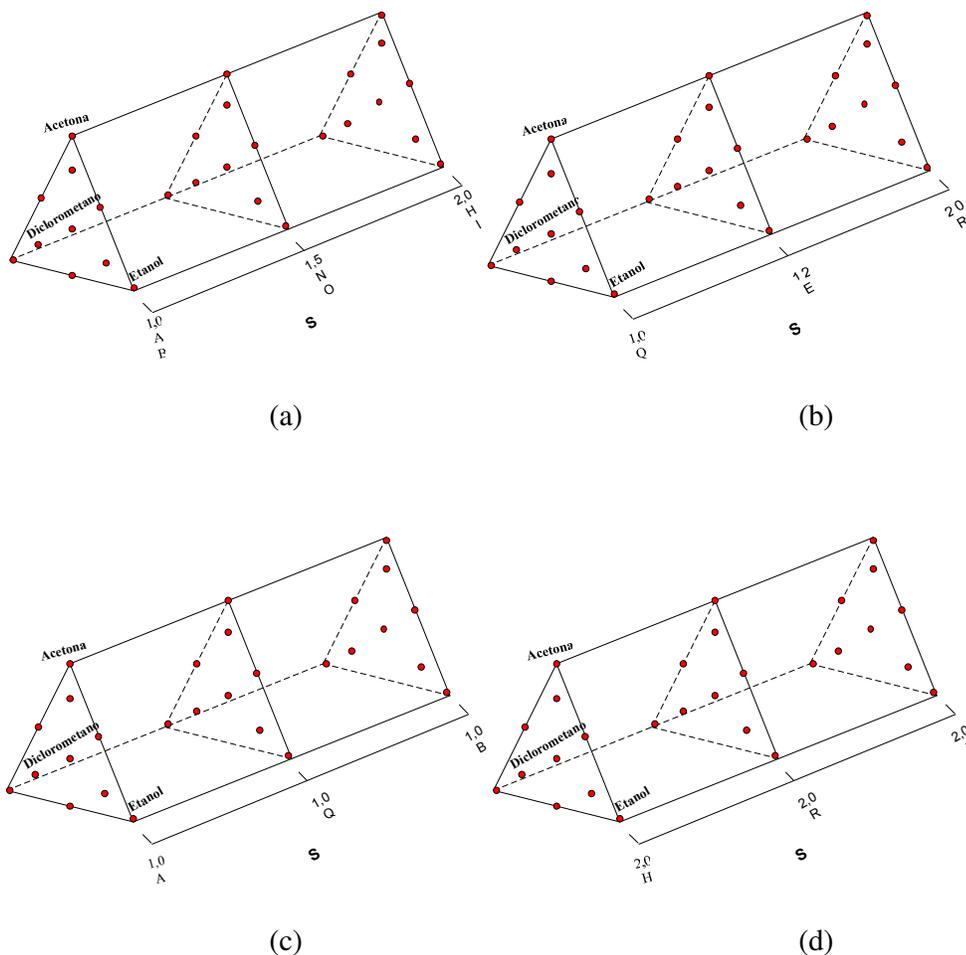


**Figura 16-**Planejamento para as fases móveis A, Q, B, N, E, O, H, R e I combinadas com o planejamento experimental do tipo Centróide Simplex dos extratos.



**Figura 17**-Planejamento experimental do tipo Centr3ide Simplex dos extratos com as fases m3veis **A, Q, B, N, E, O, H, R e I**.

O planejamento da Figura 16 3 formado por quatro prismas de solventes do sistema extrator, Figura 18, em diferentes compos3es de fases m3veis. Na dire3o das fases bin3rias **A, N, H** e **B, O, I**, Figura 16, em qualquer ponto de um dos tri3ngulos do meio extrator, representa uma 3nica compos3o da fase m3vel com for3as cromatogr3ficas 1,0, 1,5 e 2,0, respectivamente, Figura 18a. Na dire3o **Q, E, R**, o prisma dos solventes 3 analisado por tr3s fases tern3rias de for3as 1,0, 1,2 e 2,0, respectivamente, Figura 18b. Quando se olha na horizontal 3s for3as s3o constantes, **A, Q, B** for3a 1,0, Figura 18c e **H, R, I**, for3a 2,0, Figura 18d.



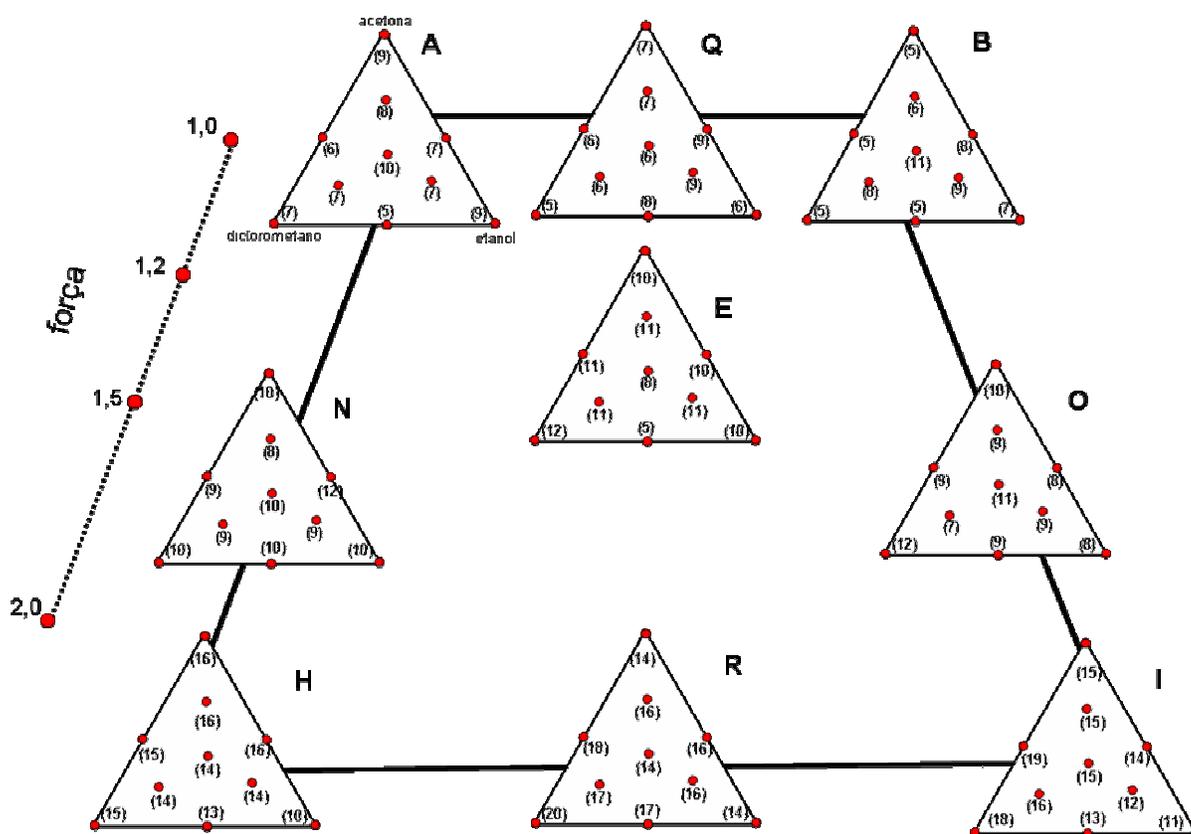
**Figura 18**-Prisma do meio extrator: (a) e (b) nas séries não isoeutrópicas (c) e (d) nas séries isoeutrópicas.

A Figura 19 mostra o resultado da análise cromatográfica usando o planejamento da Figura 16.

Observa-se que o aumento da força da fase móvel aumenta o número de picos. Este aumento não tem relação com o rendimento dos extratos, já que os dados da Tabela 3, mostram que o maior rendimento obtido é do extrato **5**, mistura

binária etanol e acetona, enquanto que o maior número de picos encontrado foi com o extrato **1**, preparado com diclorometano puro na fase **R**.

As fases que apresentaram maiores números de picos foram às fases **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v), **I** ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v) e **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v), portanto, somente estas fases foram investigadas nas modelagens.



**Figura 19**-Números de picos para cada amostra em seu meio extrator eluídas nas diferentes fases móveis.

Para avaliar a influência da fase móvel na melhor separação das substâncias químicas dos diferentes extratos obtidos através do planejamento experimental, iniciou-se a modelagem com o triângulo da fase móvel **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v), da Figura 19. Os experimentos foram feitos em duplicatas, e o ponto central em quadruplicata. A resposta utilizada por razões já explicadas foi o número de picos. O modelo linear foi ajustado ao número de picos cromatográficos. A análise de variância mostrou que o modelo linear é insatisfatório, sendo assim, o modelo quadrático foi ajustado aos dados. A equação polinomial para este modelo, ignorando os efeitos não significativos é:

$$\hat{Y} = +15,07\mathbf{d} + 10,30\mathbf{e} + 16,83\mathbf{a} - 4,91\mathbf{da} + 9,55\mathbf{ea}$$

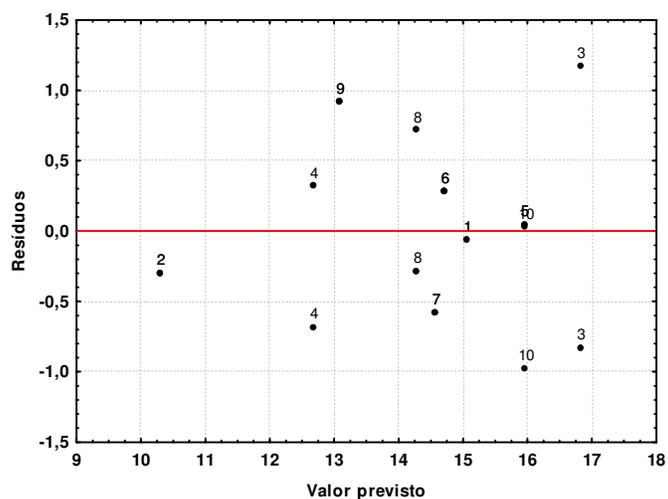
$(\pm 0,41)$      $(\pm 0,41)$      $(\pm 0,46)$      $(\pm 2,12)$      $(\pm 2,12)$

(16)

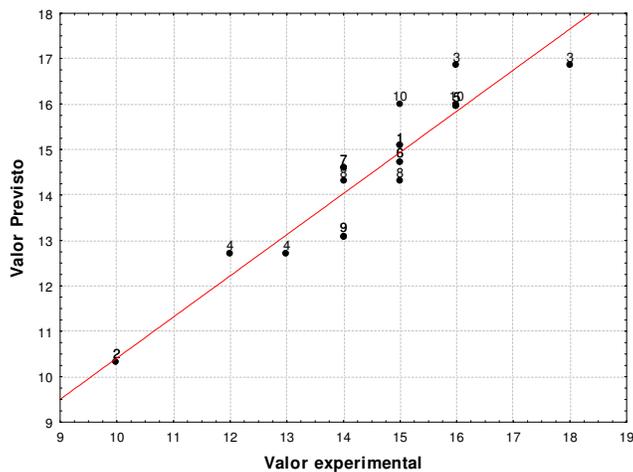
O modelo indica a existência de cinco termos significativos, ou seja, que possuem coeficientes com valores mais altos em relação ao erro padrão, são eles os termos que contém acetona (**a**), diclorometano (**d**) e etanol (**e**). Esta equação mostra que a composição do extrator deve conter maior quantidade de acetona seguida por diclorometano e com menor quantidade de etanol. No entanto, ocorreu um efeito sinérgico entre os solventes etanol e acetona, e antagônico entre diclorometano e acetona.

Para que se possa assegurar que o modelo é representativo, é essencial que se avalie a análise de variância e o gráfico dos resíduos. No nível de 95% de confiança o modelo é significativo, sem falta de ajuste. A Figura 20 mostra que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente, garantido que não possui nenhuma tendência nos resultados.

A Figura 21 mostra a linearidade entre o valor experimental pelo previsto. Considerando que não há tendência nos resíduos, foi construída a superfície de resposta usando a equação 16.

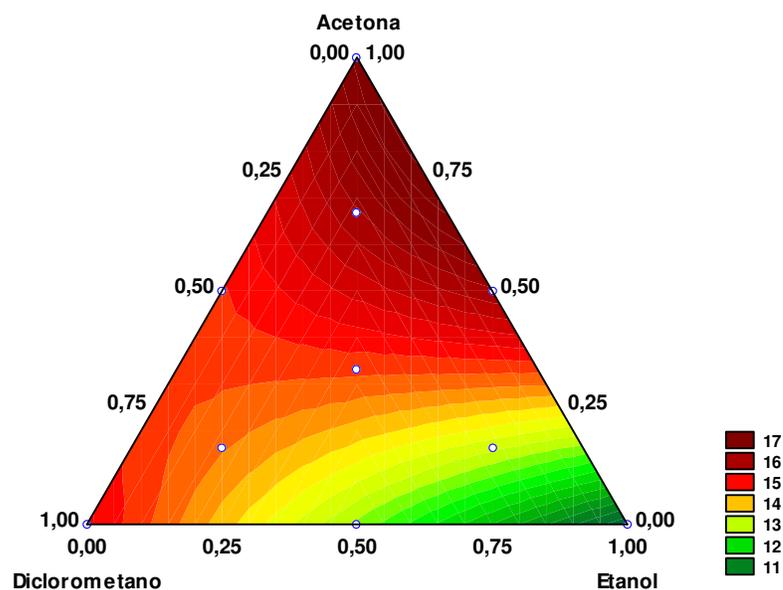


**Figura 20**—Resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático aos valores de números de picos na fase H MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v).



**Figura 21**—Respostas previstas pelo modelo quadrático na fase H MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v).

A Figura 22 apresenta as curvas de nível para este modelo. Observa-se que o maior número de picos é encontrado na mistura 75% de acetona e 25% de etanol (v/v).



**Figura 22**–Curvas de nível avaliando o efeito dos solventes extratores descritos na Tabela 2 e eluídos na fase **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v).

O mesmo procedimento foi usado para avaliar a fase **I** ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v), com todos os pontos feitos em duplicatas e o ponto central em quadruplicata.

Nesta fase o modelo linear foi ajustado à resposta de número de picos, porém, não foi o modelo usado, devido ao baixo coeficiente de correlação,  $R=0,8534$ , mostrando-se insatisfatório. O modelo usado foi o quadrático com o coeficiente de

correlação igual a 0,9718, que segue representado pela seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$\hat{y} = +18,01\mathbf{d} + 11,02\mathbf{e} + 14,93\mathbf{a} - 7,75\mathbf{ed} + 8,06\mathbf{da} + 2,08\mathbf{ea}$$

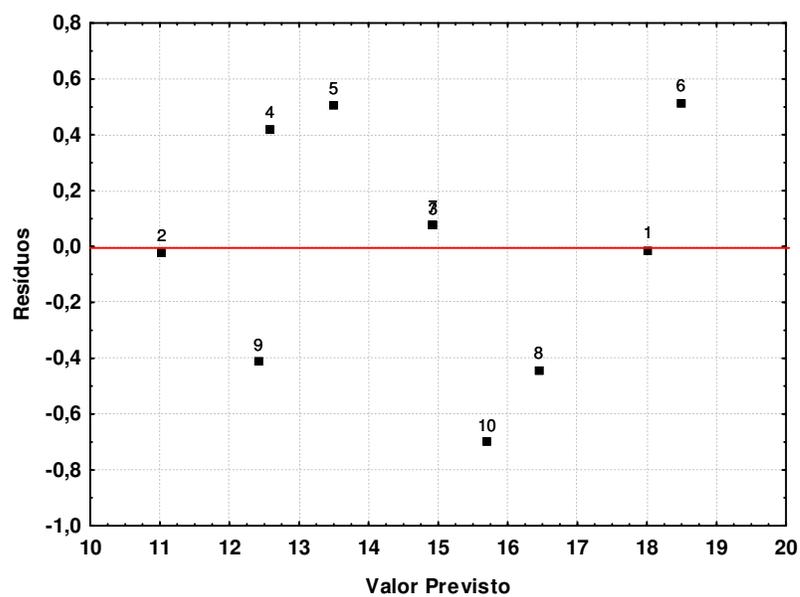
(±0,32) (±0,32) (±0,32) (±1,49) (±1,49) (±1,49)

(17)

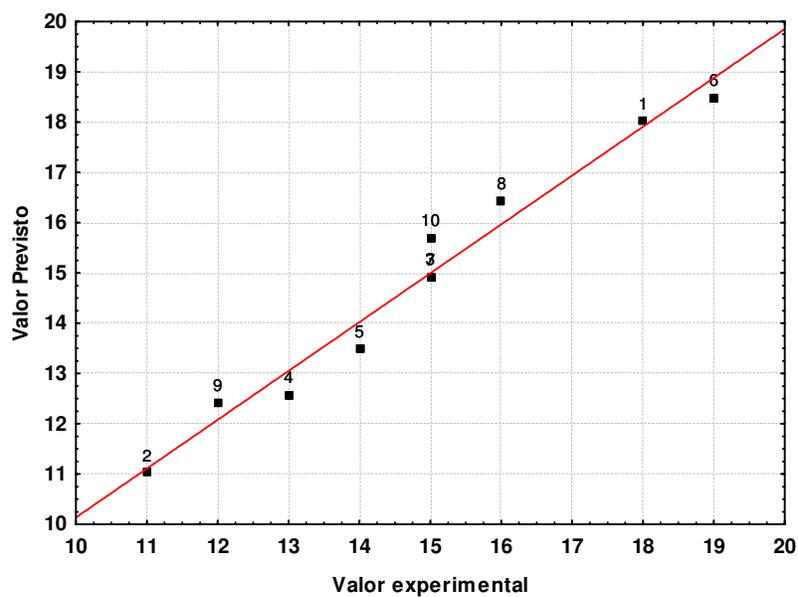
Conforme a equação 17, o modelo mostra que o diclorometano (**d**), o etanol (**e**) e a acetona (**a**) tiveram altos coeficientes em relação ao erro padrão, classificando-os como significativo. Neste caso, ao contrário da fase **H**, ocorreu um efeito sinérgico entre o diclorometano e acetona, que faz aumentar o número de picos nesta fase **I**.

O modelo se confirma, já que o gráfico dos resíduos não possui nenhuma tendência, Figura 23, e o modelo não apresentou falta de ajuste no nível de 95% de confiança. O gráfico do valor observado pelo previsto está representado na Figura 24.

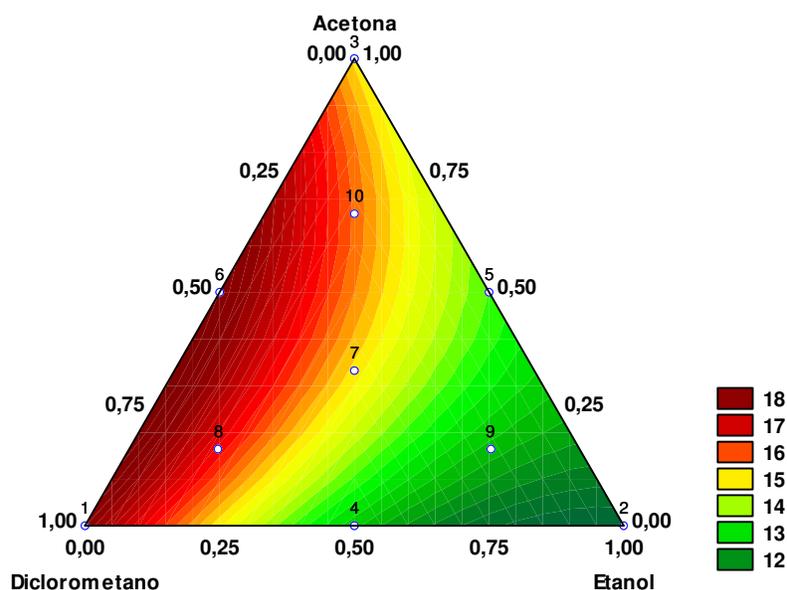
As curvas de nível para este modelo podem ser vista na Figura 25. Observa-se que o maior número de picos é encontrado na região da mistura de acetona-diclorometano, fornecendo um máximo de 18 picos em torno de 65% de diclorometano e 35% de acetona. A mistura também pode conter uma pequena fração de etanol.



**Figura 23**–Resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático aos valores de números de picos na fase I ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v).



**Figura 24**–Respostas previstas pelo modelo quadrático na fase I ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v).



**Figura 25**-Curvas de nível para o planejamento da fase I (ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v).

Para a fase **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v) os modelos linear e quadrático apresentaram falta de ajuste, sendo assim o modelo cúbico especial foi ajustado aos dados. A equação simplificada ignorando os efeitos de interação do diclorometano-etanol e diclorometano-acetona está apresentada na equação 18:

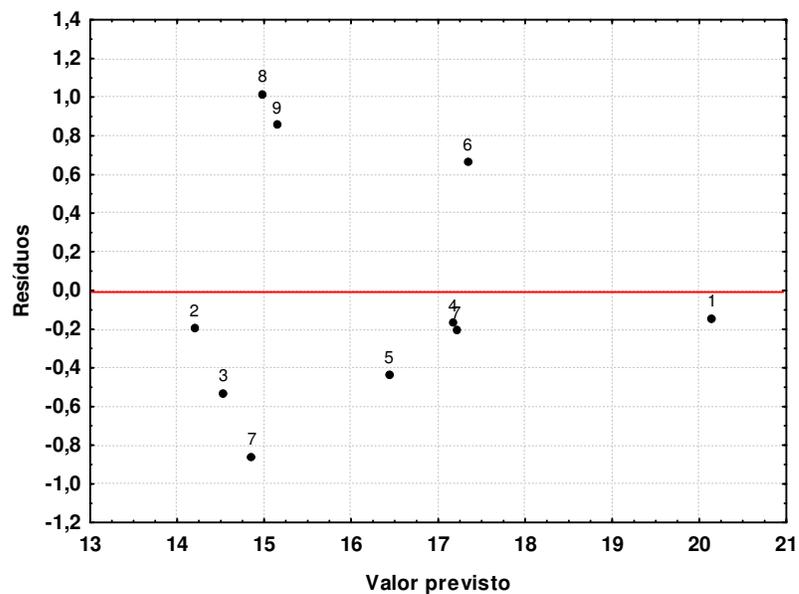
$$\hat{y} = + 20,1435d + 14,19e + 14,53a + 8,29ea - 63,51dea$$

$(\pm 0,67)$        $(\pm 0,73)$        $(\pm 0,73)$        $(\pm 3,99)$        $(\pm 22,67)$

(18)

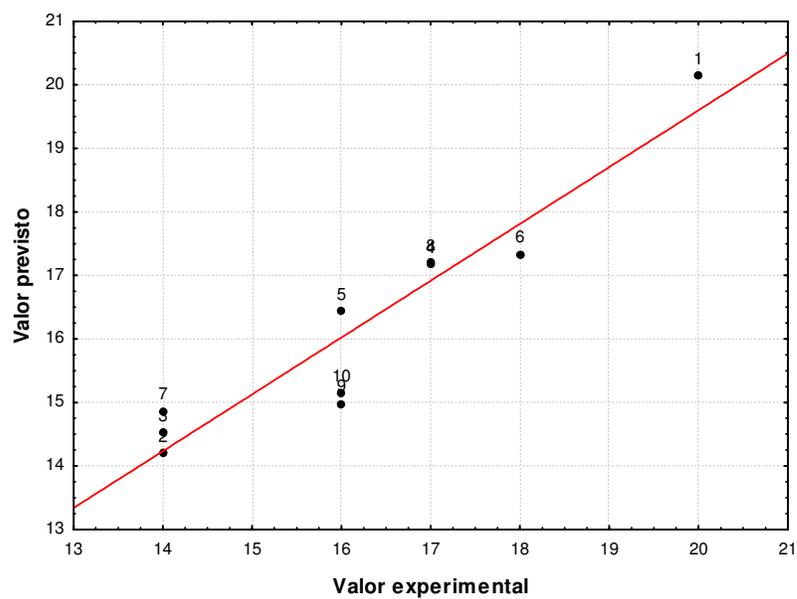
Esta equação indica quatro termos significativos, sendo o termo linear do diclorometano maior que do etanol e acetona. Há uma interação sinérgica entre etanol e acetona e um antagônico entre os três, diclorometano, etanol e acetona.

O gráfico dos resíduos da Figura 26 não mostra tendências nos resultados.



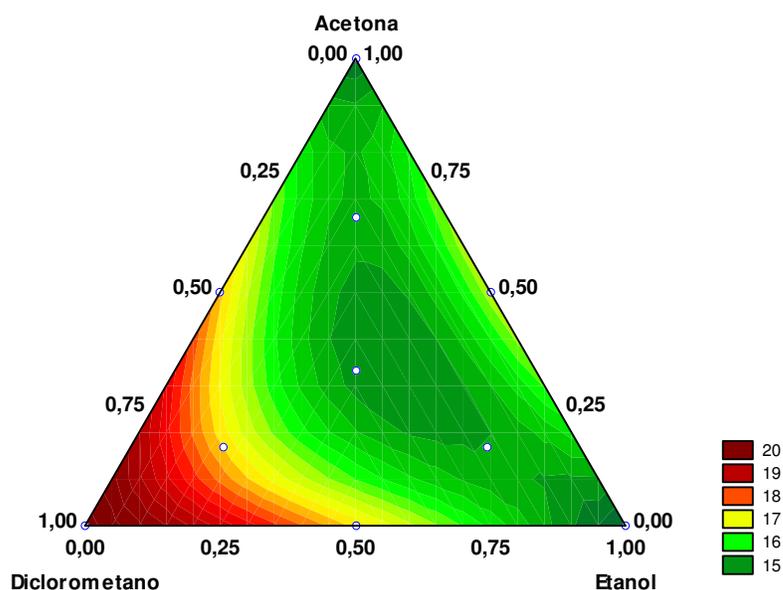
**Figura 26**–Resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial aos valores de números de picos na **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v).

A Figura 27 mostra o gráfico do valor experimental e o valor previsto pelo modelo. A Figura 28 apresenta as curvas de nível para este modelo. O extrato preparado em diclorometano foi o que apresentou maior número de picos na fase **R**. Pela superfície é possível ver também que a mesma resposta pode ser obtida com diclorometano puro, ou uma mistura de no mínimo 90% de diclorometano.



**Figura 27**-Respostas previstas pelo modelo quadrático na fase **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v).

As respostas apresentadas pelas fases isoeuotrópicas **H**, **R** e **I** mostram um perfil cromatográfico dos extratos muito diferente, o que leva a concluir que mudando o modificador orgânico mudará o perfil cromatográfico, ou seja, mesmo que as fases tenham a mesma força, sua interação com soluto muda a impressão digital da planta. Isto pode ser devido ao caráter ácido, básico ou interações de dipolo-dipolo entre a composição dos diferentes extratos, fase móvel e fase estacionária.



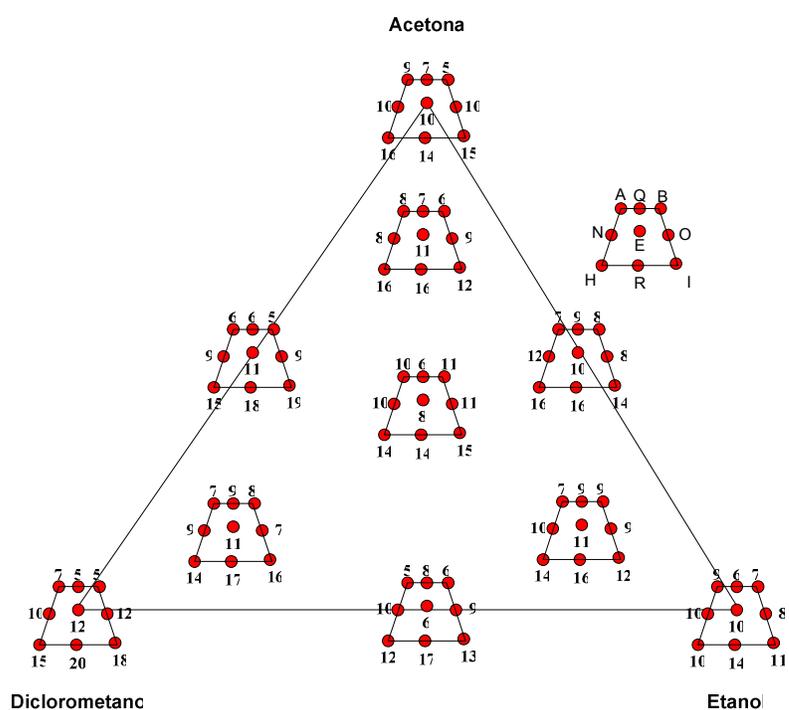
**Figura 28**-Curvas de nível para o planejamento da fase **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v).

Como se trata de uma amostra complexa e desconhecida, pouco se sabe sobre suas propriedades químicas, por isto, a importância do planejamento estatístico, não só envolvendo a fase móvel, mas seus diferentes extratores.

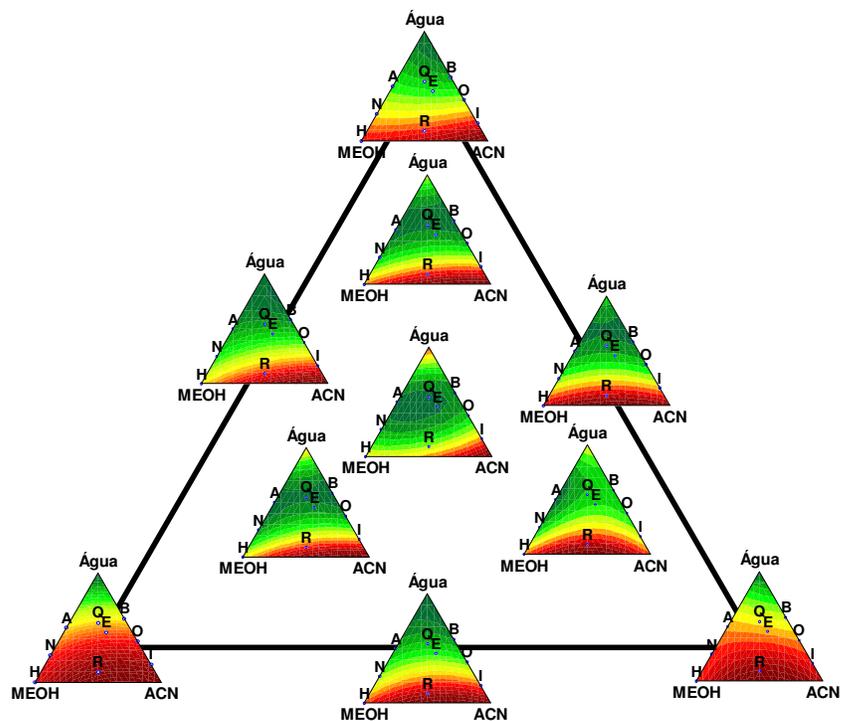
A Figura 29 mostra a variação do número de picos do cromatograma em cada extrato nas nove fases móveis. A Figura 30 mostra as curvas de nível de cada extrato do planejamento, usando como resposta o número de picos nas nove fases. Com estas figuras é possível ter uma visão mais ampla do que já foi discutido. Observa-se na Figura 30 que os cromatogramas mais informativos (com mais picos, região de cor vermelha nas curvas de nível), foram eluídos nas fases de força cromatográfica 2,0 (**H**, **R**, **I**), e que para o mesmo extrato estas fases móveis trazem informações diferentes na impressão digital cromatográfica.

Para investigar possíveis discriminações na composição química dos diferentes extratos, nas diferentes fases móveis, os cromatogramas digitalizados foram colocados

na forma de matriz  $99 \times 2813$ , sendo nove fases móveis, cada uma testada com os 10 extratos, mais uma duplicata no ponto central, totalizando 99 cromatogramas em 2813 valores de altura do pico (mAbs) nos diferentes tempos, em minutos. Estes dados foram submetidos à ACP do tipo Q e análise hierárquica (AH).



**Figura 29-**Resultado do número de picos de cada extrato nas fases A, Q, B, N, E, O, H, R, I.



**Figura 30**-Curvas de nível dos extratos de **1 a 10** descritos na Figura 8 eluídos nas fases **A, Q, B, N, E, O, H, R, I**.

Nesta ACP foram necessárias oito componentes principais para explicar 99% da variância total dos dados. A Figura 31 mostra o gráfico dos escores das componentes principais CP6 e CP7 que juntas explicam 7,21% da variância total.

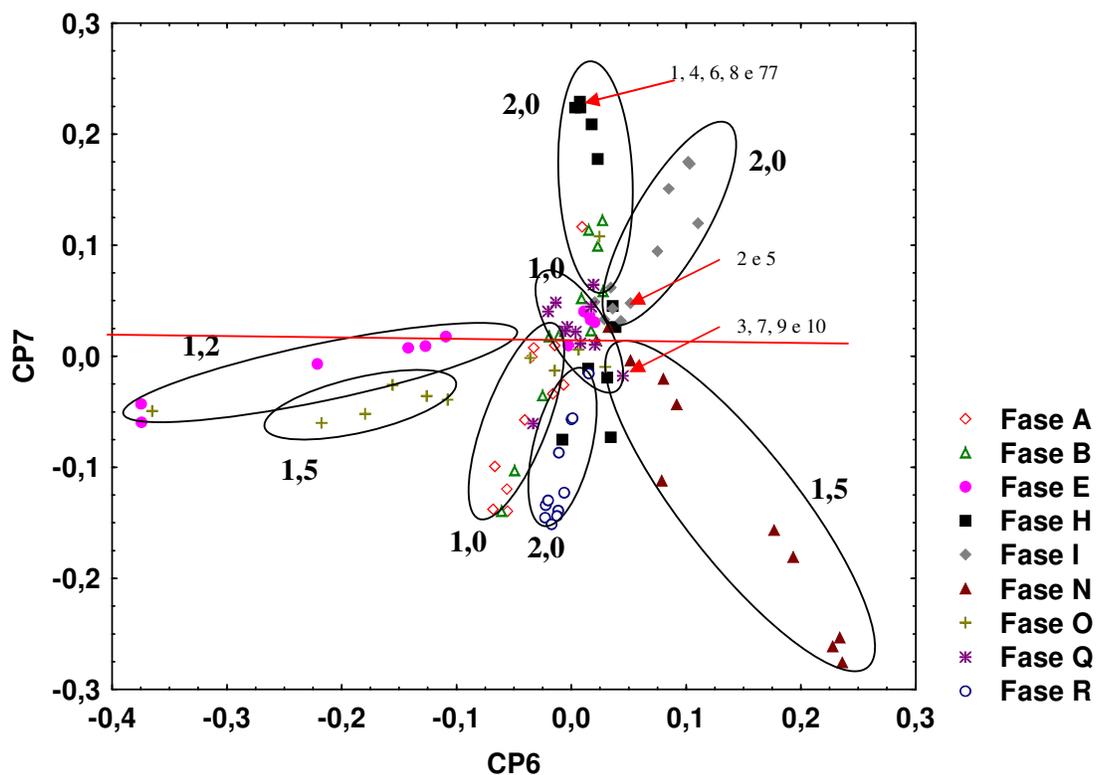
Neste gráfico é possível observar a formação de oito grupos. No quadrante negativo da CP7 encontram-se a maioria dos extratos eluídos nas fases **A, B, R, N e O**.

A Figura 32 mostra o gráfico dos loadings da CP6×CP7. Esta Figura na forma de uma

“estrela” mostra que os picos responsáveis para esta discriminação estão em torno de 2,8; 3,3; 3,4; 3,6; 4,3; 4,8 e 7,6 minutos. A Figura 33 mostra os loadings da CP6 e CP7 em função do tempo. Os loadings desta Figura confirmam que os picos responsáveis pela discriminação dos extratos nas diferentes fases estão em torno dos valores de tempo acima citados. Esta Figura mostra ainda que os extratos nas fases **A**, **B**, **R**, **N**, **E** e **O** na CP7, são discriminadas por apresentarem maiores sinais nos tempos de 2,21; 3,4; 4,3 e 7,6 minutos, e baixos valores em 2,8; 3,3 e 3,6 em relação aqueles das fases **H**, **Q** e **I** localizadas no quadrante positivo na CP7.

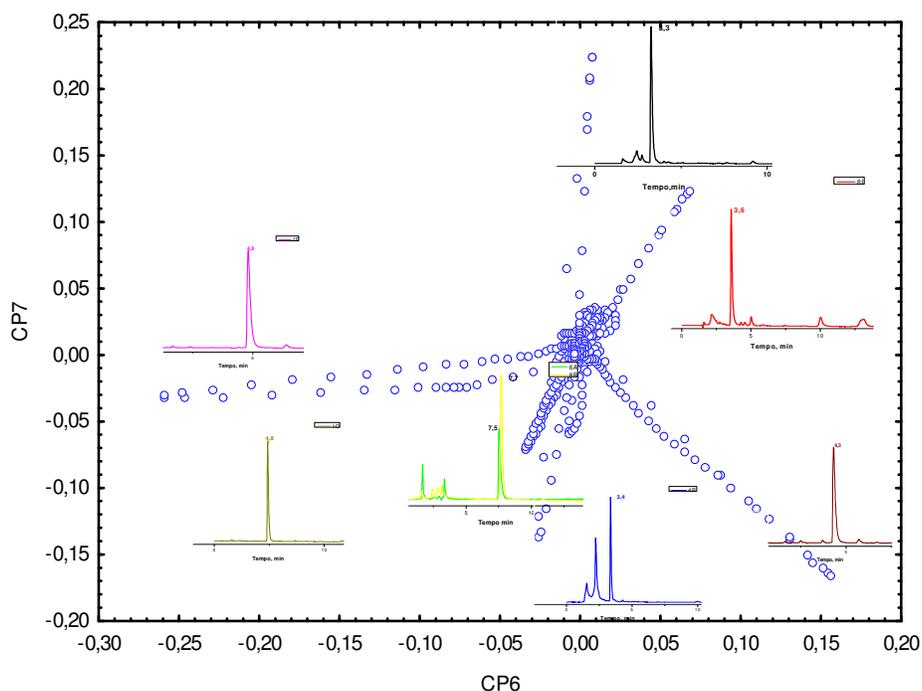
Na CP6 da Figura 31 há duas informações importantes com relação à fase **N**, localizada na região positiva e a fase **E** localizada na região negativa da CP6. Com o auxílio da Figura 33 verifica-se que as amostras da fase **N** são diferenciadas pela substância química que apresenta tempo de retenção de 4,3 minutos, enquanto que a fase **E** é discriminada pela substância química com tempo de retenção de 4,83 minutos.

Para mostrar os picos que levou a discriminação das fases, foi escolhido um cromatograma de cada extremidade mostrado na Figura 34. Esta Figura, contendo os cromatogramas, confirma os resultados obtidos pela análise de componentes principais.



**Figura 31**-Gráfico dos escores da CP6 × CP7 para os extratos **1** a **10** descritos na Figura 8 Fase **A** MeOH:H<sub>2</sub>O (38,5:61,5), **Q** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (17,5:17,5:65), **B** ACN:H<sub>2</sub>O (32:68), **N** MeOH:H<sub>2</sub>O (58:42), **E** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (16:26:58), **O** ACN:H<sub>2</sub>O (48:52), **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23), **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30)e **I** ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5) em v/v.





**Figura 34**-Cromatogramas dos extratos localizados nas extremidades dos grupos formados na Figura 31 realizadas nas condições cromatográficas descritas no item 3.9.2.

As amostras da fase **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v) estão situadas nos dois quadrantes da CP7, supostamente por haver uma diferença na composição dos extratos.

Para atestar esta hipótese, a fase **H** foi analisada separadamente em uma matriz de dimensão 11x 2100 (11 amostras e 2100 valores de tempo em min). Seis componentes juntos explicam 99,29% da variância original dos dados.

A Figura 35 mostra os escores da CP2 com CP4 que juntos explicam 30,46 % da variância total dos dados. Neste gráfico é possível verificar que os extratos (**1, 4, 6 e 8**) formam um grupo localizados no quadrante negativo da CP2, estes extratos são os mesmos que ficaram separados na CP7 mostrados na Figura 31.

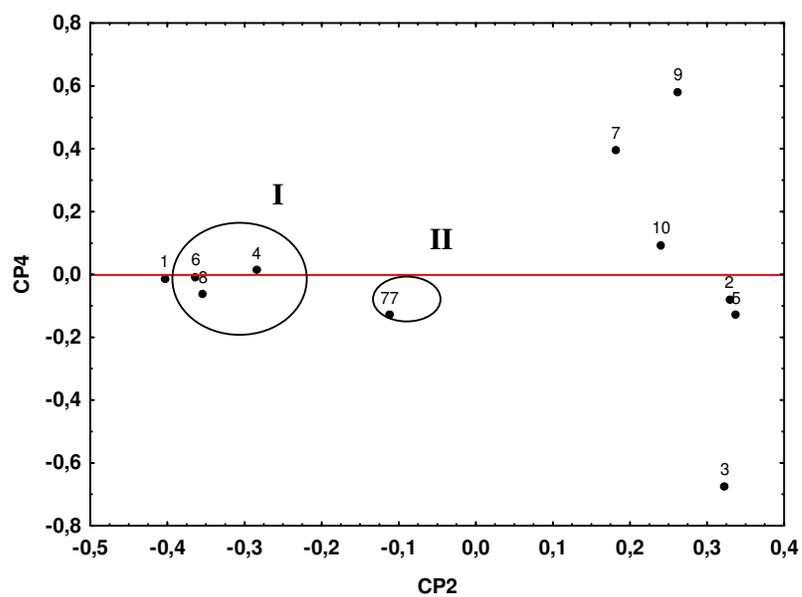
Pela CP2 negativa é possível discriminar os extratos do grupo I e II dos demais, já que o gráfico dos loadings, Figura 36, mostra que o tempo que discrimina este grupo é de 3,26, (único loading negativo).

No quadrante negativo da CP4 encontram-se os extratos **2, 5, 3, 77 e 8** com influência das substâncias que apresentam tempos de eluição 2,29; 2,73; 4,27; 7,69; 9,20 e 17,96 minutos como mostra o gráfico dos loadings negativos da Figura 36. Pelos cromatogramas, Figura 37, e o auxílio da Figura 36, pode-se inferir que os tempos de 2,29; 4,27; 7,69; 9,20 e 17,96 minutos são os responsáveis para diferenciar o extrato **3** dos extratos **5, 77 e 8**. Com esta análise conclui-se que o extrato **3** tem um perfil diferente dos demais extratos eluídos na fase **H**.

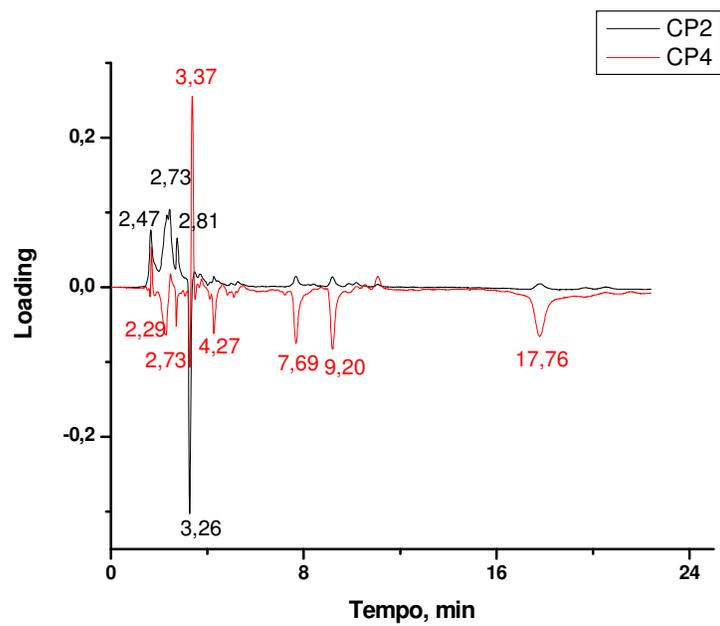
Para confirmar estes agrupamentos foi utilizada a análise hierárquica. Pela distância Euclidiana como medida de similaridade na distância de conexão 0,6 é possível verificar o grupo formado pelos extratos **1, 4, 6 e 8**, Figura 38.

Para analisar as características de cada cromatograma, foram obtidos todos os espectros de cada pico do cromatograma. A Figura 39 mostra os espectros normalizados de cada extrato obtidos na fase **H**.

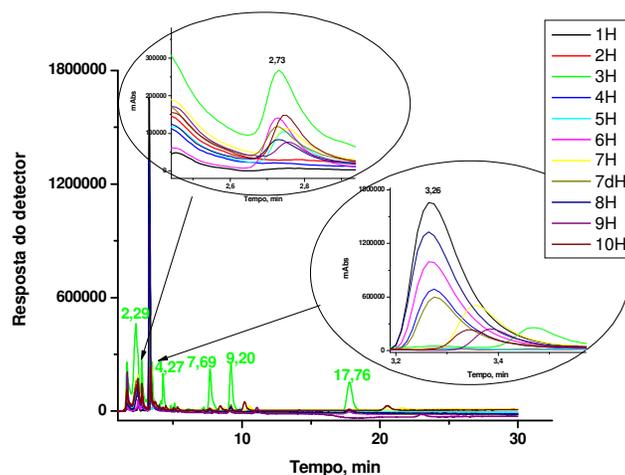
Observa-se por esta Figura que os extratos que contêm acetona (lado direito do triângulo) apresentam três substâncias não extraídas nos outros meios. Estes espectros mostram porque os extratos **1, 4, 6 e 8** são discriminados dos demais, confirmando o resultado da análise hierárquica e análise de componentes principais.



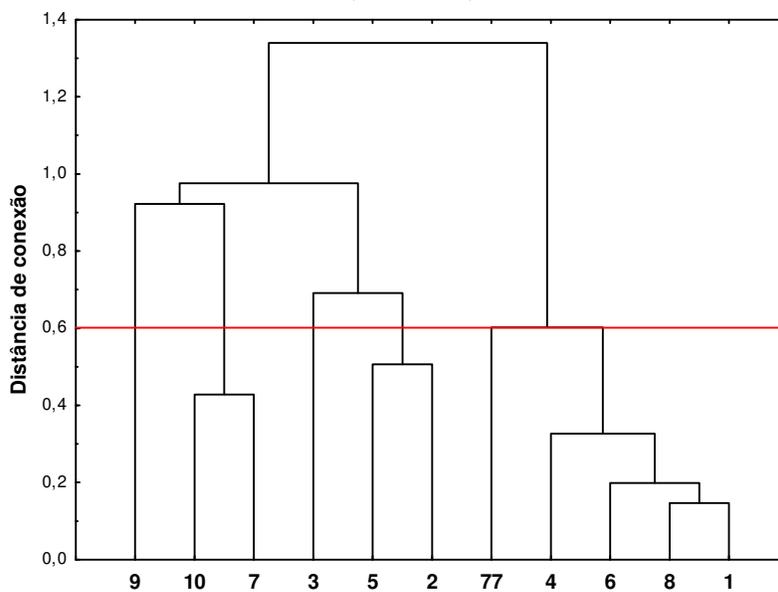
**Figura 35-**Gráfico dos escores CP2×CP4 para os extratos **1** a **10** descritos na Figura 8 eluídos na fase **H**.



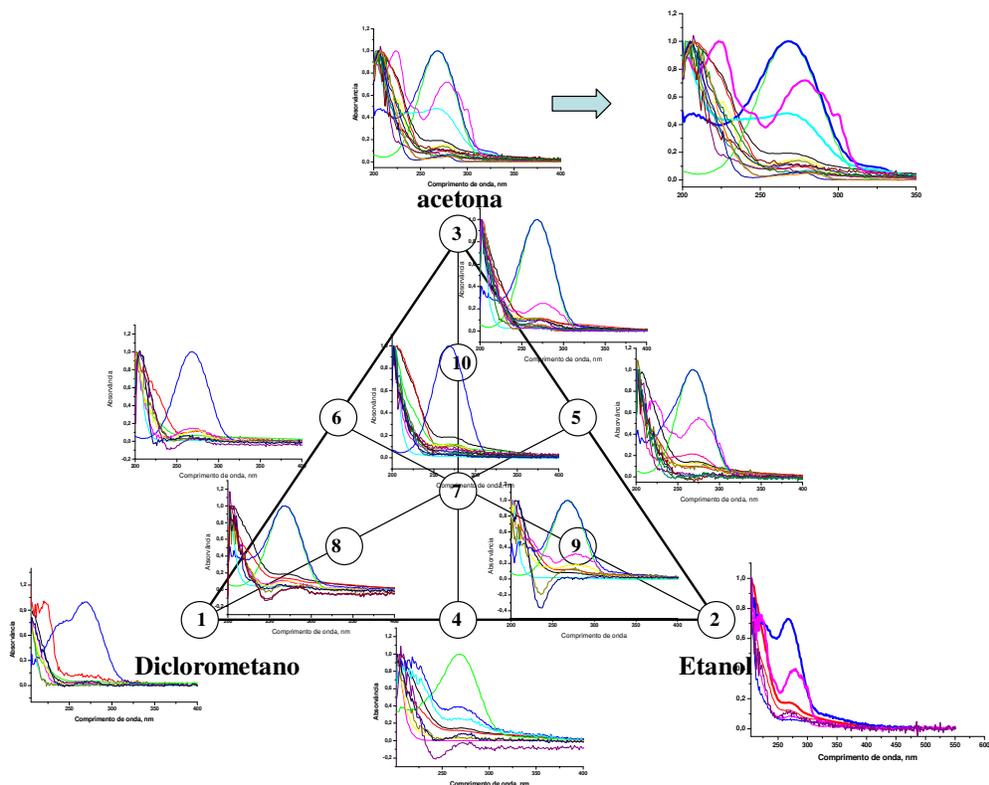
**Figura 36-**Gráfico dos loadings CP2 com CP4 para os extratos **1** a **10** descritos na Figura 8 eluídos na fase **H**.



**Figura 37**–Gráfico dos cromatogramas dos extratos **1** a **10** descritos no planejamento da Figura 8 eluídos na fase **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v).

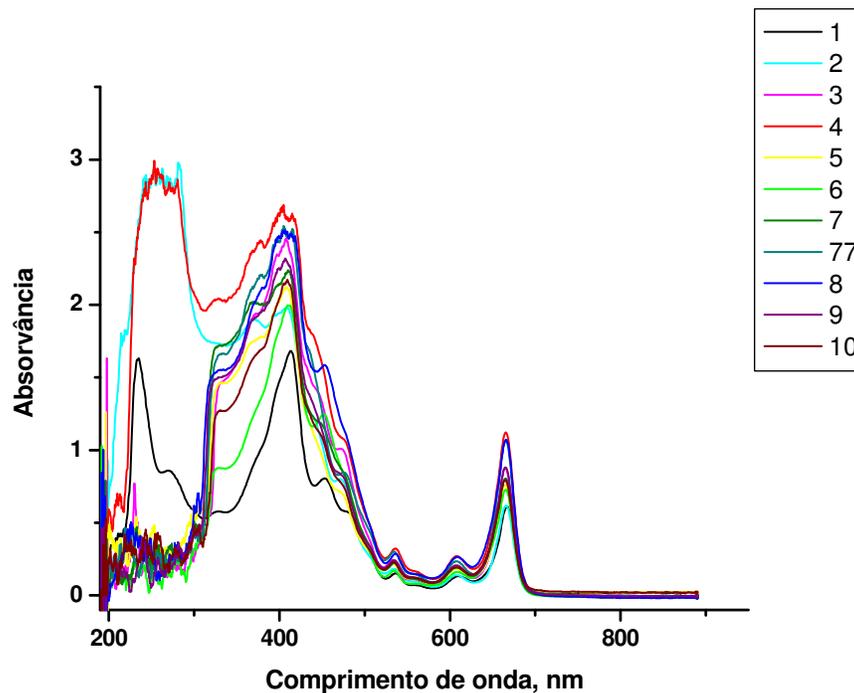


**Figura 38**–Dendrograma baseado nos dados cromatográficos dos extratos de **1** a **10** descritos na Figura 8 eluídos nas fases **H**.



**Figura 39**-Esquema dos espectros de cada pico dos cromatogramas na análise dos extratos de **1 a 10**, descritos na Figura 8 eluídos na fase **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v).

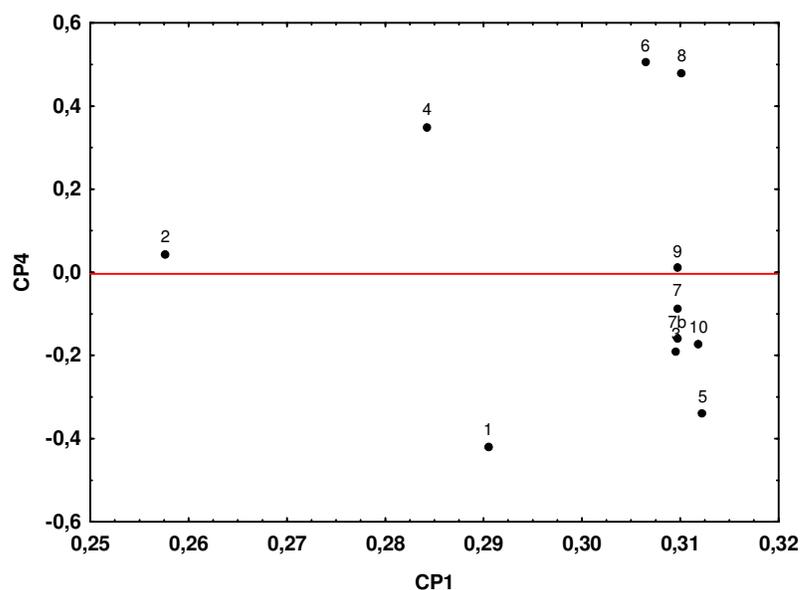
Além da análise cromatográfica, estes extratos também foram analisados por espectrofotometria na região UV-VIS e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. O objetivo de rastrear a variação composicional dos extratos e com isso mostrar que a diferença entre os cromatogramas pode estar em alguma substância diferente e que aliada à fase **H** essa substância ou grupo venha a ter um fator de discriminação maior que nas outras fases apresentadas. A Figura 40 apresenta os espectros dos diferentes extratos registrados no intervalo de 200 a 900 nm.



**Figura 40**-Especetros de absorção no ultravioleta/visível dos extratos **1** a **10** descritos no planejamento experimental do tipo Centróide Simplex modificado com 3 componentes descrito na Figura 8.

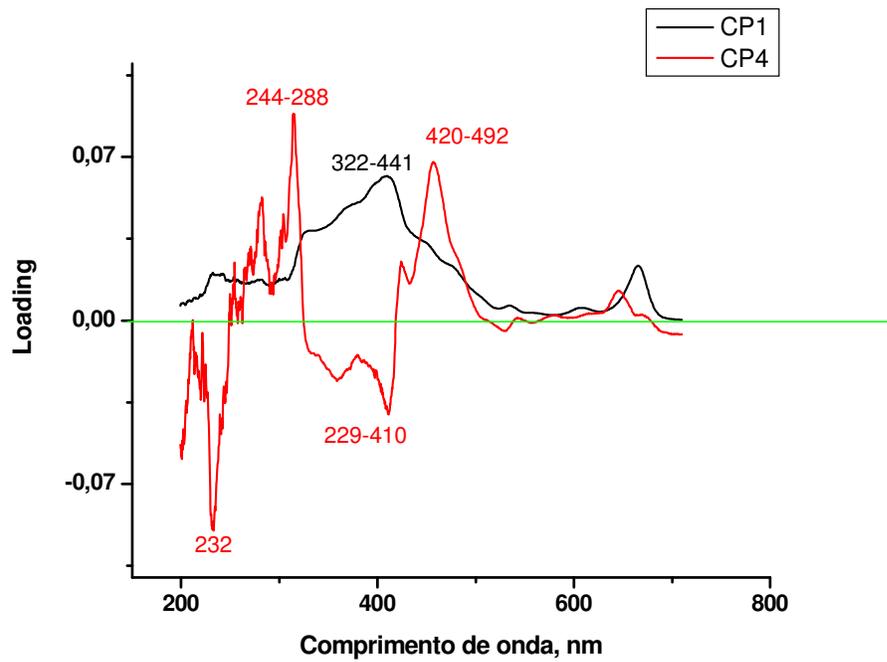
Estes espectros foram colocados na forma de uma matriz 11×1440, ou seja, 11 extratos por 1440 valores de absorvâncias nos diferentes comprimentos de onda em nm. Esta matriz foi sujeita a análise de componentes principais. A Figura 41 mostra o gráfico dos escores das componentes CP1×CP4 que juntas explicam 91,95% da variância.

Como foi visto nas Figuras 31 e 35, os extratos **1**, **4**, **6** e **8** eluídos na fase **H** se separam dos demais extratos, o mesmo acontece na análise por UV-VIS, Figura 41.

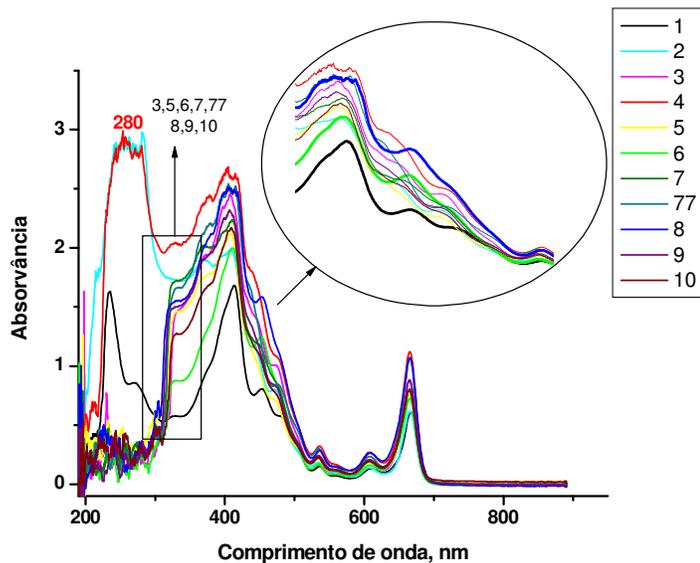


**Figura 41**-Gráfico dos escores das componentes principais 1 e 4 dos 11 espectros UV-VIS.

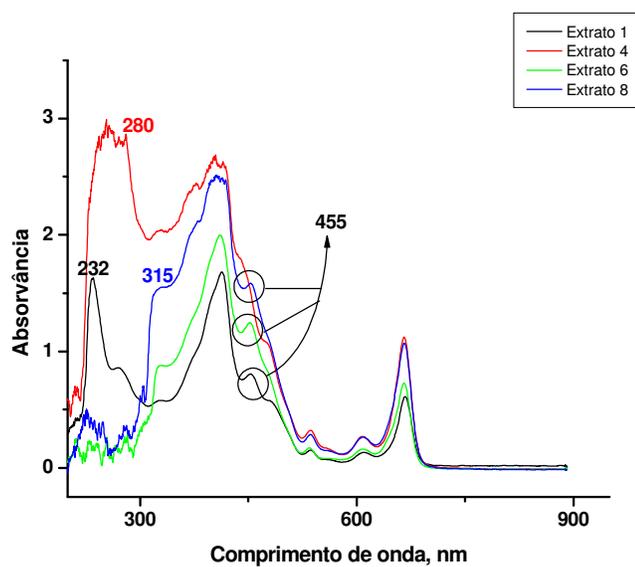
A CP4 negativa separa o extrato **1** e o grupo de extratos **3, 5, 7, 77** e **10**. A Figura 42 mostra os loadings da CP1 e CP4. Analisando esta Figura, verifica-se que estes extratos diferenciam nas regiões de comprimentos de onda de 232 nm e na faixa de 229-410 nm. A CP4 positiva separa os extratos **2, 4, 6** e **8** por apresentarem maiores influências das absorvâncias nos comprimentos de onda de 244-288 nm e 420-492 nm. Pelos espectros UV-VIS é possível identificar estas diferenças. Na Figura 40 observa-se que somente os extratos contendo diclorometano puro, etanol puro e mistura binária de diclorometano e etanol absorve na região de 244-288 nm. A região de 420-492 nm discrimina os extratos **1, 6** e **8**, sinalizada e ampliada nas Figuras 43 e 44.



**Figura 42**-Gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 4 dos 11 espectros no ultravioleta/visível.

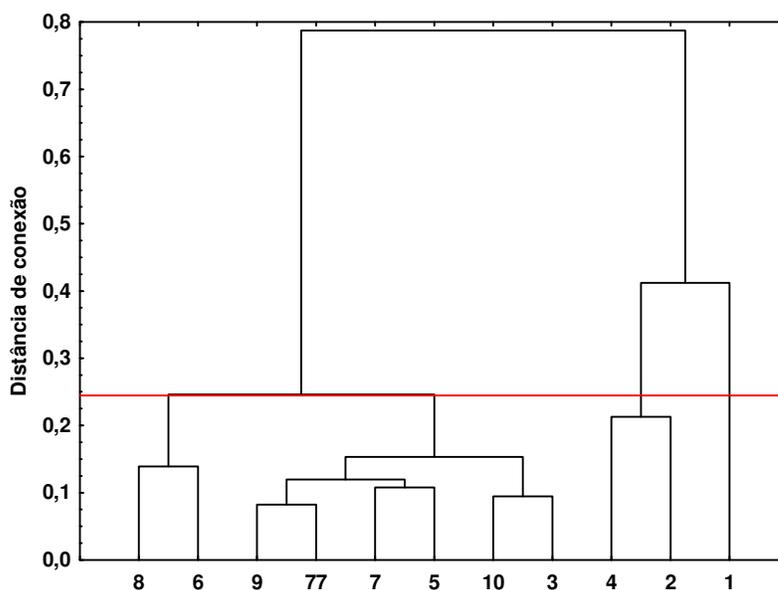


**Figura 43**-Espectros de absorção no ultravioleta/visível dos extratos **1** a **10** descritos no planejamento experimental, Figura 8.



**Figura 44**-Espectros de absorção no ultravioleta/visível dos extratos **1** (100% diclorometano); **4** (50% diclorometano e 50% etanol), **6** (50% diclorometano e 50% acetona) e **8** ( 66,6% diclorometano, 16,7% etanol e 16,7% acetona).

A Figura 45 mostra o resultado da análise hierárquica. Pelo dendrograma no valor da distância de conexão igual a 0,25 são observados grupo dos extratos **9, 7, 77, 5, 10 e 3** e os extratos **1; 2, 4 e 8, 6** separados na CP1 com CP4, Figura 41.



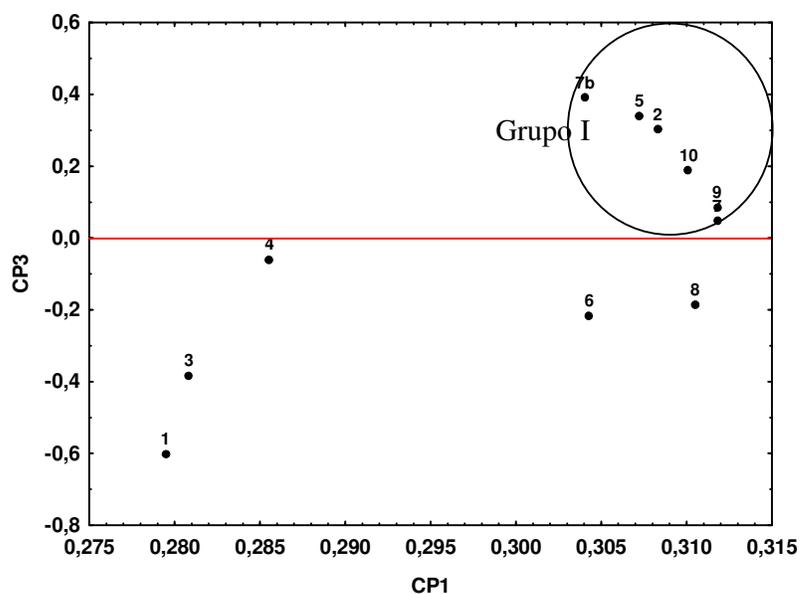
**Figura 45**–Dendrograma baseado nos dados dos espectros obtidos no ultravioleta para os 11 extratos descritos no planejamento experimental, Figura 8.

Os extratos foram submetidos à análise de FTIR e métodos quimiométricos, com a mesma finalidade do UV-VIS, a de identificar possíveis diferenças nas extrações e com isso justificar a diferença das amostras mostrada na análise por CLAE eluídas na fase **H**.

Uma matriz com 11x1700, (11 extratos e 1700 valores de absorvâncias nos diferentes números de onda  $\text{cm}^{-1}$ ), foi analisada através da projeção dos escores e

loadings. A Figura 46 mostra o gráfico dos escores da CP1 × CP3 explicando 95,42% de variância total dos dados.

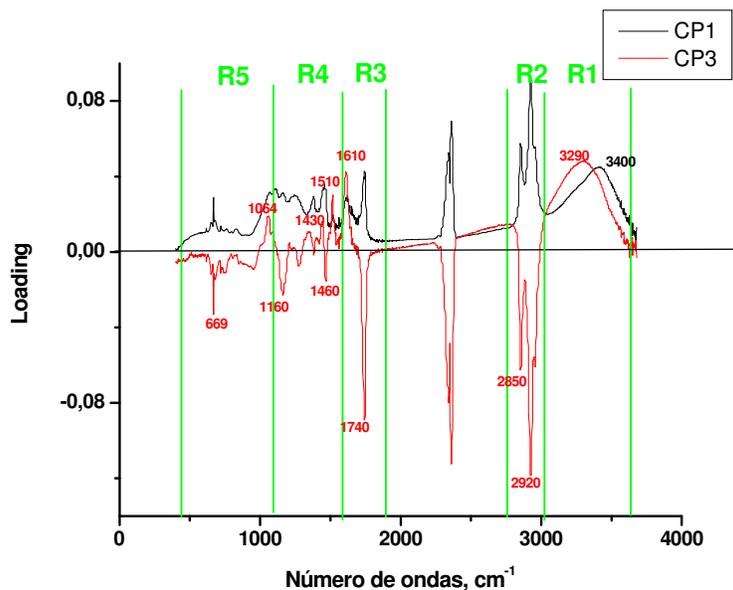
No gráfico dos escores na CP3 negativa os extratos **1**, **4**, **6**, **8** continuam separados dos demais extratos, como foi visto na análise quimiométrica dos dados cromatográficos e dos espectros UV-VIS.



**Figura 46**-Gráfico dos escores CP1 e CP3 para dos 11 espectros analisados por FTIR .

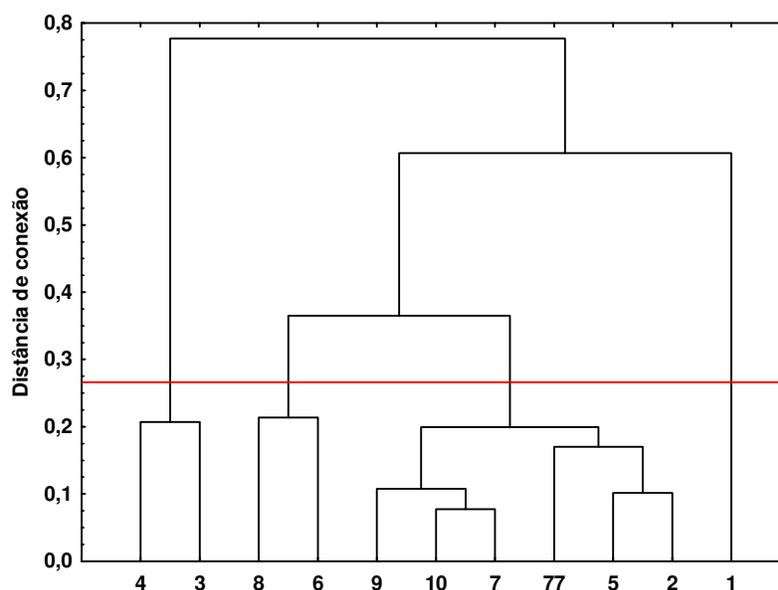
No gráfico dos loadings da CP1 com CP3 na Figura 47 existem cinco regiões discriminatórias. A região R1 está compreendida entre ( $3668-3048\text{ cm}^{-1}$ ) que caracteriza a absorção de  $\nu$  O-H de álcoois ( $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ ) e fenóis ( $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ ). Esta região também tem contribuição das absorções de  $\nu$  N-H de aminas, amidas e lactanas. A

região R2 entre 3048-2800  $\text{cm}^{-1}$  é compatível com  $\nu$   $\text{Csp}^3\text{-H}$  de alcanos. A região R3 entre 1800-1590 possui pico de 1740  $\text{cm}^{-1}$ , que indica a presença de grupamento de carbonila ( $\text{C=O}$ ) que pode estar associada a grupos funcionais de aldeídos (1740- 1720  $\text{cm}^{-1}$ ), cetonas (1770-1700  $\text{cm}^{-1}$ ) ácidos carboxílicos (1760-1660  $\text{cm}^{-1}$ ). A região R4 entre 1590-1096  $\text{cm}^{-1}$  pode conter picos de olefeínas (1680-1630  $\text{cm}^{-1}$ ) ou compostos aromáticos (1600-1450  $\text{cm}^{-1}$ ), bandas características de alguns grupos funcionais com  $\delta$  de N-H no plano,  $\nu$  C-N de amida ( $\sim$  1400  $\text{cm}^{-1}$ ), fenóis (1390-1330 e 1260-1880  $\text{cm}^{-1}$ ), ésteres (1275-1020  $\text{cm}^{-1}$ ). A região R5 com frequências entre 1096-600  $\text{cm}^{-1}$  de absorção características de  $\delta$  C-H fora do plano dos naftalenos  $\beta$ -substituídos e aromáticos substituídos com átomos adjacentes de hidrogênio. O grupo I está no quadrante positivo da CP3. Com o auxílio dos loadings na Figura 47, observa-se que a região que discrimina este grupo são R1, R3, R4 e R5. Este grupo apresenta maior concentração de substâncias com grupos funcionais de absorção de  $\nu$  O-H de álcoois e fenóis e também contribuição das absorções de  $\nu$  N-H de aminas, amidas e lactanas, ao contrário dos extratos **1, 3, 4**. Por outro lado, os espectros dos extratos **1, 3, 4, 6 e 8** apresentam maior concentração de substâncias com grupos funcionais de absorção de  $\nu$  C-H de alcanos, aldeídos, amidas e fenóis.



**Figura 47**-Gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 3 dos 11 espectros no FTIR.

O dendrograma da análise hierárquica está representado na Figura 48. No valor de distância de conexão 0,3 mostra que quatro grupos são discriminados, os grupos, (4,3); (8 e 6), (1) e (2, 5, 7, 77, 10 e 9), confirmando os resultados até agora obtidos. A discriminação dos extratos **1, 4, 6 e 8** está relacionada ao extrator diclorometano, já que, os extratos possuem 100%, 50%-50% diclorometano-etanol, 50%-50% diclorometano-acetona e a mistura ternária contendo 66 % de diclorometano, 17% de etanol e 17% de acetona, respectivamente. Substâncias lipofílicas, óleos fixos, ceras, agliconas, sapogeninas, alcalóides<sup>2</sup>, podem estar fazendo a diferença nas análises UV-VIS e FTIR e separando essas amostras das demais na análise por CLAE, na fase **H**.



**Figura 48**–Dendrograma baseado nos dados espectroscópicos para os 11 extratos descritos no planejamento experimental do tipo Centróide Simplex modificado com 3 componentes mostrados na Figura 8.

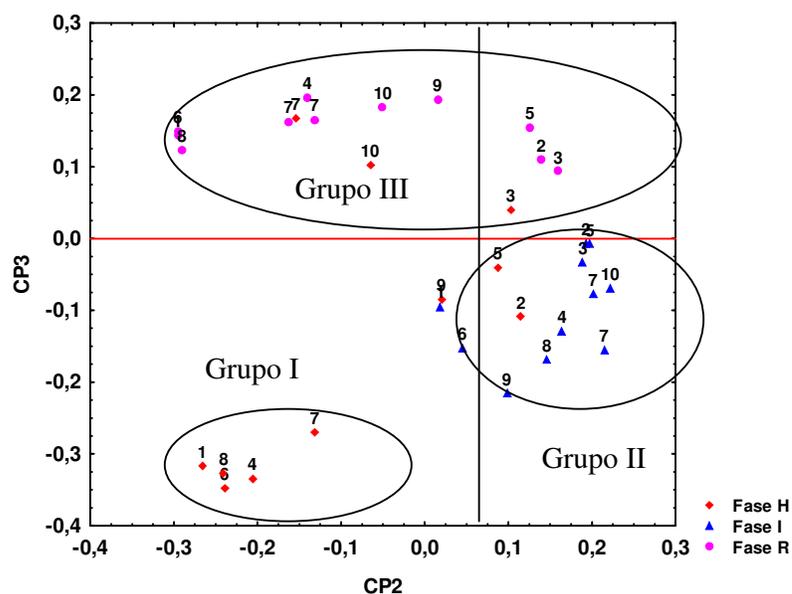
Visto que as três fases móveis **H**, **R** e **I** apresentaram os cromatogramas com maior número, os picos cromatográficos, estas fases foram submetidas à análise de componentes principais.

Uma matriz 33×2813 foi construída, sendo 33 o número de cromatogramas dos extratos eluídos nas fases móveis **H**, **R** e **I**; por 2813 variáveis relativas ao tempo em minutos. A Figura 49 mostra o gráfico dos escores da CP2 com a CP3, que juntas explicam 24,17%. A CP2 separa os extratos **1**, **4**, **6**, **7** e **8** das fases móveis **H** e **R**, dos demais extratos, confirmando mais uma vez que a composição química destes extratos são diferentes. Na fase móvel **I** eles parecem estar agrupados com os demais desta

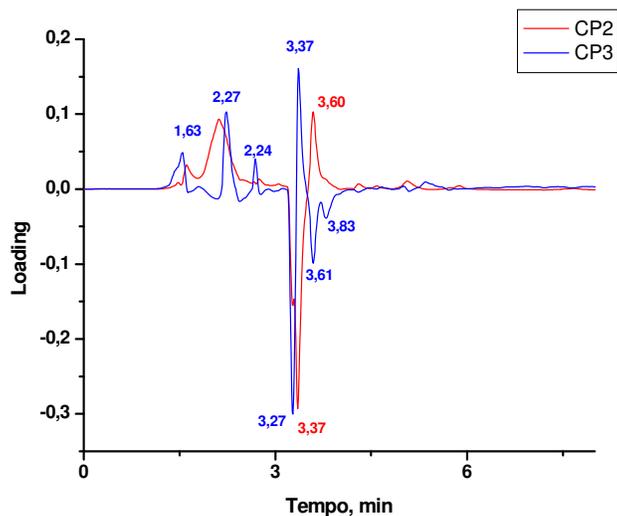
mesma fase móvel, mas deve-se lembrar que este gráfico é uma projeção do espaço 2813 para duas dimensões. Além disso, a variância explicada é somente de 24,17%. A Figura 50 pode auxiliar na interpretação das diferenças entre as três fases móveis isoelutrópicas.

A CP3 separa três grupos. O grupo I com valores mais negativos, o grupo II na região menos negativa e o grupo III localizada na região mais positiva na CP3. O grupo I tem maior contribuição dos loadings negativos na Figura 50, correspondendo principalmente aos picos localizados em 3,27, 3,37 minutos seguidos por 3,61 e 3,83 minutos. O grupo II, na região menos negativa na CP3 e mais positiva na CP2, tem menor contribuição dos picos que discriminam o grupo I, mas tem maior contribuição dos picos em torno de 2,00 e 3,60 minutos indicados na CP2. O grupo III divide em dois grupos. Um na CP3 positiva e CP2 negativa e o outro na CP2 e CP3 positivas. Este grupo tem contribuições tanto dos loadings negativos quanto dos loadings positivos.

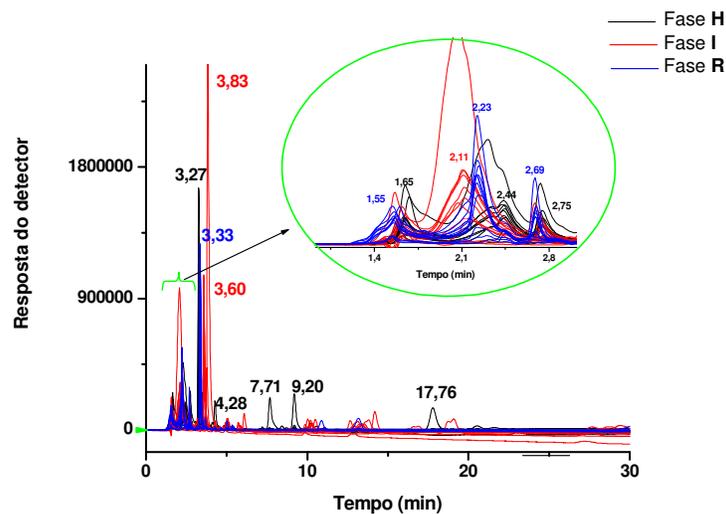
A Figura 51 mostra um cromatograma de cada fase. Os cromatogramas confirmam que os picos em 2,0, 3,27, 3,37, 3,61 e 3,83 minutos são os responsáveis por esta separação. Para confirmar que os picos localizados nos tempos 3,27; 3,37 e 3,60 minutos não correspondem a deslocamentos dos cromatogramas, foi extraído o espectro correspondente a cada um destes picos, Figura 52. Esta Figura mostra que os espectros têm perfis diferentes, portanto a diferença não é por deslocamento dos cromatogramas.



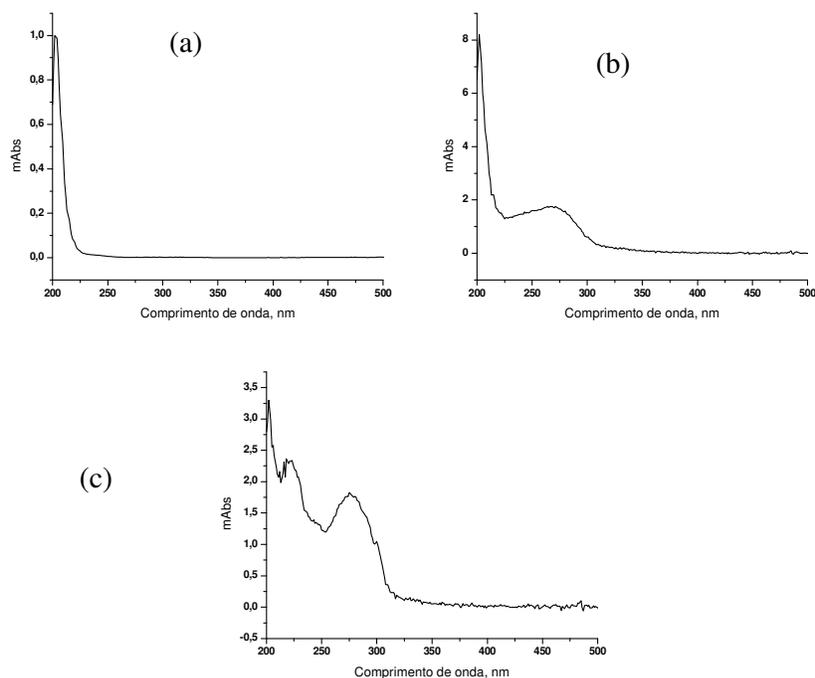
**Figura 49**-Gráfico dos escores CP2 e CP3 para os dados cromatográficos das 33 amostras extraídas conforme planejamento da Figura 8 e eluídos nas fases móveis **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v), **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v) e **I** (ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v).



**Figura 50**-Gráfico dos loadings das componentes principais 2 e 3 das 33 amostras extraídas conforme planejamento da Figura 8 e eluídos nas fases móveis **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v), **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v) e **I** (ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v).



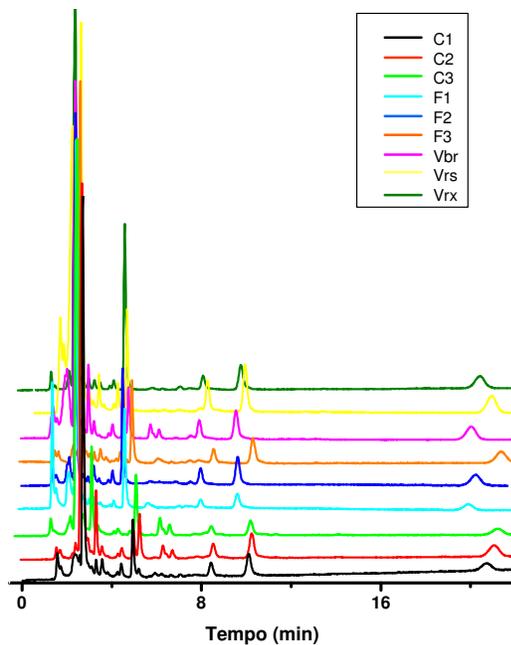
**Figura 51**-Cromatogramas das 33 amostras extraídas conforme planejamento da Figura 8 e eluídos nas fases móveis **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v), **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30 v/v) e **I** (ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5 v/v).



**Figura 52**-Espectros de absorção no UV-VIS dos picos correspondentes aos tempos (a) 3,27min (b) 3,37 min e (c) 3,60 minutos.

Após esta análise exploratória, decidiu-se comparar oito amostras não incluídas no nosso estudo. Foram utilizadas três amostras comerciais de marcas diferentes, uma sem especificação do fabricante nomeada de C1, duas com especificação do fabricante *Bauhinia forficata* nomeada de C2 e a outra *Bauhinia candicans* nomeada C3, três plantas classificadas pelo taxonomista Manuel R. C. Paiva como *Bauhinia forficata* Link, todas de flores brancas nomeadas F1, F2 e F3 e três classificadas como *Bauhinia variegata* L. de flores branca, rosa e roxa, nomeadas de Vbr, VRs e VRx, respectivamente. Essas amostras foram submetidas à análise por CLAE e eluídas na fase móvel otimizada **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v) nas condições de 75% de acetona e 25% de etanol, como mostrado na Figura 22.

Os cromatogramas das nove amostras estão mostrados na Figura 53. Mesmo usando a fase móvel otimizada na qual foi obtida uma impressão digital dos metabólitos bem informativa, analisar os cromatogramas por comparação é complicado, uma vez que os cromatogramas são muito parecidos e existem diferenças quantitativas. Para resolver o problema, métodos quimiométricos foram utilizados para comparar o grau de similaridade dos perfis cromatográficos.

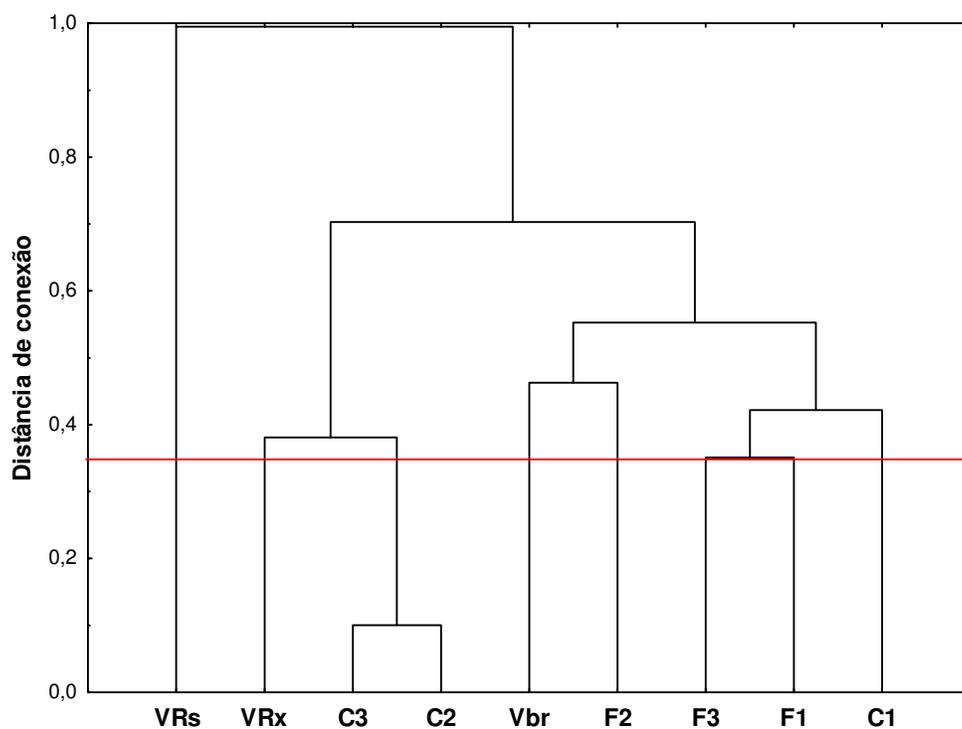


**Figura 53**-Cromatogramas das amostras C1(comercial-*Bauhinia* não especificada), C2 (comercial-*Bauhinia candicans*), C3 (comercial-*Bauhinia forficata* Link), F1(*Bauhinia forficata* Link- nº FUEL 36.475); F2 (*Bauhinia forficata* Link- nº FUEL 36.486)e F3(*Bauhinia forficata* Link- nº FUEL 37.339); Vbr (*Bauhinia variegata* L.- nº FUEL 36.474); Vrs (*Bauhinia variegata* L- nº FUEL 36.473) e Vrx (*Bauhinia variegata* Link- nº FUEL 36.472) realizado nas condições cromatográficas descritas no item 3.9.2.

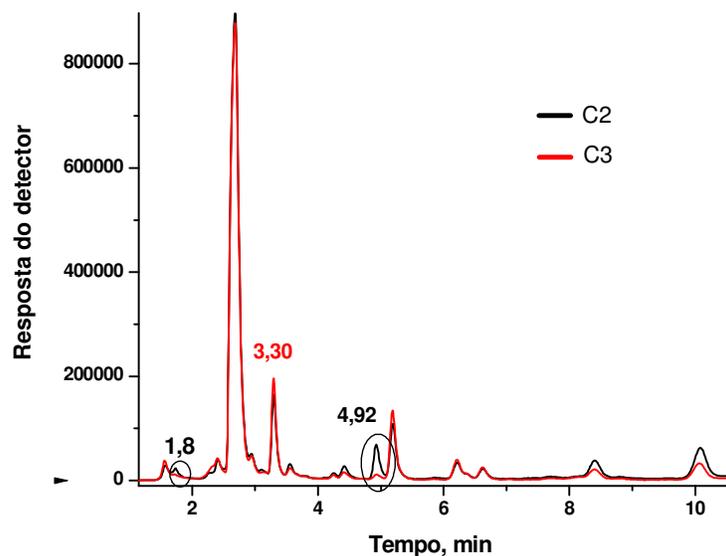
Na Figura 54 a análise hierárquica na distância de conexão 0,35 mostra que há similaridade somente entre C2 e C3. A amostra comercial sem identificação não apresenta similaridade com as demais. Aqui duas hipóteses podem ser levantadas: 1) que C2 e C3 são ambas *Bauhinia candicans* ou 2) que embora C2 e C3 sejam similares elas não são da mesma espécie. Os cromatogramas das duas amostras comerciais foram

comparados para esclarecer se estas amostras são da mesma espécie ou não, Figura 55.

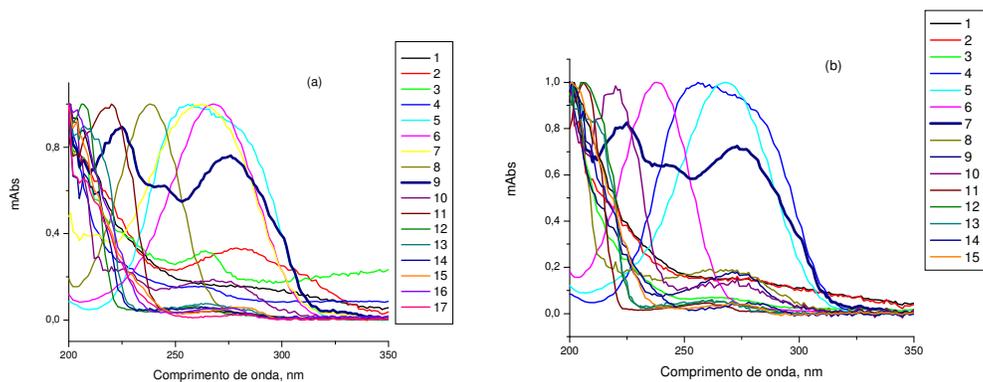
Estes cromatogramas mostram que a amostra C1 apresenta dois picos que a C3, um em 1,8 minutos e o outro em 4,92 minutos. Este resultado foi confirmado pelos espectros de absorção no UV de cada um dos picos do cromatograma, Figura 56. Estes resultados confirmam aqueles obtidos na referência <sup>22</sup>, que a *Bauhinia Candicans* não é sinonímia da *Bauhinia forficata* Link.



**Figura 54**—Dendrograma baseado nos dados espectroscópicos para as nove amostras de *Bauhinia* extraídas na condição otimizada de 75% acetona e 25% etanol (v/v) eluídas na fase móvel H MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v).



**Figura 55**-Cromatogramas das amostras comerciais 2 e 3, extraídas na condição otimizada de 75% acetona e 25% etanol (v/v) eluídas na fase H MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23 v/v) realizado nas condições cromatográficas descritas no item 3.9.2.



**Figura 56**-Espectros de absorção no UV extraídos de cada pico dos cromatogramas das amostras comerciais: a) C2 (*Bauhinia candicans*) e b) C3 (*Bauhinia forficata*).



# *Capítulo V*

## *Conclusão*

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho mostrou-se a influência da composição da fase móvel e do meio extrator na qualidade da impressão digital cromatográfica da planta *Bauhinia variegata* L. Na primeira etapa do trabalho avaliaram-se os efeitos dos três solventes usados, diclorometano, etanol e acetona no rendimento na extração das folhas da *Bauhinia variegata* L. Baseado no rendimento de extração conclui-se:

- ✓ O maior rendimento em massa no processo de extração foi 0,61g de extrato de 3 g de amostra, obtido com uma mistura binária de etanol e acetona.

Na segunda etapa foram avaliados a influência da força cromatográfica da fase móvel e o meio extrator na qualidade da impressão digital cromatográfica, sendo a resposta o número de picos. Foi possível concluir que:

- ✓ O número de picos obtidos nos 90 cromatogramas não está relacionado com o rendimento dos extratos.
- ✓ Aumentando a força cromatográfica da fase móvel de 1,0 para 2,0 aumenta o número de picos no cromatograma.
- ✓ Os melhores cromatogramas foram obtidos nas fases móveis **H** MeOH:H<sub>2</sub>O (77:23), **R** MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O (35:35:30) e **I** ACN:H<sub>2</sub>O (64,5:35,5) (v/v) todas de força 2,0.

Foram avaliadas através de modelos matemáticos as fases móveis que apresentaram maior número de picos, **H**, **R** e **I**, obtendo as seguintes conclusões:

- ✓ Para a fase móvel **H** o melhor cromatograma, com 17 picos, foi obtido com uma mistura extratora que empregou 75 % de acetona e 25 % de diclorometano.
- ✓ Para a fase móvel **R** o melhor cromatograma, com 20 picos, foi obtido com diclorometano puro ou uma mistura contendo no mínimo de 90 % de diclorometano, como solvente extrator.
- ✓ Para a fase móvel **I** o melhor cromatograma, com 17 picos, foi obtido uma solução extratora constituída de 65% diclorometano e 35 %acetona.
- ✓ A mudança do meio extrator e do modificador orgânico levam a uma impressão digital diferente. Isto pode ser devido ao caráter ácido, básico ou interações de dipolo-dipolo entre a composição dos diferentes extratos, fase móvel e fase estacionária.

Na terceira etapa do trabalho foram apontadas as diferenças dos extratos eluídos nas nove fases móveis do planejamento.

- ✓ As fases móveis se diferenciaram em oito grupos, analisados pelos componentes principais do tipo Q, levando a concluir que mudando a fase móvel muda o perfil cromatográfico além do número de informações (número de picos).
- ✓ A fase móvel **H** foi uma fase de grande espalhamento nas projeções das componentes principais, separada principalmente pelos extratos preparados em diclorometano puro (**1**), mistura binária de (**4**), diclorometano e acetona (**6**) e mistura ternária de 2/3 de diclorometano e 1/3 de etanol e 1/3 de acetona (**8**).

Com a aplicação dos métodos quimiométricos associados a análise por absorção no UV-VIS e FTIR pode verifica se as amostras apresentavam diferenças na composição dos extratos comparadas às informações obtidas na CLAE para a fase móvel **H**.

- ✓ Na análise por UV-VIS os extratos **1, 4, 6 e 8** se separam dos demais como ocorreu na CLAE para as mesmas fases móveis.
- ✓ Os extratos **2, 4, 6 e 8** apresentam maiores absorvâncias nos comprimentos de onda de 244-288nm e 420-492nm e os extratos **1, 6 e 8** são discriminados na região de 420-492 nm.
- ✓ Pelo cromatograma comprovou-se que os extratos **1, 4, 6 e 8** contêm substâncias diferentes dos demais extratos.
- ✓ Na análise FTIR a projeção dos escores e análises dos loadings mostraram os extratos **1, 3, 4, 6 e 8** encontram-se distanciados dos demais. Os resultados foram confirmados pela análise hierárquica.
- ✓ Os extratos **1, 3, 4, 6 e 8** apresentaram maiores concentrações das substâncias com grupos funcionais com estiramento de  $\nu$  C-H, possivelmente de alcanos, aldeídos, amidas e fenóis.

Outra parte do trabalho foi reavaliar as três fases móveis que apresentaram maiores números de picos, **H, R e I**. Nesta análise foi possível diferenciar as fases móveis isoluétrópicas com mudança de seletividade e com isso avaliar as diferenças nos cromatogramas.

- ✓ As componentes CP2×CP3 separou 3 grupos, nos quais o grupo I é composto pela fase móvel **H** e os extratos **1, 4, 6, 7 e 8**. Esta diferença foi devida principalmente a contribuição dos picos 3,27 e 3,37; 3,61 e 3,83 min.
- ✓ Os picos 3,27 e 3,37 não são da mesma substância uma vez que o espectro de absorção no UV-VIS foi diferente. O mesmo acontece com as substâncias nos tempos de 3,61 e 3,83 min

A última etapa do trabalho foi testar oito provenientes de fontes diferentes, usando a fase móvel **H**.

- ✓ Duas amostras comerciais C2 e C3 rotuladas *Bauhinia candicans* e *Bauhinia Forficata* Link apresentaram diferenças nos cromatogramas e nos espectros, o que leva a concluir que elas são diferentes, confirmando os resultados obtidos na referência 22.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LI, BO-YAN, LIANG, Y-Z, XIE, P-S, DU, Y-P, *Evaluation of Fingerprints of Herbal Medicine with Chromatographic Data*, Anal. Chim. Acta, Changsha, 519 (2004) 69-77.
2. SIMÕES, C.M.O, SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G, MELLO, J.C.P, MENTZ, L.A, PETROVICK, P.R., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4 ed, Porto Alegre, Florianópolis : Ed.Universidade UFRGS, Ed da UFSC, 2002.
3. RATES, S. M. K, *Plants as souce drugs*. Toxicon, 39 (2001) 603-613.
4. ASCHWANDEN, CHRISTIE. Herbs for health, but how safe are they? Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin/en>>. Acesso em: 31 ago. 2006.
5. CUPP, M. J., **From forensic science: Toxicology and clinical pharmacology of herbal products**, Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000.
6. Ministério da Saúde Resolução - RDC n.º 17, de 24 de fevereiro de 2000 (\*) Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17\\_00rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm)
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária -RDC nº 48, de 16 de março de 2004, Disponível em [www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/190805\\_edital.pdf7](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/190805_edital.pdf7)
8. LONNI, A. A. S. G., SCARMINIO, I. S., SILVA, L. M. da C. e, FERREIRA, DALVA T., *Differentiation of Species of the Baccharis Genus by HPLC and Chemometric Methods*, Anal. Sci., 19(2003)1013-1017.
9. LIANG, YI-ZENG, XIE, P., CHAN, K., *Quality control of herbal medicines*, J.Chromatogr. B, 812 (2004) 53-70.
10. WECKWERTH W., MORGENTHAL K., *Metabolomics to biological interpretation*, Drug Discovery Today: Targets, 22 (2005) 1551-1558.

11. ELLIS, D. I., DUNN, W. B., *Metabolic: current analytical platforms and methodologies*, Trends in Anal. Chem., 24(2005) 285-291.
12. CAO, Y., LICONG, WANG, X., Y., XUEJUN, Y., YE, J., *Development of the chromatographic fingerprint of herbal preparations Shuang-Huang-Lian oral liquid*, J. of. Pharm Biomed Anal, 41(2006) 845-846.
13. ELLIS ZHANG, J. L. CUI, M., He, Y., YU, H. L., Guo, D., *Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods*, J. Pharm. Biomed. Anal., 36 (2005) 1029-1035.
14. SNYDER, LLOYD R.; KIRKLAND, JOSEPH J.; GLAJCH, JOSEPH L. **Practical HPLC method development**. 2<sup>a</sup> ed Canadá: John Wiley & Sons, 1997
15. HANAI, T., **HPLC A Practical Guide**, Royal Society of Chemistry, 1999.
16. SNYDER, L. R., CARR, P. W., RUTAN, S. C., *Solvatochromically based solvent-selectivity triangle*, J. Chromatogr. A, 656 (1993) 537-547.
17. COENEGERACHT, P. M. J., METTING, H. J., SMILDE, A. K., COENEGERACHT-LAMES P. J. M. A, *chemometric investigation of the selectivity of multisolvent mobile phase systems in RP-HPLC*, Chromatographia, 27 (1989) 135-141.
18. ALMEIDA, A. A. de, SCARMINIO, I. S, *Statistical mixture design optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea*, J. Sep Sci. 30 (2007) 414-420
19. LONNI, A. A S G. Caracterização e identificação química de carquejas do gênero Baccharis por métodos quimiométricos.. 2002. 80 f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Londrina.

20. SILVA, L. M. da C. e. Estudos exploratório de extrato de carquejas por FTIR, CLAE e métodos quimiométricos. 2005. 90 f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Londrina.
21. ALMEIDA A. A. de, Uso de métodos quimiométricos e otimização das condições experimentais para análise de chás comerciais de *camellia sinensis*. 2006. 62 f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Londrina.
22. SOARES P. K. Taxonomia por abordagem metabolômica e métodos quimiométricos para análise e rastreio de plantas do gênero *Bauhinia*. 2006. 99 f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Londrina.
23. LORENZI, MARRI; MATOS, F.J. ABREU. **Plantas medicinais no Brasil: Nativa e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Pantarum, 2002
24. PIZZOLATTI, M. G.; JR, A. C.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. de; FILHO, R. B- ; SCHRIPEMA, J. Quím. Nova vol.26 no.4 São Paulo July/Aug. 2003
25. FUENTES, O., ÁVILA, P. A., ALARCÓN, J., *Hypoglycemic activity of Bauhinia candicans in diabetic induced rabbits*, *Fitoterapia*, 75 (2004)135-141.
26. SILVA, F. R. M. B., SZPOGANICZ, B., PIZZOLATTI, G., WILLRICH, M. A. V., SOUSA, E., *Acute effect of bauhinia forficata on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats*, *J.Ethnopharm.*, 83 (2002) 33-37.
27. MUJICA, G. F., MOTTA, N., MÁRQUEZ, A. H., ZULUETA, J. C., *Effects of Bauhinia megalandra aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles*, *Fitoterapia*, 74 (2003) 84-90.
28. SILVA, K. L., FILHO, V.C., *Plantas do gênero bauhinia: composição química e potencial farmacológico*, *Quím. Nova*, 25 (2002) 449-457.

29. NETO, B. B. de, SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora Unicamp, 2003.
30. REYMENT, R, JÖRESKOG, K. G., **Applied factor analysis in the natural sciences**, Editora, Cambridge University Press, Cambridge,UK, 1996.
31. MASSART, D., L., VANDEGINSTE, B. G. M., Deming, S. N., Michotti, Y., Kaufman, L., **Chemometrics: a textbook**, Editora Elsevier, Amsterdam, 1988.
32. NETO, J. M. M., MOITA, G. C., *Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados* Quím. Nova, 21(1998).467-469.
33. LOUGH, W. J., WAINR, I. W., **High performance liquid chromatography**, Editora: Blackie Academic & Professional, London, 1995.
34. SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L.; **Practical HPLC method development**; 2 ed.; Editora John Wiley & Sons Inc, New York, 1997.

# 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](#)