



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELY XAVIER SOARES

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA SEPARAÇÃO DE
METABÓLICOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO DAS
FOLHAS DE ERYTHRINA ESPECIOSA ANDREWS POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA: ESTUDO COMPARATIVO**

DANIELY XAVIER SOARES

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA SEPARAÇÃO DE
METABÓLICOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO DAS
FOLHAS DE ERYTHRINA SPECIOSA ANDREWS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA: ESTUDO COMPARATIVO**

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

Orientação: Prof^a. Dr^a. Ieda Spacino
Scarminio

Londrina

2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S676a Soares, Daniely Xavier.
Análise exploratória da separação de metabólitos secundários do extrato das folhas de *Erythrina speciosa* Andrews por cromatografia líquida : estudo comparativo / Daniely Xavier Soares. – Londrina, 2010.
89 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2010.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Análise cromatográfica – Teses. 3. Extração por solventes – Teses. 4. *Erythrina speciosa* A – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 543.4

DANIELY XAVIER SOARES

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA SEPARAÇÃO DE METABÓLICOS
SECUNDÁRIOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DE ERYTHRINA
ESPECIOSA ANDREWS POR CROMATOGRFIA LÍQUIDA: ESTUDO
COMPARATIVO**

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

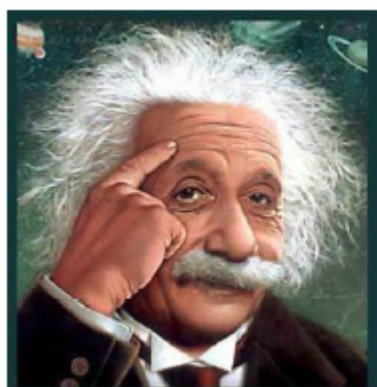
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ieda Spacino Scarmirtio (Orientadora)

Prof. Dr. Roy Edward Bruns (UNICAMP)

Prof. Dr. Ricardo Machado Eüênsoân (UEL)

Londrina, 05 de março de 2010.



“ A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

A Deus pela força que me foi concedida.
Aos meus pais, meu irmão e ao Wilson
por tudo que contribuíram com minha
caminhada em Londrina.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Celso e Nazareth por me permitirem escolher, pelo amor incondicional e por todo apoio e incentivo para realização dos meus sonhos.

Em especial à Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, excelente orientação, sempre com muita amizade, dedicação e disposição em acompanhar integralmente todo o trabalho.

Ao meu irmão Júnior, pela amizade, companheirismo, minha fonte de inspiração.

Ao Wilson Carvalho por todo amor, paciência e amizade.

A Renata e Sabrina companheiras de todas as horas.

A Raquel por todos nossos bons momentos. A todos os colegas do mestrado.

A professora Dra. Keiko, pela contribuição em físico-química e pela amizade.

Ao professor Dr. Wagner Barreto pelas discussões sobre espectros e físico-química.

Ao professor Dr. Luis Henrique por sempre estar disposto a ajudar e amizade. A todos os professores do Departamento de Química e coordenação do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

A todos as pessoas que contribuíram para realização deste trabalho.

SOARES, Daniely Xavier. **Análise exploratória da separação de metabólicos secundários do extrato das folhas de erythrina speciosa andrews por cromatografia líquida**: estudo comparativo. 2010. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

RESUMO

Planejamento estatístico de mistura de quatro componentes foi usado para investigar a influência dos solventes no fracionamento cromatográfico em coluna aberta no extrato das folhas da *Erythrina speciosa* A. Os grupos de frações obtidos foram investigados e comparados com os grupos obtidos pelo fracionamento cromatográfico envolvendo apenas solventes puros e misturas binárias (clássico). As frações foram analisadas quanto aos parâmetros solvatocrômicos α , β e π para o aumento da seletividade de compostos químicos. Os grupos de frações também foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Duas fases móveis com diferentes forças cromatográficas foram investigadas. Análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica foram aplicadas aos dados cromatográficos e espectroscópicos. As características da impressão digital cromatográfica foram compassivas à mistura de solventes e a força cromatográfica. A melhor fase móvel para produzir impressão digital informativa foi 17,5% acetonitrila, 65% de água e 17,5% de metanol (v/v/v). O grupo de frações do fracionamento cromatográfico com planejamento de misturas de maior diversidade de compostos (36 picos) foi obtido em misturas de hexano/diclorometano/acetato de etila ((60; 20; 20%) (v)). No fracionamento cromatográfico clássico o maior número de picos (34 picos) foi obtido com a mistura diclorometano/acetato de etila ((50; 50) (v)). As frações obtidas no fracionamento cromatográfico com planejamento de misturas apresentaram maior diversidade de espectros dos picos cromatográficos quando comparado com o fracionamento clássico.

Palavras chaves: Química analítica. Análise cromatográfica. Extração por solventes. *Erythrina speciosa*.

SOARES, Daniely Xavier. **Exploratory analysis of the separation of secondary metabolites of the extract of erythrina speciosa andrews liquid chromatography**: a comparative study. 2010. Dissertation (Masters in Chemistry of the Natural Resources) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

ABSTRACT

Statistical mixture design of four components was used to investigate the influence of solvent in the chromatographic fractionation in open column of the extract from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. The results were compared with a chromatographic fractionation involving only pure solvent and binary mixtures (classic). Solvatochromic parameters α , β e π were used to increase the chemical compounds selectivity. Mobile phases with different chromatographic strengths were investigated for reversed-phase liquid chromatographic (RP-HPLC). Principal component analysis (PCA) and hierarchical analysis were performed to interpret differences in the chromatographic and spectra data. Substantial differences were found between the two fractionations. The characteristic of chromatographic fingerprint was influenced by the solvent mixture and the chromatographic strength. The best mobile phase to produce fingerprint informative was acetonitrile:water:methanol, 17.5/65/17.5, % v/v/v. Fractions chromatographed in hexane:dichloromethane:ethyl acetate 60:20:20, % v/v/v resulted in 36 peaks whereas in the classic model it resulted in 34 peaks in dichloromethane:ethyl acetate, 50/50 % v/v mixture. Alkaloids, flavones, o>P unsaturated lactone and pterocarpanes were tentatively identified with reference to literature data based on their UV-VIS data.

Key words: Analytical chemistry. Analysis - chromatographic. Solvent extraction. *Erythrina speciosa*.

FIGURAS

- Figura 1-** Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).....21
- Figura 2 -** Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes.....24
- Figura 3 -** Procedimento experimental empregado no estudo do fracionamento cromatográfico do extrato (hexano: diclorometano: etanol, 1:1: 1, v/v/v) das folhas da *Erythrina speciosa*29
- Figura 4 -** Foto da *Erythrina speciosa* coletada na Universidade Estadual de Londrina30
- Figura 5 -** Planejamento de misturas com quatro componentes usados para escolha das proporções dos eluentes na CC132
- Figura 6 -** Fases móveis distribuídas em um tetraedro para CC234
- Figura 7 -** Triângulo de seletividade para as misturas da Tabela 3 para a CC140
- Figura 8 -** Triângulo de seletividade para as misturas da Tabela 3 para a CC240
- Figura 9 -** Número de picos para cada grupo de frações obtidas no fracionamento cromatográfico CC1. O asterisco significa maior porcentagem do solvente43
- Figura 10 -** Espectros do cromatograma do grupo de frações 3 a (hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v)), analisados na CLAE, fase móvel ACN:água:MeOH (17,5/65/17,5 % (v))44
- Figura 11-** Gráfico dos escores F1xF2 para a amostra 3a(hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v)) da CC1, analisados na CLAE na fase móvel ACN: água: MeOH (17,5/ 65/17, 5 % (v))45
- Figura 12 -** Gráfico dos escores F2xF3 para a amostra 3a(hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v)) da CC1, analisados na CLAE na fase móvel ACN: água: MeOH (17,5/ 65/17, 5 % (v))46
- Figura 13 -** Espectros do cromatograma do grupo de frações 3 a (hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v)), agrupados de acordo com a análise de fatores47

Figura 14 - Gráfico dos loadings dos F1, F2 e F3 para os espectros dos picos referentes ao cromatograma do grupo de frações 3a(hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v)).....	48
Figura 15 - Gráfico dos escores da F2 e F3 dos 38 cromatogramas da CC1.....	49
Figura 16 - Dendrograma referente aos cromatogramas do fracionamento CC1	50
Figura 17 - Gráfico de correlação entre os fatores e os parâmetros solvatocrômicos para os 38 cromatogramas na FM (ACN: Água: MeOH, 17.5/65/17.5° o(\))	51
Figura 18 - Gráfico do F1x F2 dos cromatogramas referentes ao fracionamento CC1	52
Figura 19 - Número de picos para cada grupo de frações obtidas no fracionamento cromatográfico CC2. O asterisco significa maior porcentagem do solvente	54
Figura 20 - Espectros do cromatograma do grupo de frações 7 (diclorometano e acetato de etila (50,50% v)), analisados na CLAE, fase móvel ACN: água: MeOH 17,5/65/17,5 % (v)	55
Figura 21 - Gráfico dos escores F1 e F2 referentes ao grupo de frações 7 (diclorometano e acetato de etila 50/50 % (v)).....	56
Figura 22 - Gráfico dos loadings dos F1, F2 para os espectros dos picos referentes ao cromatograma do grupo de frações 7 (diclorometano, acetato de etila (50/50 % (v))	56
Figura 23 - Dendrograma referente aos espectros dos picos cromatográficos do grupo de frações 7(diclorometano e acetato de etila (50/50 %(v))	57
Figura 24 - Perfis de espectros diferentes no grupo de frações 7 diclorometano e acetato de etila (50/50 % (v))	58
Figura 25 - Gráfico dos escores CP2 e CP3 dos dados cromatográficos na FM (ACN:Água:MeOH,17,5/65/17,5 % (v))	59
Figura 26 - Dendrograma referente aos dados cromatográficos na FM (ACN:Água:MeOH, 17,5/65/17,5 % (v))	60
Figura 27 - Gráfico dos espectros da mistura diclorometano e acetato de etila (50/50 % (v)) na CC1	61

Figura 28 - Dendrograma referente aos espectros dos picos cromatográficos do grupo de frações 1819 (diclorometano e acetato de etila (50/50 % (v)) na CC1.....	62
Figura 29 - Grupos de espectros dos picos cromatográficos do grupo de frações 1819 (diclorometano e acetato de etila (50/50 % (v)) na CC1	63
Figura 30 - Cromatogramas referentes ao grupo de frações obtido nos fracionamentos cromatográficos (clássico e com planeamento de misturas) para a fase móvel hexano puro e mistura de hexano e diclorometano (75/25 % (v)).....	64
Figura 31 - Grupos de espectros da FM1 e FM2 do fracionamento cromatográfico CC1 e CC2	65
Figura 32 - Grupo de espectros formados na FM1, FM2 e FM3 do fracionamento cromatográfico CC1.....	66
Figura 33 - Grupo de espectros formados na FM1, FM2 e FM3 do fracionamento cromatográfico CC2.....	67
Figura 34 - Gráfico dos escores F2 e F3 do grupo de frações obtidos da FM hexano, diclorometano e etanol (60/20/20 % (v)).....	68
Figura 35 - Gráfico dos loadings dos F2, F3 para os espectros dos picos referentes ao cromatograma do grupo de frações 5c (hexano, diclorometano e etanol (60/20/20 % (v))	69
Figura 36 - Espectro do 7° pico do grupo de frações 5c(hexano, diclorometano e etanol (60/20/20 % (v)).....	70
Figura 37 - Espectro do 25° pico do grupo de frações 5c(hexano, diclorometano e etanol (60/20/20 % (v))	70
Figura 38 - Espectro do 22° pico do GF da fase móvel composta de hexano e diclorometano (50/50 % (v)).....	71
Figura 39 - Espectro do 14° pico do GF da fase móvel hexano, acetato de etila e metanol (60/20/20 % (v)).....	71
Figura 40 - Espectro do 19° pico do GF da fase móvel hexano e acetato de etila (75/25 81 % (v)).....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Composição da fase móvel para a coluna CC1 em gradiente crescente de polaridade	33
Tabela 2 -Composição da fase móvel para a coluna CC2 com gradiente crescente de polaridade	34
Tabela 3 -Valores de α , β , π e ordem crescente de polaridade para CC1 e CC2	39
Tabela 4 -Grupos de frações (GF) obtidas em CC1 e suas respectivas composições da fase móvel	42
Tabela 5 -Grupo de frações (GF) obtidos no fracionamento CC2 e suas respectivas fases móveis	53

SIGLAS

Ac	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
ACP	Análise de Componentes Principais
AF	Análise de Fatores
AH	Análise Hierárquica
CC1	Coluna cromatográfica 1
CC2	Coluna cromatográfica 2
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
D	Diclorometano
E	Matriz dos resíduos
F1	Fator 1
F2	Fator 2
F3	Fator 3
FM	Fase móvel
GF	Grupo de frações
H	Hexano
H₂O	Água
n	Objetos
M	Metanol
P	Variáveis
P	Matriz dos loadings
F	Polaridade
q	Número de componentes principais
t	Transposta da matriz
T	Matriz dos escores
UV-Vis	Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta-visível
v	Volume
X	Matriz
β	Parâmetro relacionado à basicidade do solvente
α	Parâmetro de acidez
π	Parâmetro relacionado com o momento dipolar
φ₁	Frações de volumes de solventes puros

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	15
CAPÍTULO II	19
2 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	20
2.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS	20
2.2 PRÉ-PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	22
2.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) (OU ANÁLISE DE FATORES, AF).....	23
2.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA (AH)	24
CAPÍTULO III	28
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.1 INFORMAÇÕES SOBRE A PLANTA	30
3.2 COLETA DA PLANTA	31
3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO	31
3.4 PREPARAÇÃO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA.....	31
3.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	34
3.6 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS).	35
3.7 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	35
3.8 REAGENTES.....	36
3.9 EQUIPAMENTOS.....	36
3.10 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS	36
CAPÍTULO IV	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 INFLUÊNCIA DA FASE MÓVEL NO FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO CC1.....	41
4.2 INFLUÊNCIA DA FASE MÓVEL NO FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO CC2.....	52
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE CC1 X CC2	60
CAPÍTULO V	73
5 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS	76



1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de plantas medicinais ainda possui muitos desafios. No processo de padronização, a quantificação direta dos constituintes ativos é um dos critérios mais desejados, mas em uma só planta podem existir vários componentes ativos complexos, os quais ainda têm um conhecimento muito limitado, tornando-se praticamente impossível identificá-los e posteriormente proceder a uma análise quantitativa ¹.

Atualmente, a construção de impressões digitais cromatográficas tornou-se uma das ferramentas mais poderosas para controle de qualidade de fototerápicos e outros. O bom desempenho de uma impressão digital cromatográfica é dependente do grau de separação cromatográfica e da distribuição da concentração de todos os componentes químicos nos fototerápicos investigados ². Este método é usado para assegurar a qualidade de materiais à base de plantas, especialmente quando existe falta de padrões autênticos para identificação dos componentes ativos ³.

A impressão digital química tradicional determina a relação de teores de compostos químicos com as razões das áreas dos picos ou alturas de pico com métodos estatísticos. Pode, assim, avaliar a qualidade da planta e seus extratos através da comparação da similaridade ⁴.

A obtenção de uma boa impressão digital cromatográfica de uma planta medicinal depende de vários fatores, como o método de extração, instrumentos de medição e condições de medição. Para obter a extração completa, o solvente ideal é obviamente, o que apresenta uma seletividade máxima ⁵.

Os extratos de plantas são geralmente misturas muito complexas que contêm centenas ou milhares de diferentes constituintes ⁶. A separação destes constituintes está fortemente ligada a cromatografia líquida no nível analítico e preparativo. A separação de todos os constituintes é difícil ser obtida com uma única técnica cromatográfica. Neste caso, a cromatografia de camada delgada e a cromatografia líquida de alta eficiência são as mais comumente usadas. Por outro lado, se for necessário isolar um determinado constituinte da amostra a cromatografia de coluna aberta é geralmente usada. Esta técnica pode ser usada em diferentes passos no processo de isolamento em produtos naturais ^{6,7}.

Na cromatografia líquida de alta eficiência a escolha dos solventes é baseada no sistema de classificação de solvente introduzida por Snyder (usando modelo de mistura), que classificou mais de oitenta solventes em oito grupos para a cromatografia em fase normal de acordo às suas propriedades ^{8,9}.

Na cromatografia líquida em coluna aberta, os efeitos do solvente na separação são comumente creditados à mudança de polaridade do meio. No entanto, constantes físicas do solvente tais como a constante dielétrica (ϵ), momento de dipolo (μ) e o índice de refração são inadequados como uma medida quantitativa da polaridade do solvente. Isso decorre do fato que, embora descrevam o solvente como um todo, estas constantes não consideram interações específicas soluto solvente como ligações de hidrogênio e interações eletrônicas do tipo doador-receptor de Lewis, que, freqüentemente, representam um papel dominante em interações soluto solvente ¹⁰.

Um conjunto de três parâmetros chamados de solvatocrômicos foi concebido para descrever a acidez (α), basicidade (β) e dipolaridade (π^*). Os valores destes parâmetros para diferentes solventes foram derivados da espectroscopia (daí o nome solvatocrômico) e de outras medidas, que foram especificamente designadas para a medida de uma única interação ¹¹. Os valores dos parâmetros solvatocrômicos são as médias de resultados obtidos com vários solutos investigados para cada parâmetro, em contraste com os parâmetros do triângulo de seletividade de solvente no qual se baseou na propriedade termodinâmica de um único soluto ¹².

- π^* é um termo que mede a dipolaridade/polarizabilidade do solvente, ou seja, sua capacidade para estabilizar uma carga ou um dipolo em virtude de seu efeito dielétrico; ¹³
- α descreve a habilidade do solvente para formar ligações de hidrogênio com o soluto; ¹³
- β mede a tendência do solvente em doar um par de elétrons (ou aceitar um próton) em ligações de hidrogênio com o soluto; ¹³

Há centenas de anos que as plantas e os extratos vegetais têm sido usados na produção de compostos fotoquímicos, que são muito utilizados na preparação de suplementos dietéticos, alimentos funcionais, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos, agrícolas e cosméticos ^{14, 15}.

As principais classes dos destes compostos são os alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos ¹⁵.

Os compostos fenólicos presentes nas plantas compreendem uma grande diversidade de compostos como os flavonóides (antocianinas, flavonas, flavononas) e várias classes de não-flavonóides (ácidos fenólicos) ¹⁶. Classicamente, a extração desses compostos é realizada utilizando solventes com polaridade crescente. Assim, inicia-se o processo de extração com um solvente apolar para retirar os óleos, gorduras, esteróis e pigmentos e finaliza com água quente para extrair os heterosídeos mais polares ¹⁷.

Os alcalóides também são encontrados nas plantas constituídos por uma enorme quantidade de substâncias estruturalmente diferentes, e por isso a definição química para essa classe de compostos é muito difícil ¹⁸.

Os extratos de folhas, cascas e de raízes de várias espécies do gênero *Erythrina* são usados na medicina popular no tratamento de diversas doenças, tais como disenteria, asma, dor estomacal, infertilidade feminina e, principalmente, infecções microbianas.¹⁹ O estudo de espécies de *Erythrina* foi estimulado após a verificação, entre os anos de 1930 e 1940, que extratos de sementes de várias espécies continham alcalóides com atividade fisiológica semelhante à ação do curare. Desde então, são vários os exemplos de alcalóides isolados de diferentes espécies do gênero ²⁰. Os alcalóides podem ser definidos como sendo bases nitrogenadas orgânicas encontradas principalmente em plantas, porém em menor extensão em animais e microorganismo.²¹ Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes, sendo tipicamente classificado como aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que confere o caráter básico dos alcalóides ²².

Embora a produção da maioria dos fototerápicos inclua procedimentos de extração, pouca atenção tem sido dada a seleção de solventes adequados ou sistemas de solventes para a extração sólido-líquido para o isolamento ou para fins de produção. Este pode ser o motivo do porque as extrações sólido-líquido são geralmente baseadas em tentativa e erro ²³.

Considerando a importância da interação soluto-solvente na busca da impressão digital e que não foi encontrado nenhum trabalho na literatura explorando este efeito na separação dos constituintes químicos de extratos de

material vegetal em cromatografia em coluna aberta, este trabalho teve como objetivos:

- Investigar o efeito de quatro solventes usando planejamento de misturas no fracionamento cromatográfico.
- Comparar dois tipos de fracionamento, o clássico e usando o planejamento de misturas na separação dos constituintes do extrato das folhas de *Erythrina speciosa*.
- Utilizar métodos quimiométricos de análise multivariada associados a dados cromatográficos para analisar o efeito do solvente na separação dos constituintes químicos de extratos das folhas de *Erythrina speciosa*.

Num estudo prévio ²⁴ um planejamento centróide - simplex para os solventes: etanol, diclorometano, hexano e acetona foi usado na extração da massa bruta, fibra, frações orgânicas, neutra e básica, bem como os resíduos do fracionamento das folhas de *Erythrina speciosa*. O extrator mais eficiente para fração rica em alcalóides foi a mistura ternária etanol/diclorometano/hexano (1: 1: 1), sendo assim esta composição de extrato foi utilizada neste trabalho.



Capítulo II

*Métodos
quimiométricos*

2 QUIMIOMETRIA

No campo da química analítica, quimiometria é a disciplina que usa métodos matemáticos e estatísticos para a obtenção de informações relevantes da maneira mais favorável sobre sistemas materiais ²⁵.

O desenvolvimento de instrumentos e processos químicos avançados conduziu a uma necessidade de métodos avançados para realizar experimentos, instrumentos de calibrar e analisar dados resultantes. Agora é reconhecido que a maioria dos sistemas é de natureza multivariada e abordagens univariadas não são susceptíveis de resultar em melhores soluções. Ao mesmo tempo, os instrumentos têm evoluído em termos de complexidade, capacidade computacional avançadas, de modo que foi possível desenvolver e empregar cada vez mais, complexos métodos de computação intensiva ²⁶.

Hoje podemos encontrar grupos de pesquisa e desenvolvimento em quimiometria atuando em diversos estados da federação, não só nas universidades como em algumas indústrias de grande porte. Além disso, diversos cursos de pós-graduação - e mesmo de graduação - já incluem a quimiometria em seus currículos ²⁷.

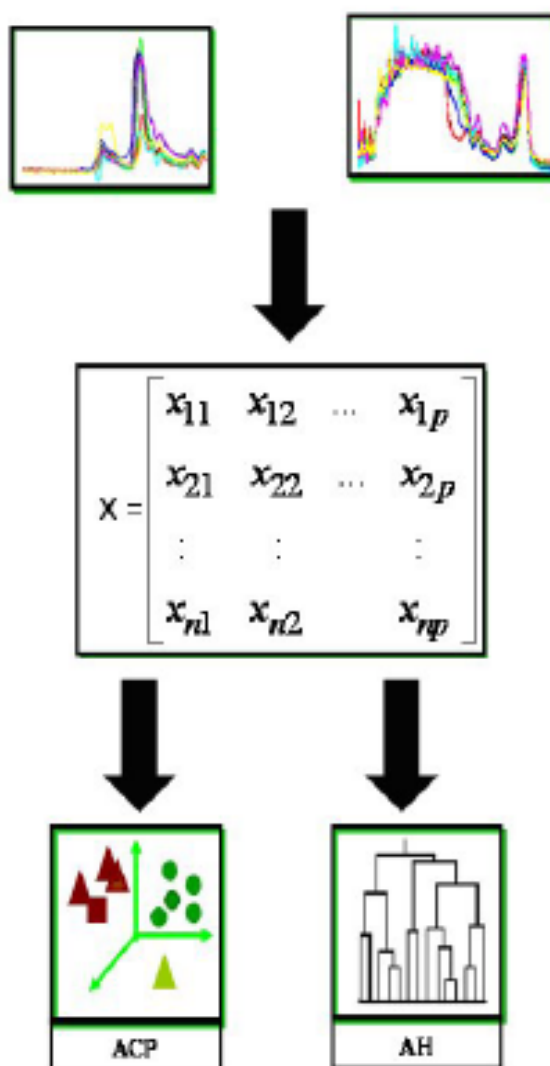
2.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS

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. ²⁸

A seqüência básica da análise de dados multivariados de dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 1. 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 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.

Figura 1 - Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).



2.2 PRÉ-PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O pré-processamento é uma etapa importante da análise, pois os dados de uma forma geral contêm fontes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos ou unidades diferentes. Ele é definido como qualquer manipulação matemática nos dados com o objetivo de remover ou reduzir estas fontes irrelevantes de variação. Pode ser dividido em dois tipos básicos, dependendo se são operados nos valores relacionados às amostras ou às variáveis, e a sua escolha vai depender do conjunto de dados e do objetivo²⁹.

A normalização nas amostras é feita dividindo cada variável por uma constante. Os dois tipos mais comuns são a normalização por área unitária ou por comprimento do vetor unitário. A normalização por área unitária é feita dividindo cada valor original pela soma de todos os valores absolutos das medidas, Equação 1. Este procedimento para os dados cromatográficos tem a finalidade de corrigir a variação do volume da amostra injetado no cromatográfico, sem destruir a proporcionalidade das substâncias orgânicas,

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

no qual x'_{ij} refere-se aos dados normalizados, da amostra i e variáveis j .

A normalização por comprimento de vetor é feita dividindo cada valor original pela soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha, Equação 2. A finalidade é remover a variação sistemática, normalmente associada com a quantidade total da amostra³⁰.

$$X' = X_{ij} / \sqrt{\sum_{j=1}^p X_{ij}^2} , \quad (2)$$

O pré-processamento mais comum para as variáveis na análise exploratória é o autoescalamento. Neste caso os valores originais em cada coluna da matriz são subtraídos das respectivas médias e divididos pelo desvio padrão, Equação 3. Este procedimento transforma as variáveis originais em novas variáveis com média zero e variância igual a um,

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} , \quad (3)$$

no qual s_j é o desvio padrão para a variável j .

2.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) (OU ANÁLISE DE FATORES, AF)

Essencialmente, ACP (ou AF) maximiza a correlação entre as variáveis originais para formar novas variáveis que são ortogonais entre si, ou não correlacionadas. A ACP transforma o conjunto original de variáveis relacionadas entre si, em um novo conjunto de um número igual de variáveis independentes ou componentes principais (CPs), que são combinações lineares das variáveis originais. As componentes principais são ordenadas de tal forma que a primeira CP explica a maior parte da variação nos dados, e cada uma subsequente representa a maior proporção de variabilidade que não tenha sido representada por seus antecessores. Embora o número de CPs seja igual ao número de variáveis independentes do original, em geral, maior parte da variação no conjunto de dados pode ser explicada pelas primeiras componentes principais, que podem ser usados para representarem as observações originais ³¹.

A primeira componente principal, CP1, é definida na direção da máxima variância dos dados de todo o conjunto. A CP2 é a direção que descreve a variação máxima no subespaço ortogonal a CP1. As componentes seguintes são ortogonais as anteriores, descrevendo o máximo das variâncias restante ³².

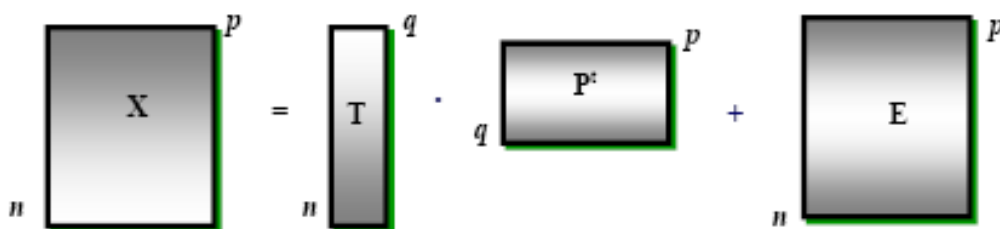
A ACP do Tipo Q define a similaridade entre objetos considerando as proporções entre eles. Na ACP do Tipo Q, a decomposição é calculada através da diagonalização da matriz de associação (XX^t), enquanto que no tipo R, a diagonalização é feita na matriz de correlação ou covariância da matriz (X^tX). A

matriz X ($n \times p$), formada por p objetos e p variáveis é decomposta no produto de duas matrizes menores:

$$X (n \times p) = T(p \times q) P^t (q \times n) + E(n \times p), \quad (6)$$

onde P é a matriz dos loadings das componentes principais, T é a matriz dos escores e E 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 2.

Figura 2 - Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes



Do ponto de vista estatístico, as variáveis originais com maiores valores de loadings na combinação linear das componentes principais são as mais importantes. Primeiramente são feitos os cálculos, em seguida, os resultados são utilizados para interpretar a distribuição das amostras em gráficos bidimensional das componentes principais e posteriormente identificar e julgar a importância das variáveis originais escolhidas.

2.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA (AH)

Tal como o nome indica, a análise de agrupamento tem como objetivo agrupar os dados de forma a permitir identificar semelhanças entre os objetos. Existem diversas abordagens, no entanto, o método mais comum é a classificação hierárquica, em que os objetos são agrupados à semelhança de uma classificação taxonômica, e representados num gráfico com uma estrutura em

árvore, o dendrograma. A suposição básica de sua interpretação é esta: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Os dendrogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos em espaço com dimensão maior do que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível. Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos no espaço n-dimensional. A maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos que estão mais próximos, usando a distância Euclidiana, e substituí-los por um novo ponto localizado na metade da distância entre eles. Distância Euclidiana é medida mais comumente usada da similaridade entre dois objetos. Essencialmente, é uma medida do comprimento de um seguimento de uma reta desenhada entre dois objetos, quando representados graficamente. A distância Euclidiana entre dois pontos n e m é definida, como

$$D_{nm} = \sqrt{\sum_{j=1}^J (x_{nj} - x_{mj})^2} \quad , \quad (7)$$

onde j é a variável .

Este procedimento, quando repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, leva a construção do dendrograma, onde, no eixo horizontal são colocadas as amostras e, no eixo vertical, o índice de similaridade, s_{nm} , entre os pontos n e m, calculado segundo a seguinte expressão:

$$s_{nm} = \left[1 - \frac{d_{nm}}{(d_{nm})_{\text{máx}}} \right] \quad , \quad (8)$$

onde d_{nm} é a distância entre os pontos n e m e $d_{\text{máx}}$ é a distância máxima entre qualquer par de pontos. Os dendrogramas, portanto, consistem em diagramas que representam a similaridade entre pares de amostras (ou grupos de amostras) numa escala que vai de um (identidade) a zero (nenhuma similaridade) ^{33,34}.

De modo geral, como passo inicial deve ser desenvolvido uma escala quantitativa para medir a associação (similaridade) entre os objetos³⁵. Deve-se definir como vai ser caracterizada a similaridade ou dissimilaridade entre dados ou grupos de dados, para em seguida agrupá-los de acordo com vários critérios, que são apresentados a seguir.

- a) **Ligação Simples (vizinho mais próximo):** Define a semelhança entre agrupamentos como a menor distância de qualquer objeto de um agrupamento a qualquer objeto no outro. Tal abordagem é provavelmente o algoritmo aglomerativo mais versátil, pois ele pode definir uma vasta gama de padrões de aglomeração. Portanto, o agrupamento é função de objetos únicos que estavam próximos.
- b) **Ligação Completa (vizinho mais distante):** É comparável ao da ligação simples, exceto que a similaridade de agrupamento se baseia em distância máxima entre observações em cada agrupamento. Similaridade entre agrupamentos é a menor esfera (diâmetro mínimo) que pode incluir todas as observações em ambos os agrupamentos. Esse método é chamado de ligação completa porque todos os objetos em um agrupamento são conectados uns com os outros a alguma distância máxima.
- c) **Ligação média:** O método de ligação média difere dos procedimentos de ligação simples e completa no sentido de que a similaridade de quaisquer dois agrupamentos e a similaridade média de todos os indivíduos em um agrupamento com todos os indivíduos em outro. a similaridade é baseada em todos os elementos dos agregados, e não em um único par de membros extremos. Os dois agrupamentos com a distância média mais baixa são unidos para formar o novo agrupamento.
- d) **Método centróide:** A similaridade entre dois agrupamentos e a distância entre seus centróides. Centróides são os valores médios das observações sobre as variáveis na variável estatística de agrupamento. Neste método, toda vez que indivíduos são reunidos um novo centróide é computado. Existe uma mudança

no centróide do agrupamento toda vez que um novo indivíduo ou grupo de indivíduos é acrescentados a um agregado já existente.

- e) Método Ward: Difere das técnicas anteriores no sentido de que a similaridade entre dois agrupamentos não é uma única medida de similaridade, mas a soma dos quadrados dentro dos agrupamentos feito sobre todas as variáveis. A seleção de qual par de agrupamentos a combinar é baseada em qual combinação de agregados minimiza a soma interna de quadrados no conjunto completo de agrupamentos separados ou disjuntos.

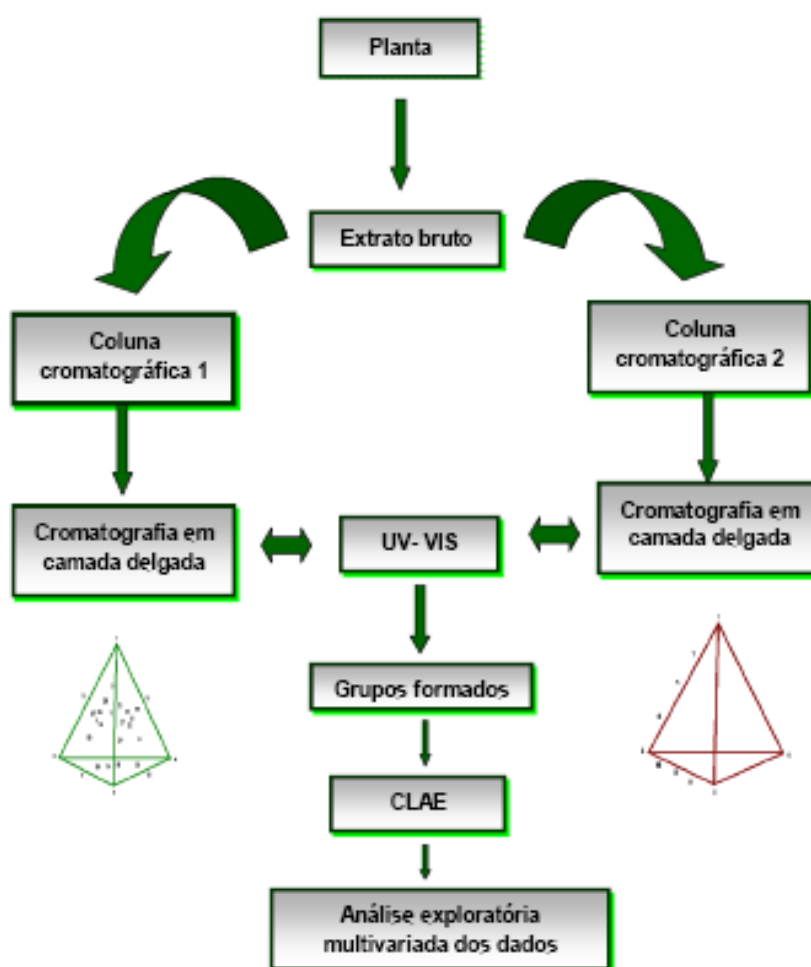


Capítulo III
Descrição
Experimental

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os aspectos relacionados ao procedimento experimental empregado na análise do fracionamento cromatográfico do extrato das folhas da *Erythrina speciosa* em coluna aberta serão abordados neste capítulo. Um resumo do procedimento experimental está representado na Figura 3.

Figura 3 - Procedimento experimental empregado no estudo do fracionamento cromatográfico do extrato (hexano, diclorometano e etanol (60/60/60 % (v)) das folhas da *Erythrina speciosa*.



3.1 INFORMAÇÕES SOBRE A PLANTA

Nome Científico: *Erythrina speciosa*

Nome Popular: Mulungu-do-litoral, Mulungu, Eritrina-candelabro, Corticeira

Família: Fabaceae

Divisão: Angiospermae **Origem:** Brasil **Ciclo de Vida:** Perene

Figura 4 - Foto da *Erythrina speciosa* coletada na Universidade Estadual de Londrina



A exsicata da planta está depositada no Herbário da Universidade Estadual de Londrina e autenticada por M.R.C. Paiva e registrada sob o número 35133.

3.2 COLETA DA PLANTA

As folhas da *Erythrina speciosa* foram coletadas na Universidade Estadual de Londrina (UEL), seguindo os mesmos padrões: folhas novas e bem verdes, livres de qualquer perfuração provocados por insetos ou queimaduras do sol. As coletas ocorreram no período de abril até outubro de 2008, sempre na parte da manhã para evitar qualquer oscilação de componentes químicos que podem ocorrer nas plantas ao longo do dia.

As folhas foram cortadas em pedaços bem pequenos para facilitar a secagem da mesma, que ocorreu em aproximadamente onze dias. Durante esse período as folhas ficaram ao ar livre, longe do calor e da umidade. Depois de secas as folhas foram trituradas em liquidificador, posteriormente armazenadas em béquer de vidro tampado com papel alumínio.

3.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Para o preparo do extrato bruto foram pesados 20 g das folhas de *Erythrina speciosa* e em seguida foi adicionado a essa massa 40 mL de etanol, 40 mL de diclorometano, 40 mL de hexano. Esta mistura ficou no banho ultrassom por 30 minutos e foram filtradas em algodão. Este processo foi repetido por três vezes e a mistura foi levada a evaporação no evaporador rotatório a temperatura de 60 °C. Depois da evaporação da mistura de solventes, os extratos foram colocados em frascos âmbar e armazenados a temperatura ambiente.

3.4 PREPARAÇÃO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA

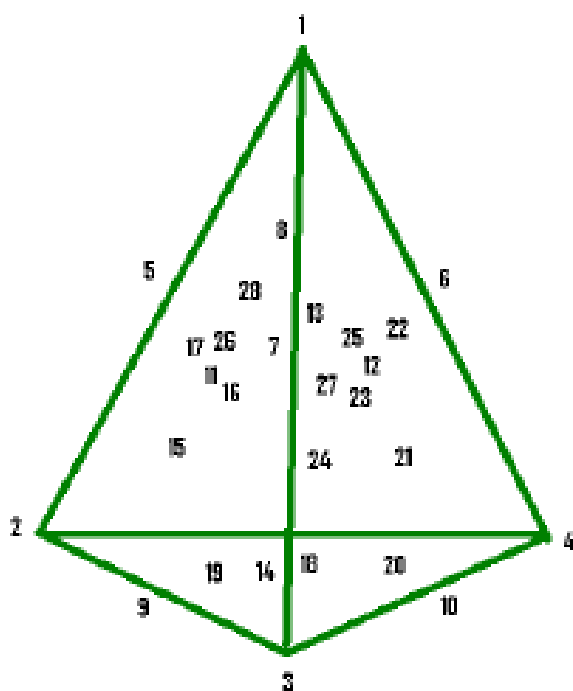
Foram pesadas 2 g do extrato bruto seco. Em uma cápsula de porcelana a amostra foi macerada juntamente com um pouco de sílica até ficar um pó bem fino. Em seguida a amostra foi colocada no topo da coluna preenchida com sílica gel 60 (0,2-0,5 mm) lentamente e foi adicionada quantidade de algodão suficiente para cobrir toda a amostra para manter a superfície uniforme.

A coluna cromatográfica 1 (CC1) foi fixada em suporte para buretas. O planejamento estatístico de misturas de quatro componentes usado na escolha das proporções dos eluentes da coluna está apresentado na Figura 5. Esse

planejamento é representado por um tetraedro no qual os vértices correspondem aos solventes puros, 1 hexano, 2 diclorometano, 3 acetato de etila e 4 metanol. Os demais pontos correspondem a misturas binárias na mesma proporção, misturas binárias em proporções diferentes, misturas ternárias na mesma proporção, misturas ternárias em proporções diferentes e mistura quaternária. A composição destas misturas está apresentada na Tabela 1, em ordem crescente de polaridade.

As vinte e nove fases móveis (FM) resultantes do planejamento estatístico foram eluídas em etapas, com modificação gradual da polaridade. Para cada fase móvel, Tabela 1, 250 mL foi usada na eluição. As frações foram coletadas em frascos transparentes de aproximadamente 20mL e enumeradas em sequência para posterior agrupamento das frações semelhantes.

Figura 5 - Planejamento de misturas com quatro componentes usados para escolha das proporções dos eluentes na CC1.



A coluna cromatográfica 2 (CC2) foi preparada em condições idênticas a primeira. Para as fases móveis (FM) foram usados os mesmos solventes (hexano/diclorometano/acetato de etila/metanol), porém, a eluição foi de acordo com o procedimento clássico, onde somente solventes puros e misturas binárias de solventes são utilizadas na fase móvel, Figura 6.

A composição das dez fases móveis para CC2 foram colocadas em gradiente crescente de polaridade, Tabela 2.

Foram eluídos 250 mL de cada fase móvel na coluna CC2 e as frações foram coletadas em frascos transparentes de aproximadamente 20 mL.

As frações foram reunidas em grupos com base em seu perfil por cromatografia em camada delgada e análise espectrofotométrica UV-VIS.

Tabela 1 - Composição da fase móvel para a coluna CC1 em gradiente crescente de polaridade.

FM	Hexano(H)	Diclorometano(D)	Acetato de etila (Ac)	Metanol(M)
1	1,00	0	0	0
2	0,75	0,25	0	0
3	0,75	0	0,25	0
4	0,60	0,20	0,20	0
5	0,50	0,50	0	0
6	0,60	0,20	0	0,20
7	0,60	0	0,20	0,20
8	0,50	0	0,50	0
9	0,33	0,33	0,33	0
10	0,50	0	0	0,50
11	0,33	0,33	0	0,33
12	0,20	0,60	0,20	0
13	0,20	0,60	0	0,20
14	0	1,00	0	0
15	0,33	0	0,33	0,33
16	0,25	0,25	0,25	0,25
17	0,20	0,20	0,60	0
18	0,20	0	0,60	0,20
19	0,20	0,20	0	0,60
20	0	0,50	0,50	0
21	0	0,60	0,20	0,20
22	0,20	0	0,20	0,60
23	0	0,50	0	0,50
24	0	0,33	0,33	0,33
25	0	0,20	0,60	0,20
26	0	0	1,00	0
27	0	0,20	0,20	0,60
28	0	0	0,50	0,50
29	0	0	0	1,00

Figura 6 - Fases móveis distribuídas em um tetraedro para CC2.

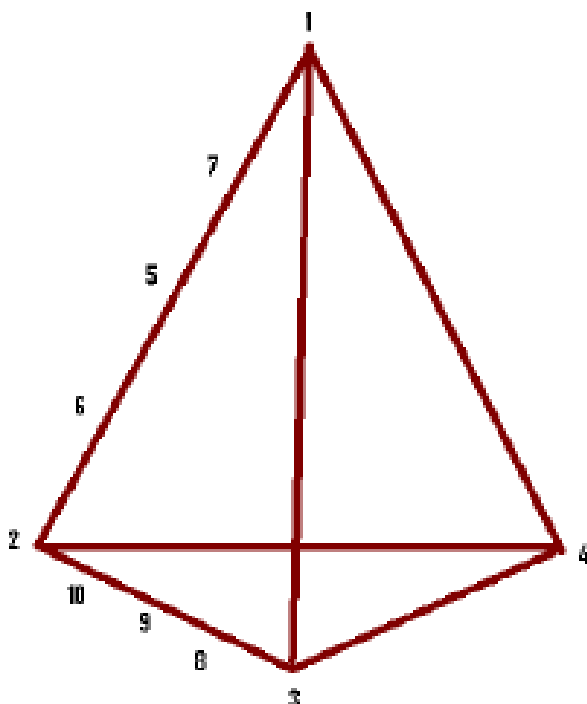


Tabela 2 - Composição da fase móvel para a coluna CC2 com gradiente crescente de polaridade.

FM	Hexano (H)	Diclorometano (D)	Acetato de etila (Ac)	Metanol (M)
1	1,00	0	0	0
2	0,75	0,25	0	0
3	0,50	0,50	0	0
4	0,25	0,75	0	0
5	0	1,00	0	0
6	0	0,75	0,25	0
7	0	0,50	0,50	0
8	0	0,25	0,75	0
9	0	0	1,00	0
10	0	0	0	1,00

3.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A preparação das placas de vidro foi feita utilizando-se espalhadores, que mantiveram as placas fixas em um suporte e sobre elas deslizaram um recipiente contendo a suspensão do adsorvente, nesse caso a sílica.

Enquanto o recipiente deslizava, deixava ecoar a suspensão, através de uma fenda regulável existente ao longo de sua base.

As amostras foram aplicadas nas cromatoplasmas na forma de solução, pois os solventes são bem voláteis e foram eliminados após aplicação. Para as aplicações foram utilizadas tubos capilares. As amostras foram aplicadas como uma faixa horizontal uniforme nas cromatoplasmas que tinham medida de 10 cm de comprimento.

Em uma cuba, as placas foram colocadas em contato com a fase móvel metanol. A detecção das placas foi feita por borrifamento de vanilina sulfúrica.

3.6 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO ULTRAVIOLETA - VISÍVEL

Após a cromatografia em camada delgada as frações foram submetidas a leituras no espectrofotômetro UV-VIS para visualização do perfil de cada espectro, Os espectros foram registrados na região de 190-800 nm em cubetas de quartzo com comprimento de caminho óptico de 10 mm.

3.7. CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As amostras já agrupadas foram diluídas em 4 mL do solvente, sendo 1mL de cada solvente, hexano diclorometano e metanol. As amostras ficaram no banho ultrassom por 30 minutos e deixadas em repouso por 1 hora. Foram filtradas em filtro Millipore millex com 0,22 μ m e colocadas no congelador.

Duas fases móveis foram usadas na CLAE, acetonitrila, água e metanol (35/30/35%(v)) e acetonitrila, água e metanol (17,5/65/17, 5%(v), respectivamente.

As amostras foram retiradas do congelador e estabilizadas a temperatura ambiente. 50 μ L da mistura amostra: fase móvel (1:1 v/v) foi injetada na alça de amostragem. A vazão da fase móvel foi 1mL. min⁻¹ e cada cromatograma foi monitorado nos comprimentos de onda de 210, 240 e 254 nm.

3.8. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da VETEC Química fina Ltda, álcool etílico, diclorometano P.A (99%), hexano P.A (99%), acetato de etila P.A metanol P.A (99%), metanol UV/HPLC grau espectroscópico (99,8%), acetonitrila grau espectroscópico (99,8%), água Milli-Q, sílica gel para cromatografia em coluna 60 (0,2 -0,5mm), sílica gel para cromatografia em camada delgada 60 (0, 060 - 0, 200 mm) - Vetec

3.9 EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro OCEAN OPTICS modelo CHEM 2000 UV-VIS na região de 200 a 900 nm
- Evaporador rotativo FISATOM 801
- Ultrassom ULTRACLEANER 1400 UNIQUE, liquidificador SKYMSSEN TA-02
- Cromatógrafo Líquido de alta eficiência THERMO ELECTRON CORPORATION FINNIGAN SURVEIJOR PLUS com detector PDA plus
- Coluna PHNOMENEX 4.60x250 nm Gemini C18 - 5 micrômetros
- Coluna de vidro de 30x2. 5 cm
- Placas de vidro 12x10 cm

3.10 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS

- Análise hierárquica e os gráficos foram feitos usando o software Statística 6.0.
- Os demais cálculos foram executados com programas em FORTRAN, desenvolvidos pela professora Doutora Ieda Spacino Scarminio -Departamento de Química - UEL.



Capítulo IV

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha do solvente foi baseada no triângulo de seletividade primeiramente proposto por Snyder-Rohrschneider para cromatografia ³⁶. A vantagem do triângulo de Snyder-Rohrschneider é o agrupamento de solventes de acordo com o tipo de interação soluto-solvente. Solventes quimicamente semelhantes possuem parâmetros de seletividade similares e fazem parte do mesmo grupo, no entanto podem apresentar diferentes valores de polaridades ³⁷. A Tabela 3 apresenta os valores de α (acidicidade), β (basicidade), π (dipolaridade) e ordem crescente de P(polaridade) para as fases móveis da CC1 e da CC2.

Os valores dos parâmetros α , π e β , da Tabela 3 para as misturas foram calculados pelas equações:

$$\alpha = \sum_{i=1}^n \alpha_i \phi_i , \quad (9)$$

$$\beta = \sum_{i=1}^n \beta_i \phi_i , \quad (10)$$

$$\pi = \sum_{i=1}^n \pi_i \phi_i , \quad (11)$$

onde n é o número de solventes, α_1 , π_1 e β_1 são os valores dos solventes puros e ϕ_i são as proporções das misturas.

A polaridade (P) das fases foram calculadas pela Equação 12. Para uma mistura de solventes, hexano/ diclorometano, por exemplo, a polaridade é dada por

$$P' = (a P_a + (b P_b \quad (12)$$

onde ϕ_a e ϕ_b representam a frações dos volume dos solventes hexano e diclorometano na mistura e P_a e P_b referem-se aos valores de P' dos solventes

puros. A "polaridade do solvente" pode ser definida como a capacidade total de solvatação, a qual depende de todas as interações soluto-solvente, específicas e não específicas ³⁸.

Tabela 3 - Valores de α , β , π e ordem crescente de polaridade para CC1 e CC2

Fracionamento CC1					Fracionamento CC2				
FM	a	P	π	P'	FM	a	P	π	P'
1	0	0	0	0,10	1	0	0	0	0,10
2	0,07	0	0,18	0,85	2	0,07	0	0,18	0,85
3	0	0,11	0,14	1,18	3	0,14	0	0,36	1,60
4	0,05	0,09	0,26	1,56	4	0,20	0	0,55	2,35
5	0,14	0	0,36	1,60	5	0,27	0	0,73	3,10
6	0,14	0,06	0,2	1,70	6	0,20	0,11	0,69	3,42
7	0,09	0,15	0,17	1,96	7	0,14	0,23	0,64	3,75
8	0	0,23	0,28	2,25	8	0,07	0,34	0,59	4,07
9	0,09	0,15	0,42	2,51	9	0	0,45	0,55	4,40
10	0,22	0,14	0,14	2,60	10	0,43	0,29	0,28	5,10
11	0,23	0,10	0,33	2,74					
12	0,16	0,09	0,55	2,76					
13	0,25	0,06	0,49	2,90					
14	0,27	0	0,73	3,10					
15	0,14	0,24	0,27	3,17					
16	0,17	0,19	0,39	3,17					
17	0,05	0,27	0,48	3,28					
18	0,09	0,33	0,39	3,68					
19	0,31	0,17	0,31	3,70					
20	0,14	0,23	0,64	3,75					
21	0,25	0,15	0,6	3,76					
22	0,26	0,26	0,28	3,96					
23	0,35	0,14	0,51	4,10					
24	0,23	0,24	0,51	4,16					
25	0,14	0,33	0,53	4,28					
26	0	0,45	0,55	4,40					
27	0,31	0,26	0,42	4,56					
28	0,22	0,37	0,42	4,75					
29	0,43	0,29	0,28	5,10					

A Figura 7 representa o triângulo de seletividade dos solventes para os eluentes com planejamento de mistura, enquanto que a Figura 8 representa o triângulo de seletividade para os eluentes da Tabela 2.

Figura 7 - Triângulo de seletividade de acordo com os valores da Tabela 3 para CC1

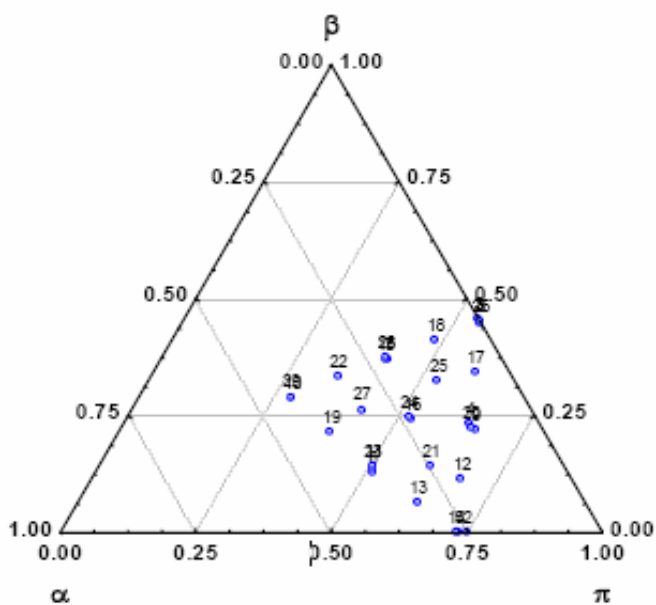
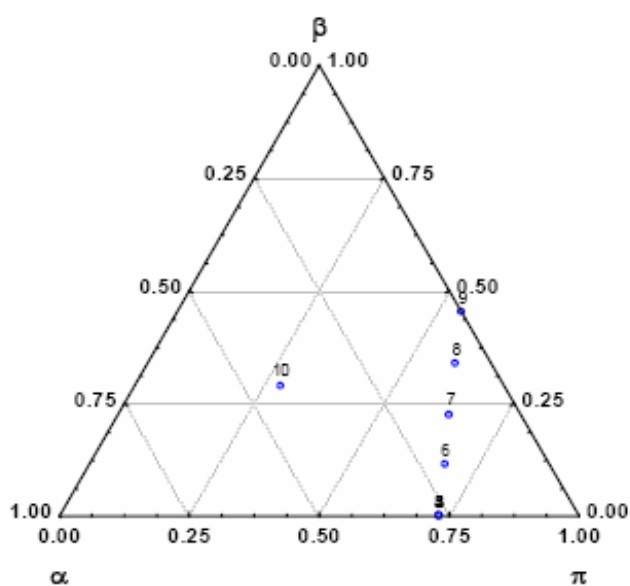


Figura 8 - Triângulo de seletividade de acordo com os valores da Tabela 3 para CC2.



Para criar uma maior mudança na seletividade, os solventes devem estar em diferentes partes do triângulo de seletividade. Comparando as Figuras 7 e 8 observamos um maior preenchimento no triângulo usando o fracionamento cromatográfico CC1 apresentado na Figura 7. Mesmo que o fracionamento cromatográfico CC2 fosse realizado utilizando-se o mesmo número de fases que o fracionamento CC1, os parâmetros solvatocrômicos continuariam apresentando o mesmo preenchimento no triângulo seletividade, Figura 8.

4.1 INFLUÊNCIA DA FASE MÓVEL DO FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA COLUNA CC1

O fracionamento cromatográfico CC1 do extrato etanol/diclorometano/hexano (60/60/60 % (v)) das folhas da *Erythrina speciosa* utilizando-se os eluentes do planejamento experimental apresentado na Tabela 1 resultou 580 frações. As frações foram reunidas com base em seu perfil cromatográfico, por meio da cromatografia em camada delgada de sílica e com auxílio da espectrofotometria de absorção resultando em 38 grupos de frações, Tabela 4. Estes grupos foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência em duas fases móveis, de forma isocrática, com forças distintas, ACN: água: MeOH (17,5/65/17,5 % (v)) (força 1) e ACN: água: MeOH (35/30/35 % (v)) (força 2).

Para auxiliar na interpretação dos resultados os cromatogramas, foram primeiramente analisados quanto ao número de picos.

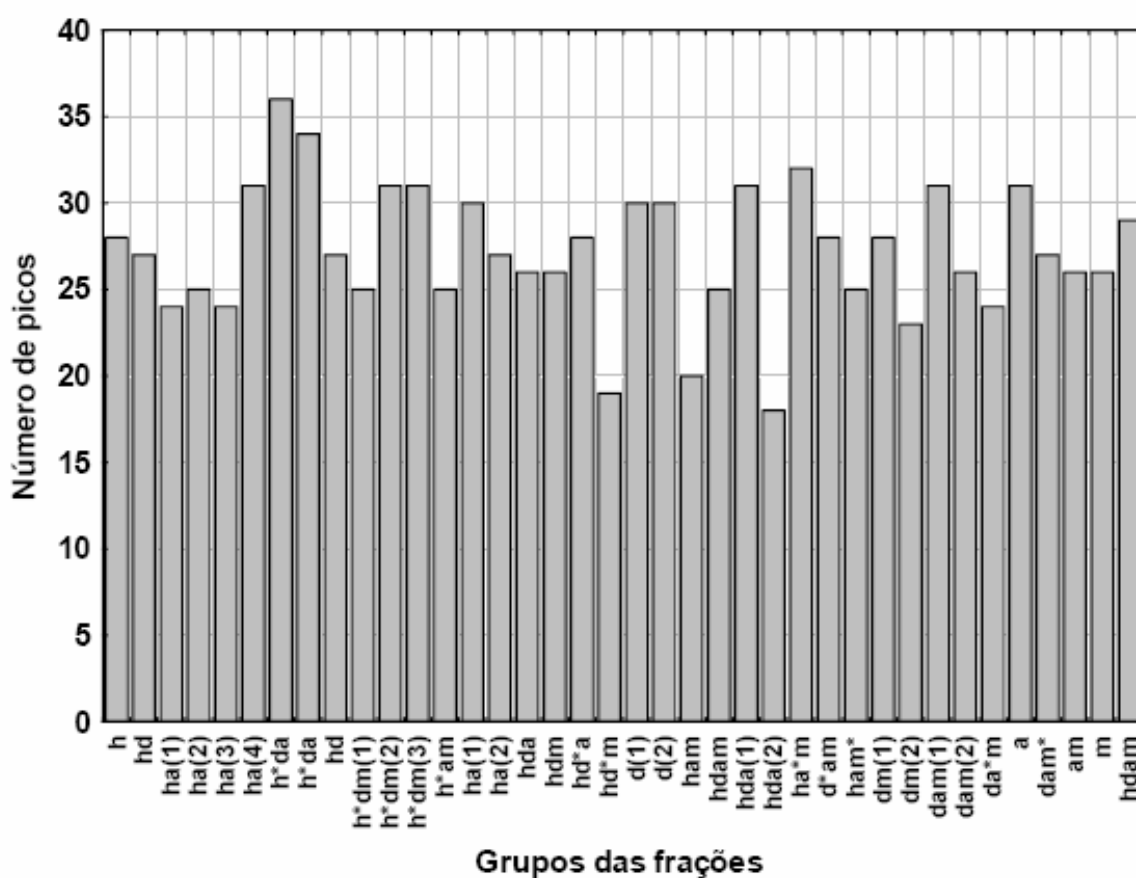
Observou-se que o aumento da força da fase móvel diminuiu o número de picos cromatográficos. Sendo assim, vamos discutir somente os resultados na fase móvel que forneceu o maior número de picos, ou seja, ACN: água: MeOH (17,5/65/17,5 % (v)).

Tabela 4 – Grupos de frações (GF) obtidas em CC1 e suas respectivas fases móveis

GF	H (%)	D (%)	Ac(%)	M(%)
1	1	0	0	0
2a	0,75	0,25	0	0
2b	0,75	0	0,25	0
2c	0,75	0	0,25	0
2d	0,75	0	0,25	0
2e	0,75	0	0,25	0
3a	0,6	0,2	0,2	0
3b	0,6	0,2	0,2	0
4	0,5	0,5	0	0
5a	0,6	0,2	0	0,2
5b	0,6	0,2	0	0,2
5c	0,6	0,2	0	0,2
6	0,6	0	0,2	0,2
7a	0,5	0	0,5	0
7b	0,5	0	0,5	0
8	0,33	0,33	0,33	0
10	0,33	0,33	0	0,33
11	0,2	0,6	0,2	0
12	0,2	0,6	0	0,2
13a	0	1	0	0
13b	0	1	0	0
14	0,33	0	0,33	0,33
15	0,25	0,25	0,25	0,25
16a	0,2	0,2	0,6	0
16b	0,2	0,2	0,6	0
17	0,2	0	0,6	0,2
1819	0,1	0,35	0,25	0,3
20	0	0,6	0,2	0,2
21	0,2	0	0,2	0,6
22a	0	0,5	0	0,5
22b	0	0,5	0	0,5
23a	0	0,33	0,33	0,33
23b	0	0,33	0,33	0,33
24	0	0,2	0,6	0,2
25	0	0	1	0
26	0	0,2	0,2	0,6
27	0	0	0,5	0,5
28	0	0	0	1

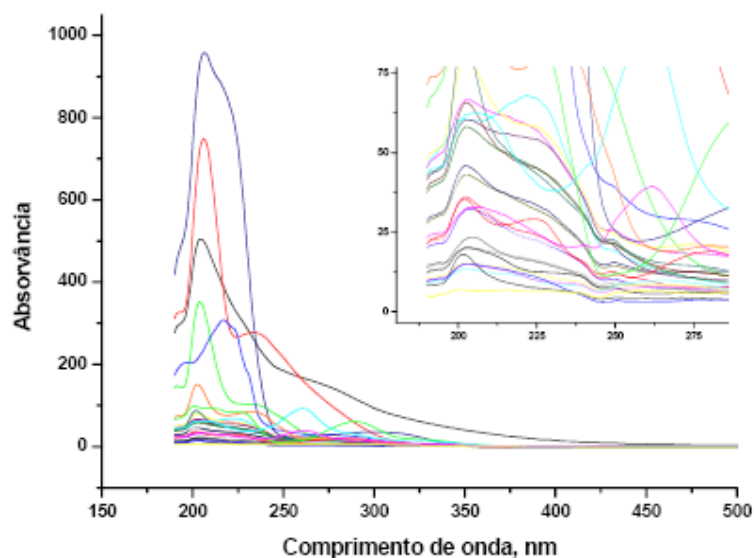
A Figura 9 mostra o gráfico do número de picos para cada grupo de frações obtidas no fracionamento cromatográfico CC1 analisadas na CLAE. Os resultados mostram que os grupos de frações eluídas em misturas binárias e ternárias apresentaram maior número de picos, em relação aos solventes puros. Por outro lado, não foi verificada nenhuma correlação entre o número de picos com os parâmetros solvatocrômicos ou polaridade.

Figura 9 - Número de picos para cada grupo de frações obtidas no fracionamento cromatográfico CC1. O asterisco significa maior porcentagem do solvente.



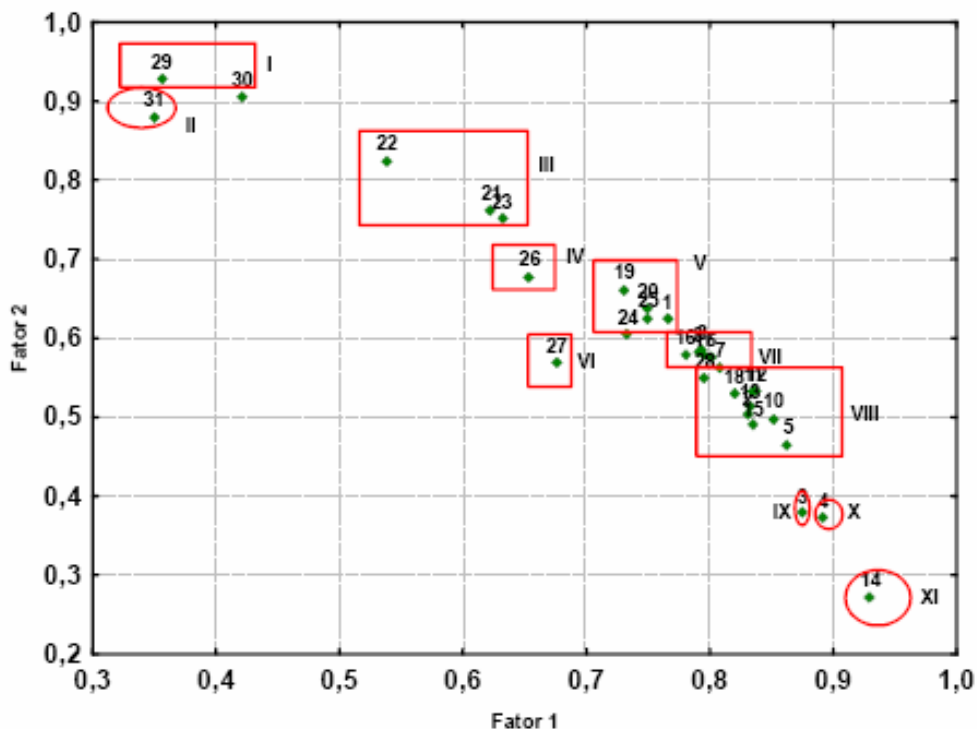
Na CC1, o maior número de picos foi do grupo de frações 3a reunidas da mistura ternária (hexano, diclorometano, acetato de etila (60, 20, 20 % v)). A Figura 10 mostra os espectros dos 31 picos no comprimento de onda de 190 a 800 nm e tempo de análise de 40 minutos.

Figura 10 - Espectros do cromatograma do grupo de frações 3a (hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v)), analisados na CLAE, fase móvel ACN:água:MeOH (17,5/65/17,5 % (v))



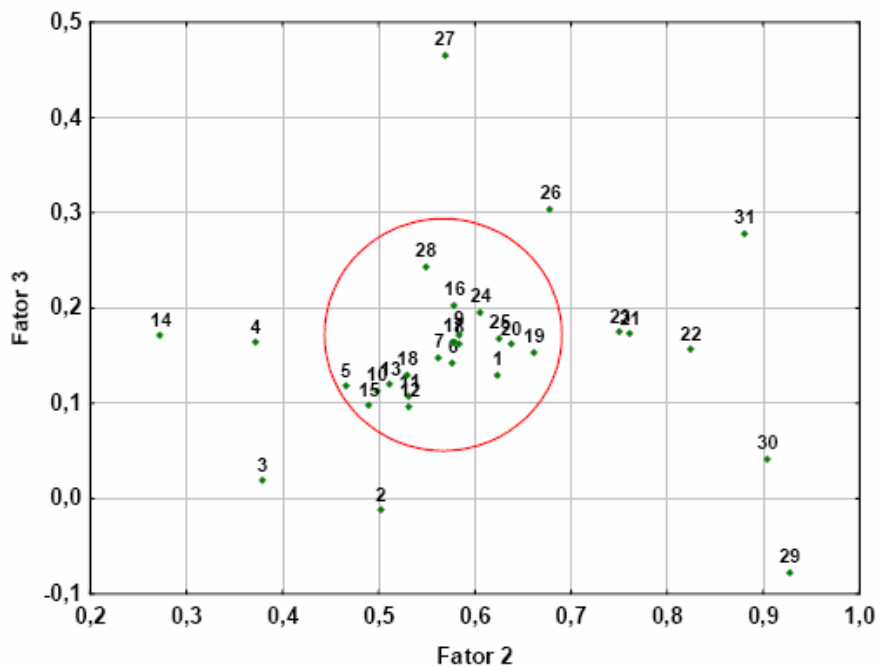
O conjunto de espectros foi colocado numa matriz 31x611 (31 espectros/amostras por 611 variáveis/ absorvâncias nos diferentes comprimentos de onda), correspondentes ao tempo de retenção de 40 minutos. Essa matriz foi submetida a análise de fatores (ou componentes principais) tipo Q, com normalização pelo comprimento do vetor. A melhor discriminação pode ser vista na projeção do fator 1x2, que juntos explicam 97% da variância total, Figura 11. Os grupos IX, X e XI estão na região mais positiva do Fator 1, enquanto os grupos I e II estão na região mais positiva do Fator 2. Os demais grupos têm a distribuição na diagonal, significando que tanto o fator 1 quanto o fator 2 exercem influência sobre os grupos III, IV, V, VI VII e VIII.

Figura 11 - Gráfico dos escores do F2 x F3 para espectros do GF 3a(hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v)) da CC1, analisados na CLAE na fase móvel ACN: água: MeOH (17,5/65/17,5 % (v)).



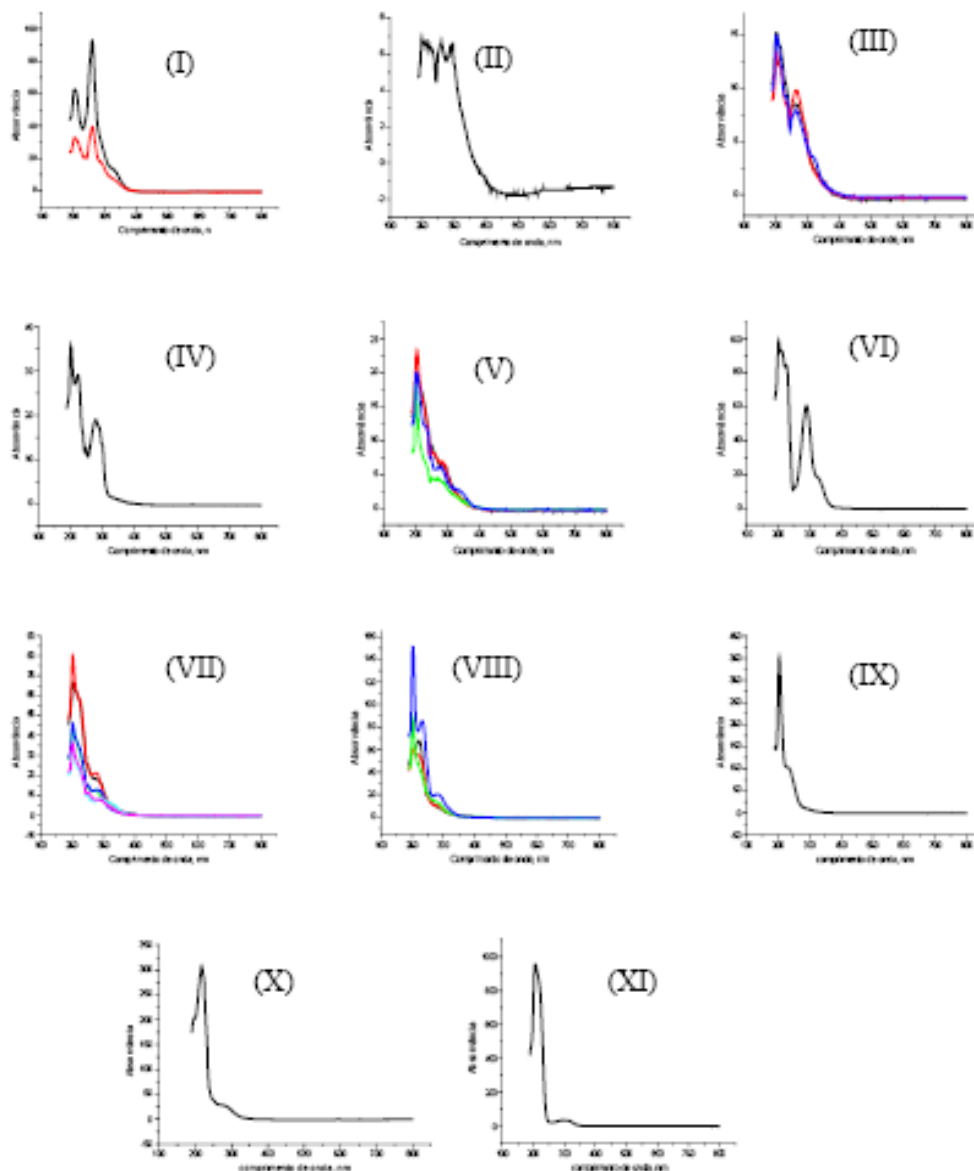
O gráfico dos escores do F2 x F3, Figura 12, mostra a formação de um grande grupo, enquanto os demais ficaram distribuídos aleatoriamente pelo gráfico. O grande grupo formado é constituído pelos grupos III, IV, V, VI, VII e VIII da Figura 11, indicando que esses grupos têm valores de absorção próximos uns dos outros, mas não na mesma região.

Figura 12 - Gráfico dos escores F2xF3 para os espectros do GF 3a(hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v)) da CC1, analisados na CLAE na fase móvel ACN: água: MeOH (17,5/ 65/17, 5 % (v)).



Os onze grupos discriminados na análise de fatores, Figura 11, estão apresentados na Figura 13. De acordo com os gráficos dos escores, os grupos III, IV, V, VI, VII e VIII tem os perfis mais próximos. Os grupos X e XI parecem similares, mas tem regiões de absorção diferentes.

Figura 13 - Espectros do cromatograma do grupo de frações 3a (hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v)), agrupados de acordo com a análise de fatores.

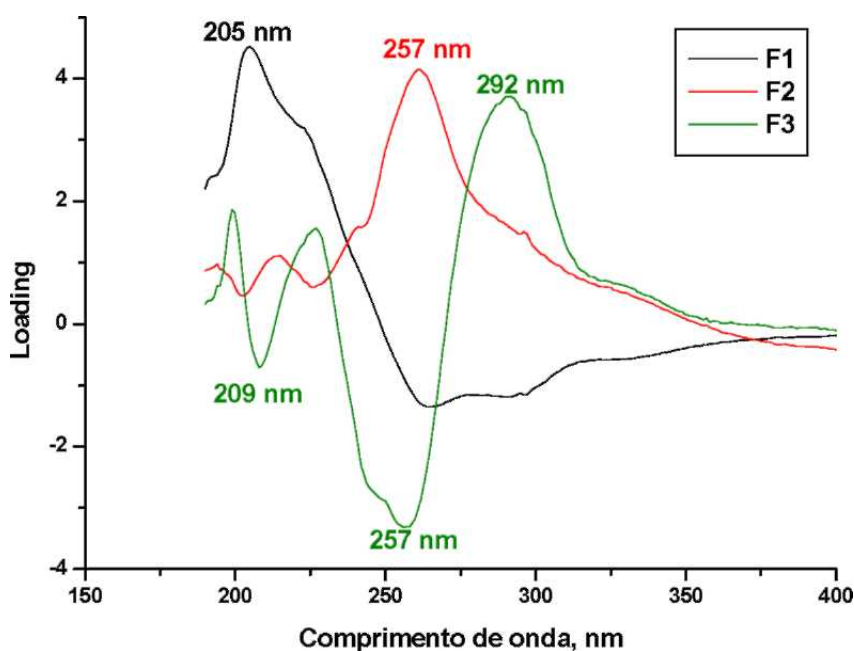


Os loadings dos Fatores 1, 2 e 3, estão apresentados na Figura 14. Nesta é possível ter uma idéia das regiões espectrais que permitem a distinção dos onze grupos formados na Figura 11.

Observa-se na Figura 14 que as amostras mais a direita do fator 1 são influenciados pela absorção em 205 nm, enquanto que no fator 2 a absorção

mais importante é do pico em 257 nm. No fator 3 mais positivo, as amostras apresentam baixas absorvâncias em 257nm e maiores em 292 nm.

Figura 14 - Gráfico dos loadings dos F1, F2 e F3 para os espectros dos picos referentes ao cromatograma do grupo de frações 3a(hexano, diclorometano, acetato de etila (60/20/20 % (v))).



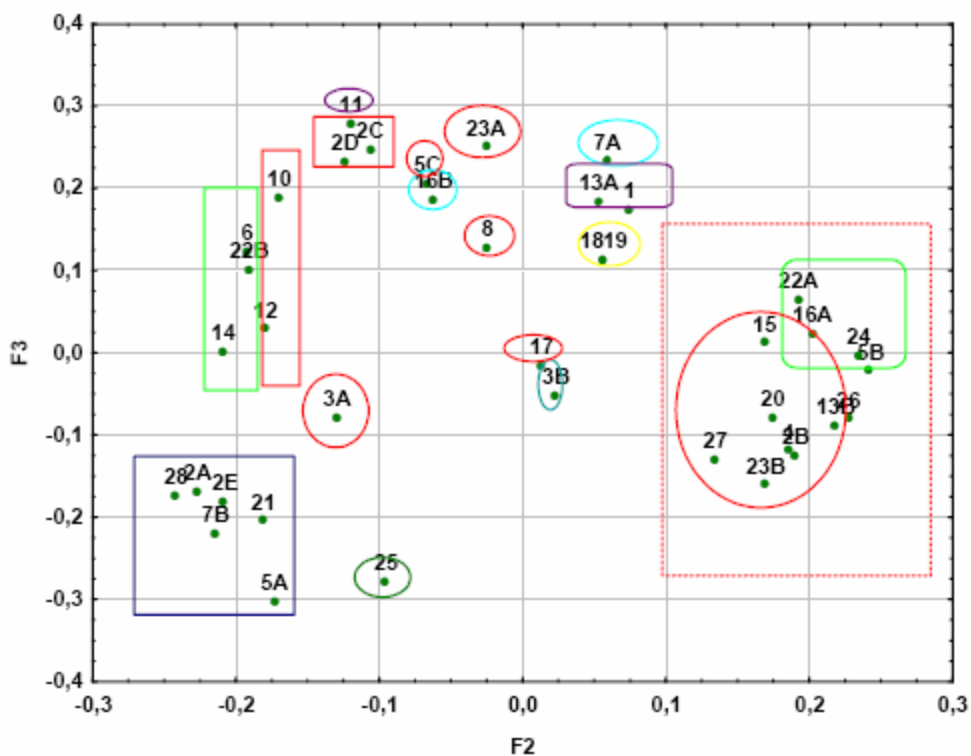
Os métodos quimiométricos de análise de fatores (ou componentes principais) e análise hierárquica (ligação completa) também foram usados para avaliar possíveis discriminações na composição química dos trinta e oito cromatogramas obtidos no fracionamento cromatográfico CC1 na fase móvel ACN: água: MeOH 17,5/ 65:/7, 5 % (v)).

Os cromatogramas foram colocados numa matriz 38x2400 (38 cromatogramas/amostras por 2400 variáveis/ altura dos picos), correspondentes ao tempo de retenção de 40 minutos. Essa matriz foi submetida ao pré - processamento por comprimento de vetor para diminuir as variações causadas pela quantidade de amostras injetadas e em seguida submetidas a análise de fatores.

Para explicar o conjunto de dados cinco fatores foram retidos para esse conjunto, que juntas explicam 85,5 % da variância total.

A melhor discriminação dos grupos pode ser vista na projeção da F2 e F3, Figura 15, que juntas explicam 29% da variância total, mostra a formação de 18 grupos distintos.

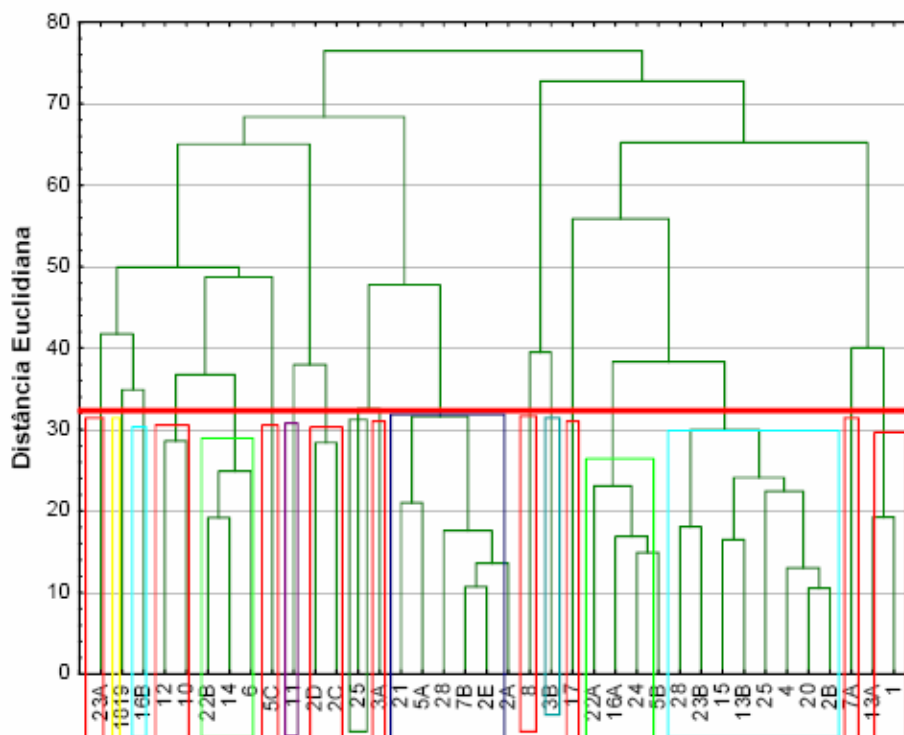
Figura 15 - Gráfico dos escores do F2 e F3 dos 38 cromatogramas da CC1.



Pelo gráfico dos escores percebemos que a polaridade não é um fator relevante na discriminação dos grupos, pois cromatogramas referentes à FMs com alta polaridade foi agrupado junto com cromatogramas referentes à FMs de menor valor de polaridade de acordo com os valores da Tabela 3.

O resultado da análise de fatores foi confirmado pela AH, Figura 16. Na distância Euclidiana de 32, foram discriminados os onze grupos da Figura 11.

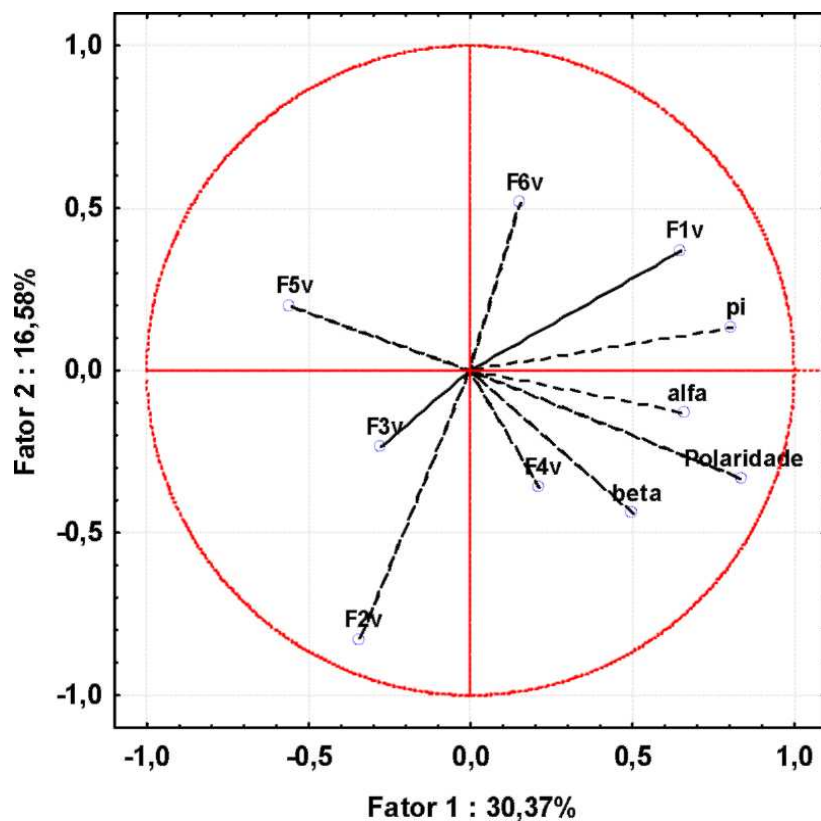
Figura 16 - Dendrograma referente aos cromatogramas do fracionamento CC1.



A matriz de correlação, no nível de 95% de confiança, correlaciona π com α (0,50); com P(0,70); β com P(0,70); a com P (0,69) e π com F1(0,38). Os fatores 2 e 5 são anticorrelacionados com π (-0,36/-0,35).

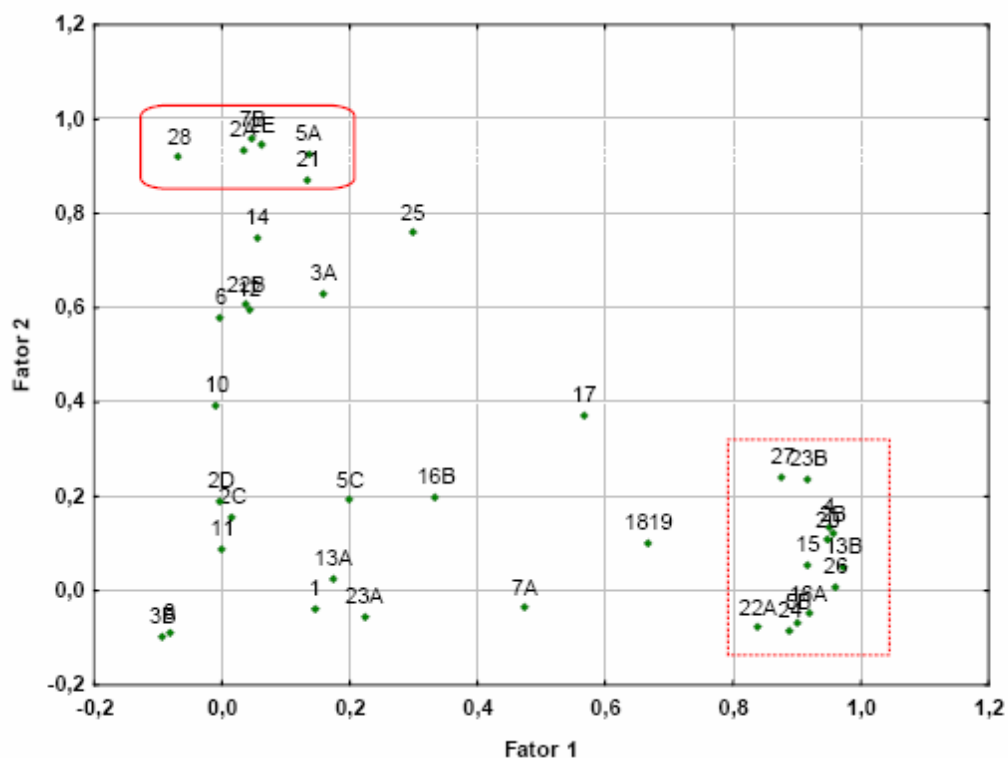
A Figura 17 apresenta as correlações existentes entre os fatores e os parâmetros solvatocrômicos. Observa-se na Figura, F1 e π estão no mesmo quadrante, enquanto que F2 está localizado no quadrante do lado oposto, indicando que F1 e F2 não são correlacionados.

Figura 17 - Gráfico de correlação entre os fatores e os parâmetros solvatocrômicos para os 38 cromatogramas na FM (ACN: Água: MeOH, 17,5/65/17,5%(v)).



A projeção do fator 1 e fator 2 referentes a matriz de correlação, Figura 18, discrimina um grupo na parte mais positiva do F1, que é o mesmo grupo discriminado na região positiva de F2, Figura 15. Esse grupo é formado pelos cromatogramas obtidos nas FMs 2b, 4, 5b, 13b, 15, 16a, 20,22a, 23b, 24, 26 e 27 com os maiores valores de %, de acordo com a Tabela 3, confirmando a correlação entre o F1 e π .

Figura 18 - Gráfico do F1x F2 da matriz de correlação referentes ao fracionamento CC1.



O grupo discriminado na região mais positiva do F2 são valores menores de π , de acordo com a Tabela 3.

4.2 INFLUÊNCIA DA FASE MÓVEL NO FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO CC2

O fracionamento cromatográfico CC2, utilizando-se como eluentes hexano, misturas de hexano/diclorometano, diclorometano, mistura diclorometano/acetato de etila, acetato de etila e metanol com gradiente crescente de polaridade (Tabela 2), gerou 195 frações. As frações foram reunidas com base em seu perfil cromatográfico, por meio da cromatografia em camada delgada de sílica e com auxílio da espectrofotometria de absorção resultando em 12 grupos de frações, Tabela 5. Estes grupos de frações foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência em duas fases móveis, de forma isocrática, com forças distintas, ACN: água: MeOH 17,5:65:17,5 % v/v/v (força 1) e ACN:água:MeOH 35:30:35 % v/v/v (força 2).

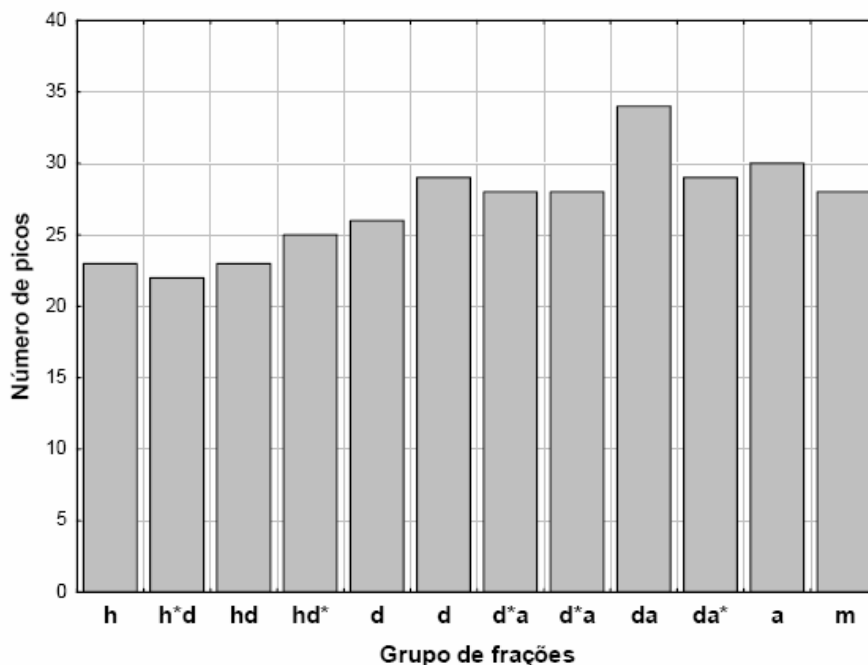
Tabela 5 - Grupo de frações (GF) obtidos no fracionamento CC2 e suas respectivas fases móveis.

GF	H(%)	D (%)	Ac (%)	M (%)
1	1	0	0	0
2	0,75	0,25	0	0
3	0,5	0,5	0	0
4	0,25	0,75	0	0
5a	0	1	0	0
5b	0	1	0	0
6a	0	0,75	0,25	0
6b	0	0,75	0,25	0
7	0	0,5	0,5	0
8	0	0,25	0,75	0
9	0	0	1	0
10	0	0	0	1

Observou-se que o aumento da força da fase móvel diminuiu o número de picos cromatográficos, assim como em CC1. Portanto, vamos discutir somente os resultados na fase móvel que forneceu o maior número de picos, ou seja, ACN: água: MeOH 17,5:65:17,5 % v/v/v.

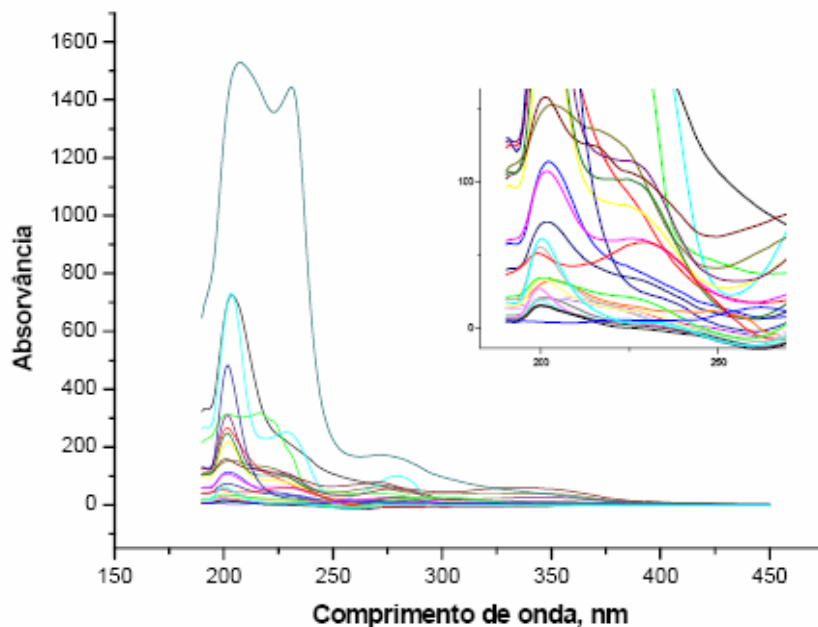
A Figura 19 mostra o gráfico do número de picos para cada grupo de frações obtidas no fracionamento cromatográfico CC2 analisadas na CLAE. Não foi verificada nenhuma correlação entre o número de picos com os parâmetros solvatocrômicos ou polaridade.

Figura 19 - Número de picos para cada grupo de frações obtidas no fracionamento cromatográfico CC2. O asterisco significa maior porcentagem do solvente.



Na CC2, o maior número de picos foi do grupo de frações 7 reunidas da fase móvel diclorometano e acetato de etila (50,50 % v). A Figura 20 mostra os espectros dos 29 picos no comprimento de onda de 190 a 800 nm e tempo de análise de 40 minutos. Os primeiros picos são ruídos e, portanto foram retirados das análises seguintes.

Figura 20 - Espectros do cromatograma do grupo de frações 7 (diclorometano e acetato de etila (50,50% v)), analisados na CLAE, fase móvel ACN:água:MeOH 17,5/65/17,5 % (v).



O conjunto de espectros dos picos foi submetido à análise de fatores. A melhor discriminação dos grupos foi na projeção do fator 1 e fator 2, Figura 21, que juntos explicam em torno de 93% da variância total, há formação de sete grupos.

O fator 2 discrimina o grupo I na região mais positiva dos demais grupos, que também foi discriminado pelo fator 1, ficando na região menos positiva deste fator. Fazendo uma análise da Figura 22, as amostras na região positiva do fator 2, tem mais baixa absorção em 261 nm, comparada com as amostras na região mais positiva do fator 1.

Figura 21 - Gráfico dos escores F1 e F2 referentes ao grupo de frações 7 (diclorometano e acetato de etila 50/50 % (v)).

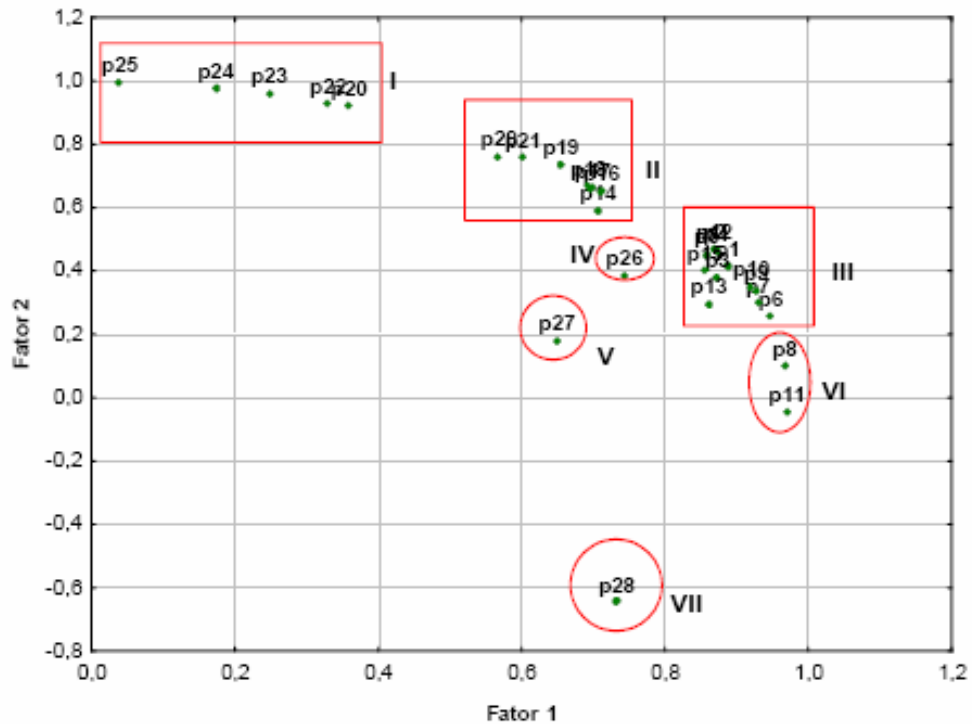
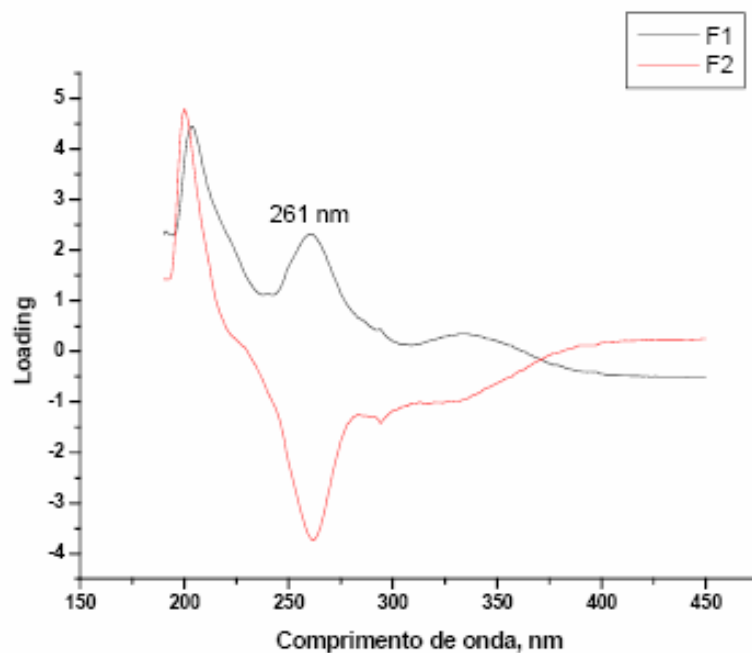
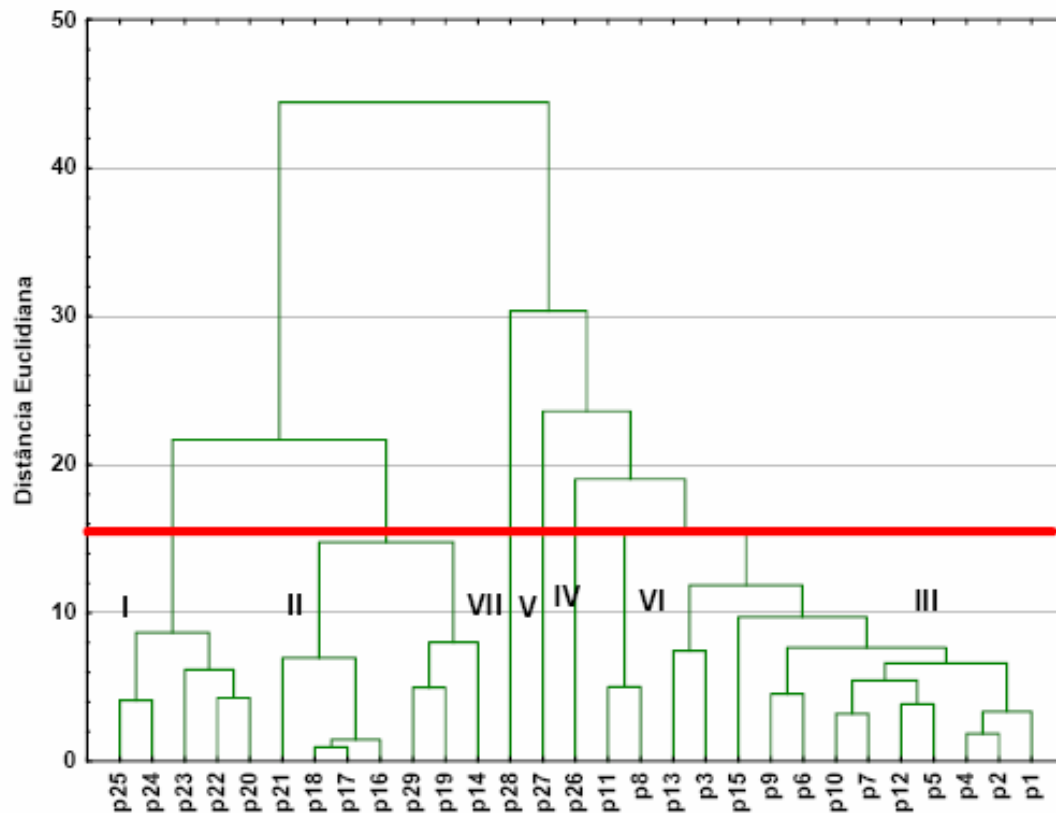


Figura 22 - Gráfico dos loadings dos F1, F2 para os espectros dos picos referentes ao cromatograma do grupo de frações 7 (diclorometano, acetato de etila (50/50 % (v))).



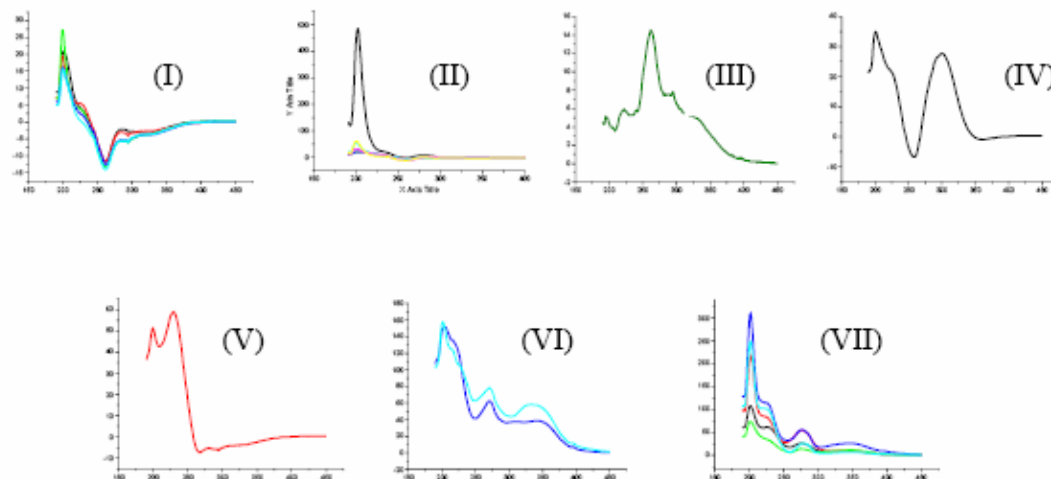
Os resultados da análise de fatores foram confirmados pela AH, Figura 23. Na distância euclidiana de 25 estão discriminados os mesmos sete grupos.

Figura 23 - Dendrograma referente aos espectros dos picos cromatográficos do grupo de frações 7 (diclorometano e acetato de etila (50/50 % (v))).



Os sete diferentes perfis de picos cromatográficos estão apresentados na Figura

Figura 24 - Perfis de espectros diferentes no grupo de frações 7 diclorometano e acetato de etila (50/50 % (v)).



Os métodos quimiométricos de análise de fatores (ou componentes principais) e análise hierárquica (HCA) também foram usados para avaliar possíveis discriminações na composição química dos doze cromatogramas obtidos no fracionamento cromatográfico CC2 na fase móvel ACN: água: MeOH 17,5:65:17,5 % (v).

Os cromatogramas foram colocados numa matriz 12x2400 (12 cromatogramas/amostras por 2400 variáveis/ altura dos picos), correspondentes ao tempo de retenção de 40 minutos. Essa matriz foi submetida ao pré - processamento por comprimento de vetor para diminuir as variações causadas pela quantidade de amostras injetadas e em seguida submetidas a análise de componentes principais.

A melhor discriminação dos grupos pode ser visualizada na projeção da CP2 e CP3, Figura 25. A CP2 consegue discriminar com 20,15% de variância os seis grupos, onde os grupos II e III estão localizados na região negativa da CP2 e os demais na região positiva. A CP3 com 15,70% separa o grupo I dos demais grupos com 12,21% de variância. Analisando os grupos, evidenciou-se que o grupo I difere-se dos outros devido a composição do solvente, sendo que nesse grupo encontra-se o hexano puro e uma mistura com 75% de hexano. Já o grupo VI contém o grupo de frações extraídas em solventes puros, diclorometano, acetato de etila e metanol. Os grupos IV e V contêm as frações em 75% de diclorometano. O grupo III é uma mistura de 50% de diclorometano e acetato de etila. O grupo II contém as frações

extraídas em 75%, 100% em diclorometano, mistura de hexano, diclorometano, 50% e acetato de etila 75%. Mais uma vez, este resultado mostra a influência do solvente na separação dos componentes químicos. Para confirmar os resultados da análise de fatores, a análise hierárquica de agrupamentos foi aplicada aos dados. O dendrograma obtido pelo conjunto de 12 amostras e 2400 valores de alturas de picos cromatográficos está representado na Figura 26. Podem ser observados no valor de distância Euclidiana de 0,7 os mesmos grupos formados na análise de fatores, Figura 25.

Figura 25 - Gráfico dos escores CP2 e CP3 dos dados cromatográficos na FM (ACN: Água: MeOH, 17,5/65/17,5 % (v)).

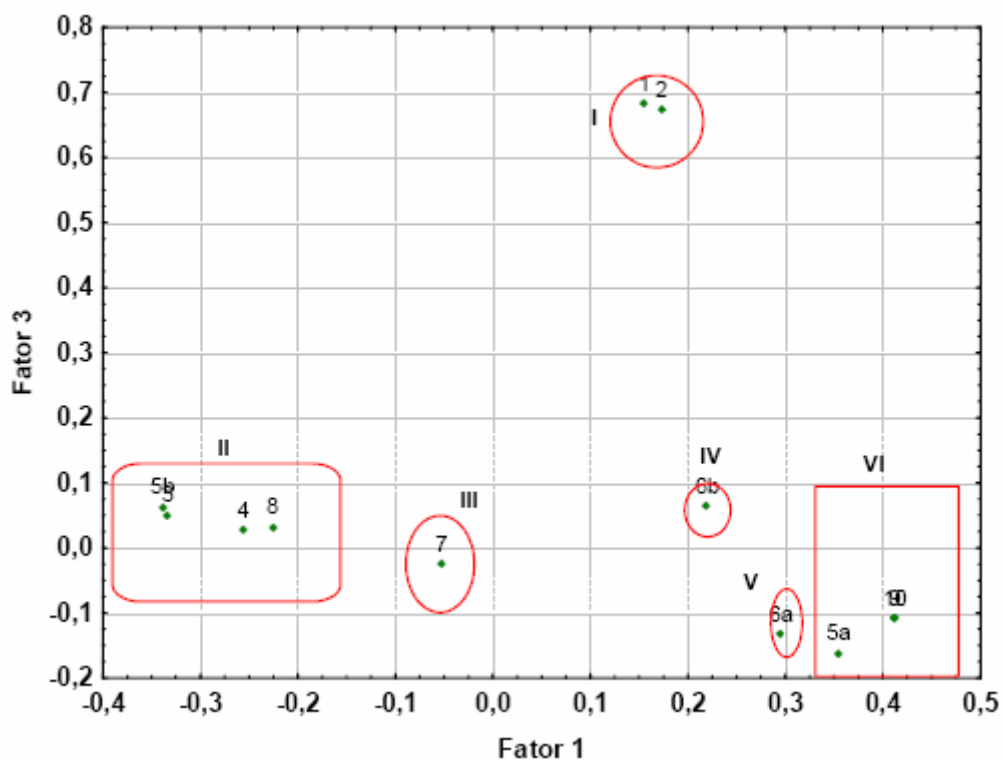
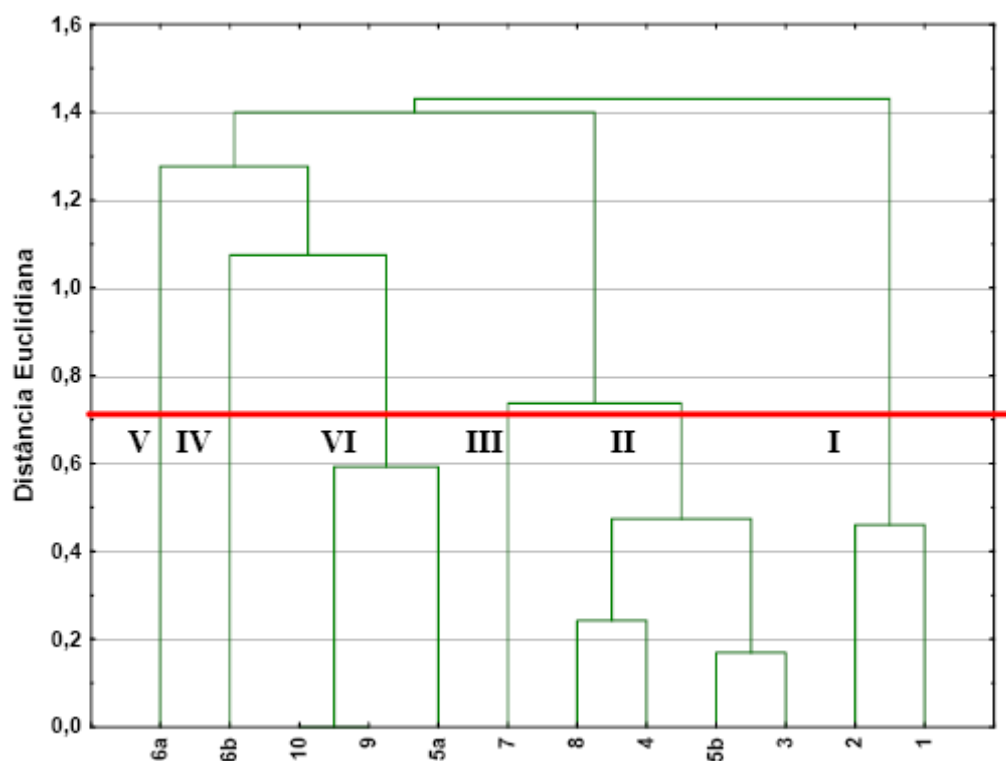


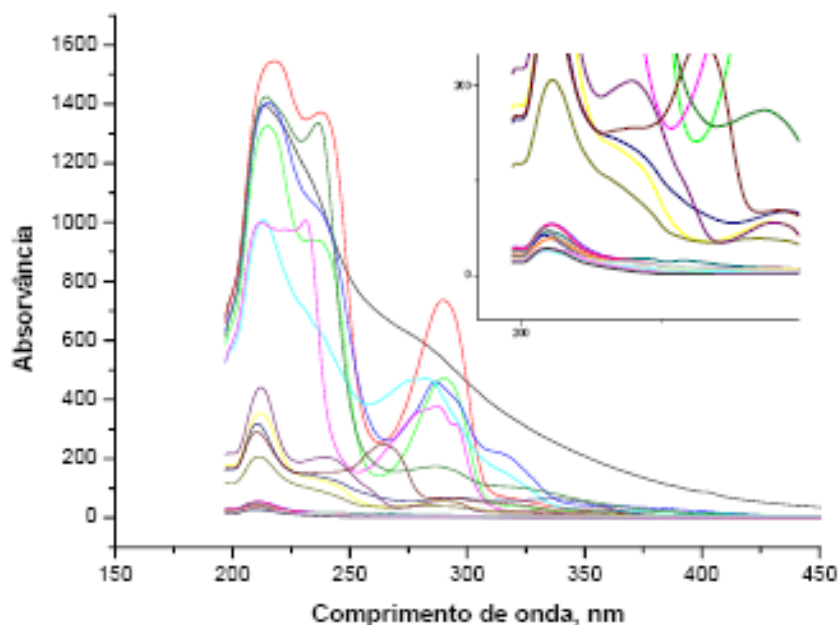
Figura 26 - Dendrograma referente aos dados cromatográficos na FM (ACN: Água: MeOH, 17,5/65/17,5 % (v)).



4.3 COMPARAÇÃO ENTRE CC1 E CC2

Na fase móvel diclorometano e acetato de etila 50,50 % (v), do fracionamento cromatográfico clássico CC2, obteve-se maior número de picos, portanto maior número de espectros que foram agrupados pela análise de fatores e análise hierárquica em 7 diferentes grupos de espectros. A mesma composição de fase na CC1 (grupo de frações 1819) apresentou 24 picos cromatográficos, Figura 27.

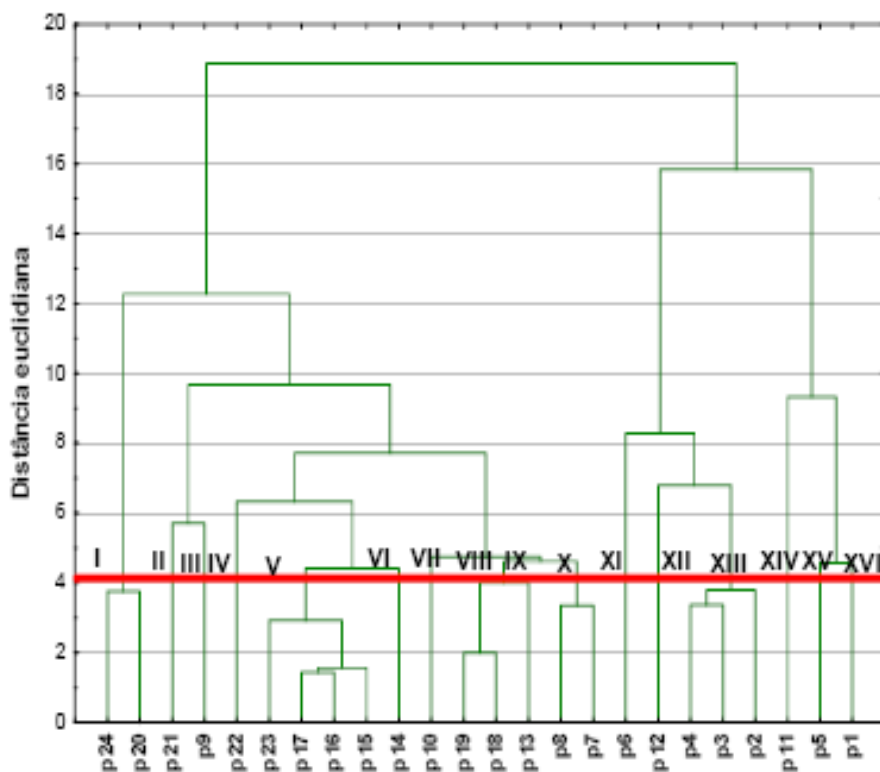
Figura 27 - Gráfico dos espectros da mistura diclorometano e acetato de etila (50/50 % (v)) na CC1.



A FM diclorometano e acetato de etila 50,50 % (v), no fracionamento clássico (CC2) foi a sétima fase a passar pela coluna em ordem crescente de polaridade, Tabela2. Essa mesma FM foi à décima oitava fase a ser passada na coluna (CC1) em ordem crescente de polaridade, Tabelai. O aparecimento de cinco perfis diferentes no fracionamento CC1 em relação a CC2 evidencia que as dezessete fases, incluindo misturas binárias, misturas ternárias e mistura quaternária, influenciaram positivamente na separação dos compostos químicos do extrato bruto fracionado.

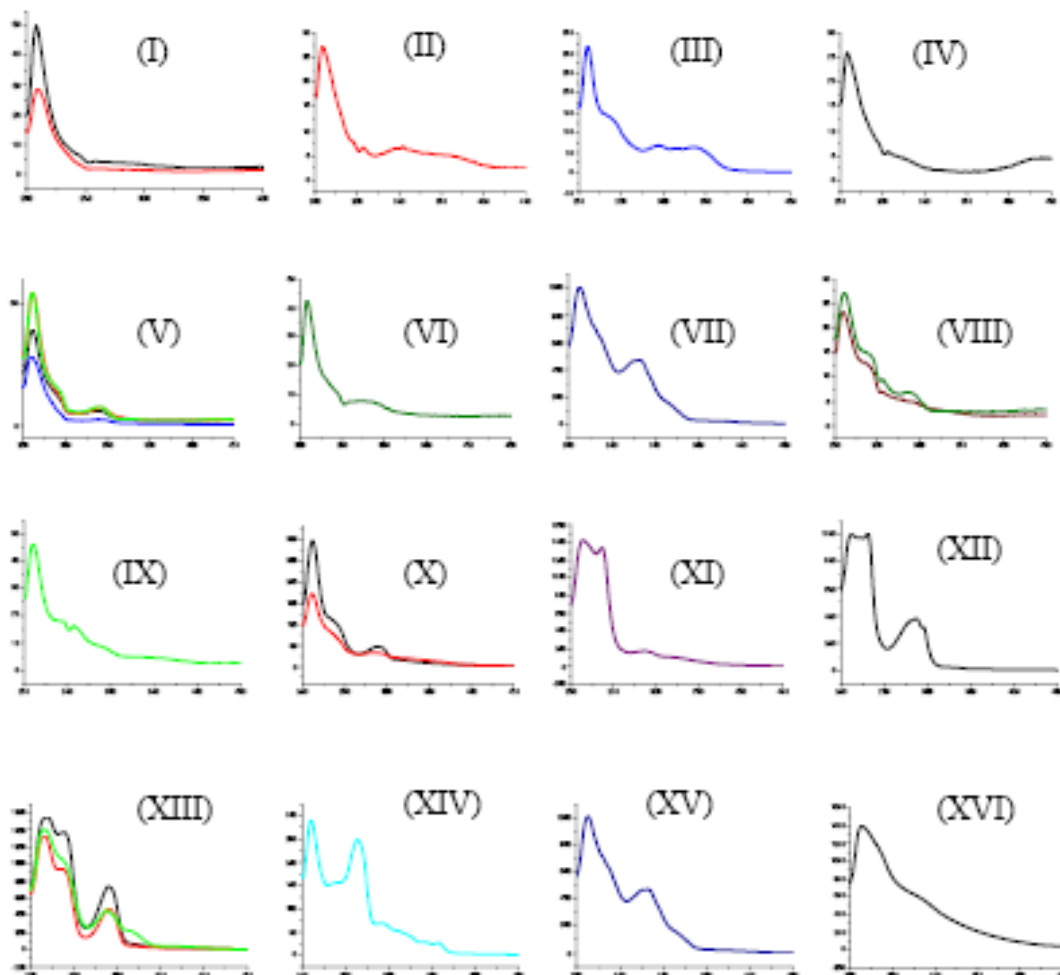
Estes espectros foram sujeitas a AH. Na distância Euclidiana 4 separa 16 grupos de espectros com perfis diferentes, Figura 28.

Figura 28 - Dendrograma referente aos espectros dos picos cromatográficos do grupo de frações 1819 (diclorometano e acetato de etila (50/50 %v)) na CC1.



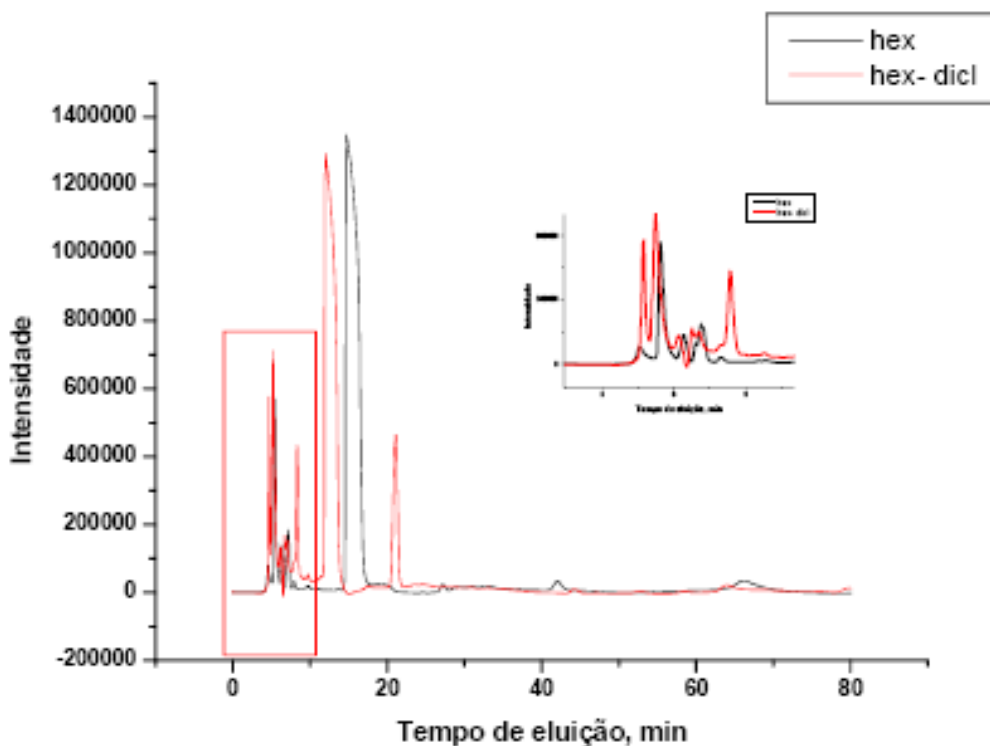
Os dezesseis perfis de espectros estão apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Grupos de espectros dos picos cromatográficos do grupo de frações 1819 (diclorometano e acetato de etila 50,50 % (v)) na CC1.



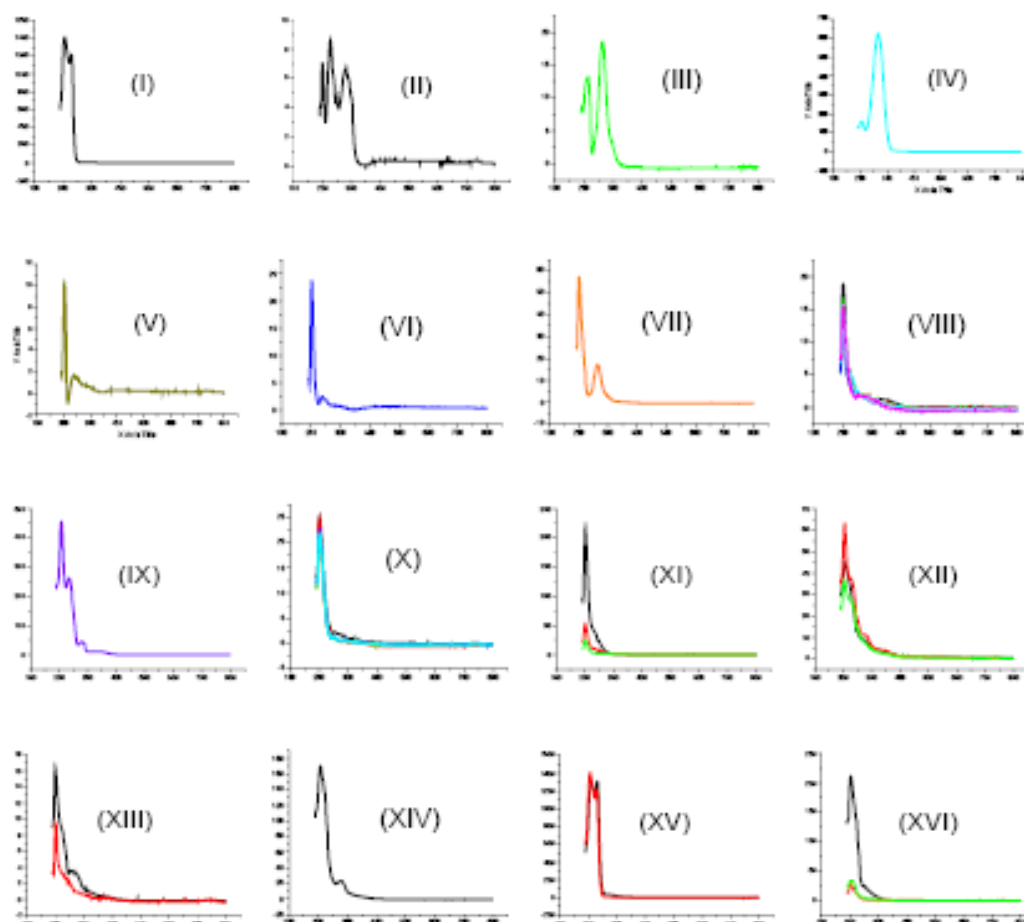
Em ambos os fracionamentos cromatográficos - o clássico e com planejamento de misturas - as duas primeiras fases móveis são as mesmas: hexano puro e mistura de 75% hexano e 25% diclorometano. Essa diminuição da proporção de hexano e a adição do diclorometano causam notável variação no cromatograma, Figura 30.

Figura 30 - Cromatogramas referentes ao grupo de frações obtido nos fraccionamentos cromatográficos (clássico e com planejamento de misturas) para a fase móvel hexano puro e mistura de hexano e diclorometano (75/25 % (v)).



O conjunto de espectros dos picos dos cromatograma referente ao grupo de frações obtido com a fase móvel hexano puro e mistura de hexano (75%) / diclorometano (25%) foram reunidos em uma única matriz, totalizando 41 valores de espectros de picos cromatográficos, sendo 22 espectros de picos para a FM hexano puro e 20 para a FM da mistura de hexano (75%) /diclorometano (25%). O conjunto de espectros de picos apresentou dezesseis grupos com perfis distintos, Figura 31.

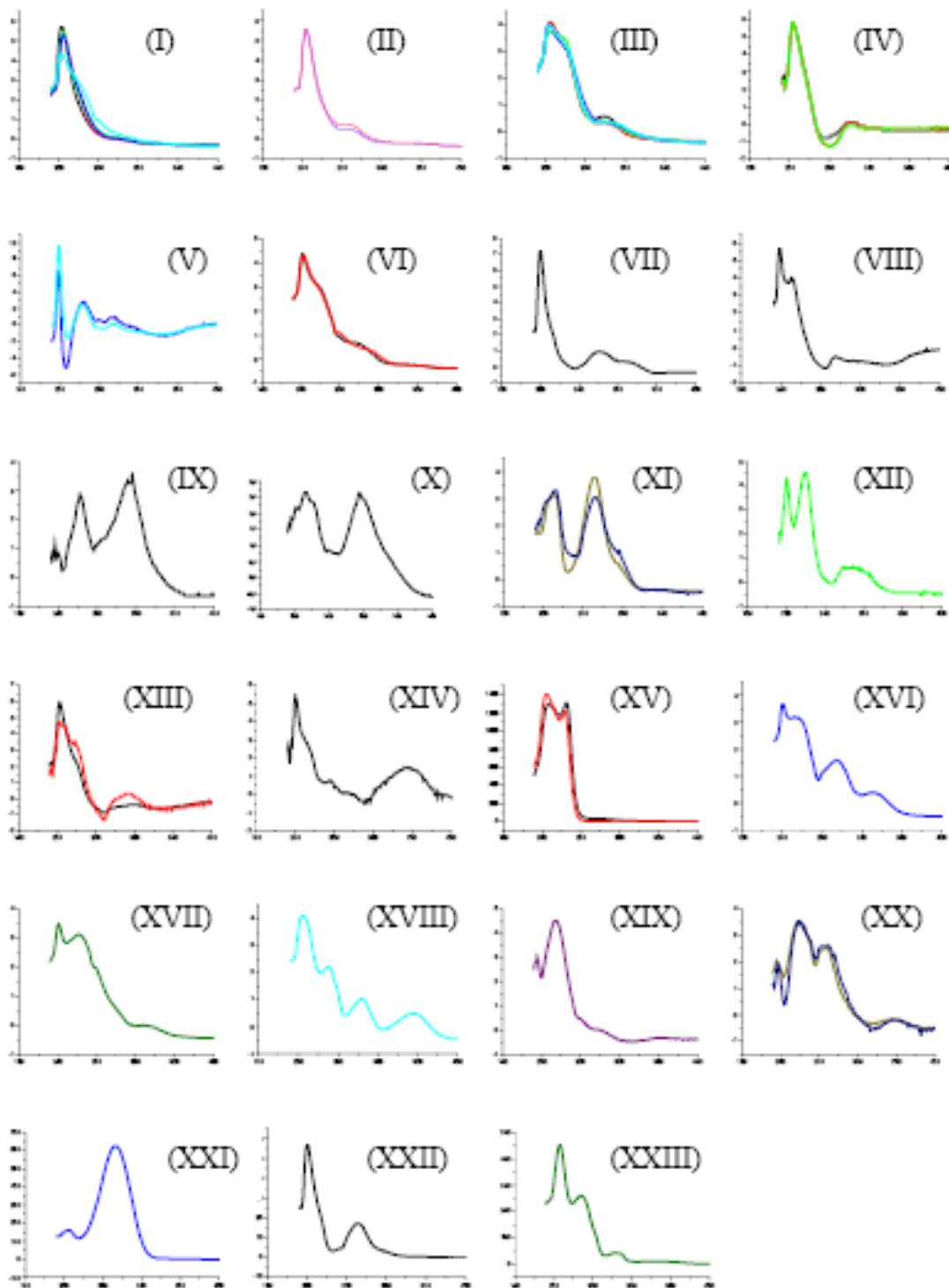
Figura 31 - Grupos de espectros da FM1 e FM2 do fracionamento cromatográfico CC1 e CC2.



Analisadas as duas primeiras FM, que são as mesmas em ambos os fracionamento, foi possível analisar a influência da terceira fase móvel do fracionamento CC1 e CC2 quanto ao número de espectros diferentes que foram acrescentados. A terceira FM no fracionamento CC1 é uma mistura binária de hexano e acetato de etila (75, 25 % (v)) e no fracionamento CC2 é uma mistura binária de hexano e diclorometano (50,50 %(v)).

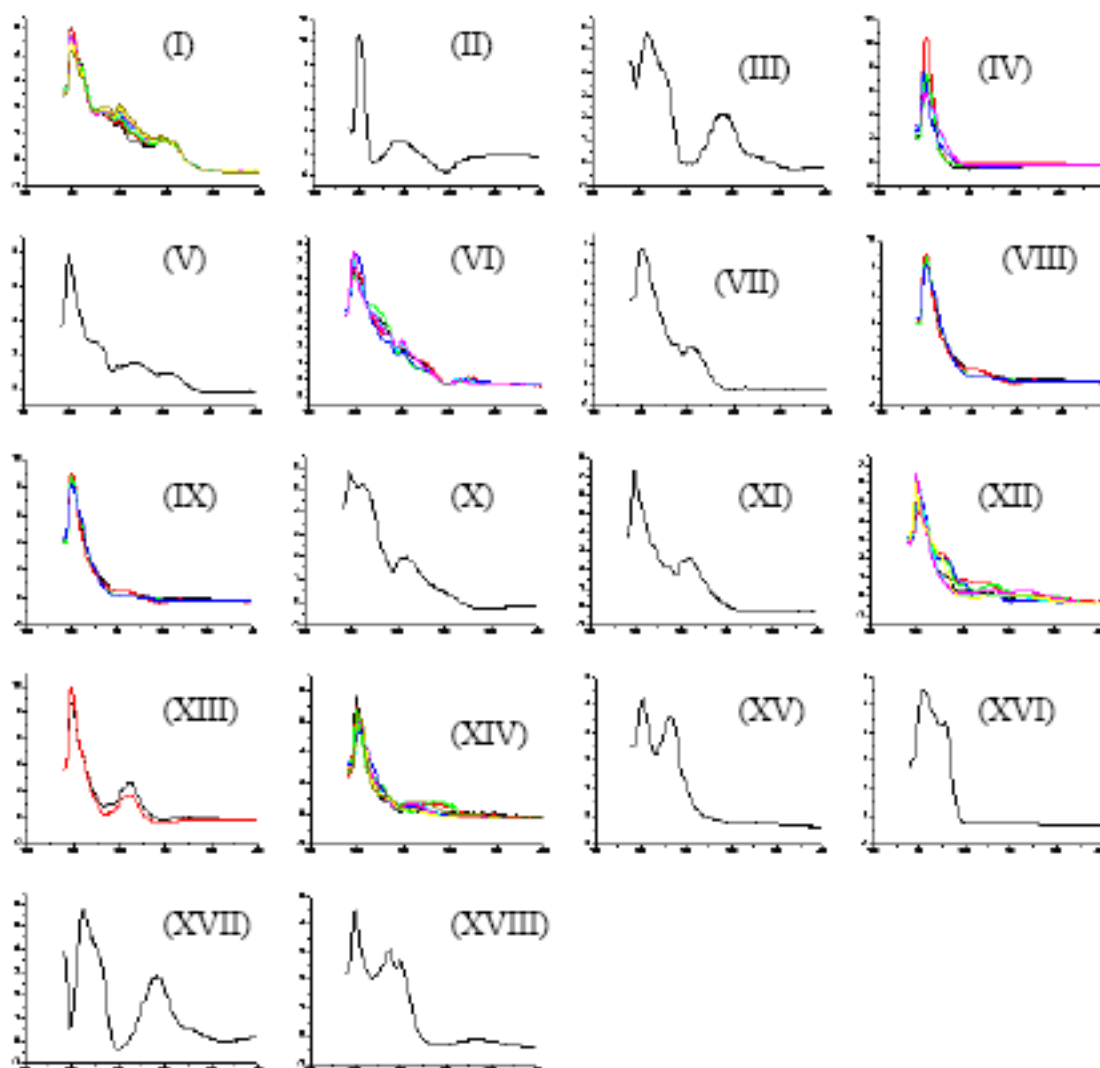
No fracionamento CC1, a FM1, FM2 e FM 3 apresentou 23 grupos de diferentes perfis de espectros, Figura 32.

Figura 32 - Grupo de espectros formados na FM1, FM2 e FM3 do fracionamento cromatográfico CC1.



No fracionamento CC2 a FM1, FM2 e FM 3 apresentou 18 grupos de perfis de espectros diferentes, Figura 33.

Figura 33 - Grupo de espectros formados na FM1, FM2 e FM3 do fracionamento cromatográfico CC2.



O aumento do número de diferentes perfis de espectros foi obtido no fracionamento CC1, sendo provavelmente um maior efeito sinérgico entre o hexano e o acetato de etila o responsável pelo aumento na seletividade dos espectros. A mudança na proporção do diclorometano da FM3 (50 %(v)) em relação a FM2 (25 %(v)) no fracionamento CC2 pouco influenciou na separação dos componentes químicos neste grupo de frações. Alguns espectros têm perfis parecidos, porém

absorvem em regiões diferentes. A AH e análise fatores não discriminaram esses grupos com perfis parecidos, mas com bandas de absorção em regiões diferentes.

Na 12ª fase móvel da CC1, (grupo de frações 5c) composta da mistura hexano, diclorometano e etanol (60/20/20 %v)), separou 27 compostos químicos que apresentaram 27 diferentes espectros. Os fatores 2 e 3 explicam 10% da variância total dos dados. A Figura 34 mostra o gráfico dos escores fator 2 com fator 3. Observa-se a formação de 11 grupos de espectros. No fator 2 os dois picos mais importantes correspondem as absorções nos comprimentos de onda 251 e 320 nm e no fator 3 231 e 339 nm, Figura 35.

Figura 34 - Gráfico dos escores F2 e F3 do grupo de frações obtidos da FM hexano, diclorometano e etanol (60/20/20 %v)).

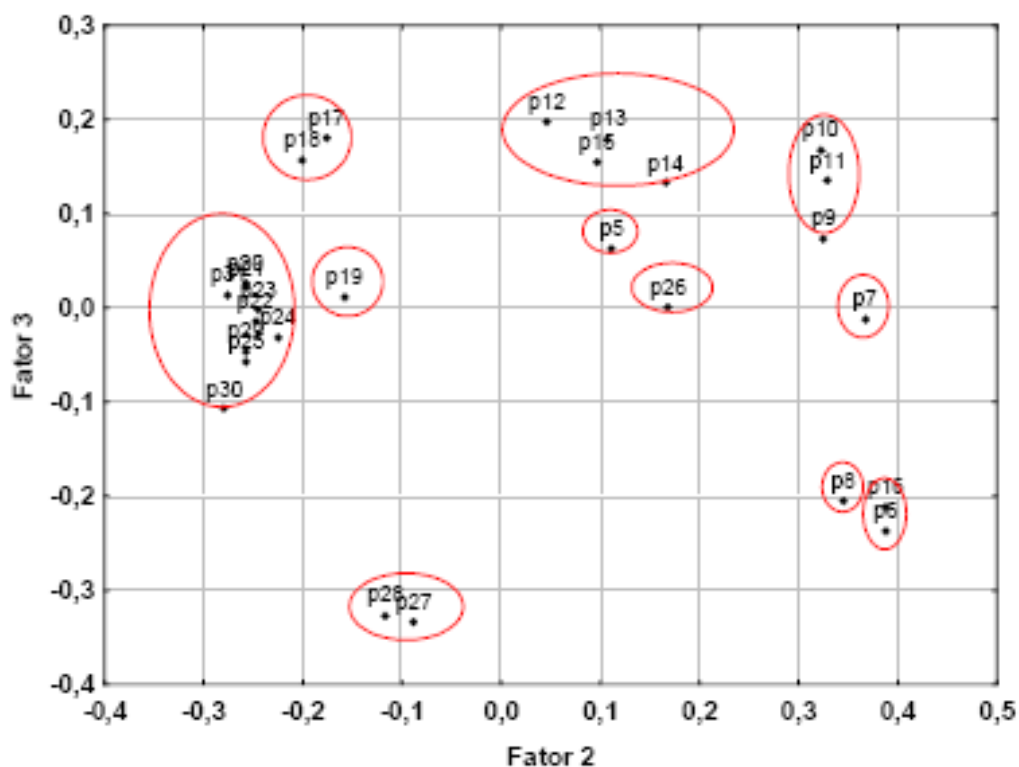
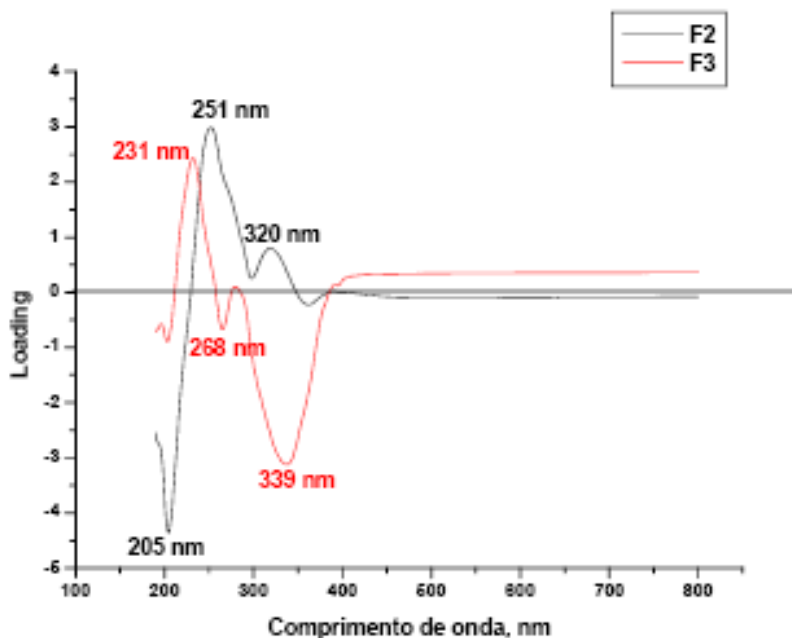


Figura 35 - Gráfico dos loadings dos F2, F3 para os espectros dos picos referentes ao cromatograma do grupo de frações 5c (hexano, diclorometano e etanol (60/20/20 %v)).



As Figuras 36 e 37 mostram os espectros correspondentes ao 7° e 25° picos eluídos na 12ª fase móvel da CC1. González-lavaut e colaboradores³⁹ isolaram um composto do extrato de *Erythrina fusca* Lour com absorvâncias em 249 e 320 nm, atribuídas a lactona α - β insaturada. Tanaka H. e colaboradores⁴⁰ isolaram três pterocarpanos (isoflavonóides) de extratos de *Erythrina crista-galli*, onde uma das moléculas isoladas apresentou bandas de absorção em 209 e 285 nm. Este resultado sugere que o extrato das folhas da *Erythrina speciosa* contém lactona α - β insaturada e pterocarpanos.

Figura 36 - Espectro do 7° pico do grupo de frações 5c(hexano, diclorometano e etanol (60/20/20 %(v))).

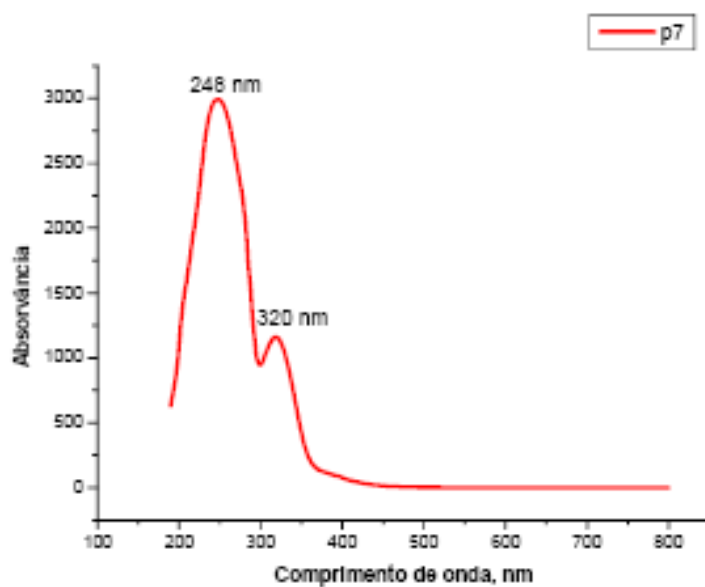
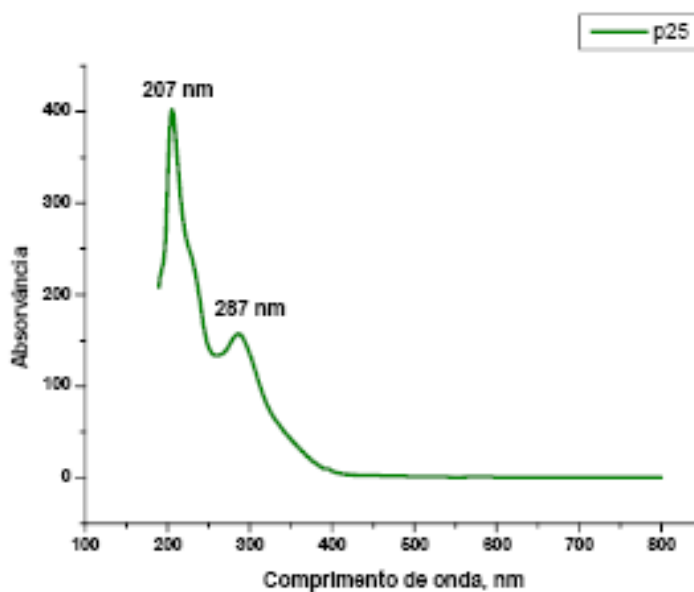


Figura 37 - Espectro do 25º pico do grupo de frações 5c(hexano, diclorometano e etanol (60/20/20 %(v))).



As Figuras 38 e 39 mostram os espectros dos constituintes químicos separados na CC1, na fase móvel composta por hexano, acetato de etila e metanol (60/20/20 % (v)); hexano e diclorometano (50/50 % (v)), respectivamente.

Figura 38 - Espectro do 22° pico do GF da fase móvel composta de hexano e diclorometano (50/50 % (v)).

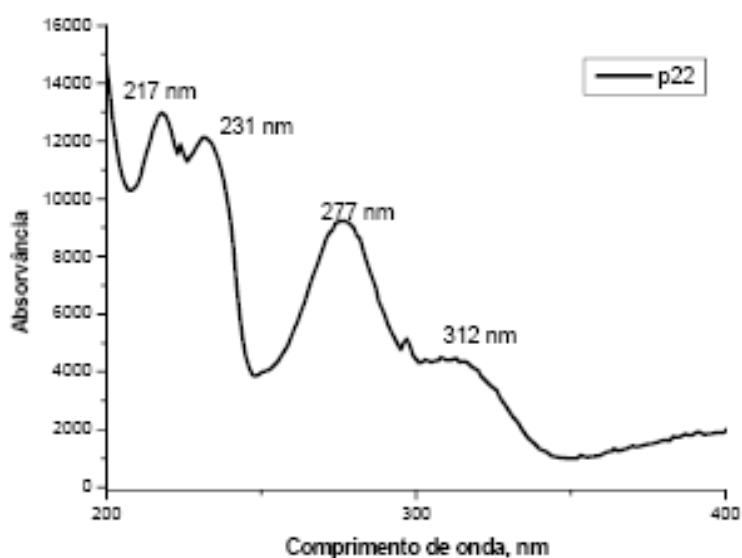
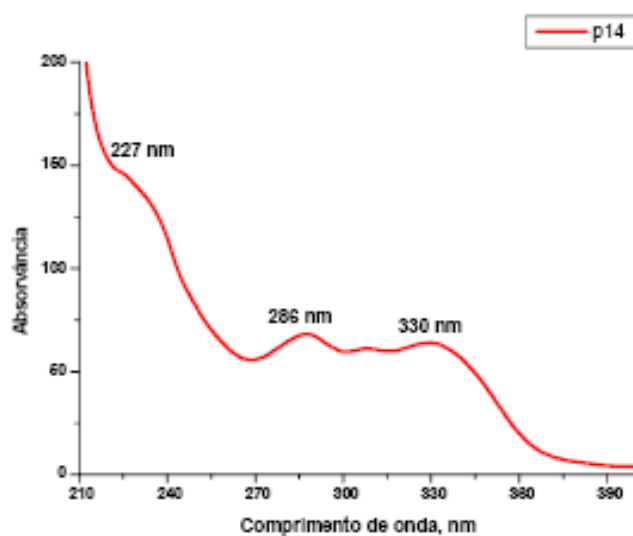


Figura 39 - Espectro do 14° pico do GF da fase móvel hexano, acetato de etila e metanol (60/20/20 % (v)).

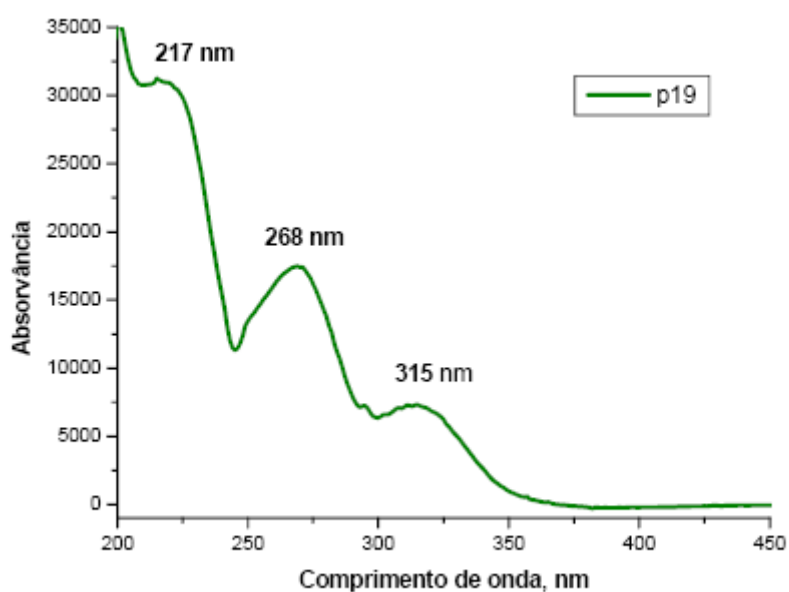


Cui e colaboradores isolaram dois compostos no extrato da *Erythrina abyssinica* com absorvâncias em 216, 237, 279 e 314 nm e 229, 288 e 330 nm, confirmados posteriormente como flavonas. As Figuras 38 e 39 apresentam bandas de absorção em 217, 231, 277 e 312 nm e 227, 296 e 330 nm, respectivamente.

Sendo assim, este resultado sugere a presença de flavonas no extrato estudado.

De acordo com a literatura ⁴², as bandas de absorção dos 19° pico do grupo de frações obtidos da mistura hexano e acetato de etila (75/25 % (v)) sugere a presença de flavonóides nesse grupo.

Figura 40 - Espectro do 19° pico do GF da fase móvel hexano e acetato de etila (75/25%(v)).





5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi feito um estudo da influência de quatro solventes no fracionamento com planejamento de misturas e envolvendo apenas solventes puros e misturas binárias do extrato das folhas de *Erythrina speciosa* A. Nossos resultados mostraram que:

- Dos parâmetros solvatocrômicos a , P e n para os solventes e misturas de solventes usados como fase móvel, somente o parâmetro n mostrou correlação na separação dos grupos na análise de fatores. A polaridade não foi correlacionada com separação, mas mostrou-se correlacionadas com os parâmetros solvatocrômicos a , P e n .

- O planejamento de misturas para fase móvel apresentou maior interação soluto-solvente, portanto maior seletividade na extração em relação às fases móveis usadas no fracionamento clássico. As misturas ternárias influenciaram positivamente no aumento da seletividade no fracionamento cromatográfico.

- O aumento da força da fase móvel diminuiu o número de picos, portanto quanto maior a força da fase móvel para cromatografia líquida em fase reversa menor será a quantidade de constituintes químicos detectados.

- A aplicação dos métodos quimiométricos aos dados cromatográficos obtidos por CLAE para o fracionamento cromatográfico clássico, o solvente influenciou na separação dos grupos independente da polaridade. Na análise de fatores o grupo I (GF 1, 2) foi discriminado na F2 e F3 em relação aos outros grupos por conter as amostras de hexano puro e a mistura com maior proporção de hexano. Os resultados foram confirmados pela análise hierárquica. O maior número de picos cromatográficos foi encontrado no grupo de frações obtidos pela fase móvel diclorometano e acetato de etila (50/50%(v)).

- A aplicação dos métodos quimiométricos aos dados cromatográficos obtidos por CLAE para as amostras do fracionamento cromatográfico com planejamento de misturas mostrou que o solvente e o parâmetro solvatocrômico n influenciaram na separação dos grupos. Os resultados obtidos pela análise de fatores também foram confirmados pela análise hierárquica. O maior número de picos cromatográficos foi encontrado no grupo das frações obtidas na fase móvel hexano, diclorometano e acetato de etila (60/20/20 % (v)).

Comparando o fracionamento CC1 e CC2 foi possível concluir que:

- No fracionamento CC1, os conjuntos de perfis de espectros formados foram maiores em relação a CC2, indicando maior separação dos constituintes químicos. Nas fases comparadas na cromatografia de coluna aberta o diclorometano e acetato de etila 50,50 % (v) presentes em ambos, hexano e acetato de etila (75/25%(v) da coluna CC1 e hexano e diclorometano, 50/50%v CC2, mostrou que a variação na proporção dos mesmos solventes provocou pouco aumento na seletividade em CC2.
- Com o uso de técnica hifenada, (CLAE e UV-Vis) e dados da literatura referentes às absorvâncias de espectros UV-Vis é possível inferir a existência de alguns compostos existentes no extrato das folhas da de *Erythrina speciosa* A., entre eles, sendo maior quantidade de alcalóides.

REFERÊNCIAS

1. CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 131-134, 2005.
2. GONG, F., LIANG, Y-Z, XIE, P-S, CHAU F-T, Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. **Journal of chromatography A**, 1002:25-40.
3. ZHANG, JIN-LAN et al. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 36:1029-1035, 2005.
4. ALAERTS, G. et al. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns **Journal of Chromatography A**, 1172:1-8, 2007.
5. BORGES, CLEBER N. et al. Mixture-mixture design for the fingerprint optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for *Camellia sinensis*. **Analytica Chimica Acta**, 595:28-37, 2007.
6. COENEGRACHT, P.M.J., SMILDE, A.K., METTING, H.J. Comparison of optimization methods in reversed-phase high-performance liquid chromatography using mixture designs and multi-criteria decision making. **Journal of Chromatography**, 485: 195-217, 1989.
7. MULHOLLAND M., NAISH P.J., STOUT, D.R. Experimental design for the ruggedness testing of high-performance liquid chromatography methodology. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 5: 263-270, 1989.
8. NYIREDY, SZ. Solid-Liquid Extraction Strategy on the Basis of Solvent Characterization. **Chromatographia Supplement**, 51:288-296, 2000.
9. SNYDER L.R.. Classification of the solvent properties of common liquids. **Journal of Chromatography**, 92:223-230, 1974.
10. SILVA, DOMINGAS CARDOSO DA. **Investigação das interações soluto-solvente e Solvente-solvente na solvatação preferencial da Merocianina de brooker em misturas binárias de Solventes**. 2002. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
11. REICHARDT, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. **Chem Rev**, 94; 2319-235B; 1994.
12. REICHARDT, C. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**; VCH: Weinheim, 2BS-40S; 19BB.

13. KAMLET, M. J.; ABOUD, J. L. M.; ABRAHAM, M. H.; TAFT, R. W. Linear Solvation Energy Relationships. A Comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters, K^* , a , and b , and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation. **J. Org. Chem.**, 48: 2877-2887, 1983.
14. SFMÓES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 1090, 2004.
15. BALUNAS, MARCY J.; KINGHORN, A. DOUGLAS. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, 78: 431-441, 2005.
16. PATHIRANA, C. L.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**: 93(1): 47-56, 2005.
17. AKINBORO, A.; BAKARE, A. A.. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, 112: 470-475, 2007.
18. CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, 55(2): 217-225, 2007.
19. FARIA, T.J. et al. ALCALÓIDES DE FLORES E FOLHAS DE *Erythrina speciosa* ANDREWS. **Química Nova**, 30 (3): 525-527, 2007.
20. VASCONCELOS, SILVANIA M. M. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal of Ethnopharmacology**, 110:271-274, 2007.
21. SOUZA, WESLEY MAURICIO DE. **ESTUDO QUÍMICO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ALCALÓIDES INDÓLICOS DE *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, APOCYNACEAE - (Agoniada)** 2008. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
22. PEREIRA, C. G. ROSA, P. T. V. MEIRELES, A. A. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC: Technical and economical analysis. **Journal of Supercritical Fluids**, 40: 232-238, 2007.
23. OLIVEIRA, JUAREZ SOUZA DE. **CARACTERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE COMPOSTOS DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)** 2005. Dissertação de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
24. SOARES, P. K. ; BRUNS, R. E. ; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design investigation of fractionated and total extracts from *Erythrina speciosa* Andrew leaves. **Journal of Separation Science**, 32: 644-652 2009.

25. SENISE, PASCHOAL. Química Analítica e Análise Química. **Química Nova**, 16(3): 257-261, 1993.
26. HOPKE, PHILIP K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, 500: 365-377, 2003.
27. NETO, B. B. SCARMINIO, I. S. BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, 29 (6): 1401-1406 2006.
28. GARCIA, LÍVIA MARIA ZAMBROSI. **Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *mikania laevigata* sch. bip. por métodos quimiométricos**. 2009. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
29. BEEBE, K.R. et al. *Chemometrics: a practical guide*. Editora John Wiley e Sons Ltd. New York, 1998.
 30. HENDRICKS, M.M.W.B. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, 545: 53-54, 2005.
31. ABDUL-WAHAB, SABAH A.; BAKHEIT, CHARLES S.; AL-ALAWI, SALEH M. Principal component and multiple regression analysis in modelling of ground-level ozone and factors affecting its concentrations. **Environmental Modelling & Software**, 20: 1263-1271, 2005.
32. FERREIRA, MÁRCIA M. C. Multivariate QSAR. **J. Braz. Chem. Soc.**, 13: (6), 742-753, 2002.
33. MOITA, JOSÉ MACHADO; MOITA, GRAZIELLA CIARAMELLA. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química nova**, 21(4): 467-469, 1998.
34. MASSART, D., L. et al. **Chemometrics: a textbook**. Elsevier, Amsterdam, 1988.
35. ANDERSON, R. E. et al **Análise Multivariada de Dados. 6ed**. Bookman Companhia, 2009.
36. SNYDER, L.R. Classification of the solvent properties of common liquids. **Journal of Chromatography**, 92: 223-230, 1974.
37. SNYDER, L.R., J.W. DOLAN. Grant. Gradient elution in High-Performance Liquid Chromatography. I. Theoretical basis for Reversed-Phase systems. **Journal of Chromatography**, 165: 3-30, 1979.
38. SILVA, DOMINGAS CARDOSO da. **Investigação das interações soluto-solvente e Solvente-solvente na solvatação preferencial da Merocianina de brooker em misturas binárias de Solventes**. 2002. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

39. CARBALLO-GONZÁLEZ, S. et al. Preliminary Phytochemical Screening and *in vitro* Antiherpetic activity of *Erythrina fusca* Lour. **Acta Farm. Bonaerense**, 23 (4): 453-8, 2004.
40. TANAKA, H. et al. Three pterocarpans from *Erythrina crista-galli*. et al. **Phytochemistry**, 45(4): 835-838, 1997.
41. CUI, L. et al. Automated off-line optimisation of programmed elutions in reversed-phase high-performance liquid chromatography using ternary solvent mixtures. **Analytica Chimica Acta**, 515: 127-141, 2004.
42. YAMAGUCHI, K. et al. Spectral Data of Natural Products. Tokyo: Elsevier Publishing Company, 1970.