



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAQUEL JUSTO

**SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS DO EXTRATO DAS  
FOLHAS DA *Bauhinia variegata* L. POR CROMATOGRÁFIA  
DE COLUNA PREPARATIVA E CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA:  
ESTUDO COMPARATIVO DE FASES**

---

Londrina  
2010

RAQUEL JUSTO

**SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS DO EXTRATO DAS  
FOLHAS DA *Bauhinia variegata* L. POR CROMATOGRÁFIA  
DE COLUNA PREPARATIVA E CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA:  
ESTUDO COMPARATIVO DE FASES**

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>41</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ieda Spacino Scarminio

Londrina

2010

RAQUEL JUSTO

**SEPARAÇÃO DE METABÓLITOS DO EXTRATO DAS FOLHAS DA  
*Bauhinia variegata* L. POR CROMATOGRAFIA DE COLUNA  
PREPARATIVA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA:  
ESTUDO COMPARATIVO DE FASES**

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.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréa Diniz (UEM)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Juliana Feijó de Souza Daniel (UTFPR)

Londrina, 12 de março de 2010

*Dedico esse trabalho as pessoas de minha família, aos meus pais Geraldo Justo e Aparecida Donizeti da Silva Justo pelo apoio e amor incondicional, ao meu marido Cesar Cristiano da Fonseca, como gratidão e amor pela ajuda e companheirismo e ao meu filho Murilo Fonseca, por me fazer ser mãe e descobrir um amor imenso.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho, por me ter feito conhecer o seu amor e ter me suprido com toda sabedoria e força em todos os momentos desta trajetória.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Química que possibilitou esta oportunidade de amadurecimento intelectual e pessoal.

Em especial à Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio pela excelente orientação desde a iniciação científica como no presente trabalho, por amizade, companheirismo, paciência, dedicação, incentivo, garra, ensinamentos transmitidos, e por ter me estendido a mão para ajudar-me a subir mais esse degrau.

Aos docentes do Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais pelo ensinamento e auxílio em meu crescimento profissional.

Ao técnico Jurandir Pereira Pinto, Didi, pelo auxílio no uso do Cromatógrafo a Líquido. Aos meus colegas do mestrado, em especial a Daniely Xavier Soares pela amizade, paciência e companheirismo nestes anos de convivência.

A minha amiga, irmã de coração e companheira de laboratório desde o tempo da iniciação científica, Sabrina Afonso, pela qual eu possuo imenso respeito, gratidão e carinho. Obrigada por todos os momentos.

Aos amigos de todas as horas: Renata Afonso, Elaine Cristina Rodrigues Maia e Edmar Fernando de Oliveira pelo apoio, carinho e amizade que nunca há de se perder no tempo e no espaço.

Aos pesquisadores do Laboratório de Eletroquímica e Matérias do Depto. de Química da UEL em especial ao Danilo e ao Bott pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos. Aos colegas de laboratório, especialmente à amiga Talita Fogaça.

À minha família: Pai, Mãe, Nato, Dé, Helen, por todo amor e carinho, que me proporcionaram força e razão para continuar.

Aos meus sobrinhos, Brenda, Rafael, Lorena, Nicolás e Theo por toda magia presente em seus olhinhos brilhantes me dando força para seguir em frente.

À todos os meus familiares, especialmente aos meus sogros Deolino e Neusa pela confiança, amor e carinho despendidos todos os dias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) pelo apoio financeiro e a Fundação Araucária pela bolsa concedida.

À todos que me auxiliaram nessa caminhada e de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

"Se não fossemos capazes ou não desejássemos olhar em novas direções, se não tivéssemos dúvidas ou não soubéssemos reconhecer a nossa ignorância, nunca conseguiríamos ter idéias novas. Não haveria nada para verificar, pois já conheceríamos a verdade. Aquilo a que hoje chamamos de conhecimento científico é um corpo de afirmações com diversos graus de certeza. Algumas são muito incertas, outras são quase certas, mas nenhuma é absolutamente certa. Os cientistas estão habituados a isso. Sabemos que é consistente conseguir viver sem saber toda a verdade. Algumas pessoas perguntam: Como é que você consegue viver sem saber? Não entendo o que querem dizer com isso. Sempre vivi sem saber. Isto é fácil. Como é possível saber é o que eu quero saber."

Richard P. Feynman

JUSTO, Raquel. **Separação de metabólitos do extrato das folhas da *Bauhinia variegata* L. por cromatografia de coluna preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência: estudo comparativo de fases.** 2010. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

## RESUMO

Planejamentos estatísticos de misturas com quatro solventes associados a cromatografia em coluna preparativa aberta foram usados para avaliar as frações dos extratos das folhas de *Bauhinia variegata* L através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). O fracionamento cromatográfico utilizando delineamento de mistura quaternária foi comparado com fracionamento utilizando mistura binária. Foram utilizadas fases móveis usando metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) como modificadores orgânicos com duas forças cromatográficas. Os efeitos da força do solvente sobre a separação cromatográfica, por cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) também foram investigados. Diferenças substanciais foram observadas entre os dois fracionamentos. A característica da impressão digital cromatográfica foi influenciada pela mistura de solventes e da força cromatográfica maior. Os resultados indicaram que a fase móvel (RP-HPLC) composta de 35% H<sub>2</sub>O:30% MeOH:30% ACN (V/V/V) foi a mais adequada para a análise das frações.

**Palavras Chaves:** Química analítica. Pata de vaca. Bauhinia. Cromatografia líquida de alta eficiência. Plantas - Análise.

JUSTO, Raquel. **Separação de metabólitos do extrato das folhas da *Bauhinia variegata* L. por cromatografia de coluna preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência: estudo comparativo de fases.** 2010. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

### ABSTRACT

Effects of four solvents and their mixtures in the chromatographic fractionation in open column of the extract from *Bauhinia variegata* L. leaves were investigated by direct comparison. Chromatographic fractionation using statistical mixture design of for components was compared with fractionation using binary mixture. The effects of the mobile phase solvent strength on the chromatographic separation for reversed-phase liquid chromatographic (RP-HPLC) were also investigated. Substantial differences were found between the two fractionations. The characteristic of chromatographic fingerprint were influenced by the solvent mixture and the chromatographic strength. The results indicated that the mobile phase (RP-HPLC) composed of 35% H<sub>2</sub>O:30% MeOH:30% ACN (V/V/V) was most suitable for the fraction analyses.

**Key words:** Analytical chemistry. High speed liquid chromatography. Plants - Analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Triângulo de seletividade de solvente de Snyder .....	16
<b>Figura 2</b> - Espaço experimental para processos com quatro fatores independentes inclui todos os pontos dentro do tetraedro. O espaço experimental para misturas de quatro componentes limita-se aos pontos pertencentes ao tetraedro.....	22
<b>Figura 3</b> - Fotografia da flor <i>Bauhinia variegata</i> L .....	24
<b>Figura 4</b> - Procedimento experimental empregado no estudo do planejamento estatístico para otimizar a extração de metabólitos secundários em plantas medicinais.....	25
<b>Figura 5</b> - Sequência do procedimento para o preparo das amostras para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	30
<b>Figura 6</b> - Cromatogramas de 3 frações (RP34, RP35 e RP36) na mistura 9 do planejamento estatístico 50%HEX:50%MeOH (V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V) .....	37
<b>Figura 7</b> - Cromatogramas de 3 frações (RP34, RP35 e RP36) na mistura 9 do planejamento estatístico 50%HEX:50%MeOH (V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F2 65 %H2O: 17,5%MeOH: 17,5 %ACN (V/V/V).....	37
<b>Figura 8</b> - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos de 3 frações (A) RP34,(B) RP35 e (C) RP36 na mistura 9 do planejamento estatístico 50%HEX:0,50MeOH (V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).....	38
<b>Figura 9</b> - Cromatogramas de 3 frações (RP45, RP46 e RP47) na mistura 13 do planejamento estatístico (diclorometano) da CCA1 e analisados por CLAE nas fases móveis (a) F1 30%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V) e (b) F2 65%H2O:17,5%MeOH:17,5%ACN (V/V/V).....	39
<b>Figura 10</b> - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos de 3 frações (A) RP45, (B) RP46 e (C) RP47 na mistura 13 do planejamento estatístico (diclorometano) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).....	40

- Figura 11** - Cromatograma da fração RP67 da mistura 23 do planejamento estatístico, 33% DIC:33% AE:34% MeOH (V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F130% H<sub>2</sub>O:35% MeOH:30% ACN (V/V/V) ..... 41
- Figura 12** - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos da fração P67 (A) picos 1-23 (B) picos 24-46, na mistura 23 do planejamento estatístico, 33% DIC:33% AE:34% MeOH (V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% H<sub>2</sub>O:35% MeOH:30% ACN (V/V/V). . 31
- Figura 13** - Cromatograma da fração (RP64) na mistura 20 do planejamento estatístico, 60% DIC:20% AC:20% MeOH (V/V/V), da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F130% H<sub>2</sub>O:35% MeOH:30% ACN (V/V/V)..... 42
- Figura 14** - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos da fração RP64 na mistura 20 do planejamento estatístico, 60% DIC:20% AE:20% MeOH (V/V/V), da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% H<sub>2</sub>O:35% MeOH:30% ACN (V/V/V)..... 43
- Figura 15** - Cromatogramas de 7 frações (RP53, RP54, RP55, RP56, RP57, RP58 e RP59) da mistura 15 do planejamento estatístico, 25% HEX:25% DIC:25% AE:25% MeOH (V/V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% H<sub>2</sub>O:35% MeOH:30% ACN (V/V/V).. 33
- Figura 16** - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (A) RP53 (13 picos), (B) RP54 (11picos) e (C) RP55 (14 picos) na mistura 15 do planejamento estatístico, 25% HEX:25% DIC:25% AE:25% MeOH (V/V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% H<sub>2</sub>O:35% MeOH:30% ACN (V/V/V)..... 45
- Figura 17** - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (A) RP56 (13 picos), (B) RP57 (14 picos) e (C) RP58 (13 picos) na mistura 15 do planejamento estatístico, 25% HEX:25% DIC:25% AE:25% MeOH (V/V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% H<sub>2</sub>O:35% MeOH:30% ACN (V/V/V)..... 46
- Figura 18** - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos da fração (a) RP59 (14 picos) na mistura 15 do planejamento estatístico, 25% HEX:25% DIC:25% AE:25% MeOH (V/V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% H<sub>2</sub>O:35% MeOH:30% ACN (V/V/V)..... 47

<b>Figura 19</b> - Cromatogramas de 3 frações obtidas na mistura 5 do planejamento de misturas binárias (diclorometano) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis (a) F130%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V) e (b) F2 65%H2O:17,5%MeOH:17,5%ACN (V/V/V).....	49
<b>Figura 20</b> - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (a) RN14 (30 picos), (b) RN15 (41 picos) e (c) RN16 (29 picos) na mistura 5 do planejamento de misturas binárias (diclorometano) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F1 30%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).....	50
<b>Figura 21</b> - Cromatograma das frações RN21 e RN22 na mistura 8 do planejamento de misturas binárias, 75%DIC:25%AE (V/V) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F1 30%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V) .....	51
<b>Figura 22</b> - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (a) RN21 (36 picos), (b) RN22 (36 picos) na mistura 8 planejamento de misturas binárias, 75%DIC:25%AE (V/V) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F1 30%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).....	52
<b>Figura 23</b> - Cromatograma das frações RN25 e RN26 na mistura 10 do planejamento de misturas binárias, MeOH puro, da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F130%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V) .....	53
<b>Figura 24</b> - Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (A) RN25 (37 picos), (B) RN26 (36 picos) na mistura 10 planejamento de misturas binárias, MeOH puro, da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F1 30%H2O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).....	54
<b>Figura 25</b> - Espectros UV-Vis das frações eluídas na mistura 1 (hexano) separadas em 3 diferentes grupos, (I) frações de 1-8 representando o grupo 1, (II) frações de 9-14 representando o grupo 2 e (III) frações de 15-21 representando o grupo 3 da CCA2.....	55
<b>Figura 26</b> - Espectros UV-vis das frações eluídas na mistura 2, 75%HEX:25%DIC(V/V), separadas em 2 diferentes grupos, (I) frações de 1-4 representando o grupo 4 e (II) frações de 22-24 repretando o grupo 5 da CCA1 .....	56

- Figura 77** - Espectros UV-vis das 65 frações da mistura 3 do planejamento 75%HEX: 25%AE(V/V) da CCA1 separadas em 11 diferentes grupos. (I) frações 1-5, (II)frações 6-8, (III) frações 9-12, (IV) frações 13-15, (V) frações 16-21, (VI) frações 22-31, (VII) frações 32-37, (VIII) frações 38-46, (IX) frações 47-51, (X) frações 52-57 e (XI) frações 58-65..... 57
- Figura 28** - Cromatogramas de 8 diferentes frações obtidas na mistura 20%DIC:60%AE:20%MeOH(V/V/V) da CCA1 analisados por CLAE nas fases móveis (A) F1 30%H<sub>2</sub>O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V) e (B) F2 65%H<sub>2</sub>O:17,5%MeOH:17,5%ACN (V/V/V)..... 58
- Figura 29** - Cromatogramas da fração obtida na mistura 9 (acetato de etila) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis (A) F1 30%H<sub>2</sub>O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V) e (B) F2 65%H<sub>2</sub>O:17,5%MeOH:17,5%ACN (V/V/V)..... 59

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Tabela de composição dos solventes pelo planejamento em ordem de eluição para a coluna cromatográfica preparativa aberta 1 (CCA1) ..... 28
- Tabela 2** - Tabela de composição dos solventes em ordem de eluição para a coluna cromatográfica preparativa aberta 2 (CCA2) ..... 29
- Tabela 3** - Proporções das misturas e o número de frações obtidas na CCA1, usando o planejamento de misturas de quatro componentes ..... 34
- Tabela 4** - Proporções das misturas e o número de frações obtidas na CCA2, usando o planejamentos de misturas binárias ..... 48

## SIGLAS

$\alpha$	Acidicidade
$\beta$	Basicidade
$\epsilon$	Constante dielétrica
$\pi$	Dipolaridade
$\Phi$	Diâmetro
AE	Acetato de etila
CCA1	Coluna cromatográfica aberta 1
CCA2	Coluna cromatográfica aberta 2
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
DIC	Diclorometano
F1	Fase móvel 1 - 30H <sub>2</sub> O%:35%MeOH:35%ACN (V/V/V)
F2	Fase móvel 2 65% H <sub>2</sub> O:17,5%MeOH:17,5%ACN (V/V/V)
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FN	Fase normal
FR	Fase reversa
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
h	Altura
HEX	Hexano
MeOH	Metanol
RN	Fração agrupada coluna cromatográfica aberta 2
RP	Fração agrupada coluna cromatográfica aberta 1
UV-Vis	Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta-visível
$x_d$	Parâmetros de seletividade - Ácida
$x_e$	Parâmetros de seletividade - Básica
$x_n$	Parâmetros de seletividade - Momento dipolar

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	13
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	14
<b>CAPÍTULO II</b> .....	19
2 QUIMIOMETRIA .....	20
2.1 MODELAGEM DE MISTURAS .....	20
<b>CAPÍTULO III</b> .....	23
3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL .....	24
3.1 PLANTA .....	24
3.2 COLETA, FRAGMENTAÇÃO, SECAGEM E MOAGEM.....	25
3.3 PREPARO DO EXTRATO PARA CROMATOGRAFIA EM COLUNA PREPARATIVA ABERTA.....	26
3.4 PREPARO DA COLUNA DE SÍLICA GEL.....	26
3.5 ESCOLHA DOS ELUENTES PARA A CROMATOGRAFIA DE COLUNA PREPARATIVA DE SILICA GEL.....	27
3.6 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CDD) .....	29
3.7 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	29
3.8 REAGENTES .....	31
3.9. EQUIPAMENTOS .....	31
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS PREPATIVAS ABERTAS .....	33
4.1.1 PRIMEIRO SISTEMA CROMATOGRÁFICO DE COLUNA PREPARATIVA ABERTA (CCA1).....	33
4.1.2 SEGUNDO SISTEMA CROMATOGRÁFICO DE COLUNA PREPARATIVA ABERTA (CCA2).....	47
4.2 COMPARAÇÃO ENTRE A CCA2 E CCA1 .....	55
<b>CAPÍTULO V</b> .....	60
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

A vertical strip of a plant with yellow flowers and green leaves, serving as a background for the text.

# Capítulo I

## Introdução e objetivos

## 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O interesse da fitoquímica no estudo dos produtos decorrentes do metabolismo secundário dos vegetais compreende as etapas de isolamento, purificação e determinação das estruturas destes metabólitos<sup>1</sup>. No entanto, cada metabólito possui uma propriedade única em termos da extração, por isto tem-se que levar em consideração alguns fatores no processo de extração como o solvente, pH do meio, temperatura, número do grau de extração, entre outros<sup>2</sup>.

Para extrair os metabólitos de interesse é necessário otimizar o processo de extração, afim de quantificar e identificar os compostos. Esta otimização é necessária porque o processo de extração é influenciado de maneira significativa pela natureza química dos compostos, pelo método de extração empregado, pelo tempo e condições de estocagem, pelas substâncias interferentes, composição do solvente, entre outros<sup>2</sup>. Em geral, a otimização do processo de extração pode ser alcançada por métodos empíricos ou estatísticos<sup>3</sup> de forma a permitir a completa extração e evitar a modificação química dos metabólitos secundários<sup>4</sup>.

Tradicionalmente, o estudo de produtos naturais de material vegetal é feito com a utilização de métodos cromatográficos, ou seja métodos de isolamento e purificação de substâncias orgânicas, associados as principais técnicas espectroscópicas. 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<sup>5</sup>.

Os métodos modernos de caracterização de solventes são baseados no sistema de classificação de solvente introduzidos por Snyder. Embora a produção da maioria dos fitoterápicos 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<sup>6</sup>.

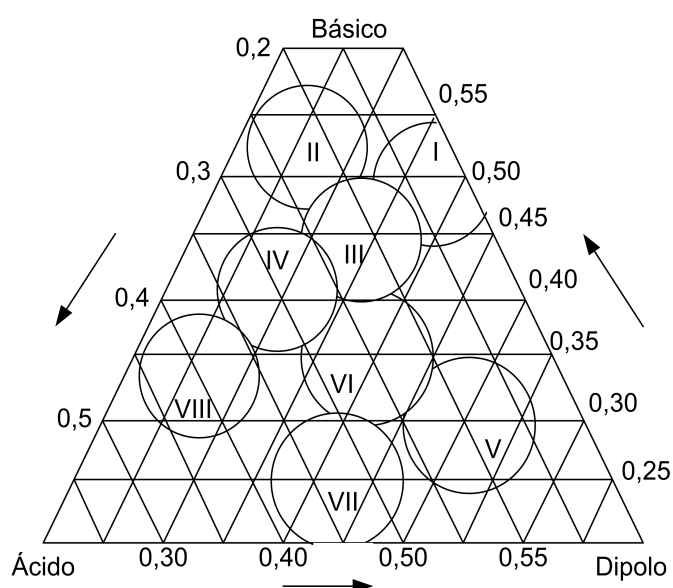
Os efeitos do solvente são comumente creditados à mudança de polaridade do meio. Constantes físicas do solvente tais como a constante dielétrica ( $\epsilon$ ), momento de dipolo ( $m$ ) e o índice de refração são inadequados como uma medida quantitativa da polaridade do solvente, porque estas constantes 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<sup>7</sup>.

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como por exemplo, a espectrofotometria<sup>8</sup>.

Uma alternativa para a escolha do melhor solvente extrator é a utilização do triângulo de seletividade de solvente proposta por Snyder<sup>9</sup> para cromatografia. Esta abordagem conduz a uma descrição dos diferentes solventes em termos de sua acidez, basicidade e dipolaridade. A classificação original do triângulo de seletividade de solvente foi feita com base na repartição das diversas interações polares que um solvente é capaz: ácida ( $x_d$ ), básica ( $x_e$ ) e momento dipolar ( $x_n$ )<sup>10</sup>.

Solventes que estão perto dos vértices do gráfico da Figura 1 possuem essencialmente um tipo de seletividade que pode ser acidez, basicidade ou dipolaridade, enquanto solventes dentro do triângulo são capazes de todas as três interações<sup>10</sup>.

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  $x_n$ ) e fazem parte do mesmo grupo, podem apresentar diferentes valores de polaridade <sup>8</sup>.



**Figura 1** – Triângulo de seletividade de solvente de Snyder.

Um conjunto de três parâmetros chamados de solvatocrômicos, semelhantes ao  $x_d$ ,  $x_e$  e  $x_n$ , foi concebido para descrever a acidez ( $\alpha^*$ ), basicidade ( $\beta^*$ ) e dipolaridade ( $\pi^*$ ). O solvatocromismo é produzido pela diferença na solvatação do estado fundamental e do primeiro estado excitado da molécula que absorve a luz (ou o seu cromóforo). A solvatação das moléculas do soluto pelas do solvente resulta de forças físicas intermoleculares soluto-solvente, tais como: íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido (forças de dispersão) e ligações de hidrogênio. Essas interações soluto-solventes alteram a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado do soluto <sup>11</sup>.

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. Os valores dos parâmetros solvatocrômicos são médias de resultados obtidos com vários solutos investigados para cada parâmetro, em contraste com os parâmetros do triângulo de seletividade de solvente no qual baseou-se na propriedade termodinâmica de um único soluto<sup>9</sup>.

- $\alpha^*$  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<sup>12</sup>;
- $\beta^*$  descreve a habilidade do solvente para formar ligações de hidrogênio com o soluto<sup>12</sup>;
- $\pi^*$  mede a tendência do solvente em doar um par de elétrons (ou aceitar um próton) em ligações de hidrogênio com o soluto<sup>12</sup>.

Estes valores de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi$  para cada solvente foram primeiros normalizados pela soma dos valores de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi$  ( $= \Sigma$ ) e, em seguida, expressando a acidez, basicidade e dipolaridade de cada solvente como a interação de coeficientes fracionários  $\alpha/\Sigma$  (acidez),  $\beta/\Sigma$  (basicidade) e  $\pi/\Sigma$  (dipolaridade)<sup>13</sup>.

Neste estudo foi usado extrato das folhas da *Bauhinia variegata* L.. Esta espécie pertence ao gênero *Bauhinia*, família Leguminosae. As folhas dessa espécie são usadas na medicina popular como antidiabéticas, diuréticas<sup>14</sup> e hipocolesterolemiantes.

Considerando que os metabólitos das plantas são estruturas complexas, e normalmente estão em concentrações relativamente baixas, os processos de separação e purificação precisam

ser eficientes. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo comparar o efeito de quatro solventes na separação de metabólitos do extrato das folhas da *Bauhinia variegata L.* por cromatografia de coluna preparativa aberta e cromatografia líquida da alta eficiência.



# Capítulo II

## Métodos quimiométricos

## 2 QUIMIOMETRIA

É uma área da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar procedimentos experimentais de forma otimizada, para fornecer o máximo de informação química relevante com a análise dos dados obtidos <sup>15</sup>.

A extração de informações dos resultados de um experimento químico envolve a análise de um grande número de variáveis. Muitas vezes, um pequeno número dessas variáveis contém as informações químicas mais relevantes, enquanto em, que a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada a interpretação dos resultados em termos químicos. A decisão sobre quais variáveis são importantes é feita, geralmente, com base na intuição química ou na experiência, ou seja, baseados em critérios que são mais subjetivos que objetivos <sup>16</sup>.

O termo quimiometria foi proposto na década de 70, para descrever as técnicas e operações associadas à manipulação matemática e interpretação de dados químicos. Hoje em dia, muitos químicos passaram a ter como objeto de estudo e pesquisa, o desenvolvimento e utilização de ferramentas matemáticas e estatísticas para extrair maior informação dos dados. Foi dentro da química analítica que a quimiometria causou maior impacto, a partir da melhor interpretação dos dados novas metodologias de análise puderam ser propostas, baseadas na utilização da quimiometria, que de outra forma nem poderiam ser pensadas <sup>17</sup>.

### 2.1 MODELAGENS DE MISTURA

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:

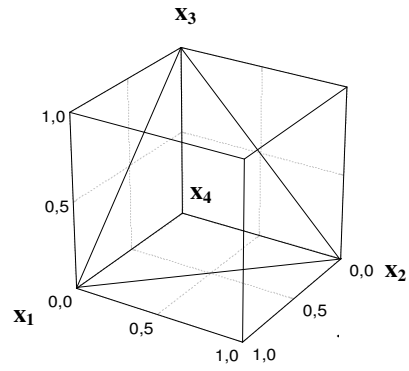
$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1, \quad (1)$$

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>18</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<sup>18</sup>.

Para sistemas com quatro fatores independentes, podem-se realizar experimentos correspondentes a qualquer ponto dentro do tetraedro da Figura 1.

Todas as composições possíveis da mistura quaternária são representadas pelos pontos pertencentes ao tetraedro. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, em cada face do tetraedro os pontos representam misturas ternárias e no ponto central do tetraedro temos a mistura quaternária.



**Figura 2**-Espaço experimental para processos com quatro fatores independentes inclui todos os pontos dentro do tetraedro. O espaço experimental para misturas de quatro componentes limita-se aos pontos pertencentes ao tetraedro.



Capítulo III

Descrição  
Experimental

### 3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

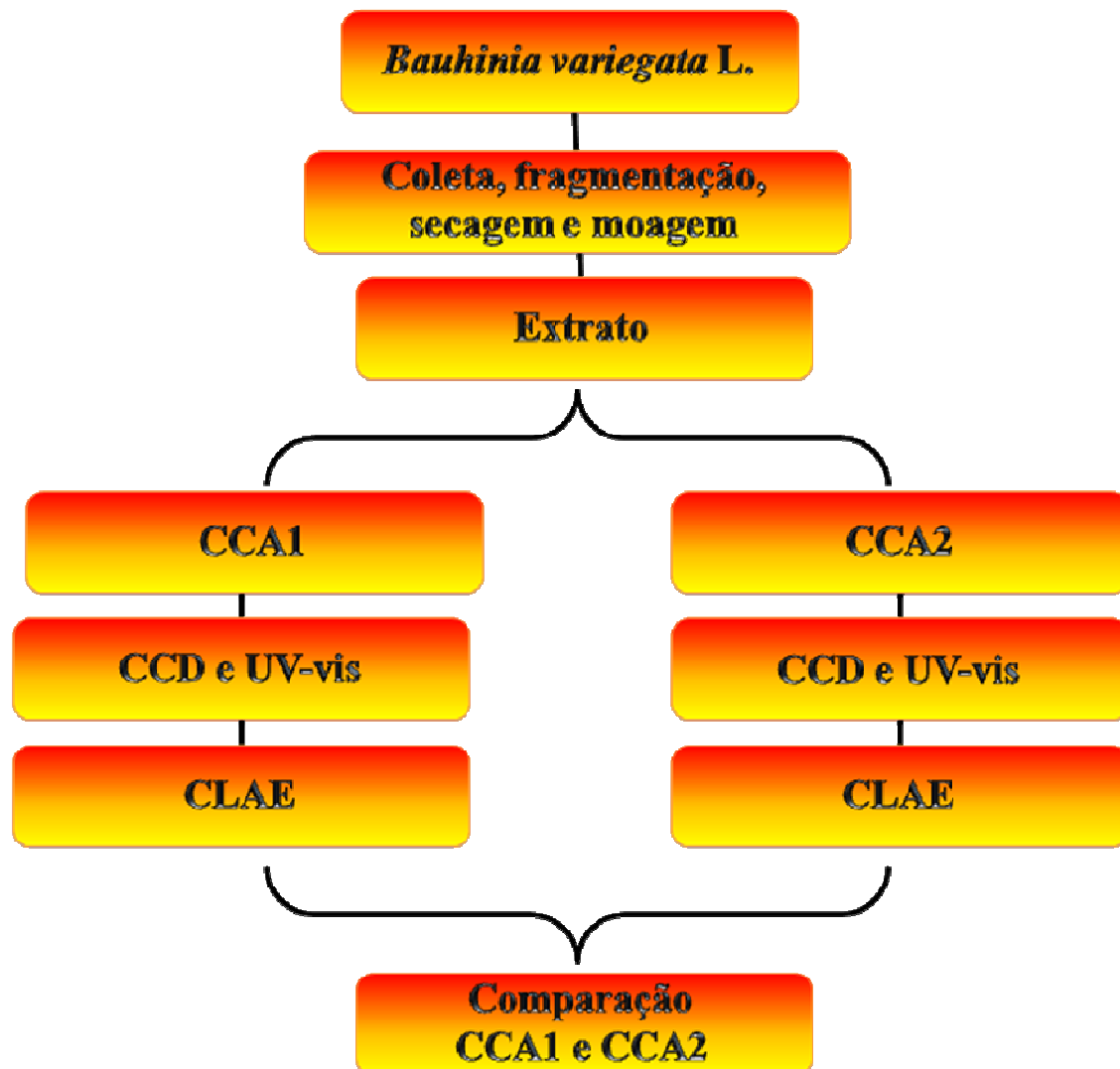
#### 3.1 PLANTA

Para a realização do estudo proposto foram utilizadas as folhas de *Bauhinia variegata* L., de flor branca, cultivada no estacionamento da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina e classificada pelo taxonomista Manuel R. C. Paiva do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina. A exsicata da planta está depositada no Herbário da Universidade Estadual de Londrina, registro número FUEL 36.474.



**Figura 3** – Fotografia da flor *Bauhinia variegata* L.

As etapas experimentais para avaliar a influência da composição da fase móvel na separação cromatográfica do extrato das folhas da *Bauhinia variegata* L., bem como o fracionamento líquido-líquido e a análise por espectroscopia no infravermelho, está apresentado na Figura 4.



**Figura 4** – Procedimento experimental empregado no estudo do planejamento estatístico para otimizar a extração de metabólitos secundários em plantas medicinais.

### 3.2 COLETA, FRAGMENTAÇÃO, SECAGEM E MOAGEM

A coleta do material foi realizada durante o ano de 2008, em diferentes partes da árvore, sempre no período da manhã. Foram coletadas somente folhas sem danos causados por insetos, fungos ou danos provocados por intempéries.

Após a coleta, as plantas foram fragmentadas com tesoura e secas por sete dias em lugar arejado, à temperatura ambiente e protegida do sol e umidade.

A moagem foi realizada com o auxílio de um liquidificador e teve 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 frascos de vidro.

### 3.3 PREPARO DO EXTRATO PARA CROMATOGRAFIA EM COLUNA PREPARATIVA ABERTA.

O extrato foi preparado pesando-se 20,00g de folhas secas de uma mistura de seis vezes de coleta durante o ano de 2008 e colocadas em contato com 100 mL da mistura de solventes, 65% diclorometano 35% acetona (V:V)<sup>19</sup>. Em seguida solubilizados no ultra-som por 30 min, e filtrados em algodão. Este processo foi repetido por seis vezes, obtendo-se um volume de 600 mL de solução, que foi levado à evaporação no evaporador rotatório a temperatura de  $50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Depois da evaporação da mistura de solvente, o extrato foi colocado em frasco âmbar e armazenado a temperatura ambiente.

### 3.4 PREPARO DA COLUNA DE SÍLICA GEL

O empacotamento deu-se fixando uma coluna de vidro ( $\Phi=30$  mm,  $h=390$  mm) em posição rigorosamente vertical em um suporte universal e colocando um pequeno chumaço de algodão, empurrando-o com um tubo de vidro até a junção do corpo da coluna com a torneira. Este procedimento tem como finalidade não permitir a saída das partículas do adsorvente e permitir o fluxo do eluente. Suspendeu-se, em um béquer, 50 g de gel de sílica para coluna (0,05-

0,2 mm) com quantidade suficiente do eluente, hexano, para formar uma mistura espessa e livre de bolhas de ar. Verteu-se a mistura adsorvente-eluente, com auxílio de um funil, para o interior da coluna, evitando a formação de bolhas de ar e mantendo sempre o adsorvente coberto pelo eluente. Ao final foi adicionado 0,2g do extrato bruto otimizado (65% diclorometano, 35% acetona)<sup>19</sup> e a coluna foi coberta novamente com chumaço de algodão para evitar contato direto com o eluente. Em seguida começou ser passado 250 mL de eluente conforme planejamento de misturas por ordem da força do solvente e retirado alíquotas de aproximadamente 10 mL por fração.

### 3.5 ESCOLHA DOS ELUENTES PARA A CROMATOGRAFIA DE COLUNA PREPARATIVA DE SÍLICA GEL

Neste trabalho foram propostos dois sistemas de fases móveis para a cromatografia de coluna preparativa aberta. No primeiro sistema (CCA1), foi utilizado um planejamento estatístico de misturas de quatro componentes, com 13 pontos adicionais. As composições químicas das misturas do planejamento estão apresentadas na Tabela 1.

A segunda coluna cromatográfica preparativa aberta (CCA2) foi preparada em condições idênticas a primeira usando os quatro componentes do planejamento de mistura de dois componentes, e por ordem crescente de polaridade. Este é o procedimento clássico utilizado em investigação fitoquímica. A mudança ocorre somente nas proporções dos solventes. A Tabela 2 apresenta o planejamento das misturas binárias dos solventes usados na coluna 2.

As fases móveis foram eluídas em etapas, com modificação gradual de acordo com a ordem da Tabela 1 e Tabela 2. Para cada fase móvel 250 mL de cada solvente puro ou proporções foram eluídas na coluna, somente a fase móvel 3 da CCA1 composta por 75% HEX:25%AE

(V/V) foram eluídos 750 mL da mistura do solvente. As frações foram coletadas em frascos de aproximadamente 15 mL e numeradas em sequência. Para posterior agrupamento das frações identificadas como semelhantes, foram utilizados espectrofotometria UV-Vis e cromatografia em camada delgada (CDD).

**Tabela 1** – Tabela de composição dos solventes pelo planejamento em ordem de eluição para a coluna cromatográfica preparativa aberta 1 (CCA1).

<b>Mistura</b>	<b>Hexano</b>	<b>Diclorometano</b>	<b>Acetato de Etila</b>	<b>Metanol</b>
<b>01</b>	1	0	0	0
<b>02</b>	0,75	0,25	0	0
<b>03</b>	0,75	0	0,25	0
<b>04</b>	0,50	0,50	0	0
<b>05</b>	0,60	0,20	0	0,20
<b>06</b>	0,60	0	0,20	0,20
<b>07</b>	0,50	0	0,50	0
<b>08</b>	0,33	0,33	0,34	0
<b>09</b>	0,50	0	0	0,50
<b>10</b>	0,33	0,33	0	0,34
<b>11</b>	0,20	0,60	0,20	0
<b>12</b>	0,20	0,60	0	0,20
<b>13</b>	0	1	0	0
<b>14</b>	0,33	0	0,33	0,34
<b>15</b>	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>16</b>	0,20	0,20	0,60	0
<b>17</b>	0,20	0	0,60	0,20
<b>18</b>	0,20	0,20	0	0,60
<b>19</b>	0	0,50	0,50	0
<b>20</b>	0	0,60	0,20	0,20
<b>21</b>	0,20	0	0,20	0,60
<b>22</b>	0	0,50	0	0,50
<b>23</b>	0	0,33	0,33	0,34
<b>24</b>	0	0,20	0,60	0,20
<b>25</b>	0	0	1	0
<b>26</b>	0	0,20	0,20	0,60
<b>27</b>	0	0	0,50	0,50
<b>28</b>	0	0	0	1

**Tabela 2** – Tabela de composição dos solventes em ordem de eluição para a coluna cromatográfica preparativa aberta 2 (CCA2).

Mistura	Hexano	Diclorometano	Acetato de Etila	Metanol
<b>01</b>	1	0	0	0
<b>02</b>	0,75	0,25	0	0
<b>03</b>	0,50	0,50	0	0
<b>04</b>	0,25	0,75	0	0
<b>05</b>	0	1	0	0
<b>06</b>	0	0,75	0,25	0
<b>07</b>	0	0,50	0,50	0
<b>08</b>	0	0,25	0,75	0
<b>09</b>	0	0	1	0
<b>10</b>	0	0	0	1

### 3.6 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CDD)

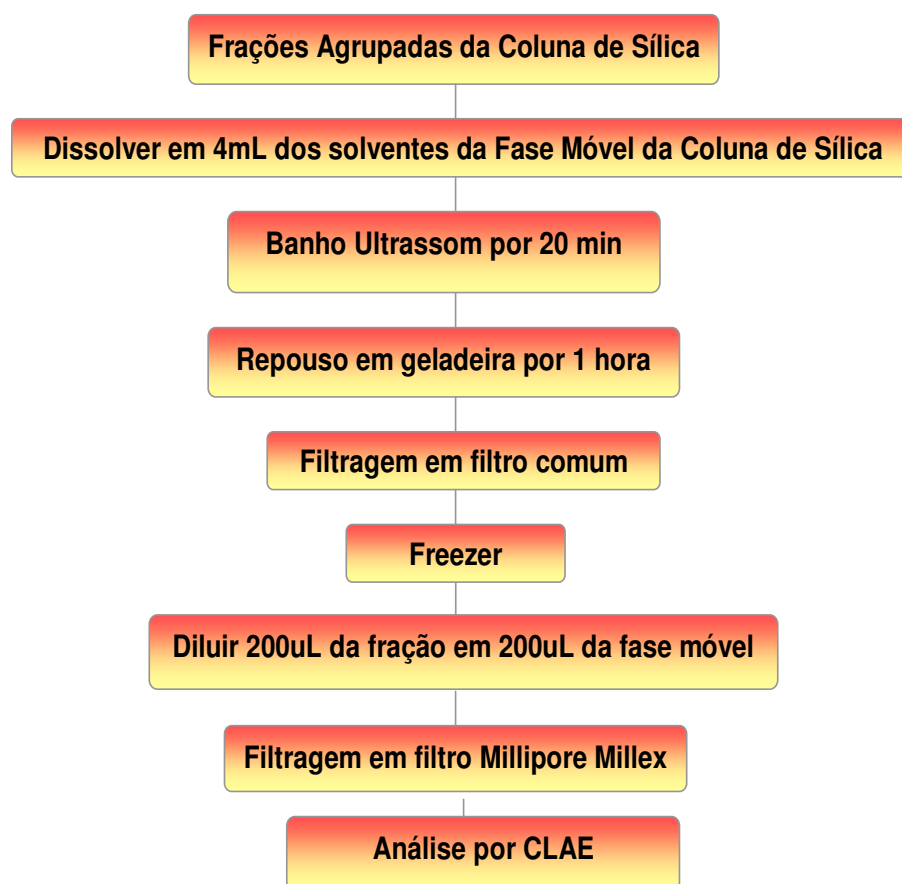
As amostras para análise por CCD foram preparadas utilizando-se 20 gotas das frações retiradas da coluna de sílica. A aplicação das frações foi feita manualmente utilizando-se tubos capilares de vidro em placas de vidro com 10 cm de altura e 20 cm de comprimento preparadas com sílica fase normal. A revelação das substâncias foi por aspensão com solução vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento.

### 3.7 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As amostras dos conjuntos de frações agrupadas por similaridade foram preparadas redissolvendo em 4 mL do solvente da fase móvel da coluna de sílica, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (1:1:1:1), em seguida colocou-se as frações dissolvidas em banho ultrassom por 20 minutos. Após 1 hora de repouso em geladeira, cada solução foi filtrada em filtro comum e conservada em freezer. Deste filtrado foram tomadas alíquotas de 200 µL e

diluídas em 200  $\mu\text{L}$  (1:1) da fase móvel (CLAE). As amostras diluídas foram filtradas mais duas vezes em filtro Millipore Millex com 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenadas em freezer, Figura 5.

A análise por CLAE foi realizada nas seguintes condições: temperatura de 20°C, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , vazão da fase móvel a 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , eluição monitorada nos comprimentos de onda de 210 nm, tempo de eluição de 40 min. Duas fases móveis com diferentes forças cromatográficas foram utilizadas, A fase F1 foi preparada em metanol:acetonitrila:água na proporção de 35:35:30 (v:v) e fase móvel F2 foi preparada em metanol:acetonitrila:água 17,5:17,5:65 (V:V).



**Figura 5** – Sequência do procedimento para o preparo das amostras para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

### 3.8 REAGENTES

Os reagentes usados para a extração das folhas da *Bauhinia variegata* L. foram diclorometano e acetona ambos P.A. (99,5 %) da marca VETEC. Para análise por cromatografia em coluna de sílica e análise espectrofotométrica na região UV-VIS foram utilizados hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol ambos P.A. (99,5%) da marca VETEC e para o preenchimento da coluna cromatográfica foi utilizado silicagel 60 (0,2 – 0,5 mm) da marca VETEC. Para as placas de vidro foram utilizados silicagel (0,060-0,200 mm, 60A) da marca CARVALHAES. Para análise por CLAE foram utilizados os modificadores orgânicos metanol e acetonitrila, ambos HPLC espectroscópico (99,8%) da marca VETEC e água Mili-Q.

### 3.9 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para realização deste trabalho foram: balança analítica Scientech AS 120, liquidificador SKYMSSEN TA-02, evaporador rotativo FISATOM 802, ultrassom ULTRACLEANER 1400 UNIQUE, cromatógrafo a líquido de alta eficiência THERMO ELECTRON CORPORATION FINNIGAN SURVEYOR PLUS – DETECTOR PDA Plus, coluna Phenomenex Gemini 5 $\mu$  C18 (250x4,6mm, 5 $\mu$ m), espectrofotômetro OCEAN OPTICS modelo CHEM 2000 UV-VIS.



Capítulo IV

Resultados e  
Discussão

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS PREPATIVAS ABERTAS

A primeira parte desse trabalho foi fazer uma comparação entre duas metodologias para separação de metabólitos em cromatografia de coluna preparativa aberta. Estudo anterior do grupo da Professora Dra. Ieda S. Scarminio, mostrou que uma das impressões digitais obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato das folhas de *Bauhinia variegata* L. foi obtida com uma mistura de solventes composta de 65% diclorometano e 35% acetona (V/V)<sup>19</sup> Sendo assim, esta composição de extrato foi utilizada neste trabalho para comparar dois sistemas cromatográficos de coluna preparativa aberta.

#### 4.1.1 Primeiro sistema cromatográfico de coluna preparativa aberta (CCA1)

Após a eluição de todos os solventes usando as misturas do planejamento estatístico de misturas na CCA1 e reunidas por similaridade do perfil cromatográfico em camada delgada de sílica e espectros UV-vis, obteve-se 95 frações. As proporções dos solventes, número de frações, bem como as polaridades de cada mistura de solventes estão apresentadas na Tabela 3. Observa-se na Tabela 4, que o maior número de grupos (11), foi obtido em 75%HEX:25%AE (V/V), mistura 3 do planejamento estatístico. Em geral, maiores grupos de frações foram obtidos em misturas contendo acetato de etila.

**Tabela 3** – Proporções das misturas e o número de frações obtidas na CCA1, usando o planejamento de misturas de quatro componentes.

Misturas	Frações	Proporção dos Solventes				Número de Frações	Frações agrupadas	Polaridade do solvente
		HEX	DIC.	AE	MeOH			
1	RP01 RP02 RP03	1	0	0	0	21	1-8 9-14 15-21	0,100
2	RP04 RP05	0,75	0,25	0	0	20	22-32 33-42	0,850
3	RP06 RP07 RP08 RP09 RP10 RP11 RP12 RP13 RP14 RP15 RP16	0,75	0	0,25	0	65	43-48 49-52 53-56 56-59 60-65 66-75 76-81 82-89 89-94 95-100 101-108	1,175
4	RP17 RP18	0,50	0,50	0	0	18	109-117 118-126	1,600
5	RP19 RP20 RP21 RP22	0,60	0,20	0	0,20	21	127-132 133-143 144-145 146-147	1,700
6	RP23A RP23B RP24 RP25	0,60	0	0,20	0,20	21	148-149 151-155 156-167 168	1,960
7	RP26 RP27 RP28	0,50	0	0,50	0	22	169-171 162-176 177-190	2,250
8	RP29 RP30 RP31 RP32 RP33	0,33	0,33	0,34	0	26	191-202 203 204-207 208 209-216	2,508
9	RP34 RP35 RP36	0,50	0	0	0,50	18	217-219 220-229 230-234	2,600
10	RP37 RP38	0,33	0,33	0	0,34	19	235-239 240-253	2,739
11	RP39	0,20	0,60	0,20	0	18	271	2,760
12	RP40 RP41 RP42 RP43 RP44	0,20	0,60	0	0,20	17	272 273-275 276-278 279-285 286-288	2,900

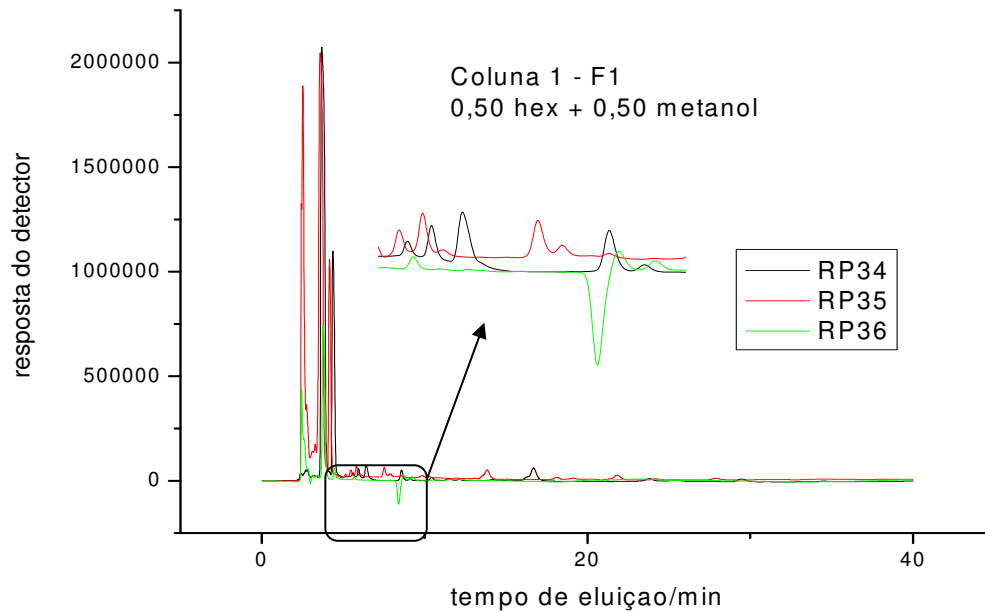
continuação Tabela 3

13	RP45	0	1	0	0	17	289-293	3,100
	RP46						294-295	
	RP47						296-305	
14	RP48	0,33	0	0,33	0,34	20	306-313	3,168
	RP49						314	
	RP50						315-319	
	RP51						320	
	RP52						321-325	
15	RP53	0,25	0,25	0,25	0,25	21	326-328	3,175
	RP54						329-330	
	RP55						331-332	
	RP56						333	
	RP57						334-336	
	RP58						337-341	
	RP59						342-346	
16	RP60	0,20	0,20	0,60	0	23	347-369	3,280
17	RP61	0,20	0	0,60	0,20	20	370-389	3,680
18	RP62	0,20	0,20	0	0,60	19	390-408	3,700
19	RP63	0	0,50	0,50	0	19	409-427	3,750
20	RP64	0	0,60	0,20	0,20	21	428-448	3,760
21	RP65	0,20	0	0,20	0,60	22	449-470	3,960
22	RP66	0	0,50	0	0,50	20	471-490	4,100
23	RP67	0	0,33	0,33	0,34	23	491-513	4,158
24	RP68	0	0,20	0,60	0,20	22	514-517	4,280
	RP69						518	
	RP70						519-522	
	RP71						523	
	RP72						524-526	
	RP73						527	
	RP74						528-530	
	RP75						531-535	
25	RP76	0	0	1	0	18	536-541	4,400
	RP77						542-544	
	RP78						545	
	RP79						546-549	
	RP80						550-553	
26	RP81	0	0,20	0,20	0,60	15	554-556	4,560
	RP82						557-559	
	RP83						560-561	
	RP84						562-563	
	RP85						564-568	
27	RP86	0	0	0,50	0,50	19	569-571	4,750
	RP87						572-577	
	RP88						578-580	
	RP89						581-582	
	RP90						583	
	RP91						584-587	
28	RP92	0	0	0	1	16	588-594	5,100
	RP93						595-599	
	RP94						600-603	

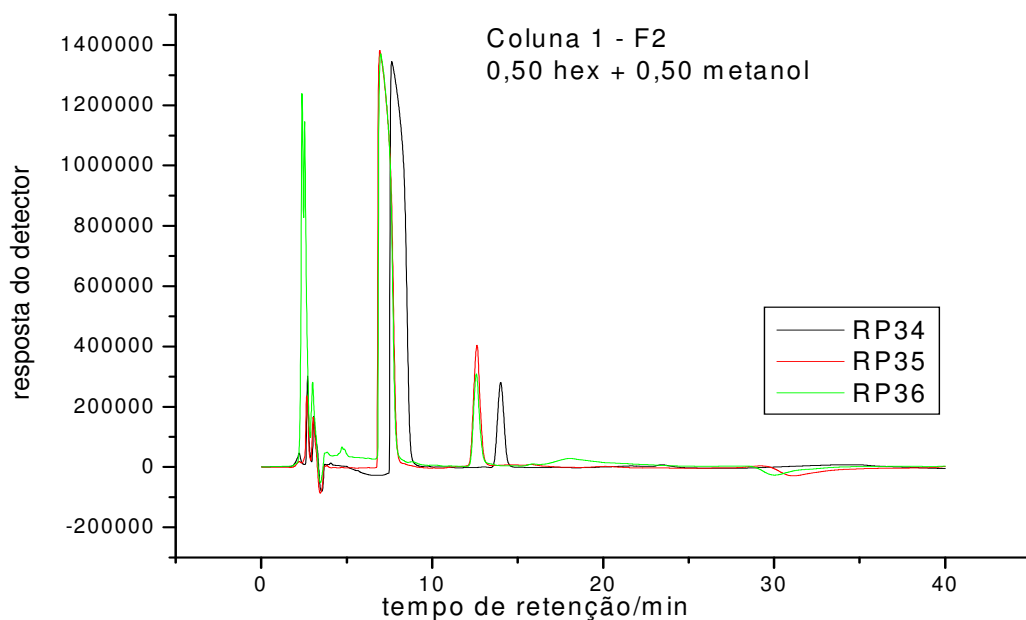
Todas as frações (95) foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). Duas fases móveis com diferentes forças cromatográficas foram

comparadas, a fase móvel F1 preparada em 30% $H_2O$ :35%MeOH:35%ACN (V/V/V), com força cromatográfica 2,0 e F2 preparada em 65% $H_2O$ :17,5%MeOH:17,5%ACN (V/V/V), com força cromatográfica 1,0.

Para avaliar o efeito dos quatro solventes no fracionamento cromatográfico foram escolhidas aleatoriamente algumas frações contendo misturas ou solventes puros para comparação. As frações eluídas na CCA1 com a mistura 9 do planejamento 50%HEX:50%MeOH (V/V), foram analisados na CLAE nas duas fases móveis, F1 e F2. As Figuras 6 e 7 mostram os cromatogramas obtidos nas duas fases. Observa-se na Figura 29 que o cromatograma da fase F1, mostra maior informação da impressão digital devido ao maior número de picos encontrados, em relação a fase móvel F2, Figura 6. Este resultado é concordante com aqueles obtidos num estudo anterior (ref. 19), onde a melhor impressão digital cromatográfica foi obtida na fase móvel com maior força cromatográfica. Por outro lado, este resultado vai contra do que se espera em cromatografia em fase reversa, onde a melhor fase deve ser aquela que apresenta menor força cromatográfica. Este resultado mostra claramente o efeito da interação soluto-solvente na cromatografia.

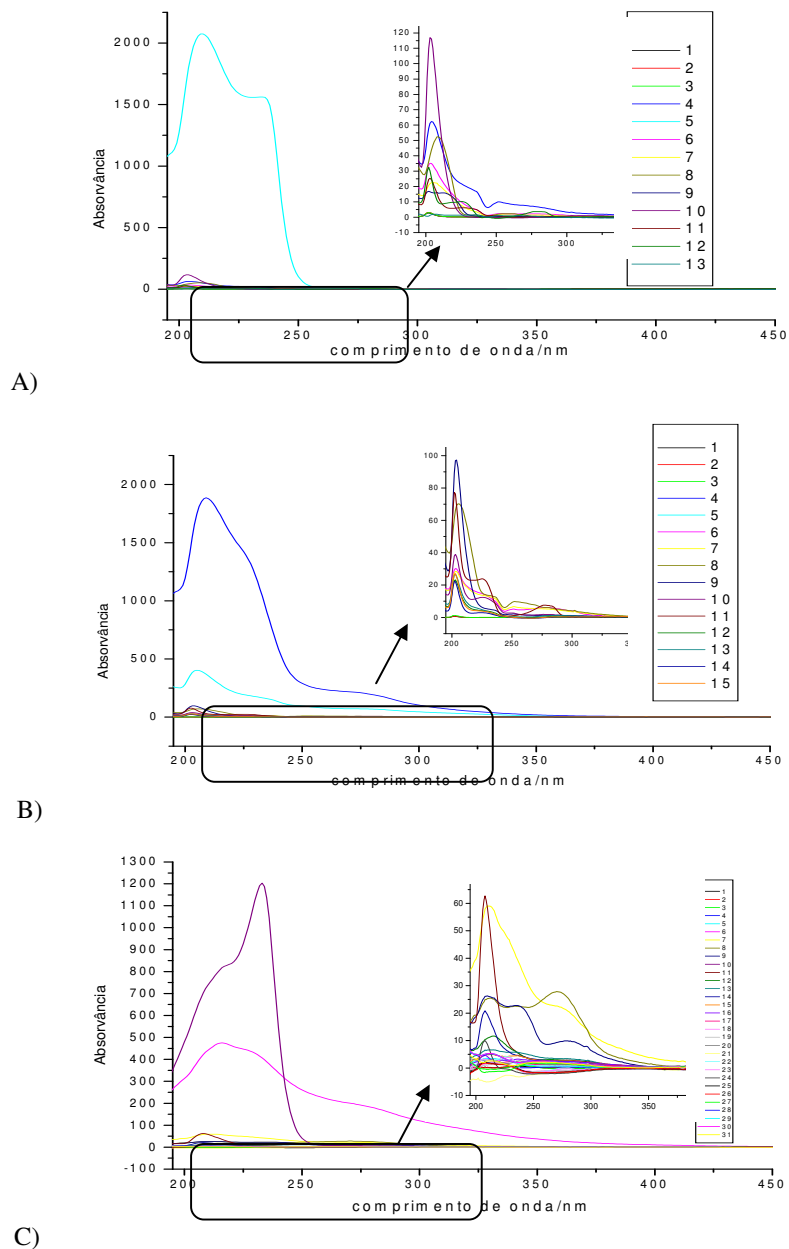


**Figura 6** – Cromatogramas de 3 frações (RP34, RP35 e RP36) na mistura 9 do planejamento estatístico 50%HEX:50%MeOH (V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% $H_2O$ :35%MeOH:30%ACN (V/V/V).



**Figura 7** – Cromatogramas de 3 frações (RP34, RP35 e RP36) na mistura 9 do planejamento estatístico 50%HEX:50%MeOH (V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F2 65% $H_2O$ :17,5%MeOH:17,5%ACN (V/V/V).

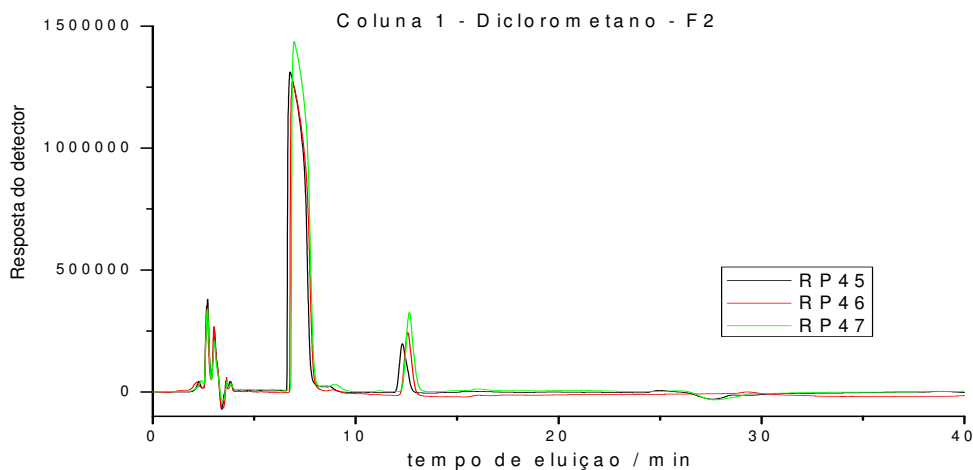
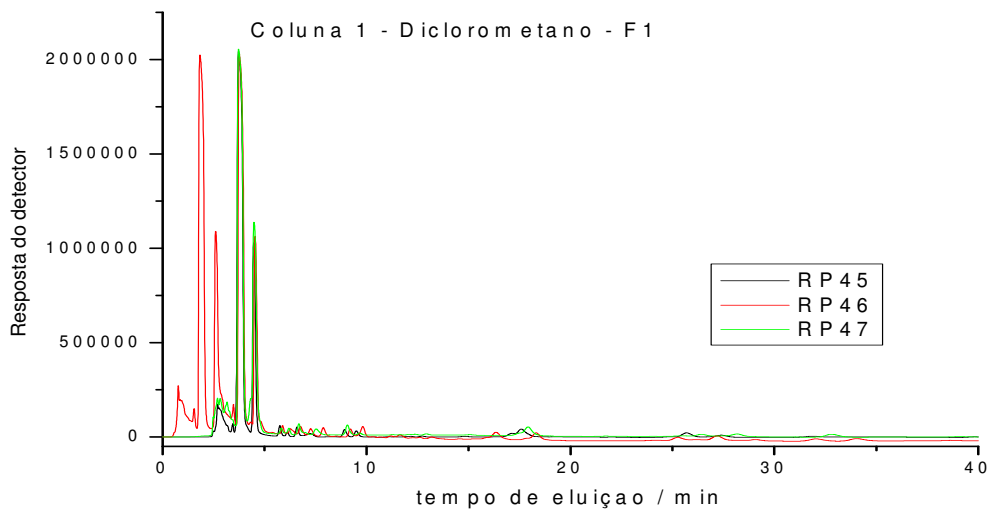
A Figura 8 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos da mistura 9 do planejamento estatístico das frações RP34 (13 picos), RP35 (15 picos) e RP36 (31 picos) analisados na fase móvel F1, 30% $\text{H}_2\text{O}$ :35% $\text{MeOH}$ :30% $\text{ACN}$  (V/V/V). Observa-se nesta Figura que, as frações apresentam diferentes perfis de metabólitos.



**Figura 8** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos de 3 frações (A) RP34,(B) RP35 e (C) RP36 na mistura 9 do planejamento estatístico 50% $\text{HEX}$ :0,50 $\text{MeOH}$  (V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% $\text{H}_2\text{O}$ :35% $\text{MeOH}$ :30% $\text{ACN}$  (V/V/V).

A Figura 9 mostra os cromatogramas das frações RP45, RP46 e RP47 eluídos na CCA1 na mistura 13 do planejamento, ou seja, diclorometano puro nas duas fases, F1 e F2. Para estas amostras observa-se também que a fase F1 apresenta maior número de picos, ou seja, melhor impressão digital para este grupo.

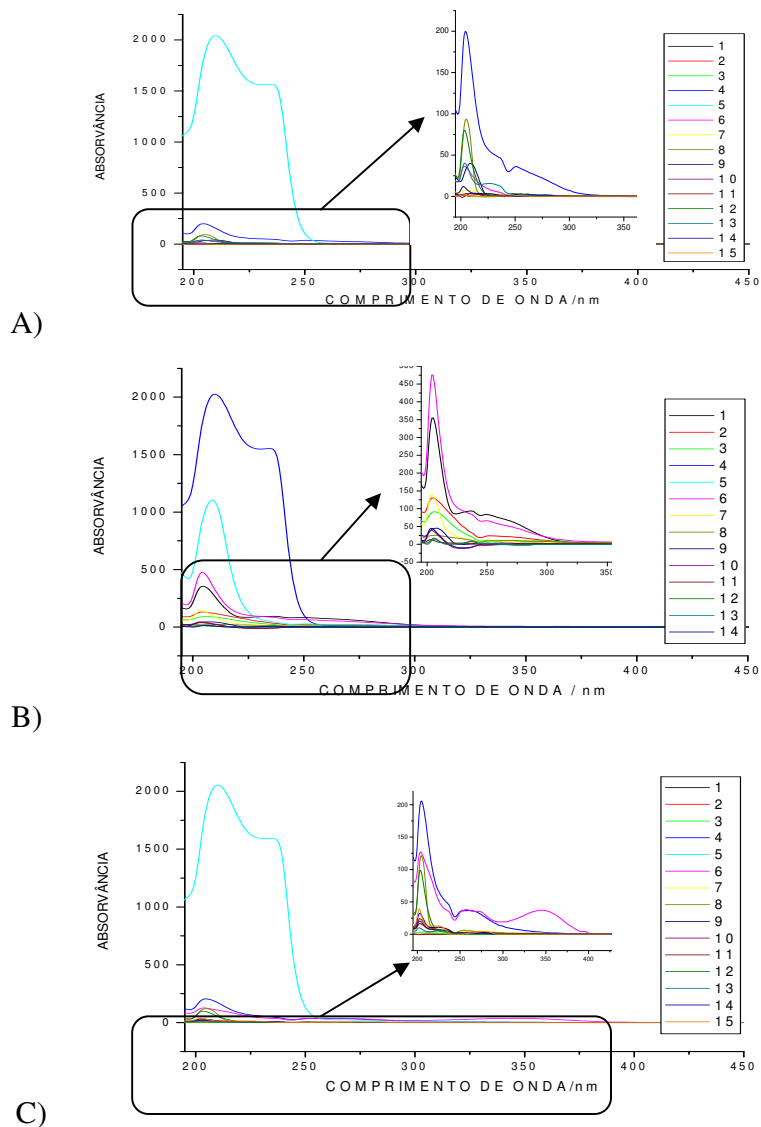
A)



B)

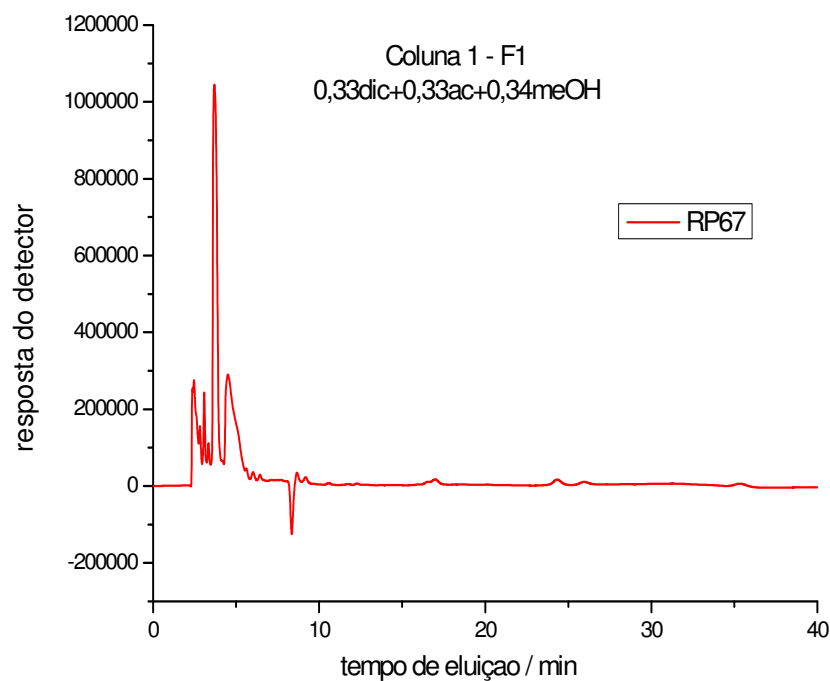
**Figura 9** – Cromatogramas de 3 frações (RP45, RP46 e RP47) na mistura 13 do planejamento estatístico (diclorometano) da CCA1 e analisados por CLAE nas fases móveis (a) F1 30% $H_2O$ :35% $MeOH$ :30% $ACN$  (V/V/V) e (b) F2 65% $H_2O$ :17,5% $MeOH$ :17,5% $ACN$  (V/V/V).

A Figura 10 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos das frações RP45 (15 picos), RP46 (14 picos) e RP47 (15 picos) obtido em diclorometano puro, analisados na fase móvel F1 30% $H_2O$ :35% $MeOH$ :30% $ACN$  (V/V/V). Observa-se nesta Figura, que não há muita diferença no perfil dos espectros, ou seja, os perfis são semelhantes, mas com absorções em comprimentos de ondas diferentes. Este resultado sugere a separação do mesmo grupo de metabólitos.

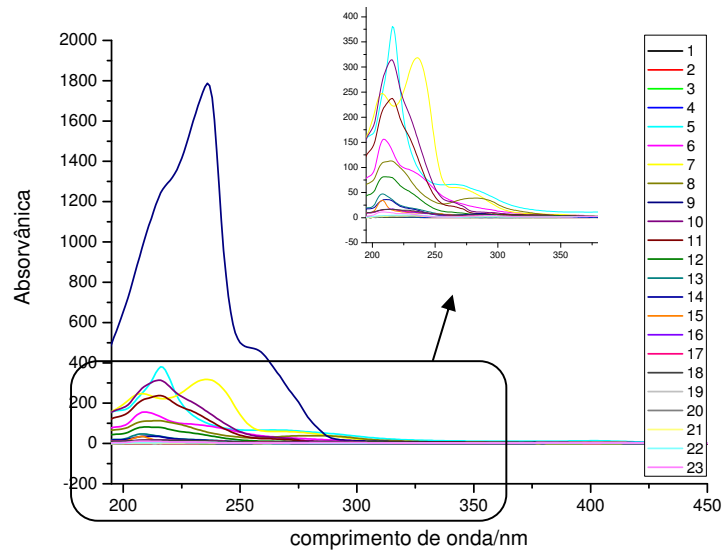


**Figura 10** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos de 3 frações (A) RP45, (B) RP46 e (C) RP47 na mistura 13 do planejamento estatístico (diclorometano) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% $H_2O$ :35% $MeOH$ :30% $ACN$  (V/V/V).

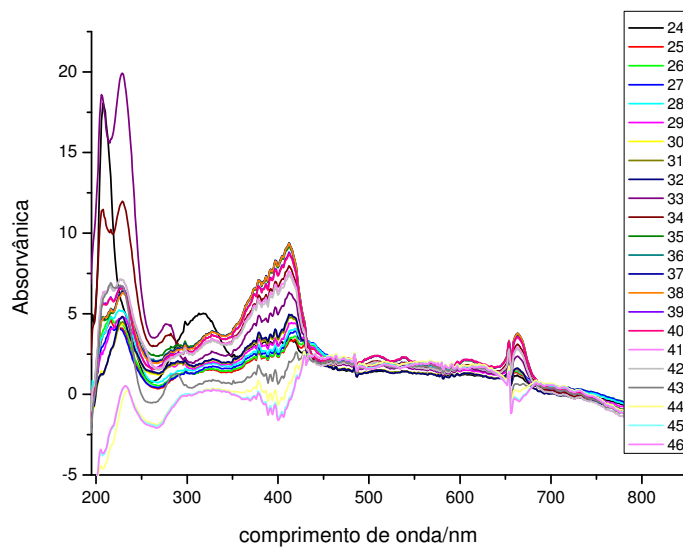
A Figura 11 mostra o cromatograma das frações RP67 eluídos na CCA1 na mistura 23 do planejamento, 33%DIC:33%AE:34%MeOH (V/V/V) analisado na fase F1 da CLAE. Este cromatograma a princípio parece pouco informativo. A melhor forma de avaliar a informação contida no cromatograma é por meio do espectro de cada pico. A Figura 12 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos da fração RP67 com 46 picos. A Figura 12a mostra os espectros dos 23 primeiros picos. A Figura 12b mostra os picos restantes. Observa-se nesta Figura, que existe pouca variedade de metabólitos, uma vez que os perfis são muito semelhantes.



**Figura 11** – Cromatograma da fração RP67 da mistura 23 do planejamento estatístico, 33%DIC:33%AE:34%MeOH (V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% $H_2O$ :35%MeOH:30%ACN (V/V/V).



a)

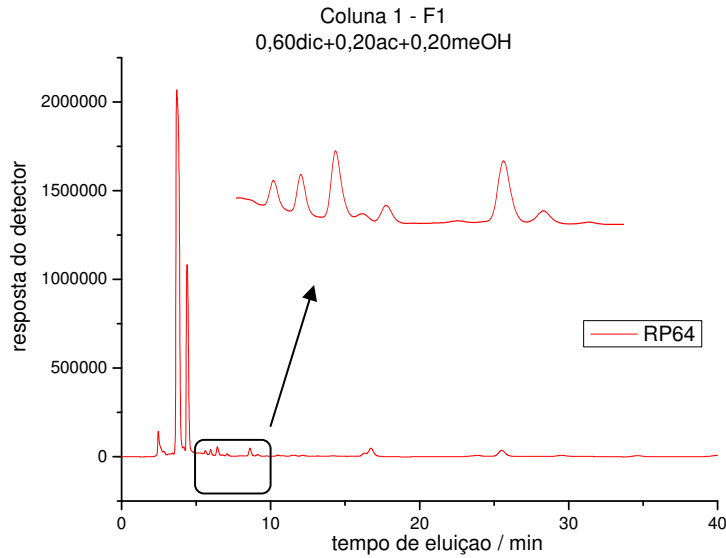


a)

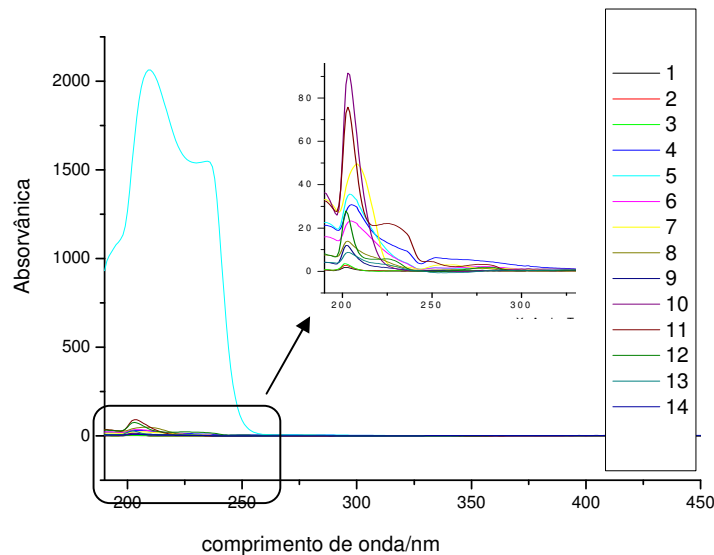
**Figura 12** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos da fração P67 (A) picos 1-23 (B) picos 24-46, na mistura 23 do planejamento estatístico, 33%DIC:33%AE:34%MeOH (V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% $H_2O$ :35%MeOH:30%ACN (V/V/V).

A Figura 13 mostra o cromatograma da fração RP64 eluídos na CCA1 na mistura 20 do planejamento, 60%DIC:20%AE:20%MeOH (V/V/V), que foram analisados por CLAE na fase F1. A Figura 14 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos da fração RP64 com 14

picos Observa-se nessa figura que existem diferenças no perfil dos espectros mostrando que há diversidade de metabólitos nesse grupo.

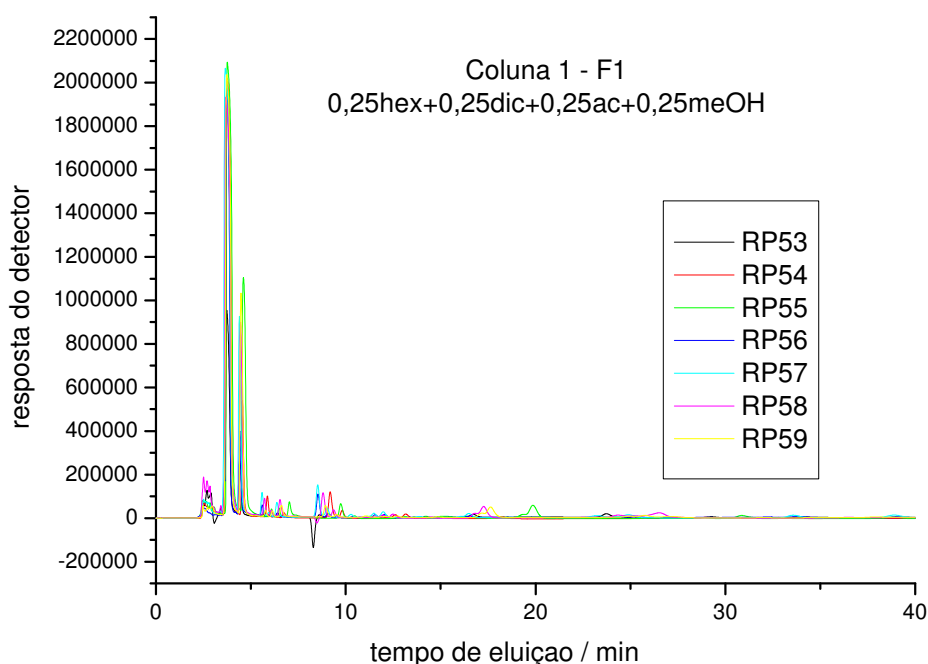


**Figura 13** – Cromatograma da fração (RP64) na mistura 20 do planejamento estatístico, 60%DIC:20%AC:20%MeOH (V/V/V), da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% $H_2O$ :35%MeOH:30%ACN (V/V/V).



**Figura 14** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos da fração RP64 na mistura 20 do planejamento estatístico, 60%DIC:20%AE:20%MeOH (V/V/V), da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30% $H_2O$ :35%MeOH:30%ACN (V/V/V).

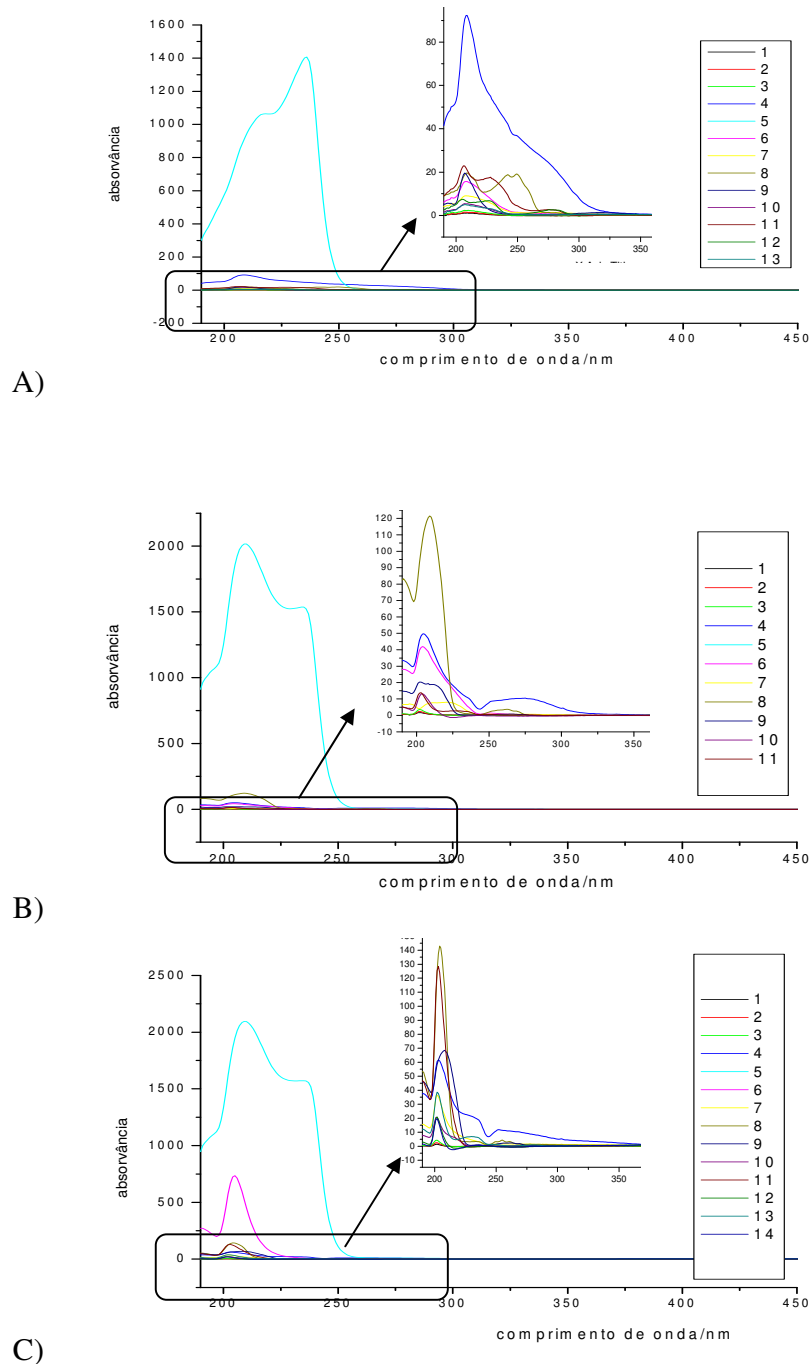
A Figura 15 mostra os cromatogramas das frações RP53 ao RP59 onde temos misturas de mesma proporção dos quatro solventes, 25%HEX:25%DIC:25%AE:25%MeOH (V/V/V/V), que foram analisados por CLAE na fase móvel F1 30%H<sub>2</sub>O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).



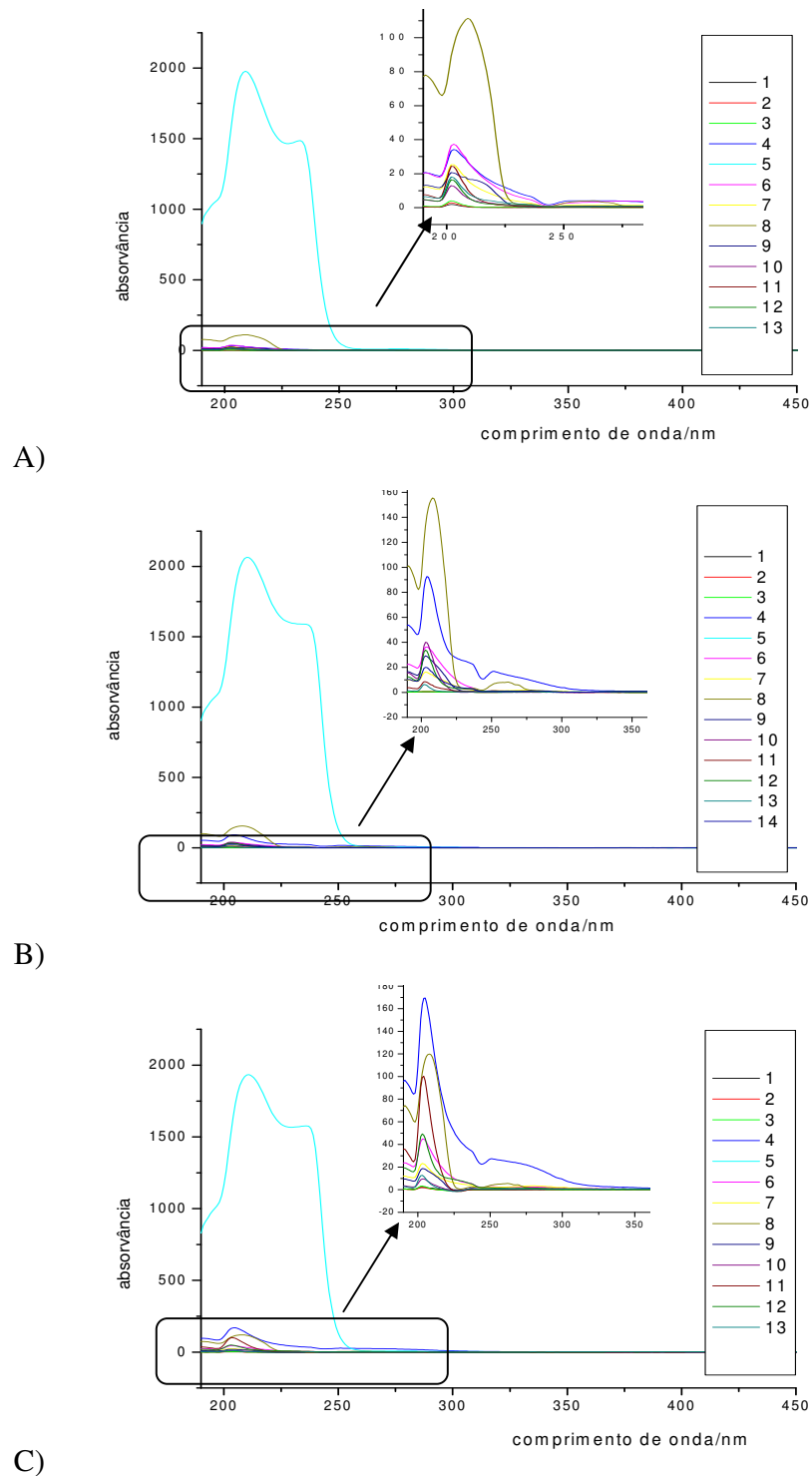
**Figura 15** – Cromatogramas de 7 frações (RP53, RP54, RP55, RP56, RP57, RP58 e RP59) da mistura 15 do planejamento estatístico, 25%HEX:25%DIC:25%AE:25%MeOH (V/V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30%H<sub>2</sub>O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).

A Figura 16 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos das frações RP53 (13 picos), RP54 (11 picos) e RP55 (14 picos) obtido na mistura quaternária com mesma proporção dos solventes, analisados na fase móvel F1 30%H<sub>2</sub>O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V). Observa-se na Figura 16A, que existe diferença no perfil dos espectros com relação aos perfis da Figura 16B e 16C. Este resultado sugere a variação de grupos de metabólitos quando temos todos os solventes envolvidos. A Figura 17 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos das

frações RP56 (13 picos), RP57 (14 picos), RP58 (13 picos), onde observamos o mesmo perfil entre as frações, havendo apenas a diferença de intensidade entre os picos.

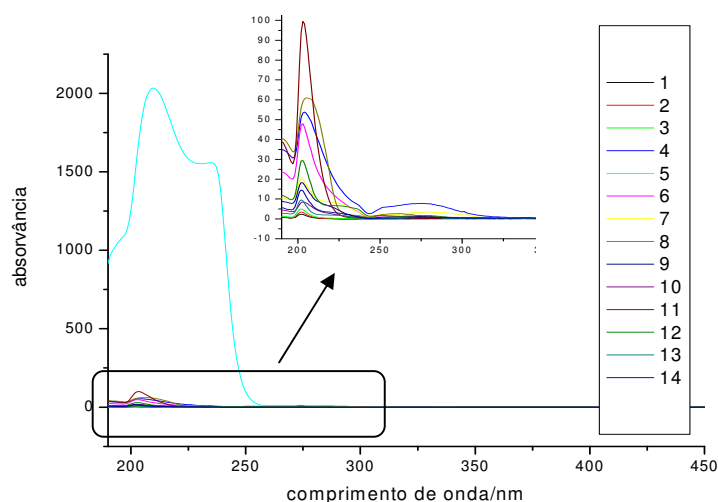


**Figura 16** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (A) RP53 (13 picos), (B) RP54 (11 picos) e (C) RP55 (14 picos) na mistura 15 do planejamento estatístico, 25%HEX:25%DIC:25%AE:25%MeOH (V/V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30%H<sub>2</sub>O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).



**Figura 17** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (A) RP56 (13 picos), (B) RP57 (14 picos) e (C) RP58 (13 picos) na mistura 15 do planejamento estatístico, 25%HEX:25%DIC:25%AE:25%MeOH (V/V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30%H<sub>2</sub>O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).

A Figura 18 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos da fração RP59 com 14 picos. Observa-se nessa figura que não existe diferenças no perfil dos espectros mostrando que não há diversidade de metabólitos nesse grupo, salvo o grupo RP53, Figura 16A.



**Figura 18** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos da fração (a) RP59 (14 picos) na mistura 15 do planejamento estatístico, 25%HEX:25%DIC:25%AE:25%MeOH (V/V/V/V) da CCA1 e analisados por CLAE na fase móvel F1 30%H<sub>2</sub>O:35%MeOH:30%ACN (V/V/V).

#### 4.1.2 Segundo sistema cromatográfico de coluna preparativa aberta (CCA2)

Após a eluição de todos os solventes usando as misturas do planejamento estatístico de misturas na CCA2 e reunidas por similaridade do perfil cromatográfico em camada delgada de sílica e espectros UV-vis, obteve-se 26 frações.

As proporções dos solventes, número de frações, bem como as polaridades de cada mistura de solventes estão apresentadas na Tabela 5. Observa-se na Tabela 4, que o maior número de grupos (4), foi obtido em 75%HEX:25%DIC (V/V), mistura 4 do planejamento de misturas binárias e em diclorometano puro, mistura 5 do planejamento de misturas binárias. Em geral, maiores grupos de frações foram obtidos em misturas contendo diclorometano.

Todas as frações (26) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). As duas fases móveis com diferentes forças cromatográficas também foram comparadas, a fase móvel F1 preparada em 30% $H_2O$ :35% $MeOH$ :30% $ACN$  (V/V/V), com força cromatográfica 2,0 e F2 preparada em 65% $H_2O$ :17,5% $MeOH$ :17,5% $ACN$  (V/V/V), com força cromatográfica 1,0.

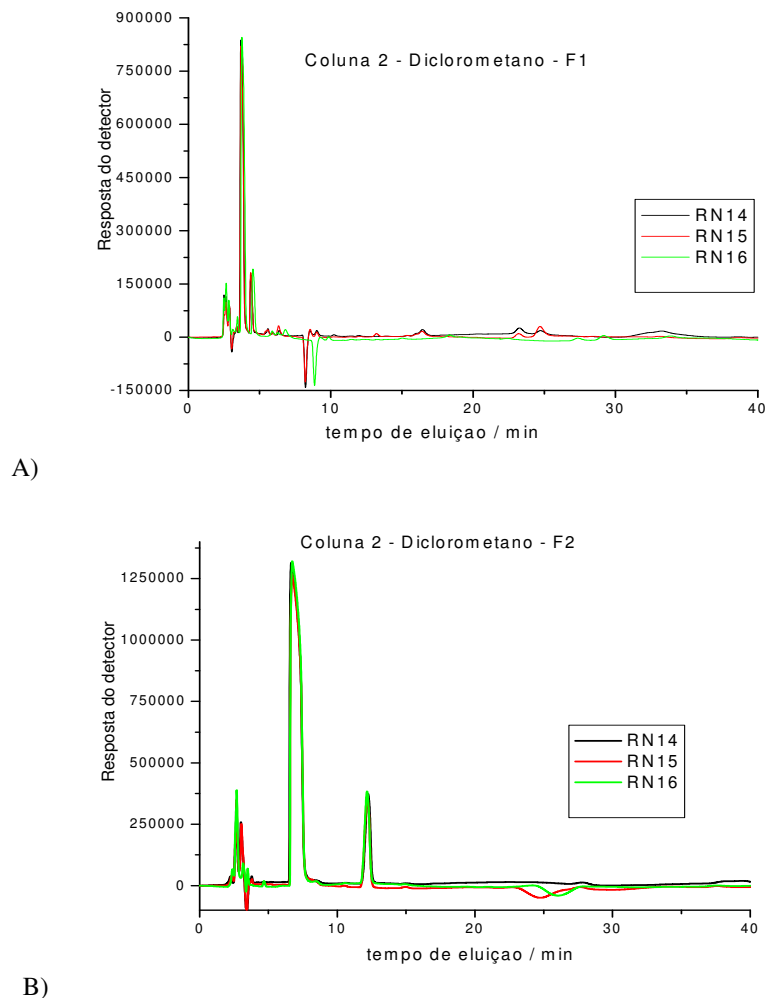
**Tabela 4** – Proporções das misturas e o número de frações obtidas na CCA2, usando o planejamentos de misturas binárias.

Misturas	Frações	Proporção dos Solventes				Número de Frações	Frações agrupadas	Polaridade do solvente
		HEX	DIC	AE.	MeOH			
1	RN01	1	0	0	0	27	1-20	0,100
	RN02						21-27	
2	RN03	0,75	0,25	0	0	24	28-31	0,850
	RN04						32-35	
	RN05						36-48	
	RN06						49-51	
3	RN07	0,50	0,50	0	0	21	52-61	1,600
	RN08						62-70	
	RN09						71-72	
4	RN10	0,25	0,75	0	0	22	73-79	2,350
	RN11						80-82	
	RN12						83-87	
	RN13						88-94	
5	RN14	0	1	0	0	20	95-97	3,100
	RN15						98-107	
	RN16						108-110	
	RN17						111-114	
6	RN18	0	0,75	0,25	0	19	115-131	3,425
	RN19						132-133	
7	RN20	0	0,50	0,50	0	17	134-143	3,750
	RN21						144-150	
8	RN22	0	0,25	0,75	0	14	151-158	4,075
	RN23						159-164	
9	RN24	0	0	1	0	18	165-182	4,400
10	RN25	0	0	0	1	12	183-187	5,100
	RN26						188-194	

Para avaliar o efeito dos quatro solventes no fracionamento cromatográfico foram escolhidas algumas frações contendo misturas ou solventes puros para comparação. As frações

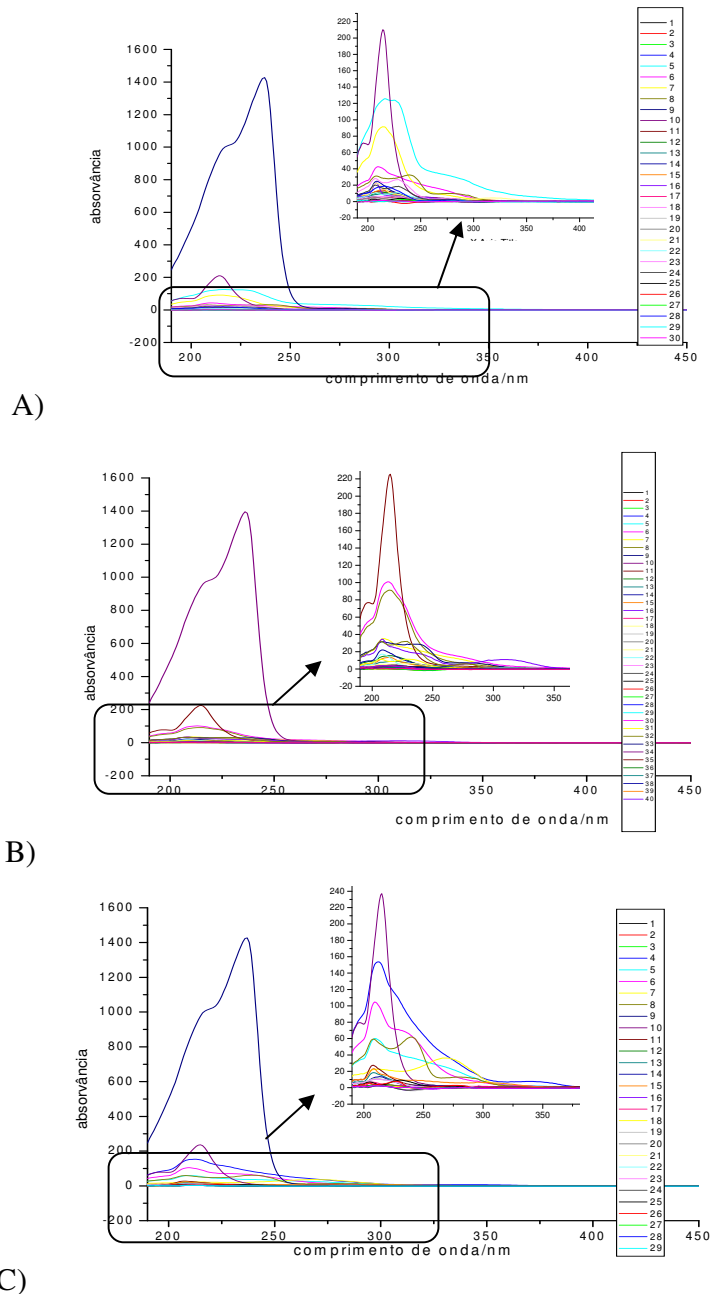
RN14, RN15 e RN16 eluídos na CCA2 com a mistura 5 do planejamento contendo diclorometano puro, foram analisados na CLAE nas duas fases móveis, F1 e F2.

A Figura 19 mostra os cromatogramas obtidos nas duas fases. Observa-se na Figura 19A que o cromatograma da fase F1, mostra maior informação da impressão digital devido ao maior número de picos encontrados, em relação a fase móvel F2, Figura 19B. Este resultado é concordante com aqueles obtidos Este resultado confirma aquele encontrado para a cromatografia de coluna usando o planejamento estatístico (CCA1).



**Figura 19** – Cromatogramas de 3 frações obtidas na mistura 5 do planejamento de misturas binárias (diclorometano) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis (a) F1 30% $H_2O$ :35% $MeOH$ :30% $ACN$  (V/V/V) e (b) F2 65% $H_2O$ :17,5% $MeOH$ :17,5% $ACN$  (V/V/V).

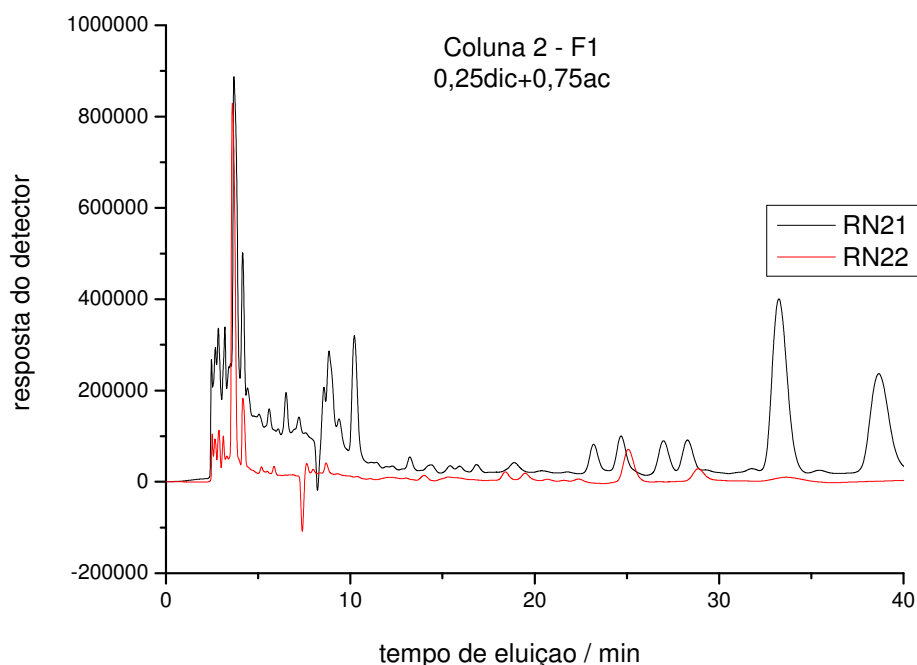
A Figura 20 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos da mistura 5 do planejamento de misturas binárias das frações RN14 (30 picos), RN15 (40 picos) e RN16 (29 picos) analisados na fase móvel F1 30% $\text{H}_2\text{O}$ :35% $\text{MeOH}$ :30% $\text{ACN}$  (V/V/V).



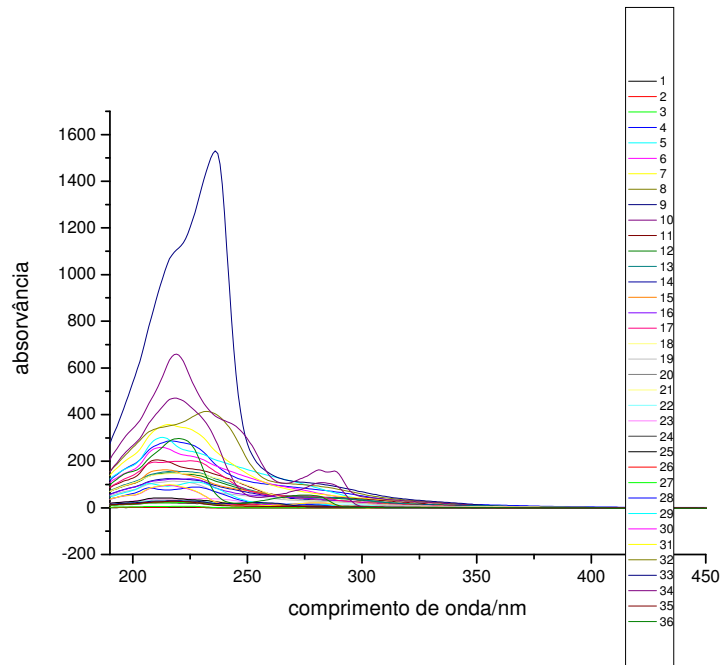
**Figura 20** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (a) RN14 (30 picos), (b) RN15 (41 picos) e (c) RN16 (29 picos) na mistura 5 do planejamento de misturas binárias (diclorometano) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F1 30% $\text{H}_2\text{O}$ :35% $\text{MeOH}$ :30% $\text{ACN}$  (V/V/V).

Observa-se nesta Figura 20, que as frações apresentam diferentes perfis de metabólitos, mas não uma boa separação dos mesmos, levando em consideração que diferentes metabólitos estão agrupados em uma mesma fração.

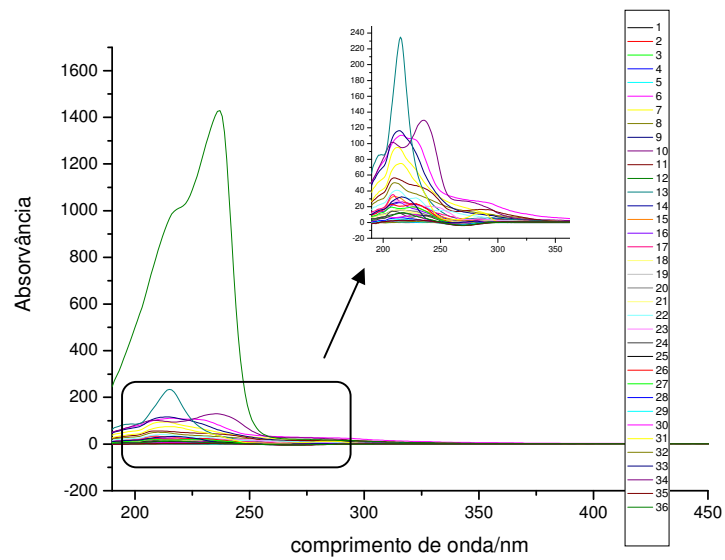
A figura 21 mostra o cromatograma da mistura 8 do planejamento de misturas binárias, com as frações RN21 e RN22. Observa-se que misturas contendo acetato de etila em sua maioria possuem picos cromatográficos com grande intensidade e bem separados, o que não ocorreu com outras misturas do planejamento binário. A figura 22 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos da mistura 8 do planejamento de misturas binárias das frações RN21 e RN22 ambas com 36 picos analisados na fase móvel F1 30% $\text{H}_2\text{O}$ :35% $\text{MeOH}$ :30% $\text{ACN}$  (V/V/V). Observa-se nesta Figura, que os grupos de frações apresentam o mesmos perfis de metabólitos, diferindo apenas na intensidade entre eles além de possuírem o mesmo número de picos.



**Figura 21** – Cromatograma das frações RN21 e RN22 na mistura 8 do planejamento de misturas binárias, 75%DIC:25%AE (V/V) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F1 30% $\text{H}_2\text{O}$ :35% $\text{MeOH}$ :30% $\text{ACN}$  (V/V/V).



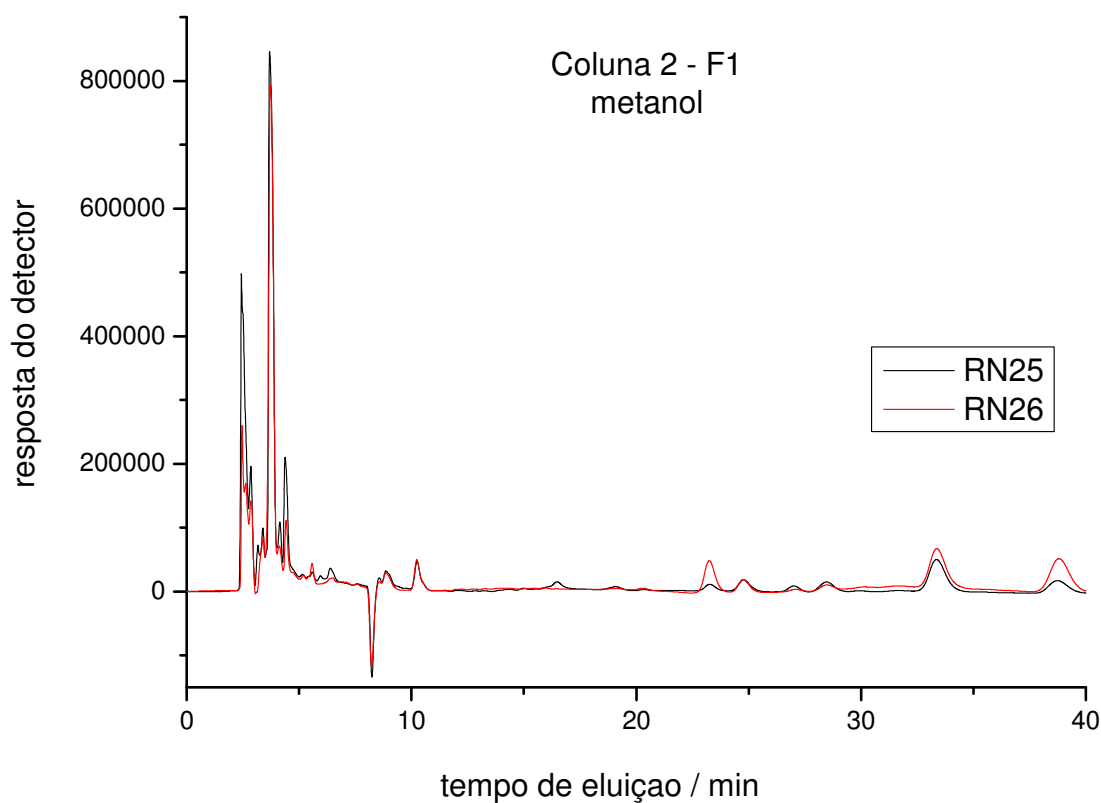
A)



B)

**Figura 22** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (a) RN21 (36 picos), (b) RN22 (36 picos) na mistura 8 planejamento de misturas binárias, 75%DIC:25%AE (V/V) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F1 30% $H_2O$ :35%MeOH:30%ACN (V/V/V).

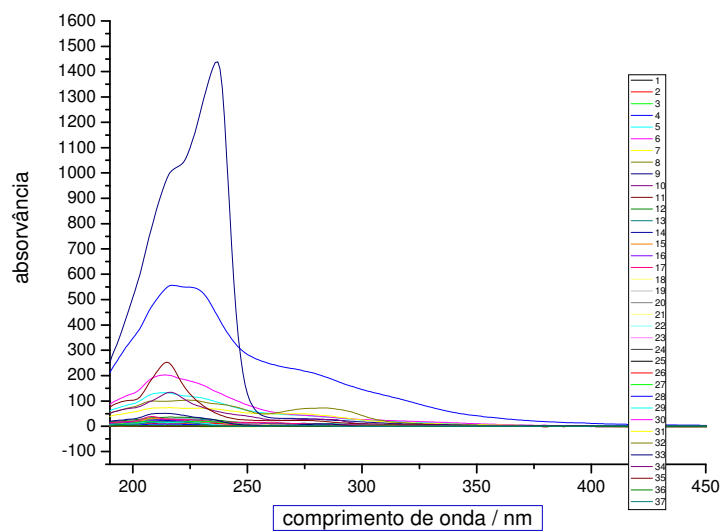
A Figura 23 mostra o cromatograma da mistura 10, última do planejamento de misturas binárias das frações RN25 e RN26. Observa-se que a fração contendo metanol fornece um cromatograma com vários picos, mostrando que quando utilizamos esta estratégia de separação, somente quando aumenta a polaridade é que são obtidos cromatogramas com grande quantidade de metabólitos e poucos separados.



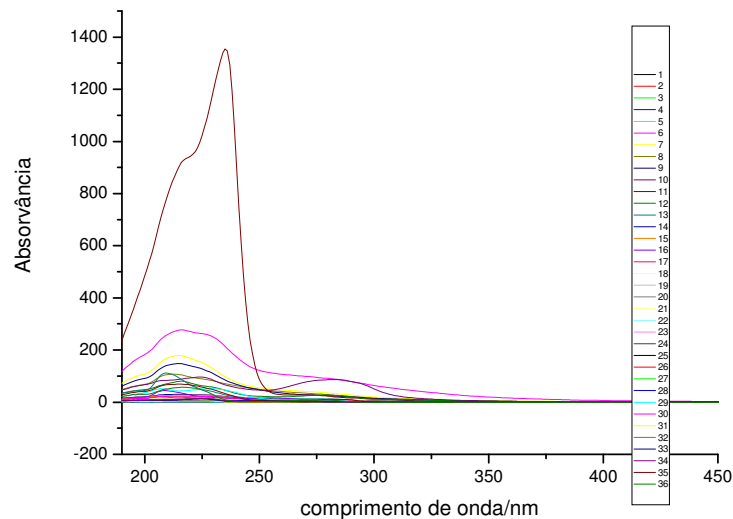
**Figura 23** – Cromatograma das frações RN25 e RN26 na mistura 10 do planejamento de misturas binárias, MeOH puro, da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F1 30% $H_2O$ :35%MeOH:30%ACN (V/V/V).

A Figura 24 mostra os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos das frações RN25 (37 picos) e RN26 (36 picos) na mistura 10 do planejamento de misturas binárias, contendo

metanol apenas como eluente. Observa-se que os perfis dos espectros são semelhantes e que apesar da grande quantidade de metabólitos extraídos nessa fração, não há grande diversidade dos mesmos. Este resultado mostra que utilizando o planejamento de misturas binárias diminui a separação dos metabólitos, pois devemos levar em consideração não apenas a polaridade do solvente como também a interação que ocorre entre os mesmos para obter uma boa separação.



A)

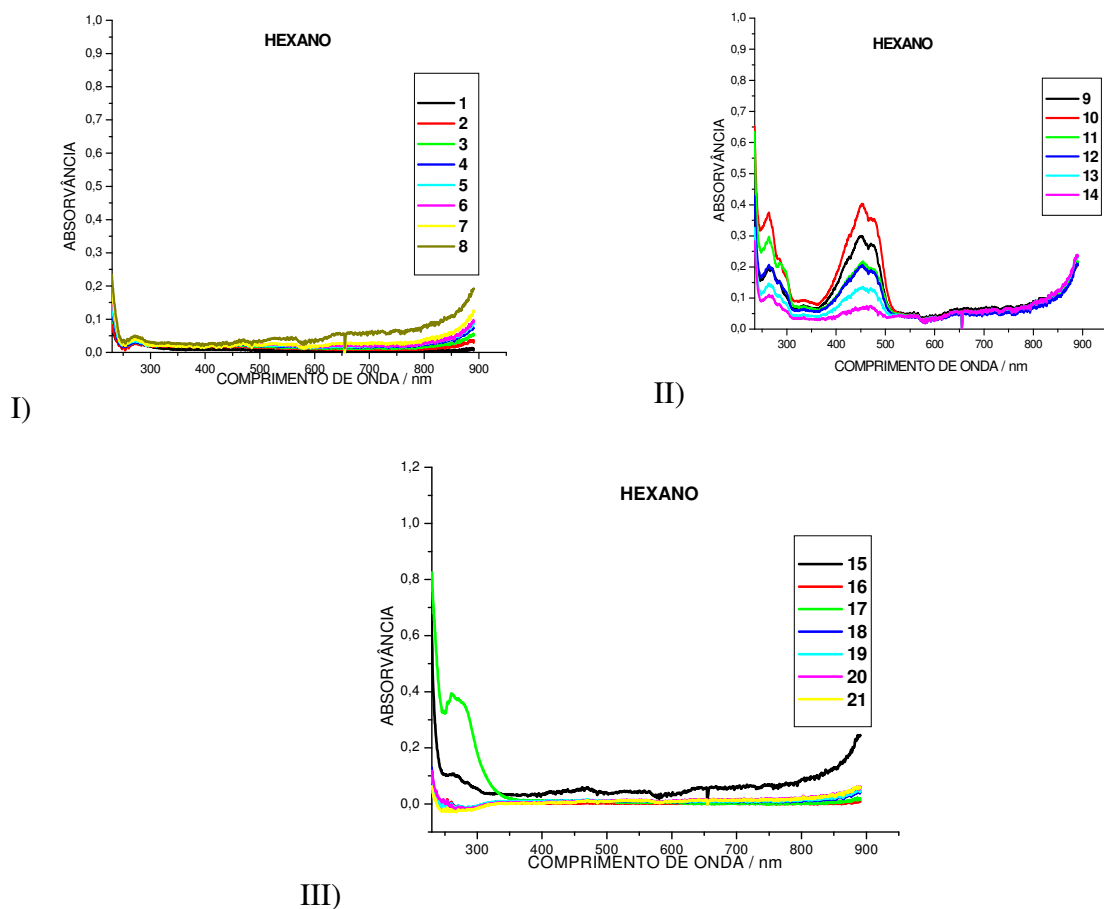


B)

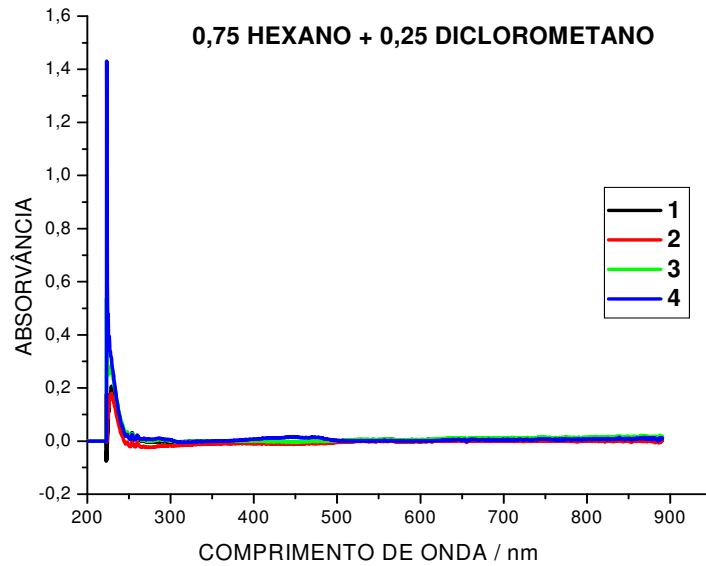
**Figura 24** – Espectros UV-vis dos picos cromatográficos das frações (A) RN25 (37 picos), (B) RN26 (36 picos) na mistura 10 planejamento de misturas binárias, MeOH puro, da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis F1 30% $H_2O$ :35%MeOH:30%ACN (V/V/V).

## 4.2 COMPARAÇÃO ENTRE A CCA2 E CCA1

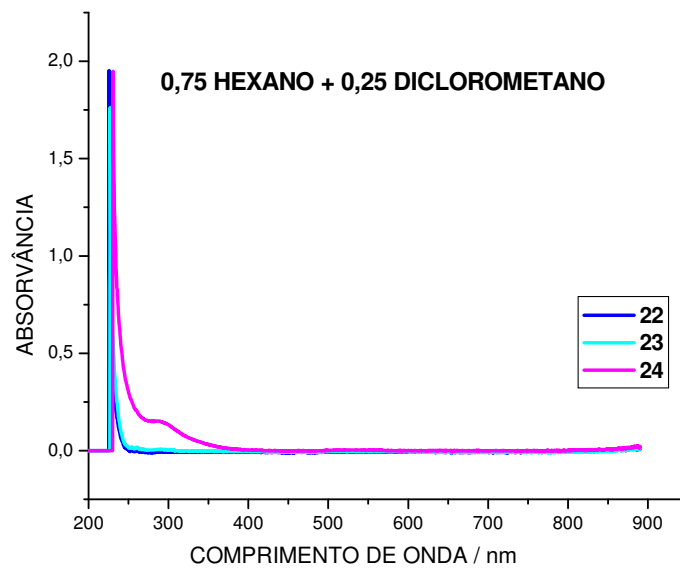
A Fig 25 mostra os espectros das três primeiras frações eluídas em hexano puro na CCA2 que foram os mesmos observados na CCA1. A Figura 26 mostra os espectros UV-Vis dos três grupos obtidos da fase móvel 75%HEX: 25%DIC(V/V) da CCA1. Observa-se nestas Figuras que não há uma diversidade na extração dos metabólitos na coluna. Por outro lado, quando o diclorometano é substituído pelo acetato de etila (fase da coluna CCA1), Figura 27 mostra que obtém uma grande variação na composição dos grupos na coluna cromatográfica preparativa aberta 1.



**Figura 25** – Espectros UV-Vis das frações eluídas na mistura 1 (hexano) separadas em 3 diferentes grupos, (I) frações de 1-8 representando o grupo 1, (II) frações de 9-14 representando o grupo 2 e (III) frações de 15-21 representando o grupo 3 da CCA2.

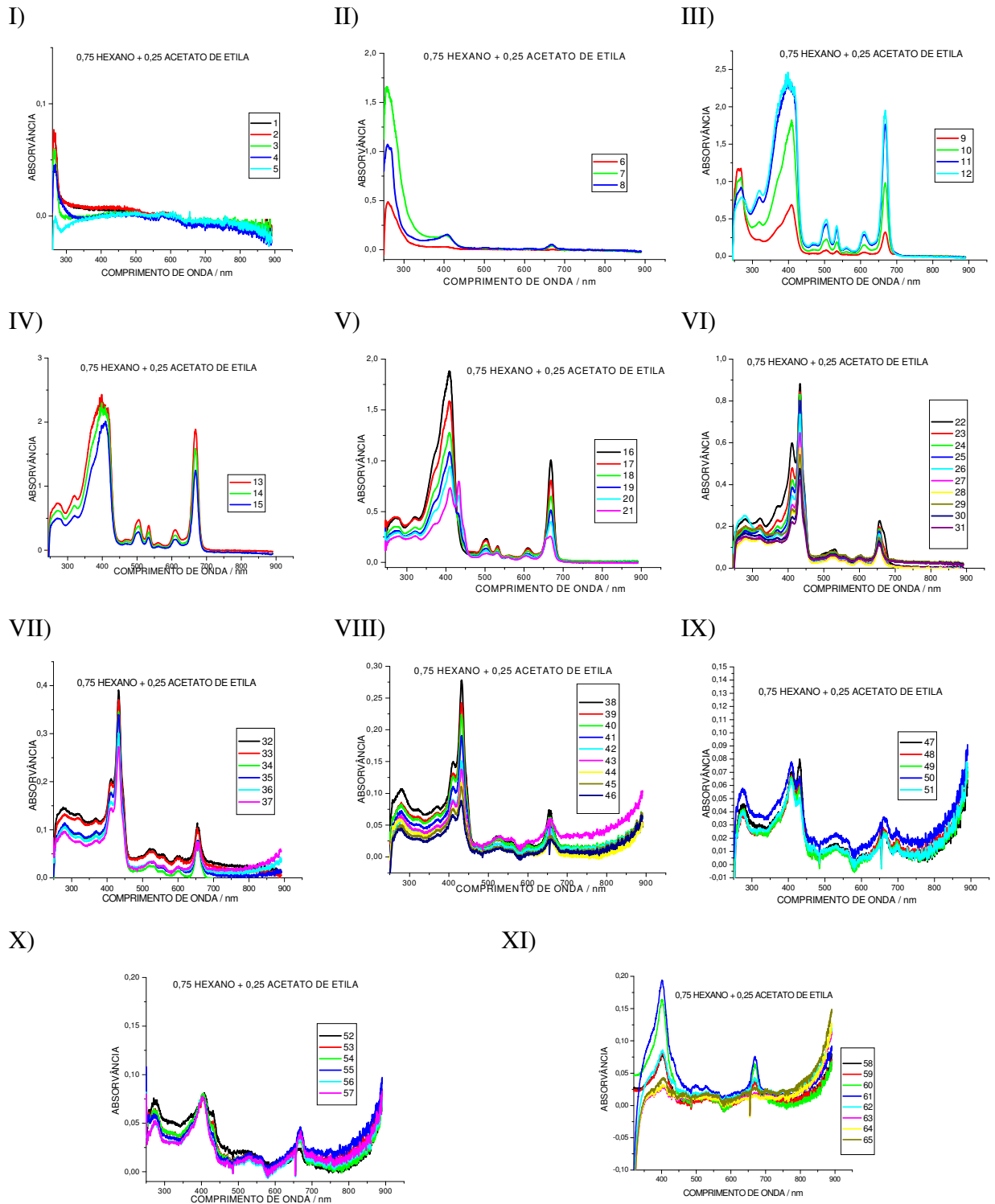


I)



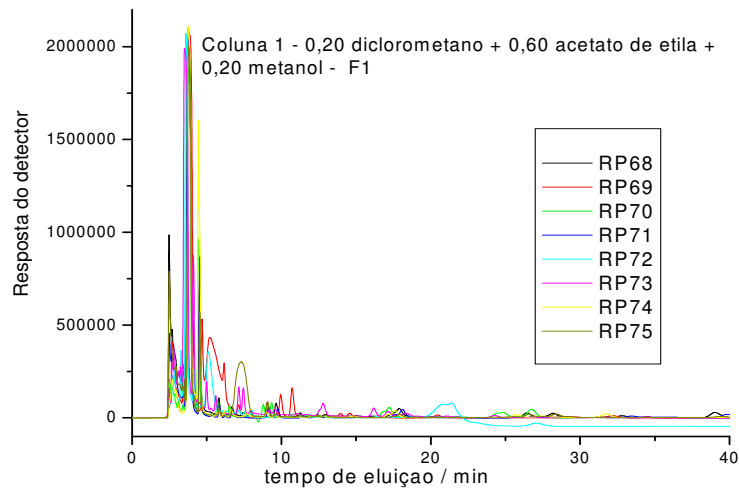
II)

**Figura 26** – Espectros UV-vis das frações eluídas na mistura 2, 75%HEX:25%DIC(V/V), separadas em 2 diferentes grupos, (I) frações de 1-4 representando o grupo 4 e (II) frações de 22-24 representando o grupo 5 da CCA1.

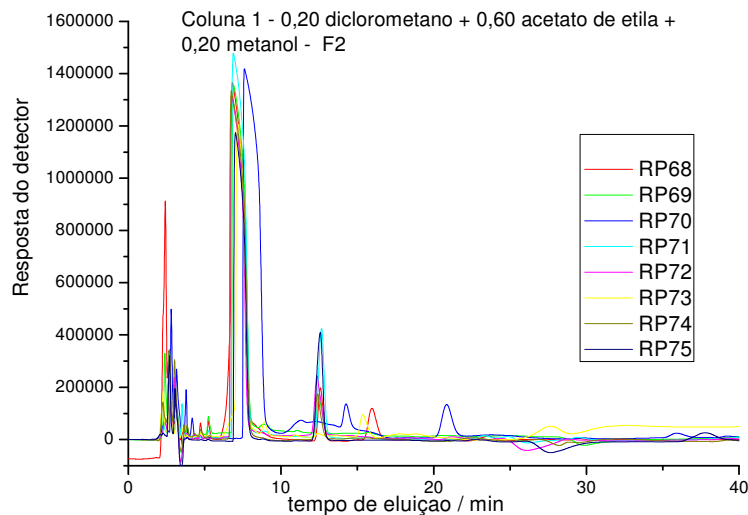


**Figura 27** – Espectros UV-vis das 65 frações da mistura 3 do planejamento 75%HEX: 25%AE(V/V) da CCA1 separadas em 11 diferentes grupos. (I) frações 1-5, (II) frações 6-8, (III) frações 9-12, (IV) frações 13-15, (V) frações 16-21, (VI) frações 22-31, (VII) frações 32-37, (VIII) frações 38-46, (IX) frações 47-51, (X) frações 52-57 e (XI) frações 58-65.

A Figura 28 mostra os cromatogramas da CCA1 das frações agrupadas por uma mistura ternária de solventes, 20%DIC:60%AE:20%MeOH(V/V/V), com uma polaridade de 4,28. A Figura 29 mostra os cromatogramas da CCA2 em uma fase com polaridade muito próxima (acetato de etila de polaridade 4,40)

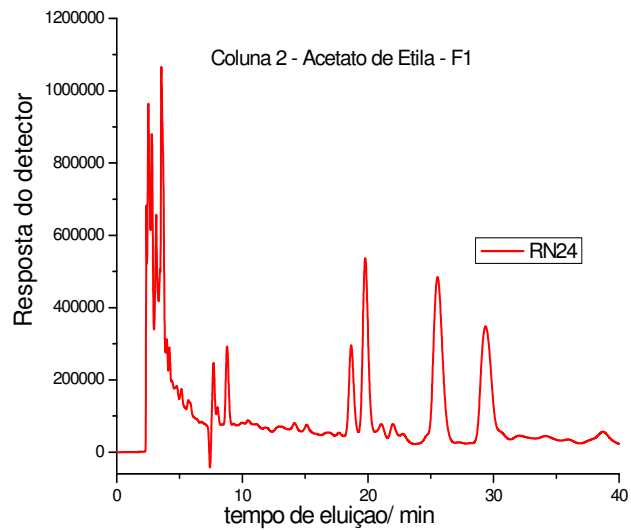


A)

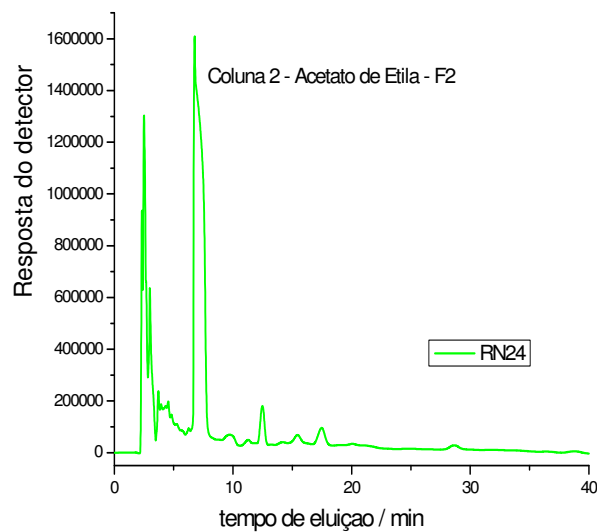


B)

**Figura 28** – Cromatogramas de 8 diferentes frações obtidas na mistura 20%DIC:60%AE:20%MeOH(V/V/V) da CCA1 analisados por CLAE nas fases móveis (A) F1 30% $H_2O$ :35%MeOH:30%ACN (V/V/V) e (B) F2 65% $H_2O$ :17,5%MeOH:17,5%ACN (V/V/V).



A)



B)

**Figura 29** – Cromatogramas da fração obtida na mistura 9 (acetato de etila) da CCA2 e analisados por CLAE nas fases móveis (A) F1 30% $H_2O$ :35% $MeOH$ :30% $ACN$  (V/V/V) e (B) F2 65% $H_2O$ :17,5% $MeOH$ :17,5% $ACN$  (V/V/V).

Mais uma vez, observa-se que os cromatogramas da CCA 1 trazem mais informações que aqueles da coluna 2, mostrando que os efeitos de interação entre os solventes na separação é maior que a polaridade.



# Capítulo V

# Conclusões

## 5 CONCLUSÕES FINAIS

Com a utilização da coluna de sílica gel eluída com planejamento estatístico de quatro componentes (CCA1) e modo clássico (CCA2) foi possível mostrar que:

✓ Na CCA1 houve a formação de 603 frações que foram reunidas por similaridade em 95 diferentes grupos.

✓ A mistura 13 da CCA1, diclorometano puro, onde temos os grupos RP45, RP46 e RP47, obteve-se perfis de espectros semelhantes o que sugere a separação dos grupos de metabólitos pois sua absorção foram em comprimento de onda diferentes.

✓ Na mistura 9 da CCA1, 50%HEX50%MeOH (V/V), obteve-se diversidade nos perfis dos espectros dos picos dos grupos, mostrando a importância das interações entre os solventes , não levando em consideração somente sua polaridade.

✓ Na CCA2 houve 194 frações que foram reunidas por similaridade em 26 diferentes grupos.

✓ A mistura 5 da CCA2, diclorometano puro, mostraram diferentes perfil nos espectros mas não uma boa separação dos mesmos, levando em consideração que diferentes metabólitos estão agrupados em uma mesma fração.

✓ A mistura 10 da CCA2, metanol puro, mostra que os perfis dos espectros são semelhantes e que apesar da grande quantidade de metabólitos extraídos nessa fração, não há grande diversidade dos mesmos.

✓ Este resultado mostra que utilizando o planejamento de misturas binárias diminui a separação dos metabólitos, pois devemos levar em consideração não apenas a polaridade do solvente como também a interação que ocorre entre os mesmos para obter uma boa separação.

✓ Os espectros UV-Vis dos picos cromatográficos na CCA1 mostrou uma maior diversidade

✓ Com o auxílio da cromatografia líquida de alta eficiência foi possível distinguir qual coluna de sílica gel extraiu maior diversidade de metabólitos utilizando as fases móveis F1 (30% $H_2O$ :35%MeOH:35%ACN) e F2 (65% $H_2O$ :17,5%MeOH:17,5%ACN)

✓ A melhor fase móvel para análise dos extratos das folhas da *Bauhinia variegata* L. na CLAE foi preparada em 30% $H_2O$ :35%MeOH:35%ACN (V/V/V), observando o maior número de informação na impressão digital da planta pois forneceu o maior número de picos de metabólitos, mostrando claramente o efeito de interação soluto-solvente na cromatografia.

✓ O planejamento estatístico para misturas de solventes oferece grande variação na composição das frações separadas na CCA1, quando comparada com a CCA2.

✓ Observou-se que a troca do diclorometano para a mesma quantidade de acetato de etila na CCA1, favorece melhor separação dos metabólitos, rendendo 11 diferentes frações. Estas frações não são observadas no procedimento clássico, CCA2.

✓ Quando comparado os cromatogramas de solventes eluídos com polaridades próximas nas duas colunas verificamos a importância das interações entre os solventes, pois uma mistura ternária de 20%DIC:60%AE:20%MeOH (V/V/V) forneceu mais informação do que o solvente acetato de etila da CCA2.

# Referências



## REFERÊNCIAS

1. BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, Interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A perigração de um Pacatubano, **Química Nova**, v. 17, p. 405-445, 1994.
2. CHIRINOS, R. ROGEZ, H. CAMPOS, D. PEDRESCHI, R. LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaedum tuberosum* Ruíz e Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**. v. 55, p. 217-225, 2007.
3. PATHIRANA, C. L.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**. v. 93,n. 1, p. 47-56, 2005.
4. TABART, J.; KEVERS, C.; SIPEL, A.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O. DOMMES, J. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. **Food Chemistry**. v. 105, n. 3, p. 1268-1275, 2007.
5. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC. p. 1090, 2004.
6. OLIVEIRA, Juarez Souza de. **CHARACTERIZAÇÃO, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE COMPOSTOS DE URUCUM (*Bixa orellana* L.)** 2005. Dissertação de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

7. 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.
8. COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S.. **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. São Paulo:Unicamp, 2006.
9. SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2ª ed., Editora John Wiley & Sons Inc., New York, 1997.
10. SILVA, L.M.C.; **Estudo exploratório de extratos de carquejas por FTIR, CLAE e métodos quimiométricos**. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.
11. SEWELL, P.A. e CLARKE, B., Chromatographic Separations- **Analytical Chemistry by Open Learning** John Wiley & Sons, 335p.,1994.
12. 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.
13. SNYDER, L.R.; CARR, P.W.; RUTAN, S.C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. **Journal of Chromatography A**, v.656, n.1-2, p.537-547, 1993.

14. CECHINEL FILHO, V., SILVA, K. L., Plantas do Gênero Bauhinia: Composição química e potencial farmacológico, **Química Nova**, v. 25, nº 3, p. 449-454, 2002.
15. HOPKE, P.K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v.500, n.1-2, p.365-377, 2003.
16. LONNI, A. A. S. G. Caracterização e identificação química de carquejas do gênero *Baccharis* por métodos quimiométricos. **Dissertação de Mestrado em Química dos Recursos Naturais**, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2002.
17. SENA, M. M., POPPI, R. J., FRIGUETTO, R. T. S., VALARINI, P. J., Avaliação do uso de métodos quimiométricos de análise de solos, **Química Nova**, v. 23, nº 4, p.547-556, 2000.
18. 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.
19. DELAROZA, F. Influência da composição da fase móvel e meio extrator na qualidade da impressão digital cromatográfica da *Bauhinia variegata L.* por planejamento estatístico. **Dissertação de Mestrado em Química dos Recursos Naturais**, Universidade Estadual de Londrina, 2007.