



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PATRÍCIA KAORI SOARES

**TAXONOMIA POR ABORDAGEM METABOLÔMICA E  
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA ANÁLISE E  
RASTREIO DE PLANTAS DO GÊNERO *BAUHINIA***

---

Londrina  
2006

PATRICIA KAORI SOARES

**TAXONOMIA POR ABORDAGEM METABOLÔMICA E  
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA ANÁLISE E  
RASTREIO DE PLANTAS DO GÊNERO *BAUHINIA***

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

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

Londrina  
2006

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

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

S676t Soares, Patrícia Kaori.

Taxonomia por abordagem metabólica e métodos quimiométricos para análise e rastreio de plantas do gênero *Bauhinia* / Patrícia Kaori Soares. – Londrina, 2006.  
103f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

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

Bibliografia: f. 99-103.

1. Química analítica – Teses. 2. Taxonomia vegetal – Teses. 3. Quimiometria – Teses. 4. Pata de vaca – Teses. 5. Bauhinia – Teses. 6. Plantas – Análise – Teses. 7. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 8. Espectroscopia de infravermelho – Teses. 9. Espectrofotometria – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 543.4

PATRICIA KAORI SOARES

**TAXONOMIA POR ABORDAGEM METABOLÔMICA E  
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA ANÁLISE E  
RASTREIO DE PLANTAS DO GÊNERO *BAUHINIA***

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Roy Edward Bruns

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Sônia Regina G. Barreto

Londrina, 15 de fevereiro de 2006.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Eudes e Zilda (in memoriam), que me apoiaram incondicionalmente com dedicação paciência, carinho, amizade, atenção, confiança compreensão e principalmente amor, tornando possível a minha caminhada até aqui e que me motivam a seguir em frente.

## AGRADECIMENTOS

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

Em especial à Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio pela amizade, companheirismo, paciência, dedicação, incentivo, garra, excelente orientação e ensinamentos transmitidos.

À Professora Dra. Isabel Craveiro Moreira pela ajuda na interpretação dos espectros de infravermelho.

À Professora Dra. Flaveli A. de Souza Almeida pela colaboração neste trabalho.

Ao Professor Dr. Roy E. Bruns pela colaboração e discussão do artigo.

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

Ao técnico Jurandir Pereira Pinto pelo auxílio no uso do Cromatógrafo a Líquido.

Aos pesquisadores do Laboratório de Moléculas Bioativas do Depto. de Química da UEL pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos.

Ao taxonomista Manuel R. C. Paiva pela classificação botânica das amostras.

Aos amigos de todas as horas: Nelson, Juliana, Cacá, Josy, Renata, Paulo Henrique, Thaise, Renata Galli e André pelo apoio e carinho.

Ao meu grande amigo Lucas Mariano da Cunha e Silva pela intensa colaboração e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do mestrado, em especial a minha amiga Aline Almeida pela amizade, paciência, companheirismo e força nestes anos de convivência.

Aos colegas de laboratório, especialmente à amiga Fernanda Delaroza.

À minha família: Pai, Mãe, Cau, Décio, Nagá, Patrícia, Matheus e Nathália por todo amor e carinho, que me proporcionaram força e razão para continuar.

À todos os meus familiares, especialmente à minha tia Elena e minha vó Hisako pela confiança, amor e carinho despendidos todos os dias.

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

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

À todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SOARES, Patrícia K. **Taxonomia por abordagem metabolômica e métodos quimiométricos para análise e rastreio de plantas do gênero *Bauhinia***. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.

## RESUMO

O experimento metabolômico tem como objetivo obter informação biológica relacionada ao metaboloma, rastreando tantos metabólitos quanto possível em uma única análise. Para este experimento o extrato não é usualmente purificado, em contraste com os procedimentos de rotina usados para análise de metabólitos específicos. Assim, uma abordagem mais adequada é analisá-los por meio da “impressão digital dos metabólitos”. Neste trabalho foram investigadas as folhas de sete plantas do gênero *Bauhinia* (Leguminosae-Caesalpinioideae), conhecidas vulgarmente como pata-de-vaca, sendo três classificadas como *Bauhinia forficata* Link, três como *Bauhinia variegata* L. de flor branca, rosa e roxa e uma comercial nominada *Bauhinia Candicans*. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-Vis). Com o auxílio dos métodos quimiométricos de modelos de misturas, Análise de Componentes Principais (ACP), Análise Hierárquica (AH), Modelos independentes de similaridade usando Componentes Principais (SIMCA) e Peso de Variância, foi possível determinar uma composição ótima do solvente extrator (36% de diclorometano, 17% de etanol e 47% de acetato de etila, %v/v), traçar o perfil metabolômico sem a necessidade de identificar seus constituintes químicos, determinar uma região discriminatória no cromatograma. Baseado nos grupos funcionais encontrados no espectro de infravermelho foi possível inferir que a *B. candicans* contém mais alcalóides derivados de aminoácidos em relação às outras espécies estudadas. Finalmente comprovar que a *B. candicans* tida como sinonímia da *B. forficata* não é semelhante a nenhuma espécie estudada.

**Palavras-chave:** Química Analítica. Taxonomia Vegetal. Pata de vaca. *Bauhinia*. Plantas. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Espectroscopia no Infravermelho. Espectrofotometria.

## ABSTRACT

Metabolomic experiments try to obtain biological information related to the metabolome by examining as many metabolites as possible in a single analysis. In these experiments the extract is normally purified in contrast to routine procedures used for analyzing specific metabolites. Therefore a more adequate manner to analyze them is by their metabolite fingerprint. In this work the leaves of seven plants of the *Bauhinia* (Leguminosae-Caesalpinioideae) genus, popularly known as “cow-hoof” were investigated with three having been classified as *Bauhinia forficata* Link, three as *Bauhinia variegata* L. with white, red and purple flowers and one that is commercially called *Bauhinia Candicans*. The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography in the reversed phase (HPLC), Fourier transform infrared spectroscopy and UV-visible spectrophotometry (UV-Vis). Using the chemometrics methods of mixture design, principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), similarity independent models using principal components (SIMCA) and variance weighting it was possible to determine an optimum solvent extraction medium (36% dichloromethane, 17% ethanol, and 47% ethyl acetate. % v/v), trace the metabolic profile without identifying its chemical constituents and determine a chromatographic discriminating region. Based on the functional groups identified from infrared spectroscopic evidence it was possible to infer that *B. candicans* contains more aminoacid alkaloid derivatives relative to the other species studied. Finally it was shown that *B. candicans*, often taken as synonymous with *B. forficata*, is not similar to any of the other species studied.

**Key works** : Analytical Chemistry. Plant Taxonomists. Bauhinia. Plants. High Performance Liquid Chromatography. Spectrophotometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do símbolo da quimiometria, .....	23
Figura 2	Esquema da seqüência usada na análise multivariada de dados experimentais .....	25
Figura 3	Esquema da decomposição da matriz <b>A</b> no produto de duas matrizes.....	28
Figura 4	Triângulo de seletividade para solventes para cromatografia .....	36
Figura 5	Foto das seis exsiccatas classificadas no herbário FUEL: (a)-(c) <i>B. forficata</i> Link e (d)-(f) <i>B. variegata</i> L. ....	40
Figura 6	Seqüência do procedimento para o preparo dos extratos para a escolha do solvente extrator .....	41
Figura 7	Planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex modificado com 3 componentes para a escolha do solvente extrator .....	42
Figura 8	Planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex modificado com 3 componentes para a escolha da fase móvel.....	44
Figura 9	Seqüência do procedimento para o preparo das amostras para análise por Cromatografia em Camada Delgada .....	45
Figura 10	Seqüência do procedimento para o preparo das amostras para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. ....	46
Figura 11	Seqüência do procedimento para o preparo das amostras para análise por espectrofotometria no ultravioleta-visível.....	48
Figura 12	Gráfico dos rendimentos obtidos usando planejamento de misturas de três componentes.....	51
Figura 13	Curva de nível para a polaridade dos eluentes do planejamento para três componentes.....	53
Figura 14	Curva de nível para a força dos eluentes do planejamento .....	53
Figura 15	Placa cromatográfica para <i>B. forficata</i> eluída na fase AMA 100% (ponto 3 do planejamento) .....	54
Figura 16	Placa cromatográfica para <i>B. forficata</i> eluída na fase metanol:acetonitrila:AMA 1/6:1/6:2/3 (27% metanol, 27% acetonitrila e 46% água) (ponto 10 do planejamento) .....	54
Figura 17	Placa cromatográfica para <i>B. forficata</i> eluída na fase acetonitrila:AMA 1/2:1/2 (ponto 5 do planejamento) .....	54

Figura 18	Curva de nível para o modelo quadrático ajustado para escolha do melhor solvente extrator. ....	56
Figura 19	Resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático no estudo de extratos da <i>B. forficata</i> para escolha do solvente extrator .....	56
Figura 20	Cromatogramas de cada amostra de F obtidas de acordo com o planejamento experimental para escolha do solvente extrator.....	57
Figura 21	Gráfico dos escores da CP1 e CP2 dos dados cromatográficos dos 20 extratos diluídos no solvente extrator. ....	58
Figura 22	Gráfico dos loadings da CP1 com CP2 para os dados cromatográficos dos 20 extratos .....	59
Figura 23	Cromatogramas dos extratos da <i>B. forficata</i> e <i>B. candicans</i> extraídos em etanol puro.....	60
Figura 24	Cromatogramas dos extratos d <i>B. forficata</i> e <i>B. candicans</i> extraídos em diclorometano puro .....	61
Figura 25	Dendrograma baseado nos dados cromatográficos dos extratos de F e C .....	62
Figura 26	Cromatogramas de um exemplar de cada uma das 7 plantas pesquisadas com tempo de retenção de 15 min.....	63
Figura 27	Cromatogramas de um exemplar de cada uma das 7 plantas pesquisadas com tempo de retenção no intervalo entre 0,16 a 3,62 min .....	64
Figura 28	Gráfico dos escores da CP1 com CP2 dos dados cromatográficos das amostras obtidas na condição otimizada .....	65
Figura 29	Gráfico dos loadings da CP1 com CP2 dos dados cromatográficos dos 70 extratos obtidos na condição otimizada .....	66
Figura 30	Gráfico dos escores da CP2 com CP3 dos dados cromatográficos dos 70 extratos obtidos na condição otimizada .....	67
Figura 31	Gráfico dos loadings da CP3 dos dados cromatográficos dos 70 extratos.....	67
Figura 32	Diagrama baseado nos dados cromatográficos dos 70 extratos .....	68
Figura 33	Gráfico dos escores das componentes principais 1 e 2 dos espectros obtidos dos cromatogramas das 7 plantas estudadas .....	72
Figura 34	Gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 2 dos espectros obtidos dos cromatogramas das 7 plantas estudadas.....	73
Figura 35	Gráfico dos escores da CP2 com a CP3 para as amostras do grupo IV. ....	74
Figura 36	Gráfico dos loadings das componentes principais 2 e 3 para as amostras do grupo IV .....	75

Figura 37	Gráfico dos escores das componentes principais 2 e 3 para as amostras classificadas como <i>Bauhinia forficata Link</i> e para a amostra comercial .....76	76
Figura 38	Gráfico dos loadings das componentes principais 2 e 3 para as amostras classificadas como <i>Bauhinia forficata Link</i> e para a amostra comercial .....77	77
Figura 39	Diagrama baseado nos dados cromatográficos das 40 amostras de <i>Bauhinia</i> .....78	78
Figura 40	Espectros de infravermelho das 20 amostras do planejamento experimental.....79	79
Figura 41	Gráfico dos escores da CP1 e CP2 dos dados espectrais das amostras das duas espécies de <i>Bauhinia</i> .....80	80
Figura 42	Gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para as 20 amostras do planejamento (Fig 7).....81	81
Figura 43	Espectros de infravermelho dos extratos 1(diclorometano) e 2 (etanol) de C e F.....83	83
Figura 44	Dendrograma obtido pela AH dos extratos das duas espécies de <i>Bauhinia</i> .....84	84
Figura 45	Espectros dos extratos da <i>B. forficata</i> obtidos em diclorometano puro etanol puro e na condição otimizada.....85	85
Figura 46	Espectros dos extratos da <i>B. candicans</i> obtidos em diclorometano puro, etanol puro e na condição otimizada.....86	86
Figura 47	Espectros de infravermelho de um exemplar de cada uma das sete plantas obtidas na condição otimizada .....87	87
Figura 48	Gráfico dos escores da CP2 com CP3 dos dados espectroscópicos das 70 amostras obtidas na condição otimizada .....88	88
Figura 49	Gráfico dos loadings da CP2 com CP3 dos dados espectroscópicos das 70 amostras obtidas na condição otimizada .....89	89
Figura 50	Dendrograma baseado nos dados obtidos por FTIR para as 7 plantas preparadas na condição otimizada.....90	90
Figura 51	Espectros no ultravioleta visível de um exemplar de cada uma das sete plantas preparadas na condição otimizada .....91	91
Figura 52	Gráfico dos escores das componentes principais 2 e 3 dos 70 espectros no ultravioleta visível.....92	92
Figura 53	Gráfico dos loadings das componentes principais 2 e 3 dos 70 espectros no ultravioleta visível.....93	93
Figura 54	Dendrograma baseado nos dados dos espectros obtidos no ultravioleta visível para as 7 plantas.....94	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Membros dos grupos determinados por Snyder .....	36
Tabela 2	Descrição das amostras de plantas do gênero <i>Bauhinia</i> utilizadas neste trabalho .....	39
Tabela 3	Matriz de planejamento para escolha do solvente extrator.....	43
Tabela 4	Matriz de planejamento para a escolha da fase móvel.....	52
Tabela 5	Resultado da classificação das amostras do conjunto de dados cromatográficos normalizados, através do SIMCA.....	69
Tabela 6	Peso da variância obtida através do Peso de Fisher para cada par de categoria nos respectivos tempos de retenção .....	70
Tabela 7	Tempos de retenção dos picos encontrados nos cromatogramas das 7 plantas estudadas.....	71
Tabela 8	Resultado da classificação das amostras do conjunto de dados espectroscópicos na região UV-Vis, através do SIMCA.....	95

## LISTA DE SIGLAS

<b>A</b>	Acetato de etila
<b>ACP</b>	Análise de componentes principais
<b>AH</b>	Análise hierárquica
<b>AMA</b>	Fase móvel correspondente ao ponto 3 do planejamento composta por 15% de metanol, 15% de acetonitrila e 70% de água
<b>C</b>	Amostra comercial de Bauhinia candicans
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgad
<b>CCD-FN</b>	Cromatografia em camada delgada em fase normal
<b>CFN</b>	Cromatografia em fase normal
<b>CFR</b>	Cromatografia em fase reversa
<b>CG</b>	Cromatografia gasosa
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CLAE-FR</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
<b>CP1</b>	Componente principal 1
<b>CP2</b>	Componente principal 2
<b>CP3</b>	Componente principal 3
<b>D</b>	Diclorometano
<b>DABC</b>	Drug Administration Bureau of China
<b>E</b>	Etanol
<b>EC</b>	Eletroforese capilar
<b>EMEA</b>	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
<b>F</b>	Planta classificada como Bauhinia forficata Link com número de identificação 36.475
<b>F1</b>	Planta classificada como Bauhinia forficata Link com número de identificação 36.486
<b>F2</b>	Planta classificada como Bauhinia forficata Link com número de identificação 37.339
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FE</b>	Fase estacionária
<b>FM</b>	Fase móvel
<b>FN</b>	Fase normal
<b>FR</b>	Fase reversa

<b>FTIR</b>	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
<b>IR</b>	Espectroscopia de absorção no infravermelho
<b>KNN</b>	Regra dos K vizinhos mais próximos
<b>LQCN</b>	Laboratório de quimiometria em ciências naturais
<b>MS</b>	Espectrometria de massa
<b>NIR</b>	Espectroscopia de absorção no infravermelho próximo
<b>NMR</b>	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>SIMCA</b>	Modelo independente de similaridade utilizando componentes principais
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta-visível
<b>VBr</b>	Planta de flor branca classificada como Bauhinia variegata L com número de identificação 36.474
<b>VRs</b>	Planta de flor branca classificada como Bauhinia variegata L com número de identificação 36.473
<b>VRx</b>	Planta de flor branca classificada como Bauhinia variegata L com número de identificação 36.472

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	16
<b>1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	17
<b>CAPÍTULO II</b> .....	21
<b>2 QUIMIOMETRIA</b> .....	22
2.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS .....	23
2.1.1 Pré - Processamento de Dados .....	26
2.1.1.1 Normalização por Área Unitária .....	26
2.1.1.2 Normalização por Comprimento do Vetor .....	26
2.2 MÉTODOS DE APRENDIZAGEM NÃO SUPERVISIONADA.....	27
2.2.1 Análise de Componentes Principais (ACP).....	27
2.2.2 Análise de Agrupamentos Hierárquica (AH) .....	29
2.3 MÉTODOS DE APRENDIZAGEM SUPERVISIONADA .....	30
2.3.1. Modelo Independente de Similaridade Utilizando Componentes Principais (SIMCA).....	31
2.4 PESO DE FISHER E PESO DE VARIÂNCIA .....	31
<b>CAPÍTULO III</b> .....	33
<b>3 CROMATOGRAFIA</b> .....	34
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	38
<b>4 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL</b> .....	39
4.1 COLETA E SECAGEM .....	40
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR .....	41
4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESCOLHA DA FASE MÓVEL .....	43
4.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	44
4.5 ANÁLISE POR CROMOTOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	45
4.6 PREPARO DOS EXTRATOS NA CONDIÇÃO OTIMIZADA.....	46
4.7 ANÁLISE POR ESPECTROS COPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER .....	47
4.8 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL .....	47

4.9 REAGENTES E EQUIPAMENTOS .....	48
4.10 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS .....	49
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>50</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>96</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>

A vertical strip of a photograph showing pink flowers and green leaves. The flowers are in the center, with green leaves below them. The background is a light, textured surface.

# *Capítulo I*

## 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990 a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que cerca de 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde<sup>1</sup>. Na metade do século 19 pelo menos 80% dos medicamentos eram derivados de ervas. Então veio a revolução inspirada no desenvolvimento da indústria farmacêutica e conseqüentemente a predominância das drogas sintéticas, porém a medicina tradicional nunca esteve fora de cena, sendo que 25-30% das drogas ainda são derivadas de plantas. De fato, muitas classes farmacológicas de drogas incluem um protótipo do produto natural<sup>(2,3)</sup>. Entretanto, 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 temos um conhecimento muito limitado, tornando-se praticamente impossível identificá-los e posteriormente proceder uma análise quantitativa. Além disso, os padrões de referência para estes compostos não estão disponíveis comercialmente<sup>4,5</sup>.

O experimento metabolômico (amostragem, preparação da amostra, instrumentação analítica e interpretação dos dados), tem como objetivo obter informação biológica relacionada ao metaboloma<sup>6</sup>, que representa uma série completa de todos os metabólitos existentes em uma espécie biológica, rastreando tantos metabólitos quanto possível em uma única análise, e sendo assim o extrato não é usualmente purificado, em contraste com os procedimentos de rotina usados para análise de metabólitos específicos. Assim, uma abordagem mais adequada é analisá-los por meio da “impressão digital dos metabólitos”.

Geralmente, um ou dois marcadores ou componentes farmacológicos ativos de plantas ou mistura de plantas são correntemente empregados para: avaliar a qualidade e autenticidade de plantas medicinais, identificar uma planta ou mistura de plantas e para obter a quantificação desses componentes<sup>7</sup>. Este tipo de determinação não fornece um parâmetro completo da planta, pois os efeitos terapêuticos muitas vezes são alcançados por múltiplos constituintes, os quais podem agir sinergicamente e dificilmente podem ser separados em “partes ativas”. Atualmente, muitas técnicas cromatográficas como a CLAE, CG, EC e CCD e

técnicas espectrométricas como FTIR, NIR, NMR, MS e IR podem ser aplicadas para obter este tipo de resposta, já que neste caso o perfil cromatográfico ou espectroscópico inteiro seria tomado como “composto ativo”<sup>8,9</sup>.

A técnica de impressão digital cromatográfica vem atraindo cada vez mais a atenção da comunidade científica, especialmente por enfatizar a caracterização sistêmica dos componentes da amostra focando na identificação e estabilidade dos constituintes químicos observados<sup>10</sup>. A análise de impressão digital foi introduzida e aceita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como estratégia para a avaliação de ervas naturais, exigido pelo Drug Administration Bureau of China (DABC) para a padronização das ervas medicinais chinesas e suas matérias primas, e ainda é recomendado por outras entidades como a Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA) e a European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Devido às suas vantagens e popularização, a técnica de CLAE para a análise da impressão digital é tida como primeira escolha, pois permite a caracterização das espécies com base em seus metabólitos secundários<sup>10</sup>, no entanto, antes de toda essa modernização no campo da cromatografia, a CCD era um método comum na análise de extratos de ervas e hoje em dia algumas farmacopéias como a American Herbal Pharmacopoeia e a Pharmacopoeia of People’s Republic of China ainda utilizam esta técnica para obter as primeiras características químicas das ervas medicinais<sup>5</sup>. A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas<sup>11</sup> devido às inúmeras vantagens, como viabilidade de custos, não destruição da amostra, rapidez, precisão, reprodutibilidade, menos etapas de preparação de amostra e outras, porém, devido à falta de interpretação integrada do espectro, a FTIR isolada raramente é usada para avaliar ervas tradicionais chinesas ou outras matrizes mais complicadas<sup>12</sup>. Sendo assim, o ideal é aliar o poder de identificação das técnicas espectroscópicas com o poder de separação das técnicas cromatográficas<sup>13</sup>.

Tipicamente tais técnicas (ou instrumentos) fornecem um grande conjunto de dados e para que estes dados sejam convertidos em informação útil deve-se usar métodos matemáticos e estatísticos sofisticados<sup>14</sup>. A aplicação de métodos quimiométricos nestes casos aumenta consideravelmente a qualidade da impressão digital obtida. Comparações avançadas de dados podem ser feitas utilizando o reconhecimento de padrões, métodos de classificação como o Modelo Independente de Similaridade utilizando Componentes Principais (SIMCA), agrupamento (cluster) como a Análise Hierárquica (AH) bem como a Análise de Componentes Principais (ACP) além de outros. A ACP é uma das técnicas mais utilizadas,

pois permite projetar os dados num espaço dimensional menor do que o original, se a compressão for suficiente, o alto número de variáveis é substituído por um número pequeno de fatores latentes (componentes principais) não correlacionados, que permitem explicar a estrutura dos dados e a detectar “outliers” na simples projeção dos objetos num espaço definido pelas componentes selecionadas. Hoje em dia a quimiometria não é mais uma opção na análise de matrizes complexas como o rastreamento da impressão digital de ervas medicinais, mas sim uma ferramenta essencial<sup>13,15</sup>.

Uma das plantas medicinais que vem ganhando a atenção de pesquisadores na área da saúde<sup>16-18</sup>, por serem muito utilizadas na medicina alternativa, mas que ainda não está disponível comercialmente, são as plantas do gênero *Bauhinia* (Leguminosae-Caesalpinioideae) mais especificamente a *B. forficata* (sinonímia *B. candicans*), conhecida vulgarmente como pata-de-vaca verdadeira<sup>19</sup>. As folhas, caules e raízes desta planta são amplamente utilizados no Brasil e em outros países na forma de chás ou outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades<sup>20</sup>. A principal indicação terapêutica e que desperta o interesse da comunidade científica é com relação à sua possível ação hipoglicemiante, uma vez que estas plantas são utilizadas como auxiliar no tratamento do diabetes mellitus<sup>21</sup>, doença que aflige cerca de 5% da população global. Estima-se que haja um aumento de 27% na incidência do diabetes em países desenvolvidos e 48% nos países em desenvolvimento entre os anos 1995 a 2025<sup>22,23</sup>.

Estima-se que no mundo existam cerca de 300 espécies do gênero *Bauhinia*. A diferenciação dessas espécies é complexa devido à semelhança entre elas. A problemática da distinção entre as várias espécies do gênero *Bauhinia* tem causado confusão tanto na nomenclatura quanto na caracterização taxonômica. Esta caracterização nem sempre é conclusiva, porque é baseada em dados de literatura, comparação com exsicatas depositadas em herbários e análises histológicas. A taxonomia das *Bauhinias* apresenta dificuldade extra, devido à grande sinonímia entre algumas espécies.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo geral utilizar métodos quimiométricos de análise multivariada associados a dados espectroscópicos e cromatográficos para discriminar as diferentes espécies do gênero *Bauhinia* por abordagem metabolômica. Os objetivos específicos foram a utilização de métodos quimiométricos para:

Investigar a influência de diferentes solventes no meio extrator por planejamento de misturas para preparar a impressão digital dos extratos das espécies do gênero *Bauhinia*,

Investigar a melhor fase móvel para CLAE por CCD usando planejamento de misturas,

Desenvolver metodologia analítica para auxiliar na taxonomia de material vegetal bem como no controle de qualidade de produtos fitoterápicos.



*Capítulo II*

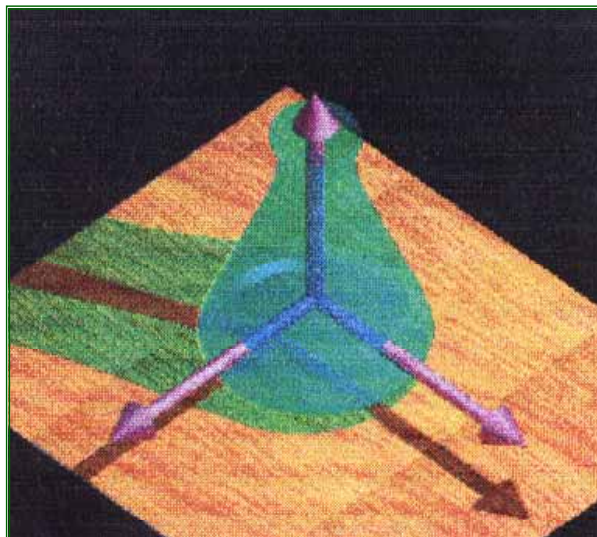
## 2 QUIMIOMETRIA

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 que a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada à 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 do que objetivos<sup>25</sup>.

Com a crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química, impulsionada pela invasão de microprocessadores e microcomputadores no laboratório, técnicas de tratamentos de dados mais complexas do ponto de vista matemático e estatístico tornaram-se necessárias<sup>26</sup>.

A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento, sendo univariada quando somente uma variável é medida sistematicamente para várias amostras. Há muito tempo, a estatística univariada vem sendo aplicada à problemas químicos, mas sua utilização tornou-se limitada. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, ganhando popularidade rapidamente, e dando origem a uma nova disciplina, batizada de Quimiometria. A Figura 1 mostra o símbolo da quimiometria, que representa a interação da matemática e da estatística com problemas químicos<sup>26</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. Isso acabou por gerar procedimentos e domínio de informações que não seriam possíveis, ou não teriam sentido sem o conhecimento dessas ferramentas matemáticas para análise de dados.



**Figura 1:** Representação do símbolo da quimiometria

Foi dentro da química analítica que a quimiometria causou o maior impacto. Com o avanço da instrumentação, interfaceamento de técnicas e automação dentro dos laboratórios, uma enorme quantidade de dados, tabelas e gráficos começaram a ser gerados rapidamente. A identificação, classificação e interpretação desses dados podem ser fatores limitantes na eficiência e efetividade da operação das análises, principalmente sem a utilização de um tratamento adequado dos dados. Além disso, novas metodologias de análise puderam ser propostas, baseadas na utilização da quimiometria, que de outra forma nem poderiam ser pensadas<sup>27</sup>.

## 2.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS

De uma maneira geral, um conjunto de dados químicos consiste num certo número de objetos, descritos por um número de variáveis. Os objetos químicos típicos são amostras analíticas ou compostos químicos. As variáveis são, muitas vezes, derivadas das quantidades de constituintes químicos nos objetos, tais como a concentração, altura de picos em perfis cromatográficos, comprimento de onda em perfis espectroscópicos, etc. As variáveis medidas devem ser as mesmas para todos os objetos<sup>28</sup>.

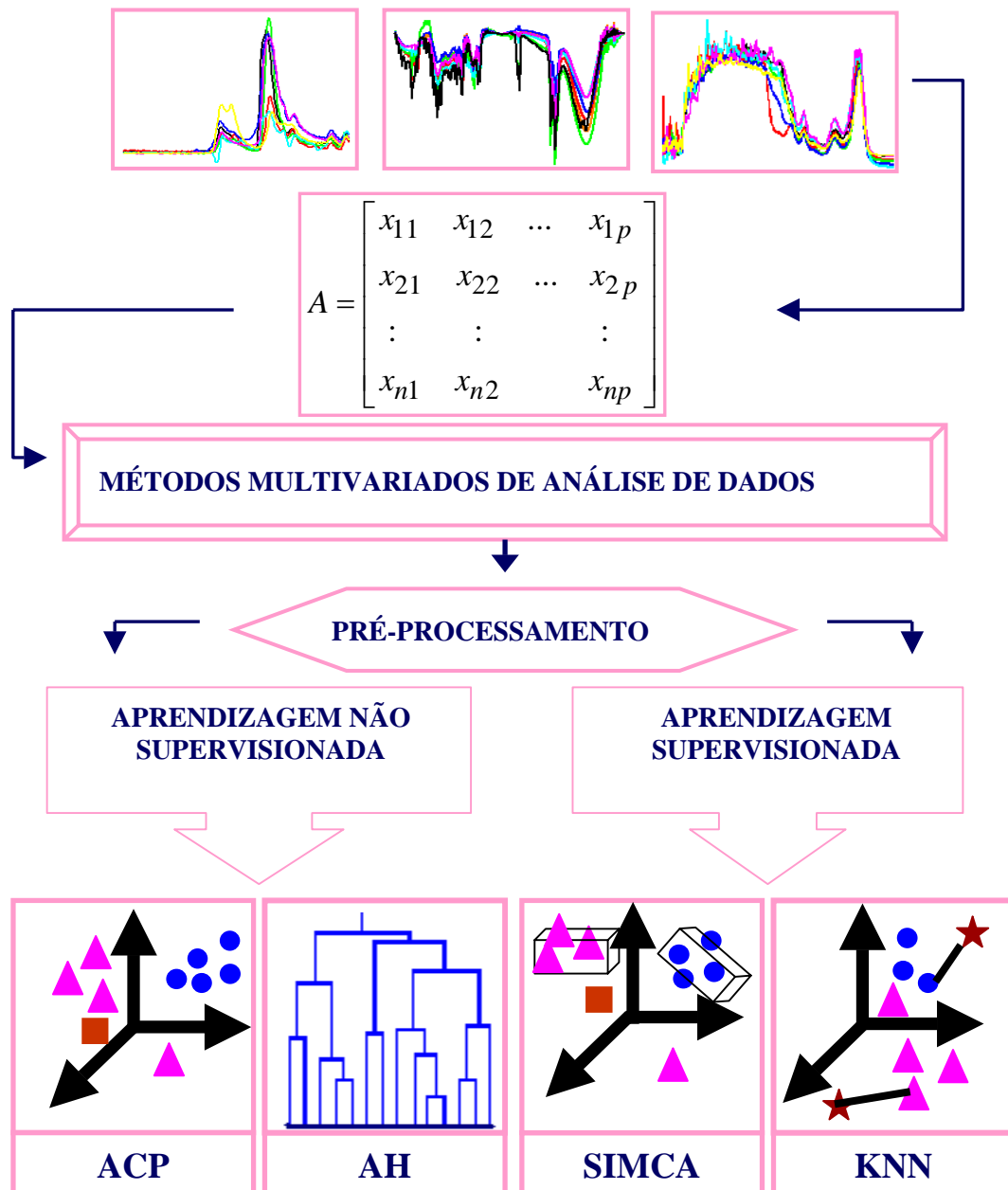
O objetivo principal de uma análise exploratória é extrair o máximo de informação dos dados experimentais, estabelecendo relações entre objetos e variáveis. A

seqüência básica da análise de dados multivariados por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 2<sup>28</sup>.

Primeiramente, é necessário dispor os dados experimentais obtidos na forma de uma matriz. Os dados consistem em  $p$  medidas de diferentes propriedades (variáveis) executadas sobre  $n$  amostras (objetos), de modo que a matriz de dados  $\mathbf{A}$  é formada por  $n \times p$  elementos, onde as amostras correspondem às linhas e as colunas correspondem às variáveis.

A etapa de pré-processamento tem a finalidade de remover ou reduzir fontes irrelevantes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos, com o uso de manipulações matemáticas<sup>29</sup>.

Os métodos multivariados de análise de dados podem ser divididos em dois grupos; a aprendizagem não supervisionada e a aprendizagem supervisionada.



**Figura 2:** Esquema da seqüência usada na análise multivariada de dados experimentais.

Na aprendizagem não supervisionada o objetivo é encontrar agrupamentos naturais das amostras num espaço p-dimensional. Os métodos mais utilizados são a análise de agrupamentos hierárquica (AH) e análise de componentes principais (ACP). Já na aprendizagem supervisionada o objetivo é desenvolver modelos baseados nas informações da origem das amostras, para que estas sejam classificadas corretamente e então aplicar esta regra para amostras de origem desconhecidas visando sua classificação. Um método muito utilizado para modelagem é o modelo independente de similaridade utilizando componentes principais (SIMCA)<sup>28,29</sup>.

### 2.1.1 Pré Processamento de Dados

Existem dois tipos básicos de pré-processamento, dependendo de como são operados. A ferramenta de pré-processamento por linhas, opera sobre as amostras, enquanto que ferramenta de pré-processamento por colunas opera sobre as variáveis. Dentre os tipos de pré-processamento por linhas está a normalização<sup>29</sup>.

A normalização de um perfil analítico é um passo importante no pré-processamento de dados de perfil metabolômico e a escolha do critério de normalização não é arbitrário<sup>30</sup>. Os critérios de normalização mais usados para as amostras são: a normalização por área unitária e normalização por comprimento do vetor<sup>29</sup>.

#### 2.1.1.1 Normalização por Área Unitária<sup>28,29</sup>

Esta normalização é feita dividindo cada valor original pela soma de todos os valores absolutos das medidas, Equação 1. Este procedimento para os dados cromatográficos tem a

finalidade de corrigir a variação do volume da amostra injetado no cromatógrafo, sem destruir a proporcionalidade das substâncias orgânicas,

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

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

#### 2.1.1.2 Normalização por Comprimento do Vetor<sup>28,29</sup>

Esta normalização é feita dividindo cada valor original pela raiz quadrada da soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha, Equação 2. A

finalidade é remover a variação sistemática, normalmente associada com a quantidade total da amostra.

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

## 2.2 MÉTODOS DE APRENDIZAGEM NÃO SUPERVISIONADA

Um método mais formal para o tratamento de amostras é o de aprendizagem não supervisionada, que consiste basicamente na análise de “clusters” (agrupamentos). Muitos métodos tiveram sua origem na taxonomia numérica, que nasceu do desejo de determinar as relações entre as espécies, gênero, família, etc. Muitas vezes a quantidade de informação é tão grande, que a única maneira prática de buscar a similaridade é a análise de clusters<sup>31</sup>.

A redução de variáveis através de critérios objetivos, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística, pode ser conseguida com a análise de componentes principais. Também é possível construir agrupamentos entre as amostras de acordo com suas similaridades, utilizando todas as variáveis disponíveis, e representá-los de maneira gráfica<sup>25</sup>.

A ACP e a AH são técnicas de estatística multivariada e complementares que têm grande aceitação na análise de dados químicos.

### 2.2.1 Análise de Componentes Principais (ACP)

A ACP consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise de dados<sup>25</sup>. Este método tem por finalidade básica a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais, com o objetivo de reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, detectar amostras anômalas, selecionar variáveis e fazer modelagens de classificação, enquanto simultaneamente retém a informação contida nos dados<sup>28</sup>. Em outras palavras, as  $p$  variáveis

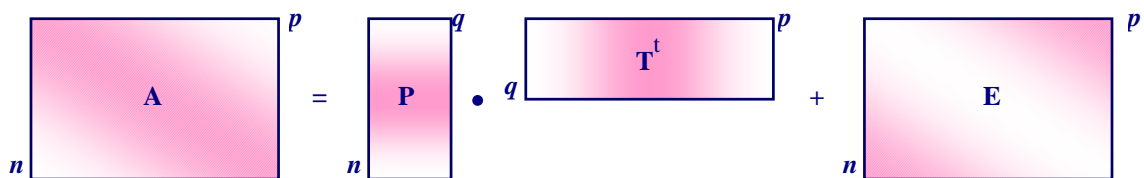
originais geram, através de suas combinações lineares,  $q$  componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 (CP1) retém mais informação estatística do que a CP2, que por sua vez tem mais informação que a CP3 e assim por diante.

Mesmo com a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras e levando em conta que a informação estatística presente nas  $p$  variáveis originais sejam a mesma das  $q$  componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 componentes mais que 90% dessa informação.

A ACP do Tipo Q define a similaridade entre objetos considerando as proporções entre eles, ou seja, é definida em função das amostras e oferece vantagens, como menos cálculos e matrizes menores. Para o tratamento de diferentes conjuntos de dados, fornece resultados das análises químicas de uma forma especialmente conveniente para interpretação<sup>32</sup>. Na ACP do Tipo Q<sup>33</sup>, a decomposição é calculada através da diagonalização da matriz de associação ( $\mathbf{A}\mathbf{A}^t$ ). A matriz  $\mathbf{A}$  ( $n \times p$ ), formada por  $n$  objetos e  $p$  variáveis é decomposta no produto de duas matrizes menores:

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

onde  $\mathbf{P}$  é a matriz dos “loadings” (pesos) das componentes principais,  $\mathbf{T}$  é a matriz dos escores das componentes principais,  $\mathbf{E}$  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 3.



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

Após os cálculos, os resultados são utilizados para interpretar a distribuição das amostras num gráfico bidimensional das componentes principais e posteriormente identificar e julgar a importância das variáveis originais escolhidas, pois, as variáveis

originais com maiores valores de loadings na combinação linear das componentes principais em módulo, são as mais importantes do ponto de vista estatístico.

### 2.2.2 Análise Hierárquica (AH)<sup>34</sup>

A “análise de agrupamentos” é um nome coletivo dado a uma grande variedade de técnicas que permitem a separação dos objetos ou variáveis em grupos diferentes. O método mais utilizado é a análise hierárquica de agrupamentos (AH)<sup>25</sup>.

A AH descreve a estrutura dos dados interligando as amostras por suas associações, revelando os agrupamentos naturais existentes no conjunto de dados, com base na informação das variáveis medidas, reproduzindo a classificação de tal maneira, que mesmo um pequeno grupo formado na separação do conjunto de dados possa ser inteiramente incluído num grupo maior formado na separação consecutiva.

Graficamente, a hierarquia pode ser representada na forma de um gráfico bidimensional chamado de dendrograma, onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas são agrupadas entre si. Devido ao seu caráter não supervisionado, ela é comumente aplicada antes de outras técnicas de análise multivariada.

Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos no espaço p-dimensional. A maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos (amostras) que estão mais próximos, usando a distância Euclidiana (Equação 4), e substituí-los por um novo ponto, localizado na metade da distância entre eles.

$$d_{ik} = \left[ \sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2} \quad (4)$$

Nesta equação,  $d_{ik}$  é a distância Euclidiana entre os pontos  $i$  e  $k$ .

O procedimento descrito é repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, levando à construção do dendrograma, onde no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical, o índice de similaridade, que é calculado com base na equação:

$$S_{ik} = \left[ 1 - \frac{d_{ik}}{(d_{ik})_{\text{máx}}} \right] \quad (5)$$

onde  $S_{ik}$  é o índice de similaridade entre os pontos  $i$  e  $k$ ,  $d_{ik}$  a distância Euclidiana e  $(d_{ik})_{\text{máx}}$  é a distância máxima entre dois pontos de um conjunto de dados no espaço  $p$ -dimensional.

Considera-se que quanto menor a distância entre os pontos, maior a similaridade entre as amostras representadas por eles. Dessa forma, num dendrograma, a similaridade entre os pares ou grupo de amostras vai da escala de 1 ( $S_{ik} = 1$ ) para amostras altamente semelhantes (identidade) até 0 ( $S_{ik} = 0$ ) que significa nenhuma similaridade, ou seja, corresponde a dois pontos separados pela maior distância constatada no conjunto de dados estudado.

### 2.3 MÉTODOS DE APRENDIZAGEM SUPERVISIONADA<sup>34</sup>

A aplicação dos métodos de aprendizagem supervisionada tem o objetivo de construir modelos para serem usados futuramente na classificação de amostras de composição desconhecidas (conjunto de teste). Isso é feito com um conjunto de dados que possui classificação conhecida (conjunto de treinamento). Este conjunto é utilizado para desenvolver regras de classificação, ou seja, para que ele consiga distinguir uma classe da outra. Os métodos de aprendizagem supervisionada diferem da aprendizagem não supervisionada, porque neste último, embora a relação entre as amostras também seja importante, ele não utiliza grupos ou categorias pré-definidas.

Os métodos de modelagem utilizados na aprendizagem supervisionada são o modelo independente de similaridade utilizando componentes principais, SIMCA (do inglês “*soft independent modelling of class analogy*”) e a Regra dos  $K$  vizinhos mais próximos, KNN.

### **2.3.1 Modelo Independente de Similaridade Utilizando Componentes Principais (SIMCA)<sup>31</sup>**

As propriedades de modelagem da técnica de ACP foram usadas para desenvolver uma outra técnica de modelagem chamada SIMCA, que vem sendo aplicada com muito sucesso na resolução de problemas relacionados ao reconhecimento de padrões.

O SIMCA considera cada classe (grupo ou categoria) separadamente. Para cada classe, a ACP é aplicada independentemente, o que leva a um modelo de componentes principais para cada classe, sendo que cada classe pode ser descrita por um número diferente de componentes principais.

Os dados do conjunto de treinamento são utilizados para determinar o modelo das componentes principais para cada grupo. A classificação do conjunto teste é obtida através da inclusão de cada amostra em cada uma das categorias e depois decidir no nível de confiança de 95%, se essa amostra pertence ou não à classe correspondente.

O SIMCA é capaz de indicar quando uma amostra não pertence a nenhuma das categorias definidas no conjunto de treinamento, representando-o como um ponto ou membro potencial de uma categoria não definida.

### **2.4 PESO DE FISHER E PESO DA VARIÂNCIA<sup>28</sup>**

Determina a importância individual (peso) de cada variável na discriminação entre cada par de categorias (amostras com as mesmas propriedades). O peso de Fisher para uma variável é calculado dividindo-se o quadrado da diferença dos valores médios da variável  $j$  (para duas categorias  $a$  e  $b$ ) pela soma das variâncias dessa variável calculada em cada categoria, Equação 6. Quanto maior for o peso de Fisher, maior o poder discriminatório da variável para o par de categorias em questão.

O peso de variância é a razão das variâncias intercategorias pela soma das variâncias intracategorias, Equação 7

$$\text{Peso de Fisher}_{a,b} = \frac{(\bar{x}_{j(a)} - \bar{x}_{j(b)})^2}{s_{j(a)}^2 + s_{j(b)}^2} \quad (6)$$

$$\text{Peso de variância}_{a,b} = \frac{\left[ \sum_{j=1}^p x_{j(a)} - \sum_{j=1}^p x_{j(b)} \right]^2}{N} \frac{1}{s_{j(a)}^2 + s_{j(b)}^2} \quad (7)$$



*Capítulo III*

### 3 CROMATOGRAFIA

No campo da cromatografia existem centenas de solventes à nossa disposição para definirmos os componentes da fase móvel (FM) e o solvente da amostra ou para o pré-tratamento da amostra. A seleção desses solventes, usualmente é afetada pelas características do solvente relacionadas à detecção, separação, resistência ao fluxo (viscosidade da FM), e miscibilidade. A disponibilidade comercial desses solventes na pureza adequada e a um preço razoável, também são fatores importantes<sup>35</sup>.

A composição da FM pode afetar a separação devido à sua polaridade e seletividade. Na cromatografia em fase normal (CFN), a fase estacionária (FE) é mais polar, e na cromatografia em fase reversa (CFR) a FM é mais polar, de forma que um solvente ou mistura de solvente com alta polaridade aumentam o tempo de retenção, e na CFN o mesmo solvente faz diminuir o tempo de retenção<sup>35</sup>.

Dentre as várias técnicas de cromatografia líquida, na qual a FM é um líquido, estão a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia em camada delgada (CCD).

Na CCD em fase normal (CCD-FN) as placas preparadas com sílica ou outros sólidos inorgânicos polares, como a alumina, por exemplo, são afetadas pela água. Se a FM contém água, a FE tende a extrair uma certa quantidade de água da FM, tornando-se menos retentora. No caso de uma FM menos polar, a solubilidade da água na FM vem a ser muito baixa. A FE, por outro lado, pode adsorver uma quantidade considerável de água, de tal forma que, uma pequena variação na quantidade de água da FM irá acarretar num grande volume da nova FM para alcançar o equilíbrio da FE e na obtenção de tempos de retenção constantes. Porém, variações na quantidade de água são muito comuns, devido à instabilidade da umidade atmosférica, sendo que a água pode ser adsorvida para dentro do reservatório da FM ou da cuba. Sendo assim, é muito comum observar mudanças no tempo de retenção de corrida para corrida<sup>35</sup>.

Em alguns casos, o efeito da variação na concentração de água na FM pode ser minimizado com a adição de 0,1 a 0,5% (v/v) de metanol ou propanol na FM. Porém, algumas vezes isso pode causar a distorção de picos e uma drástica perda de eficiência da coluna ou placa cromatográfica. Um procedimento mais confiável para eliminar o efeito da água na separação da CFN é adicionar uma quantidade conhecida de água na FM, de tal forma que, variações (acidentais) no seu conteúdo torne-se relativamente menor. O efeito deste

procedimento é similar à ação de uma solução tampão, que é adicionada ao solvente para manter o pH constante.

A adição de um modificador polar na CFN tem a finalidade de desativar os sítios de adsorção mais polares na superfície da FE, e para melhorar a forma dos picos bem como a reprodutibilidade dos tempos de retenção<sup>35</sup>.

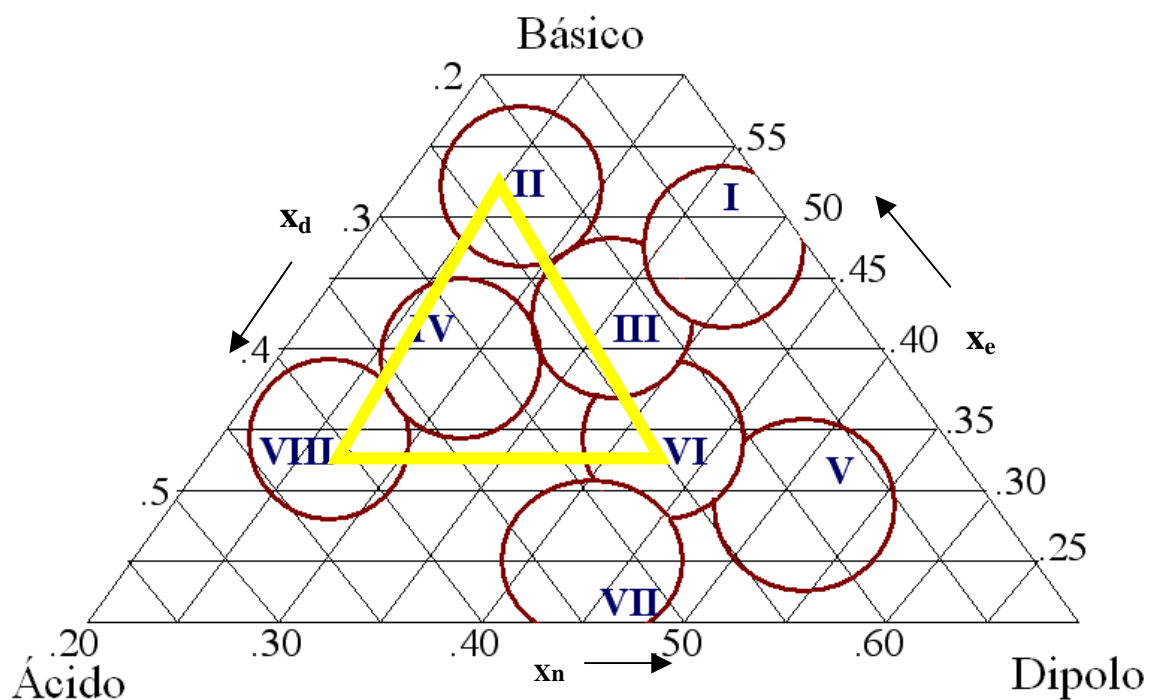
A utilização da CCD- FN para a otimização da fase móvel para CLAE em fase reversa (CLAE- FR), gera algumas controvérsias, mas, teoricamente, a melhor FM para CLAE- FR seria aquela que apresentasse a pior separação na CCD- FN. Devido a esse fato, ao eluir uma FM polar sobre uma placa preparada com sílica (polar) as substâncias com alta e média polaridade tendem a ficar estacionadas no ponto de partida. As substâncias que são arrastadas pela FM possuem maior afinidade pela mesma, ou seja, são tão polares quanto, ou de menor polaridade que a fase.

Uma alternativa para a escolha da FM é usar o esquema de polaridade proposto por Snyder. A classificação da propriedade do solvente por Snyder em termos de polaridade e interações químicas específicas é bem estabelecida e é descrito em livros texto de química analítica<sup>36</sup>. Além do índice de polaridade ( $P'$ ) ele determinou outros três parâmetros experimentalmente,  $x_e$  (parâmetro relacionado à basicidade do solvente),  $x_d$  (parâmetro de acidez) e  $x_n$  (parâmetro relacionado com o momento dipolar). A vantagem do esquema de Snyder é o agrupamento de solventes de acordo com o tipo de interação os quais eles fazem parte. Solventes quimicamente semelhantes que possuem parâmetros de seletividade similares ( $x_e$ ,  $x_d$  e  $x_n$ ) fazem parte do mesmo grupo, embora possam apresentar diferentes valores de polaridade. A Tabela 1 mostra a discriminação desses grupos<sup>37, 38</sup>.

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

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

A Figura 4 mostra esses parâmetros de seletividade representados em um diagrama triangular.

**Figura 4:** Triângulo de seletividade para solventes para cromatografia.

O triângulo mostra que algumas vezes, um grupo pode conter solventes quimicamente diferentes, como o tolueno e o nitrometano, que fazem parte do grupo VII. Devido ao fato de que solventes do mesmo grupo possuem valores de similaridade muito próximos, se uma separação cromatográfica não puder ser obtida com uma mistura em particular formada por dois solventes do mesmo grupo, será necessária a substituição de um dos solventes por um solvente de outro grupo.

Na CFR o solvente comumente utilizado é a água (grupo VIII), o segundo solvente, ou o modificador é escolhido de um dos grupos restantes, sendo que os mais utilizados são o metanol (grupo II), a acetonitrila (grupo VI) e o tetrahidrofurano (THF) (grupo III) todos com baixa viscosidade ( $\eta$ ), 0,55, 0,38 e 0,55, respectivamente.

A polaridade ( $P'$ ) das fases é calculada pela Equação 8. Para uma mistura composta pelos eluentes A e B, a polaridade é dada por;

$$P' = \phi_a P_a + \phi_b P_b \quad (8)$$

onde  $\phi_a$  e  $\phi_b$  representam a fração de volume dos solventes A e B na mistura e  $P_a$  e  $P_b$  referem-se aos valores de  $P'$  dos solventes puros.

A força do solvente de uma mistura eluente determina a variação dos fatores de capacidade no qual todos os solutos de uma amostra são eluídos e dependem principalmente da fração de água na mistura.

Na CFR, a relação entre a polaridade e a força do solvente é indiretamente proporcional, ou seja, a força do solvente diminui com o aumento da polaridade.

O índice de polaridade pode ser utilizado para calcular a força do solvente. Para a CLAE-FR, foram propostos os parâmetros de força do solvente para os quatro solventes mais utilizados, isto é, para a água ( $S_i = 0$ ), metanol ( $S_i = 2,6$ ), acetonitrila ( $S_i = 3,1$ ) e tetrahidrofurano ( $S_i = 4,5$ ). Usando estes valores, a água não influenciará no poder de eluição da FM e a força do solvente será definida pela fração do volume de modificador orgânico.

Existem várias maneiras de calcular a força do solvente, uma delas é expressa pela somatória do produto da força do solvente puro ( $i$ ) pela fração de volume, como mostra a equação 9;

$$S = \sum S_i \phi_i \quad (9)$$

onde,  $S_i$  é a força do solvente  $i$  e  $\phi_i$  é a fração do volume do solvente  $i$ .



*Capítulo IV*

#### 4 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Para este estudo foram utilizadas sete plantas, três plantas classificadas como *Bauhinia forficata* Link, três classificadas como *Bauhinia variegata* L. de flor branca, rosa e roxa e uma comercial nominada *Bauhinia Candicans*. As exsicatas das plantas pesquisadas estão depositadas no herbário da Universidade Estadual de Londrina, e foram determinadas por M.R.C. Paiva de acordo com a Tabela 2. As seis exsicatas das plantas classificadas no herbário podem ser vistas na Figura 5.

**Tabela 2:** Descrição das amostras de plantas do gênero *Bauhinia* utilizadas neste trabalho.

<b>Espécime</b>	<b>N° FUEL</b>	<b>Cor das flores</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Nominação</b>
<i>B. forficata</i> <i>Link</i>	36.475	Branca	Campus da UEL,CEFD	F
<i>B. forficata</i> Link	36.486	Branca	Campus da UEL,CEFD	F1
<i>B. forficata</i> Link	37.339	Branca	Campus da UEL,CEFD	F2
<i>B. variegata</i> L.	36.474	Branca	Estacionamento da BC da UEL	VBr
<i>B variegata</i> L.	36.473	Rosa	Estacionamento da BC da UEL	VRs
<i>B variegata</i> L.	36.472	Roxa	Estacionamento da BC da UEL	VRx
<i>B. candicans</i>	---	---	---	C



(a) 36.475

(b) 36.486

(c) 37.339



(d) 36.473

(e) 36.472

(f) 36.474

**Figura 5:** Foto das seis exsicatas classificadas no herbário FUEL: (a)-(c) *B. forficata* Link e (d)-(f) *B. variegata* L.

#### 4.1 COLETA E SECAGEM

As coletas foram realizadas em 2005 selecionando as folhas de *Bauhinia*, de forma a evitar amostras com danos causados por insetos, fungos ou danos mecânicos e

também com flores. Em seguida as amostras foram cortadas com tesoura para manter as substâncias orgânicas distribuídas de forma homogênea.

A secagem adequada pode ser definida como uma medida que visa a durabilidade das substâncias da planta. Ela é necessária para que não haja modificações físicas, químicas ou microbiológicas, evitando-se assim reações adversas, como oxidações, ataque de microorganismos e hidrólise das substâncias orgânicas<sup>28</sup>.

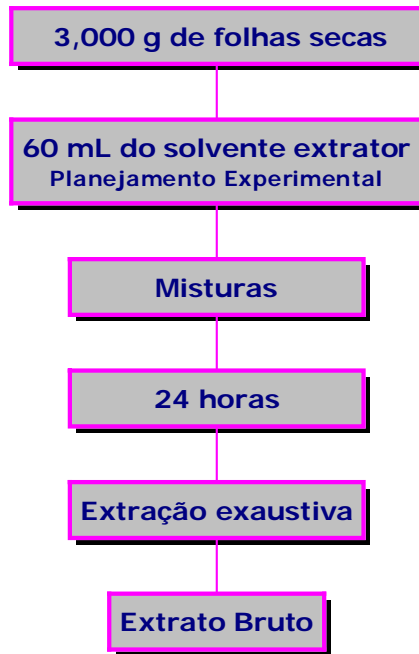
Neste trabalho a secagem das plantas foi realizada à temperatura ambiente por nove dias, protegida da luz, umidade e ataque de fungos, insetos e roedores. Este procedimento deve ser realizado em local seco e na sombra, já que a irradiação solar pode alterar a constituição química do material.

#### **4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESCOLHA DO SOLVENTE EXTRATOR**

Para a escolha do melhor solvente extrator, foram utilizadas as folhas secas da *B. forficata Link*, nominada por F com número de identificação FUEL 36.475, e da amostra comercial de *B. candicans*, nominada por C.

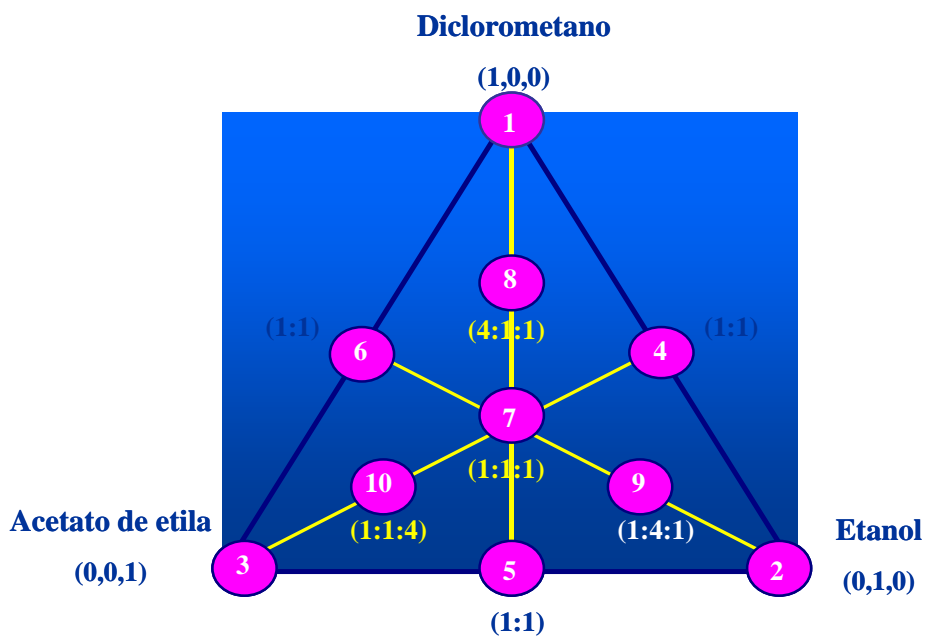
Os extratos foram preparados de acordo com a seqüência apresentada na Figura 6.

Para o preparo de cada extrato foram pesados 3,000 g de folhas secas e em seguida foi adicionado 60 mL do solvente ou misturas de solventes. Estas misturas ficaram em repouso por 24 horas, em seguida foram filtradas com algodão e submetidas à evaporação num evaporador rotativo a uma temperatura inferior a  $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 6:** Seqüência do procedimento para o preparo dos extratos para a escolha do solvente extrator.

A escolha do solvente foi baseada em um planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex<sup>39</sup> modificado com três componentes (Figura 7).



**Figura 7:** Planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex modificado com 3 componentes para a escolha do solvente extrator.

Este planejamento é representado por um triângulo equilátero no qual os vértices correspondem aos solventes puros, 1 diclorometano, 2 etanol e 3 acetato de etila, as arestas à misturas binárias de mesma proporção e o ponto central à uma mistura ternária de volumes iguais dos três solventes. Foram adicionadas mais três misturas axiais nas proporções de 4:1:1, 1:4:1 e 1:1:4, totalizando 10 misturas de solventes para cada planta de acordo com a matriz de planejamento, Tabela 3.

Os 20 extratos (10 da planta F e 10 da planta C) foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa, sendo que o critério para a escolha do solvente extrator foi o número de picos cromatográficos.

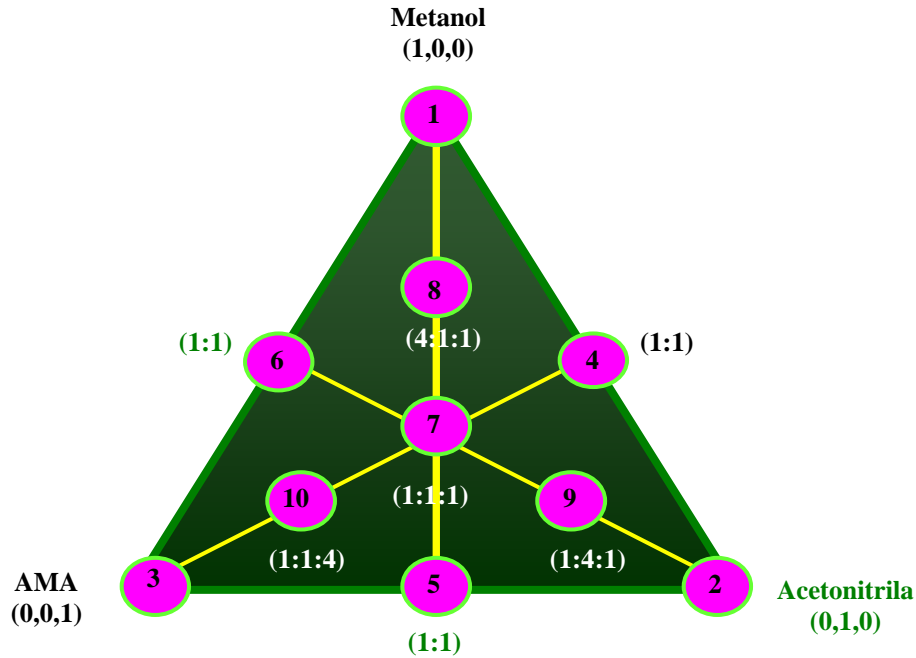
**Tabela 3:** Matriz de planejamento para escolha do solvente extrator.

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

#### 4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESCOLHA DA FASE MÓVEL

A otimização da fase móvel foi feita por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) baseada num planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex<sup>39</sup> modificado com três componentes, sendo os três eluentes, 1 metanol, 2 acetonitrila e 3 uma

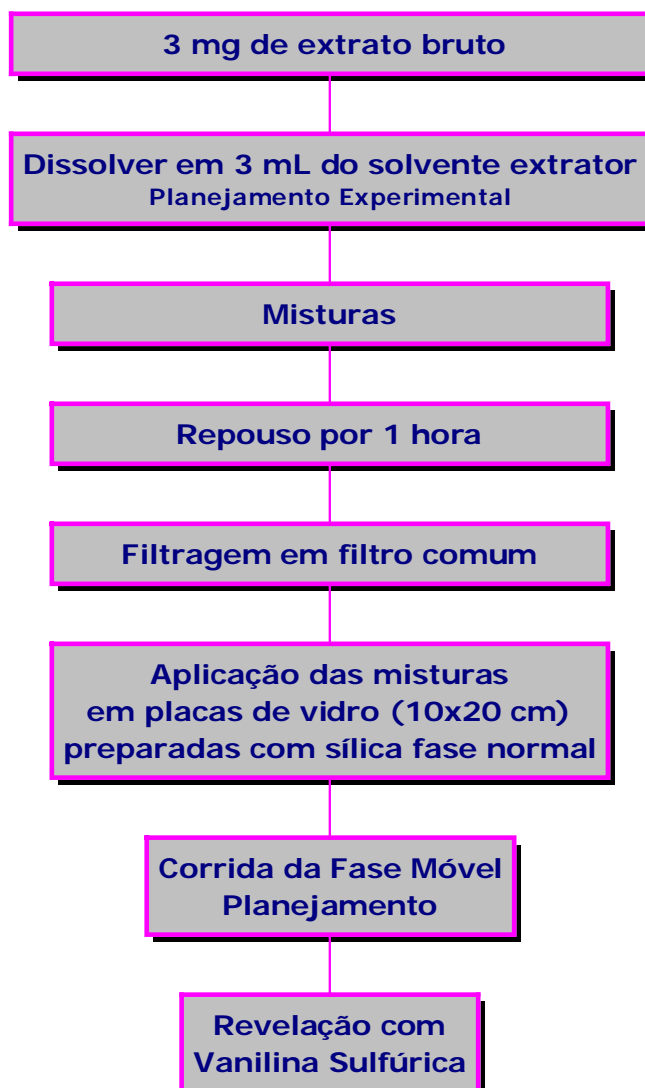
mistura composta por 15% de metanol, 15% de acetonitrila e 70% de água ultra-pura, esta composição será nominada “AMA”, Figura 8.



**Figura 8:** Planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex modificado com 3 componentes para a escolha da fase móvel.

#### 4.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As amostras para análise por CCD foram preparadas pesando-se 30,0 mg dos extratos (*B. forficata* e *B. candicans*) e re-dissolvendo-os em 3 mL do solvente extrator ou mistura de solventes extratores (Tabela 3). Após 1 hora estas misturas foram filtradas com algodão. A aplicação dos extratos 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. As revelações dos cromatogramas foram feitas com vanilina sulfúrica (Figura 9).



**Figura 9:** Seqüência do procedimento para o preparo das amostras para análise por Cromatografia em Camada Delgada.

#### 4.5 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As amostras foram preparadas pesando-se 5 mg do extrato bruto e redissolvendo em 3 mL do solvente extrator (Figura 10). Após 1 hora, cada solução foi filtrada em filtro comum. Deste filtrado foram tomadas alíquotas de 50  $\mu$ L e diluídas em 950  $\mu$ L (1:20) do solvente extrator. As amostras diluídas foram filtradas mais duas vezes em filtro Millipore Millex com 0,22  $\mu$ m e armazenadas em freezer.



**Figura 10:** Seqüência do procedimento para o preparo das amostras para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A análise por CLAE foi realizada nas seguintes condições: Temperatura do forno 50°C, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , vazão da fase móvel a 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , eluição monitorada no comprimento de onda de 210 nm, tempo de retenção de 30 min e a fase móvel foi o ponto 10 do planejamento para escolha da fase móvel (Figura 8).

#### 4.6 PREPARO DOS EXTRATOS NA CONDIÇÃO OTIMIZADA

Para o preparo dos extratos na condição otimizada foram pesados 3,000 g de folhas secas e em seguida foram adicionados 60 mL da mistura ótima de solventes composta por 36% de diclorometano, 17% de etanol e 47% de acetato de etila. Estas misturas ficaram em repouso por 24 horas, em seguida foram filtradas com algodão e submetidas à evaporação

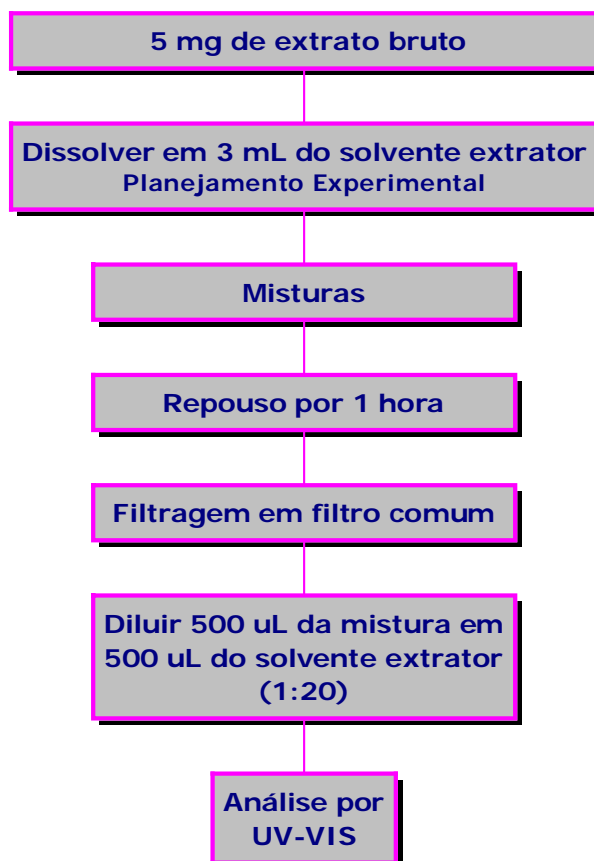
num evaporador rotativo a uma temperatura inferior a  $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Este procedimento foi repetido por 4 vezes.

#### **4.7 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER**

Para preparar as pastilhas foram pesados 0,6 mg de cada extrato e homogeneizados com 150 mg de KBr e algumas gotas de clorofórmio. Os espectros no infravermelho foram registrados na região de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ , em resolução de  $1,93\text{ cm}^{-1}$  e média de 40 leituras.

#### **4.8 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL**

Para a análise por espectrofotometria no UV-Vis foram pesados 5 mg do extrato bruto e diluídos em 3 mL do solvente extrator, após 1 hora estas misturas foram filtradas em filtro comum. Para a obtenção dos espectros diluiu-se 500  $\mu\text{L}$  desta solução em 500  $\mu\text{L}$  do solvente. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 189-890 nm. Esta técnica foi aplicada somente nos extratos obtidos na condição otimizada. Este procedimento está representado na Figura 11.



**Figura 11:** Sequência do procedimento para o preparo das amostras para análise por espectrofotometria no ultravioleta- visível.

#### 4.9 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados foram: Diclorometano p.a. (99,5%), Acetato de Etila p.a. (99,5%), Silicagel 60 para cromatografia (70-230Mesh), Acetonitrila UV/HPLC espectroscópico (99,8%), Metanol UV/HPLC espectroscópico (99,8%), todos procedentes da VETEC, Etanol p.a. Regentes Analíticos Dinâmica (99,5%), Clorofórmio p.a.-acs Synth (99,8%), KBr p.a.-acs Synth (99%) e água ultrapura.

Os equipamentos utilizados foram: Balança analítica Adventurer OHAUS, Evaporador Rotativo FISATOM 802, sonicador T7, Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu LC-10AD com detector diodo array SPD-M10AVP, Coluna Metasil C18 ODS PN0380 Metachem (250x4,6mm, 5µm), Espectrômetro de Infravermelho Shimadzu FTIR-8300 e Espectrofotômetro OCEAN OPTICS modelo CHEM 2000 UV-Vis.

#### **4.10 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS**

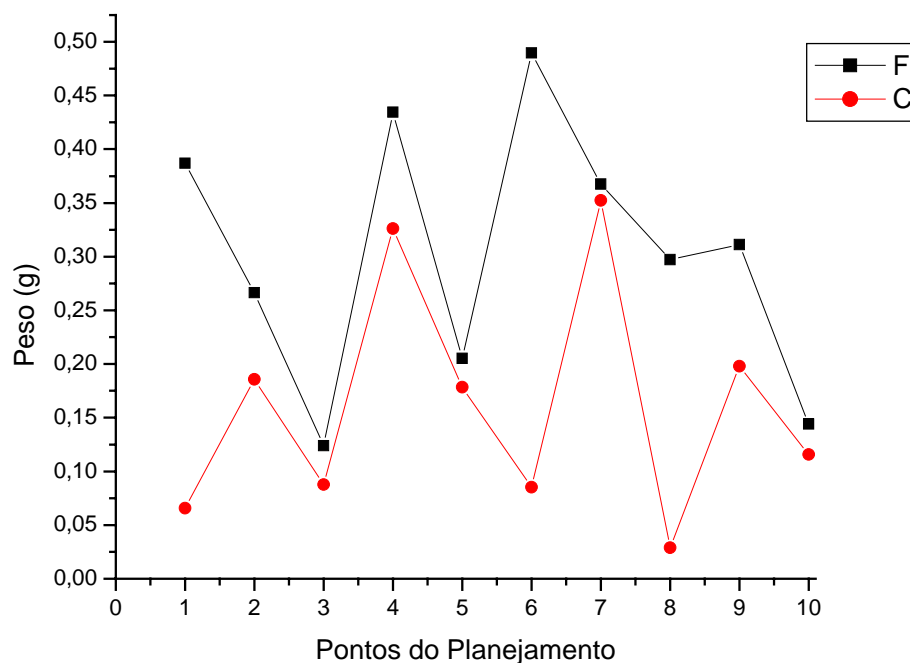
Os cálculos de classificação foram realizados com o programa computacional ARTHUR/75<sup>40</sup> e os demais foram desenvolvidos pela Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio do Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais (LQCN) do Depto.de Química da Universidade Estadual de Londrina.



*Capítulo V*

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa deste trabalho foi otimizar o processo de extração. Os 20 extratos foram preparados nas composições especificadas no planejamento mostrado na Figura 7, sendo 10 para cada espécie, *B. forficata* (F) e *B. candicans* (C). Como resposta, foi avaliado o rendimento dos extratos obtidos das folhas das duas espécies de *Bauhinia*. A Figura 12 mostra o gráfico dos valores dos pesos em grama para os 10 extratos obtidos para as *B. forficata* (F) e *B. candicans* (C).



**Figura 12:** Gráfico dos rendimentos obtidos usando planejamento de misturas de três componentes (F = *B. forficata* e C = *B. candicans*).

Nestas condições os rendimentos obtidos para a *B. forficata* foram maiores que para a *B. candicans* em todos os casos. As maiores diferenças foram encontradas nos extratos preparados nas composições especificadas 1, 6 e 8. Observa-se que o solvente extrator que permitiu o maior rendimento em peso dos extratos de *B. forficata* foi aquele preparado de acordo com o ponto 6 (mistura binária de diclorometano e acetato de etila) e para *B. candicans*, foi o ponto 7 (ponto central) do planejamento.

A etapa mais importante na aplicação da CLAE é encontrar a composição ótima do solvente para a fase móvel. A resolução completa dos solutos em uma mistura complexa muitas vezes não é possível com misturas binárias simples de solventes. A seleção das proporções apropriadas destes solventes é tediosa e, além disto, consomem muito reagente. Neste caso um processo de otimização torna-se necessário. Sendo assim, a segunda etapa do trabalho teve como objetivo escolher por meio de um planejamento experimental de misturas, Figura 8, a composição da fase móvel (FM). Para a otimização da FM a CCD foi escolhida por se tratar de uma técnica simples e rápida<sup>5</sup>.

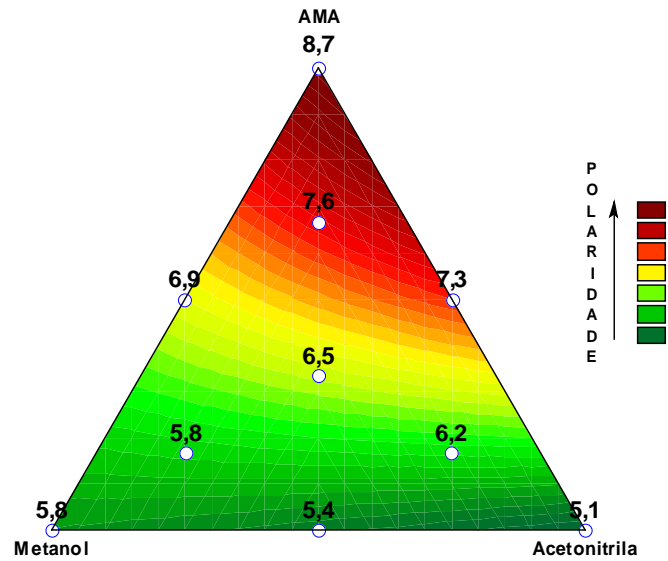
Foram selecionados três eluentes para o planejamento da fase móvel, água, acetonitrila e metanol. Com base nos dados apresentados na literatura, foi possível calcular a polaridade ( $P'$ ) e a força do solvente ( $S$ ) de cada fase, por meio das equações 8 e 9, respectivamente. A combinação dos três solventes permitiu obter uma variação de polaridade entre 5,1 e 8,7 e força do solvente entre 0,85 e 3,1. A área compreendida entre os três solventes está demarcada na Figura 4 pelo triângulo com linhas amarelas. A Tabela 4 mostra a polaridade e a força de cada uma das FM investigadas no planejamento.

**Tabela 4:** Matriz de planejamento para a escolha da fase móvel.

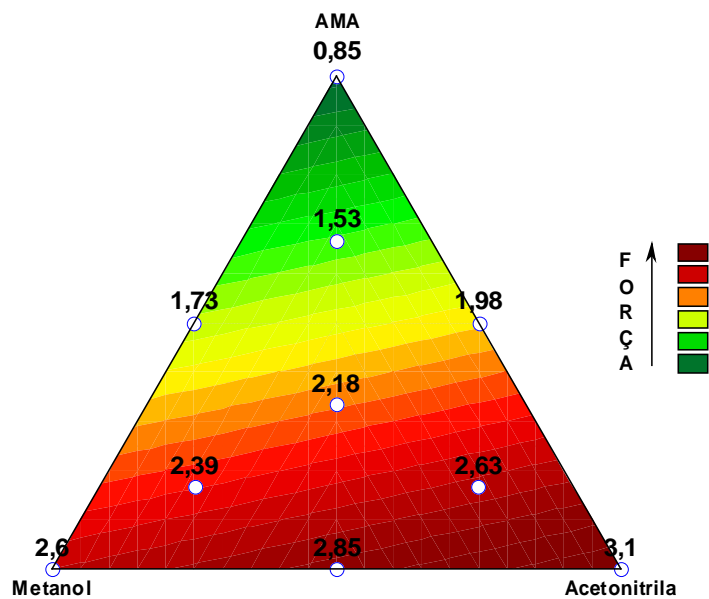
Extrato	Eluentes			Polaridade	Força
	Metanol	Acetonitrila	AMA*		
<b>1</b>	<b>1</b>	0	0	<b>5,1</b>	<b>2,60</b>
<b>2</b>	0	<b>1</b>	0	<b>5,8</b>	<b>3,10</b>
<b>3</b>	0	0	<b>1</b>	<b>8,7</b>	<b>0,85</b>
<b>4</b>	<b>1/2</b>	<b>1/2</b>	0	<b>5,4</b>	<b>2,85</b>
<b>5</b>	0	<b>1/2</b>	<b>1/2</b>	<b>7,3</b>	<b>1,98</b>
<b>6</b>	<b>1/2</b>	0	<b>1/2</b>	<b>6,9</b>	<b>1,73</b>
<b>7</b>	<b>1/3</b>	<b>1/3</b>	<b>1/3</b>	<b>6,5</b>	<b>2,18</b>
<b>8</b>	<b>2/3</b>	<b>1/6</b>	<b>1/6</b>	<b>5,8</b>	<b>2,39</b>
<b>9</b>	<b>1/6</b>	<b>2/3</b>	<b>1/6</b>	<b>6,2</b>	<b>2,63</b>
<b>10</b>	<b>1/6</b>	<b>1/6</b>	<b>2/3</b>	<b>7,6</b>	<b>1,53</b>

\* AMA: 15% metanol, 15% acetonitrila e 70% água ultrapura.

As curvas de nível ajustadas à matriz de planejamento aos dados de polaridade (modelo quadrático) e força do solvente (modelo linear) estão apresentadas nas Figuras 13 e 14, respectivamente. As polaridades mais intensas são obtidas na direção do vértice superior, que corresponde às misturas mais ricas em água, Figura 13, enquanto que a força dos eluentes aumenta, na direção oposta, fases ricas em metanol e acetonitrila, Figura 14.

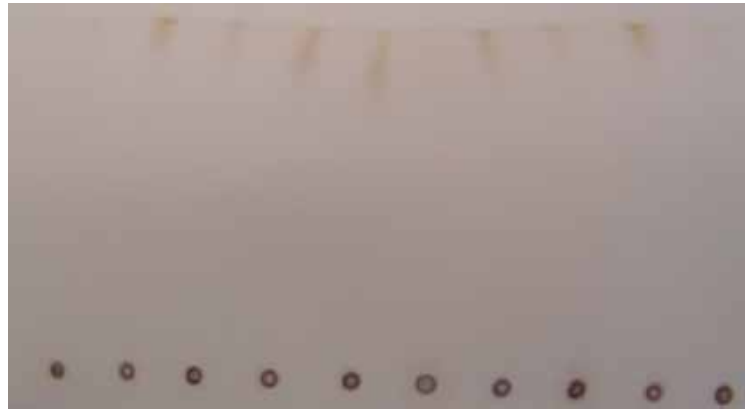


**Figura 13:** Curva de nível do modelo quadrático ajustado para a polaridade dos eluentes do planejamento para três componentes (AMA = 15% metanol, 15% de acetonitrila e 70% H<sub>2</sub>O).

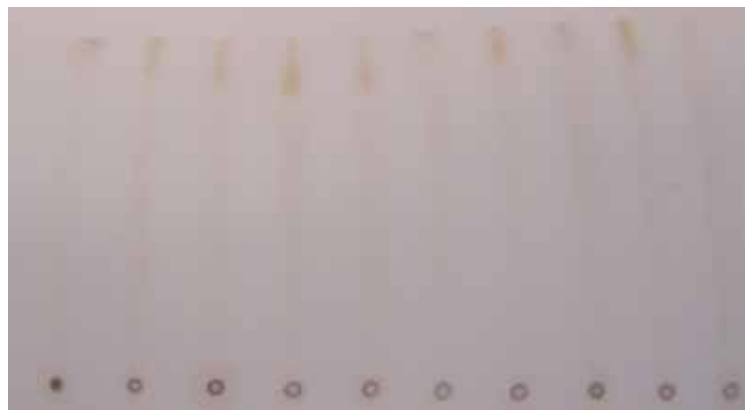


**Figura 14:** Curva de nível do modelo linear ajustado para a força dos eluentes do planejamento para três componentes (AMA = 15% metanol, 15% de acetonitrila e 70% H<sub>2</sub>O).

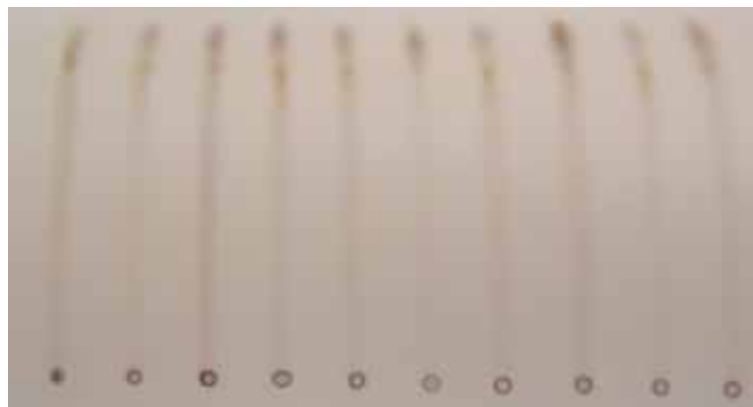
As Figuras 15, 16 e 17 mostram as placas cromatográficas de *B. forficata* eluídas nas três fases mais polares.



**Figura 15:** Placa cromatográfica para *B. forficata* eluída na fase AMA 100% (15% metanol, 15% acetonitrila e 70% água) (ponto 3 do planejamento).



**Figura 16:** Placa cromatográfica para *B. forficata* eluída na fase metanol:acetonitrila:AMA 1/6:1/6:2/3 (27% metanol, 27% acetonitrila e 46% água) (ponto 10 do planejamento).



**Figura 17:** Placa cromatográfica para *B. forficata* eluída na fase acetonitrila:AMA 1/2:1/2 (ponto 5 do planejamento).

As placas mostram que conforme a polaridade da fase móvel aumenta, aumenta a quantidade de substâncias que ficam retidas no ponto de partida, ou seja, são substâncias polares, e poucas são arrastadas com a fase móvel. Na CLAE-FR a eficiência na separação das bandas aumenta com a polaridade, ao contrário da fase normal, sendo assim, a composição da melhor fase no domínio investigado é (AMA) 15% metanol, 15% de acetonitrila e 70% H<sub>2</sub>O. Considerando que nesta fase o tempo médio de retenção aumenta, devido a quantidade de água na fase móvel, esta fase foi substituída por uma segunda com composição de 27% metanol, 27% de acetonitrila e 46% H<sub>2</sub>O, (ponto 10 do planejamento), Figura 8.

Na seqüência, foi avaliado o efeito do solvente na extração das substâncias química da *B. forficata*. O problema encontrado é decidir como será escolhido o melhor solvente para a extração. Na busca da impressão cromatográfica, quanto maior a informação contida no cromatograma do material vegetal maior a possibilidade de identificar marcadores, sendo assim o critério adotado foi o número de picos.

Ajustando aos dados os modelos linear e cúbico especial, todos apresentaram falta de ajuste, sendo assim o modelo quadrático foi ajustado aos dados, e a equação para este modelo é dada por:

$$\hat{y} = 12,61d + 9,89e + 12,79a + 18,70de + 16,52da + 11,07ea \quad (10)$$

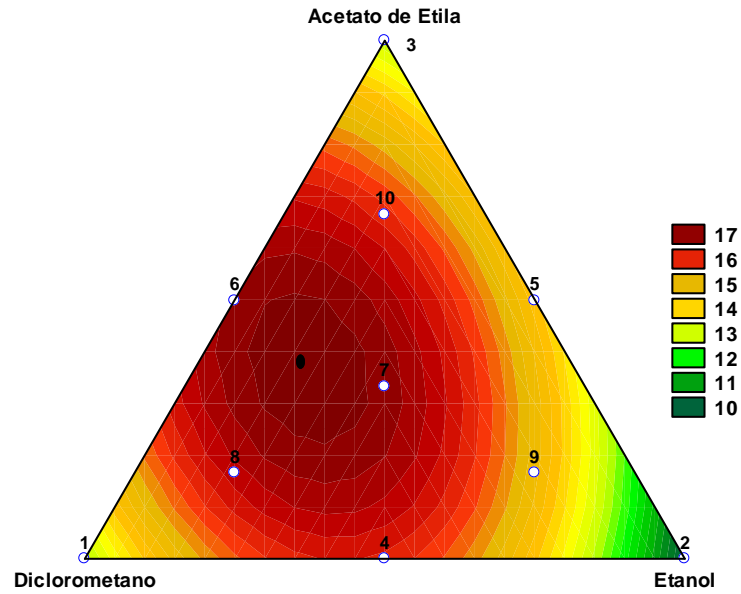
$(\pm 1,50)$      $(\pm 1,50)$      $(\pm 1,50)$      $(\pm 6,92)$      $(\pm 6,92)$      $(\pm 6,92)$

onde *d*= diclorometano, *e*= etanol e *a*= acetato de etila e os valores entre parênteses representam os erros padrão de cada coeficiente.

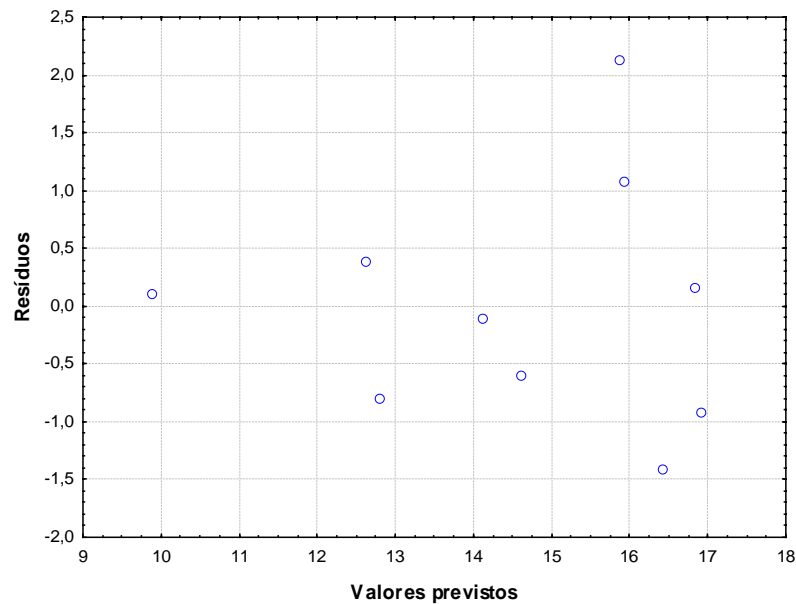
Esta equação mostra que a composição do extrator deve conter maior quantidade de acetato de etila, seguido por diclorometano e com menor quantidade de etanol. No nível de confiança de 95%, o modelo também indica uma interação entre o diclorometano e o etanol. A curva de nível para este modelo pode ser vista na Figura 18. Os sinais analíticos mais intensos, ou maior número de picos, pode ser obtido na região com coloração carmim.

Dessa forma, o melhor solvente extrator encontrado para *B. forficata* foi uma mistura dos três solventes contendo 36% de *d*, 17% de *e* e 47% de *a* indicado pelo círculo preto.

Na Figura 19 é possível ver os resíduos deixados pelo ajuste versus as respostas previstas pelo modelo. A distribuição dos resíduos não revela tendências.

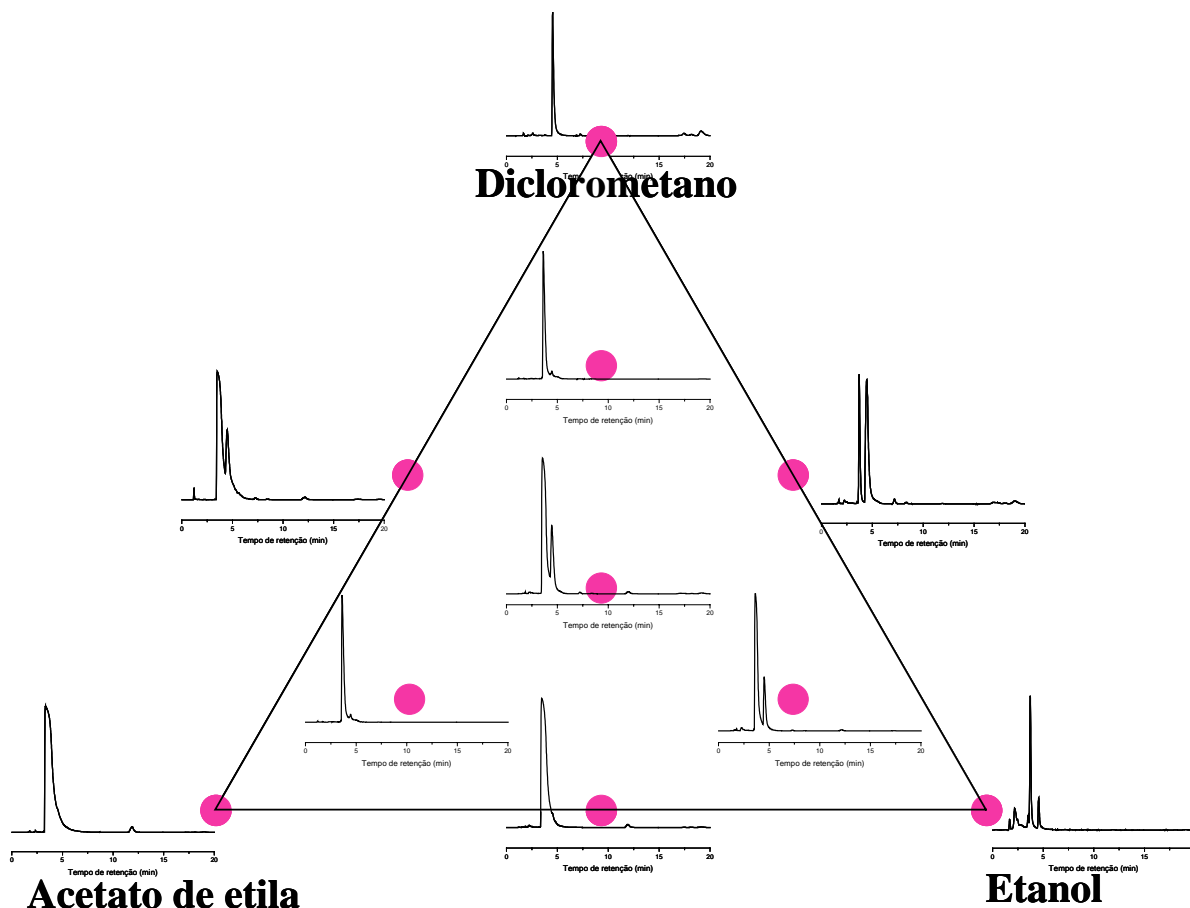


**Figura 18:** Curva de nível para o modelo quadrático ajustado para escolha do melhor solvente extrator.



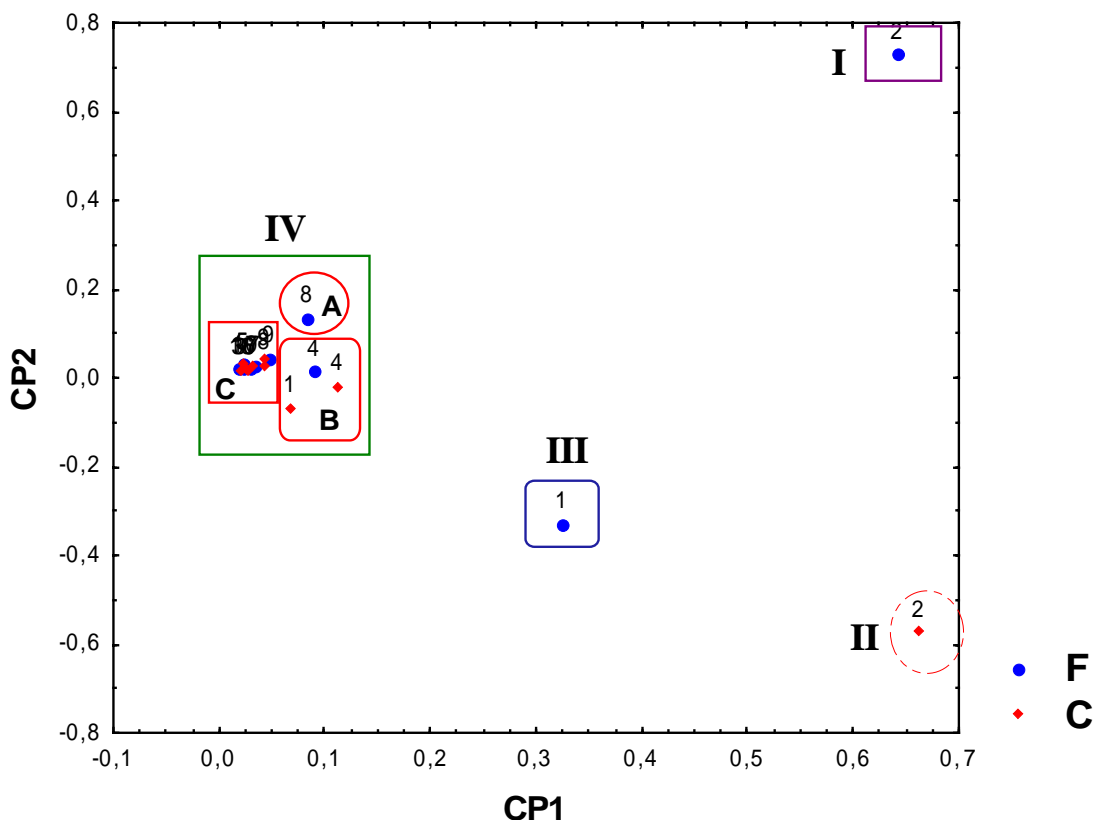
**Figura 19:** Resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático no estudo de extratos da *B. forficata* para escolha do solvente extrator.

Os cromatogramas dos 10 pontos do planejamento (Tabela 3) da *B. forficata* podem ser visualizados na Figura 20.



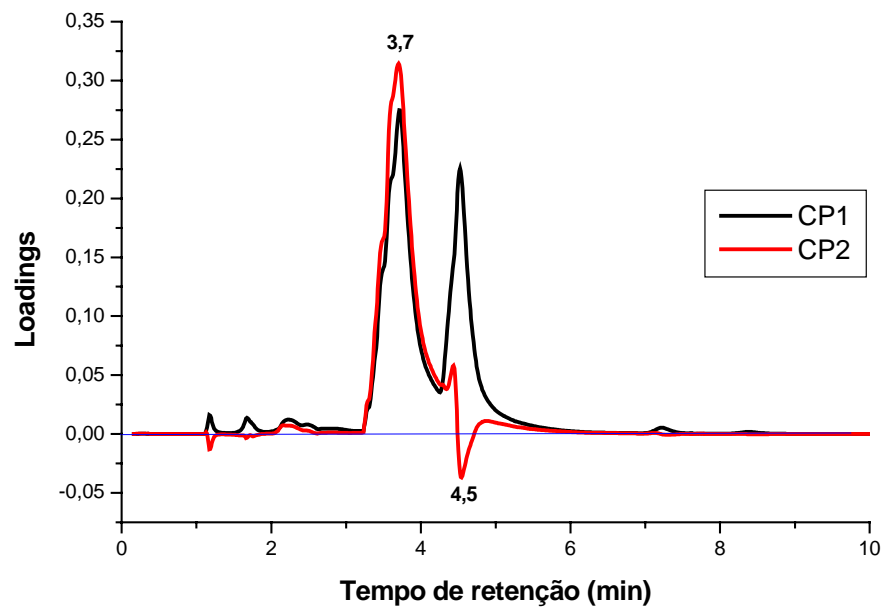
**Figura 20:** Cromatogramas de cada amostra de F obtidas de acordo com o planejamento experimental para escolha do solvente extrator, obtidas na fase móvel composta por 27% metanol, 27% de acetonitrila e 46% H<sub>2</sub>O.

A próxima etapa do trabalho teve como objetivo fazer um estudo comparativo entre os 20 cromatogramas simultaneamente, para investigar possíveis discriminações na composição química dos diferentes extratos. Sendo assim, as alturas dos picos cromatográficos dos 20 extratos da *B. forficata* e *B. candidans* foram colocados na forma de uma matriz formada por 20 amostras e 2000 valores de altura dos picos e submetidos a ACP. Para esta aplicação foram testados 5 tipos de pré-processamento. Os melhores resultados foram conseguidos com pré-processamento por vetor unitário. Na ACP as primeiras três componentes explicam cerca de 97,9% da variância total. A Figura 21 representa o gráfico dos escores das componentes principais 1 e 2, que juntas explicam 96,5% da variância total.



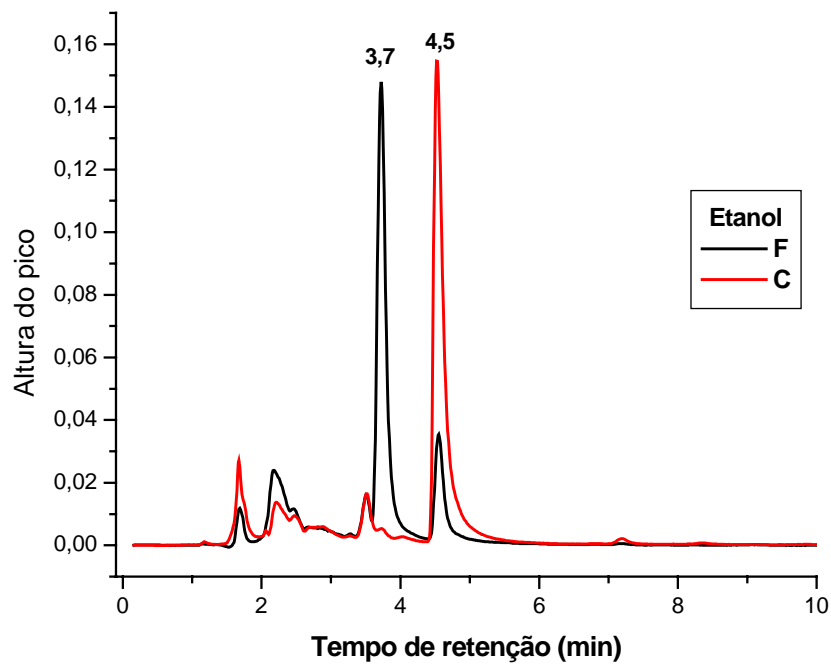
**Figura 21:** Gráfico dos escores da CP1 e CP2 dos dados cromatográficos dos 20 extratos diluídos no solvente extrator.

Neste gráfico, na CP1 é possível diferenciar três regiões. A primeira contém os grupos I e II, formados pelas amostras preparadas em etanol puro (2), a segunda o grupo III, representado pela *B. forficata* preparada em diclorometano puro (1) e a terceira que contém as outras amostras. Os loadings das componentes 1 e 2 estão apresentados na Figura 22. Esta Figura mostra que todos os valores dos loadings da CP1 são positivos. Isto indica que as amostras contidas no grupo I estão mais deslocadas para a direita por apresentar maior influência das variáveis com valores mais altos de loadings no intervalo de 3,0 a 5,0 min, ou seja, das substâncias com tempo de retenção em 3,7 e 4,5 min. Mais para a esquerda da CP1 (grupo IV), estão alocadas as amostras em acetato de etila, misturas binárias e ternárias.



**Figura 22:** Gráfico dos loadings da CP1 com CP2 para os dados cromatográficos dos 20 extratos.

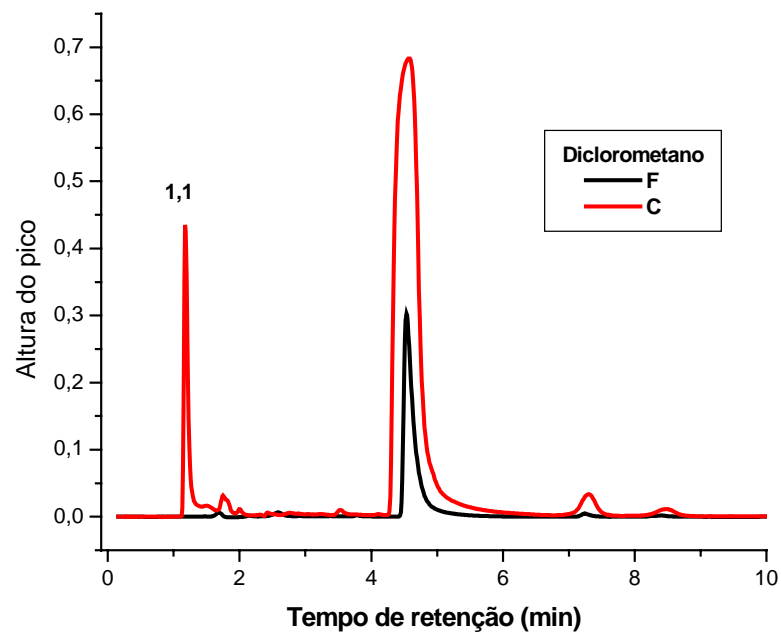
A CP2 separa os quatro grupos. Os loadings da CP2 mostram que a separação dos grupos I e II é causada pela diferença quantitativa das substâncias ou grupo de substâncias extraídas em etanol com tempo de retenção em 3,7 e 4,5 min, Figura 23. Sendo assim o etanol permitiria uma discriminação das duas espécies devido à diferença das concentrações e não perfil metabolômico.



**Figura 23:** Cromatogramas dos extratos da *B. forficata* e *B. candicans* extraídos em etanol puro.

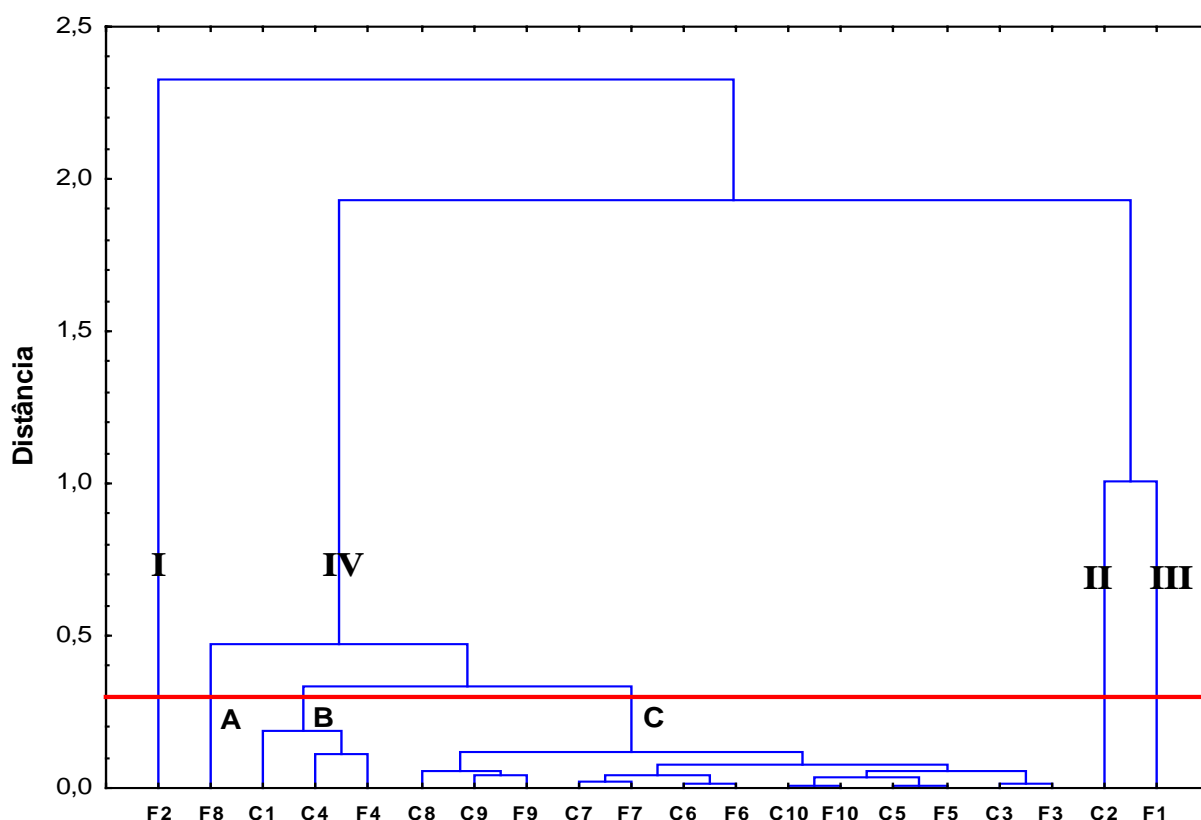
A Figura 24 mostra os cromatogramas das duas plantas extraídas em diclorometano puro. Estes cromatogramas mostram que a discriminação da *B. forficata* e *B. candicans* na projeção da CP1 com a CP2 está associada à presença de um pico com intensidade elevada em 1,1 min no cromatograma da *B. candicans* que não aparece no cromatograma da *B. forficata*.

Este resultado indica que o diclorometano puro extrai uma substância química que discrimina a *B. forficata* e *B. candicans*.



**Figura 24:** Cromatogramas dos extratos d *B. forficata* e *B. candidans* extraídos em diclorometano puro.

Para confirmar os agrupamentos da ACP, a AH foi aplicada aos dados cromatográficos dos 10 extratos de F e dos 10 extratos de C. O dendrograma obtido pelo conjunto de 20 amostras e 2000 valores de altura de picos está apresentado na Figura 25. No valor de distância de 1,0, é observada a formação de 4 grupos, concordando com os resultados da ACP, que os extratos preparados em etanol puro ou diclorometano puro são os mais divergentes. Diminuindo o valor da distância para 0,3 é possível separar o grupo IV em três novos grupos mostrados na Figura 25.

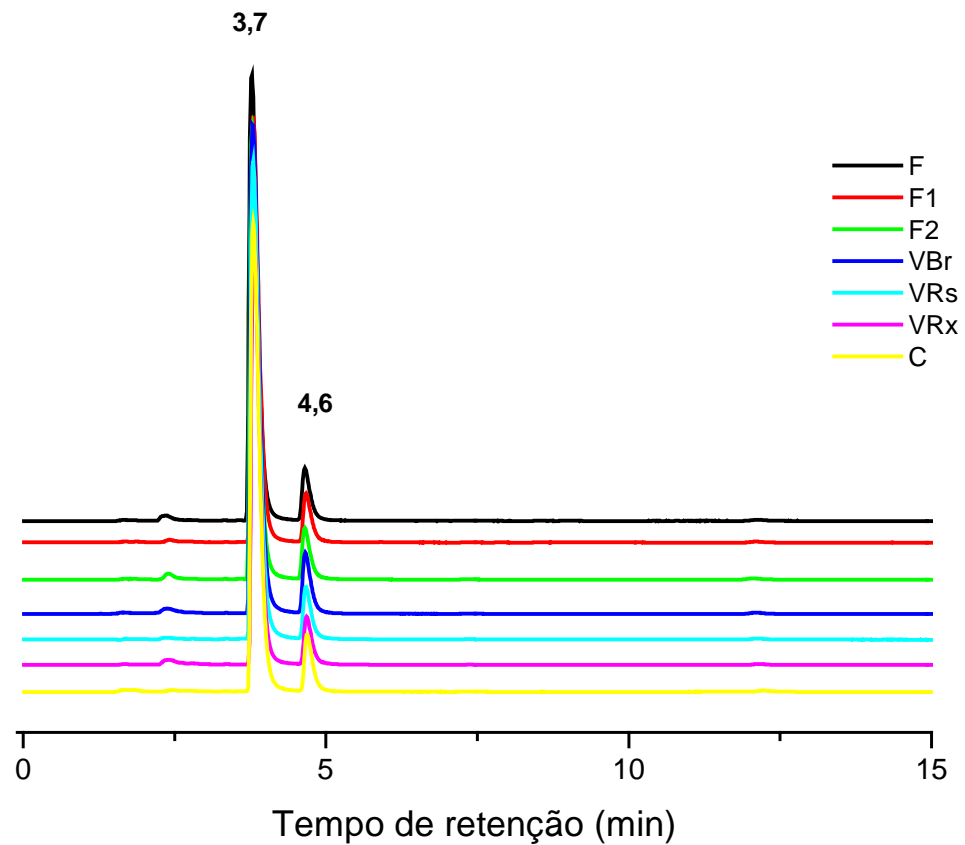


**Figura 25:** Dendrograma baseado nos dados cromatográficos dos extratos de F e C.

Uma vez otimizada a fase móvel (27% metanol, 27% acetonitrila e 46% água) e o extrator (36% de *d*, 17% de *e* e 47% de *a*), foram preparados 10 extratos das 7 plantas selecionadas, 3 exemplares de *B. forficata*, 3 exemplares de *B. variegata* e um chá comercial de *B. candicans*, totalizando 70 extratos, conforme o item 4.6.

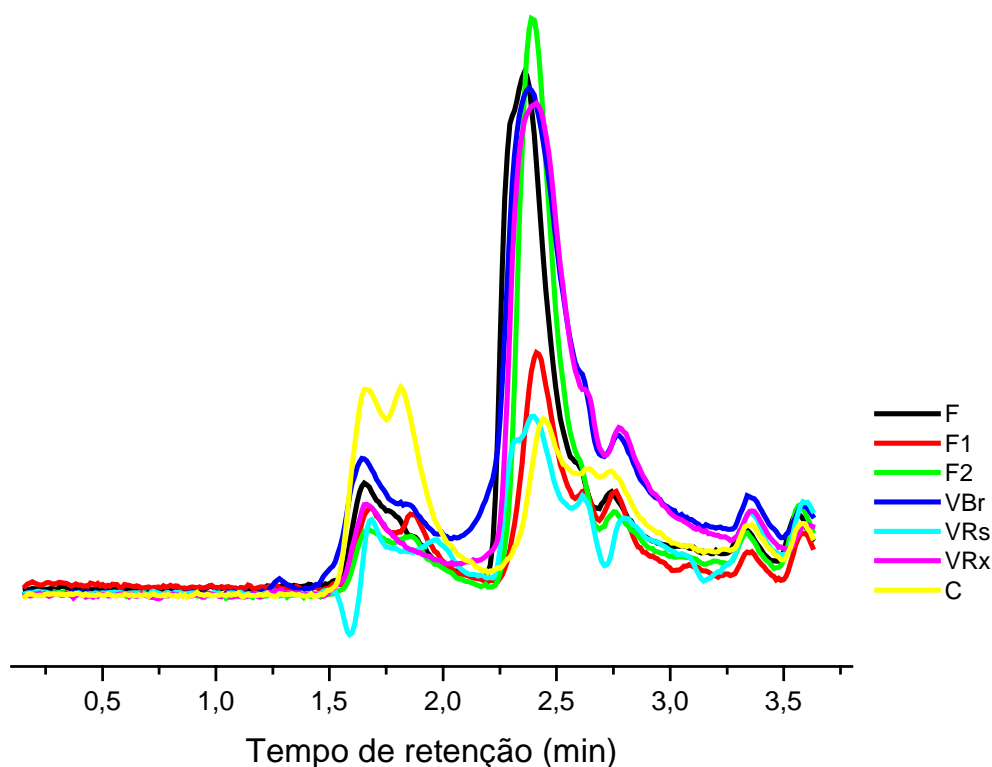
Para diferenciar os exemplares das diferentes espécies, daqui para frente nominaremos a *Bauhinia forficata* como F, F1 e F2, a *Bauhinia variegata* como VBr (flor branca), VRs (flor rosa) e VRx (flor roxa) e o chá comercial de *Bauhinia candicans* como C.

A análise desses extratos por CLAE foi realizada de acordo com as condições descritas no item 4.5. A Figura 26 contém os cromatogramas de um exemplar de cada uma das 7 plantas na condição otimizada com tempo máximo de retenção de 15 min



**Figura 26:** Cromatogramas de um exemplar de cada uma das 7 plantas pesquisadas com tempo de retenção de 15 min obtidos na fase móvel composta por 27% metanol, 27% acetonitrila e 46% água)

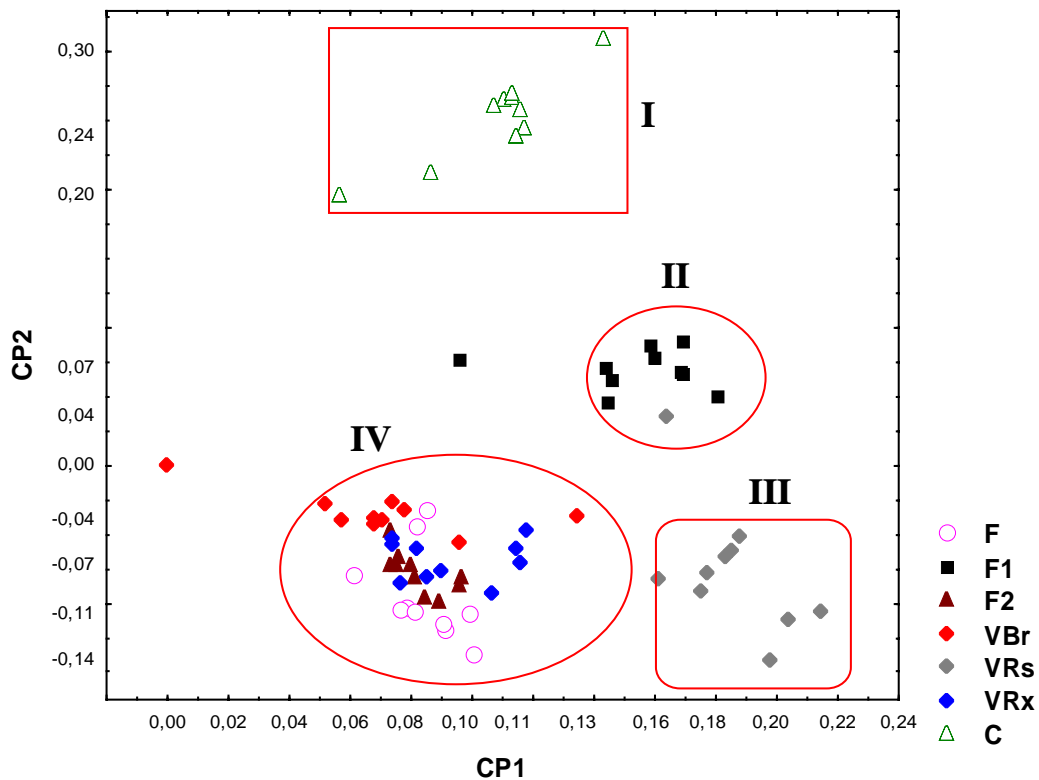
Baseado na Figura 26 é impossível discriminar uma espécie da outra. Os picos nos tempos de retenção de 3,7 e 4,6 min ocultam os outros picos por serem muito intensos. Sendo assim, para o processamento dos dados cromatográficos foram utilizadas apenas as informações cromatográficas entre os tempos de retenção de 0,16 a 3,62 min, totalizando 326 valores de altura de picos. Os picos correspondentes a este intervalo podem ser visualizados na Figura 27.



**Figura 27:** Cromatogramas de um exemplar de cada uma das 7 plantas pesquisadas com tempo de retenção no intervalo entre 0,16 a 3,62 min

Para a interpretação dos dados obtidos por CLAE, foi aplicada a ACP do Tipo Q com pré-processamento pela soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha da matriz **A**. O conjunto de dados original foi transformado em uma matriz de dimensão 70x326 (70 amostras e 326 valores de altura de picos). Com esse tratamento, foi obtido um modelo que com três componentes explica em torno de 97% da variância dos dados originais.

A Figura 28 mostra os escores da CP1 com a CP2, que juntas explicam 94,14% da variância total. Neste gráfico é possível observar a formação de 4 grupos. O grupo I é formado pelas amostras nominadas C, o grupo II pelas amostras F1, o grupo III pelas amostras VRs e o grupo IV pelas amostras F, F2, VBr e VRx.

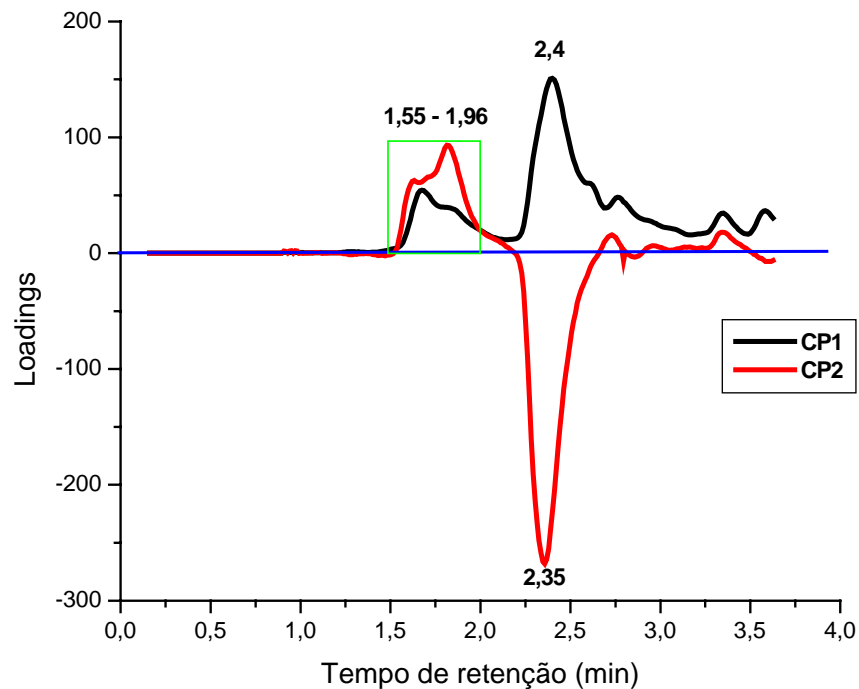


**Figura 28:** Gráfico dos escores da CP1 com CP2 dos dados cromatográficos dos 70 extratos obtidos na condição otimizada.

A CP1 separa os grupos I e IV dos grupos II e III que possuem valores de loadings mais positivos. A CP2 separa os grupos I e II, que estão localizados na parte positiva, dos grupos III e IV que se encontram na parte negativa.

O grupo IV contém 2 exemplares de *B. forficata* (F e F2) e 2 exemplares da *B. variegata*, a de flor branca e a outra de flor roxa (VBr e VRx).

Os loadings das componentes 1 e 2 podem ser visualizados na Figura 29. Todos os valores de loadings da CP1 são positivos, sendo assim, os grupos II e III localizados na parte mais positiva sofrem maior influência dos picos com tempo de retenção em 2,4 min, e entre 1,55 e 1,96 min.



**Figura 29:** Gráfico dos loadings da CP1 com CP2 dos dados cromatográficos dos 70 extratos obtidos na condição otimizada.

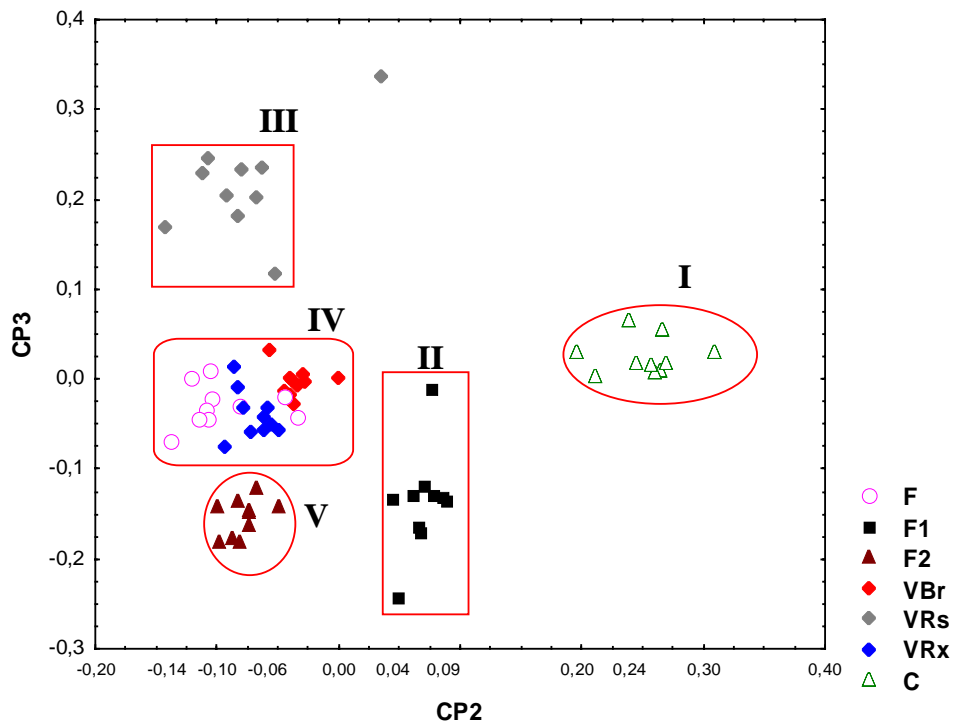
Os loadings da CP2 mostram que os valores de intensidade responsáveis pela discriminação dos grupos I e II dos grupos III e IV correspondem aos picos com tempo de retenção entre 1,55 e 1,96 e em 2,35 min.

A Figura 30 mostra o gráfico dos escores da CP2 e CP3, que juntas explicam 8,3% da variância total. Neste gráfico é possível verificar a formação de 5 grupos. O grupo I é formado pelas amostras C, o grupo II pelas amostras F1, o grupo III pelas amostras VRs, o grupo IV pelas amostras F, VBr e VRx e o grupo V pelas amostras F2, estes dois últimos grupos, na projeção da CP1 com CP2 (Figura 28) pertenciam ao mesmo grupo. Os grupos I e III encontram-se na parte positiva da CP3, o grupo IV fica próximo de zero e os grupos II e V na parte negativa.

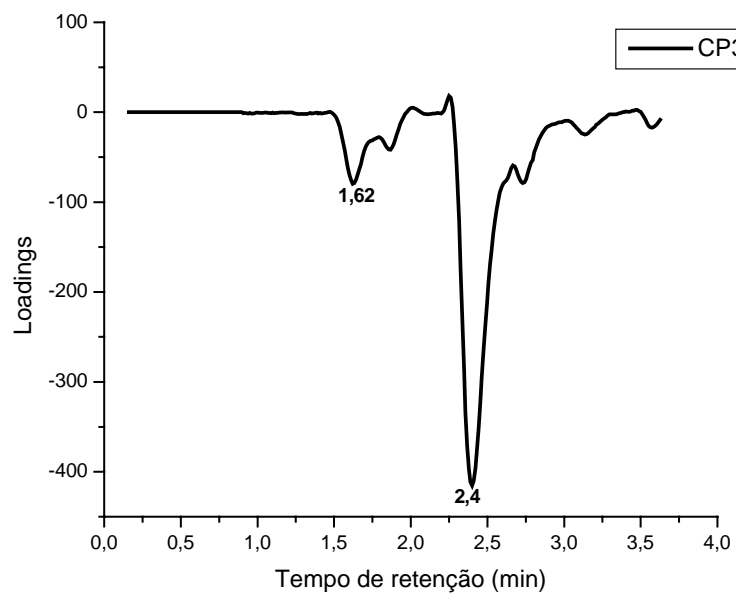
Os loadings da componente 3 podem ser visualizados na Figura 31, e mostra que os valores de intensidade responsáveis pela discriminação dos grupos I e III dos grupos II e V, correspondem aos picos com tempo de retenção em 1,62 e 2,4 min

Analisando estes resultados, podemos inferir que a *B. candicans* não é sinonímia da *B. forficata*, e que os três exemplares classificados pelo taxonomista como *B.*

*forficata* são quimicamente diferentes. Das três espécimes de *B. variegata* a de flor rosa (VRs) também é quimicamente diferenciada.

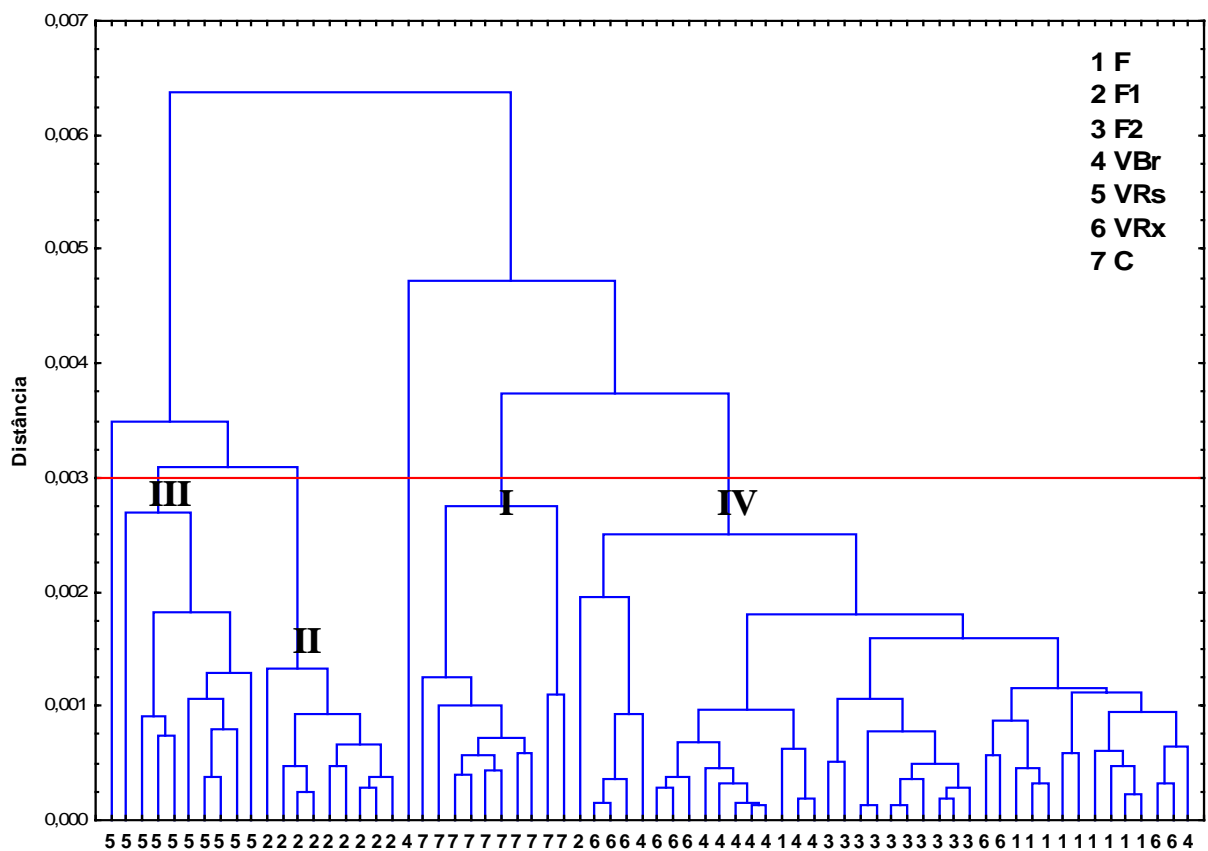


**Figura 30:** Gráfico dos escores da CP2 com CP3 dos dados cromatográficos dos 70 extratos obtidos na condição otimizada.



**Figura 31:** Gráfico dos loadings da CP3 dos dados cromatográficos dos 70 extratos.

A AH foi aplicada para servir como base de classificação. O dendrograma obtido para o conjunto de 70 amostras e 326 valores de altura de picos está apresentado na Figura 32. No valor de distância de 0,003, é observada a formação de 4 grupos. Esses grupos são idênticos àqueles grupos verificados na projeção da CP1 com CP2 (Figura 28). As maiores similaridades são encontradas entre as amostras F, F2, VBr e VRx (grupo IV da Figura 28). Dentro do grupo IV do dendrograma, é possível ver que as amostras de número 3 correspondentes à F2 ficam todas agrupadas e na projeção da CP2 com a CP3 (Figura 30) houve a discriminação dessa amostra (grupo V).



**Figura 32:** Diagrama baseado nos dados cromatográficos dos 70 extratos.

Para confirmar estes grupamentos, o SIMCA também foi aplicado, utilizando a matriz normalizada. Este método foi capaz de classificar as 70 amostras distribuídas em 7 categorias, com uma porcentagem correta de 91,43%. Este resultado pode ser visualizado na tabela 5.

As amostras F1, F2, VRs, VRx e C foram corretamente classificadas, enquanto que uma amostra de F foi classificada como sendo VBr. Cinco amostras de VBr

foram classificadas como sendo VRx. Esta classificação incorreta pode ser devido à alguma variação experimental, como por exemplo deslocamento de pico.

**Tabela 5:** Resultado da classificação das amostras do conjunto de dados cromatográficos normalizados, através do SIMCA.

Plantas		n° de amostras	F	F1	F2	VBr	VRs	VRx	C
<i>B. forficata Link</i>	<b>F</b>	10	<b>9</b>	-	-	<b>1</b>	-	-	-
<i>B. forficata Link</i>	<b>F1</b>	10	-	<b>10</b>	-	-	-	-	-
<i>B. forficata Link</i>	<b>F2</b>	10	-	-	<b>10</b>	-	-	-	-
<i>B. variegata L.</i>	<b>VBr</b>	10	-	-	-	<b>5</b>	-	<b>5</b>	-
<i>B. variegata L.</i>	<b>VRs</b>	10	-	-	-	-	<b>10</b>	-	-
<i>B. variegata L.</i>	<b>VRx</b>	10	-	-	-	-	-	<b>10</b>	-
<i>B. candicans comercial</i>	<b>C</b>	10	-	-	-	-	-	-	<b>10</b>

Visto que 91,43% das amostras foram classificadas corretamente, foi aplicado o peso de variância, apenas para obter um indicativo dos picos que possuem maior peso na discriminação das 7 plantas. De um total de 326 variáveis (valores de altura de picos), para alguns pares de categorias, foram selecionadas as 2 variáveis com os maiores pesos, e para outros pares, foi selecionado apenas o maior peso.

Os maiores pesos de variância foram observados nos tempos de retenção de 1,58, 1,85, 1,97, 2,19, 2,32, 2,62 e 3,57 min, confirmando os resultados da ACP pela análise dos loadings. Os pares de categorias que podem ser discriminados nesses tempos de retenção com os respectivos pesos de variância estão apresentados na Tabela 6.

Este resultado mostra que os picos com maior poder discriminatório possuem tempos de retenção em 1,85 e 2,32 min. Os valores de peso mais altos são obtidos nos pares de categorias que possuem a categoria C, ou seja, as substâncias ou grupo de substâncias com tempos de retenção de 1,85 e 2,32 min discriminam as amostras da categoria C. Já os menores valores de variância são observados nos pares VBr x F e VBr x VRx, essa evidência explica o fato dessas três categorias (F, VBr e VRx) pertencerem ao mesmo grupo na ACP (grupo IV, Figura 30).

Para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos com o peso da variância, foram analisados os espectros de cada pico das 7 plantas estudadas. Serão

apresentados os espectros dos picos obtidos até o tempo de retenção de 3,62 min para 5 cromatogramas de cada planta. No total foram analisados 220 espectros registrados no intervalo de 200-300 nm, sendo que algumas plantas apresentaram diferentes números de picos. A Tabela 7 mostra os tempos de retenção onde foram obtidos os espectros de cada planta e a categoria à qual ele pertence. No total foram 10 categorias, ou seja, são 10 tempos de retenção diferentes.

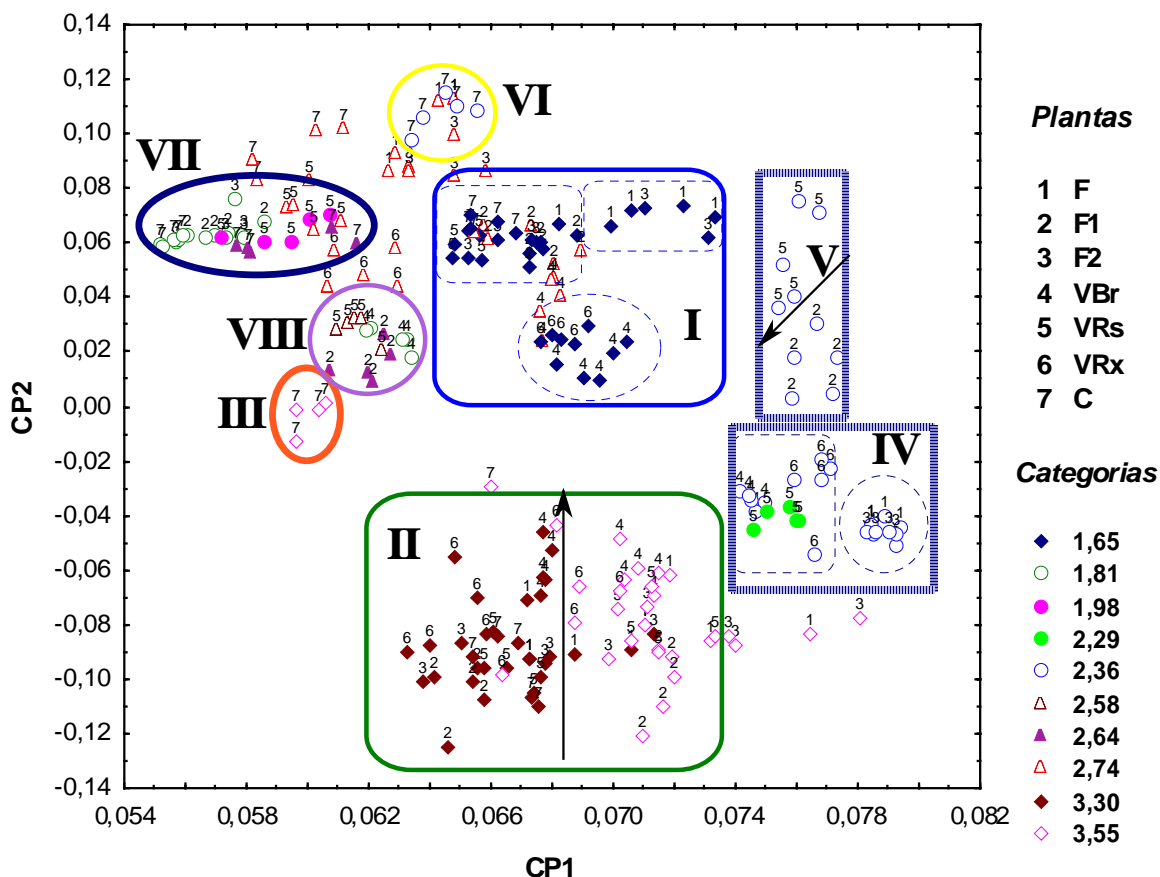
**Tabela 6:** Peso da variância obtida através do Peso de Fisher para cada par de categoria nos respectivos tempos de retenção.

Pares de categorias	Peso da variância nos tempos de retenção						
	1,58	1,85	1,97	2,19	2,32	2,62	3,57
VBr x C		78,00					
VBr x F				7,074			
VBr x F1		33,56					
VBr x VRs	10,97						
VBr x F2				8,433			
VBr x VRx			6,853				
C x F		97,28			168,0		
C x F1		35,30			30,36		
C x VRs		62,78			69,00		
C x F2		122,0			133,3		
C x VRx		119,0			183,2		
F x F1					90,53		
F x Vrs						20,42	23,00
F x F2					26,88		
F x VRx						23,48	
F1 x Vrs					21,77	24,03	
F1 x F2		66,00				55,40	
F1 x VRx		55,54			53,82		
VRs x F2					44,40		
VRs x VRx							29,27
F2 x VRx					108,1		

**Tabela 7:** Tempos de retenção dos picos encontrados nos cromatogramas das 7 plantas estudadas.

Plantas	Categoria e Tempo de retenção									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>F</b>	1,65				2,35			2,74	3,31	3,55
<b>F1</b>	1,67	1,85			2,40		2,62	2,75	3,35	3,58
<b>F2</b>	1,67	1,86			2,38			2,75	3,32	3,56
<b>VBr</b>	1,64	1,86			2,37			2,76	3,33	3,58
<b>VRs</b>	1,67		1,98	2,29	2,36	2,58		2,74	3,28	3,51
<b>VRx</b>	1,65				2,40			2,77	3,35	3,58
<b>C</b>	1,65	1,81			2,44		2,64	2,74	3,35	3,57

Os 220 espectros foram colocados na forma de uma matriz de dimensão 220 x 82, ou seja, 220 espectros e 82 valores de absorvância. Estes dados foram submetidos a ACP do Tipo Q. A Figura 33 mostra os escores da CP1 com CP2, que juntas explicam 98,6% da variância contida nos dados. Na Figura é possível observar a formação de 8 grupos. O grupo I contém os espectros dos picos com tempo de retenção em 1,65 min. No grupo I, vemos a formação de três subgrupos, um que contém os espectros de VBr e VRx, outro F e F2 e o terceiro os espectros de F1, VRs e C. No grupo II, estão agrupados os espectros dos picos com tempo de retenção em 3,30 e 3,55 min. O grupo III contém os espectros dos picos com tempo de retenção em 3,55 min da planta C que fica distante dos espectros dos picos com o mesmo tempo de retenção alocados no grupo II. Os grupos IV, V e VI contém os espectros dos picos com tempo de retenção de 2,36 min.



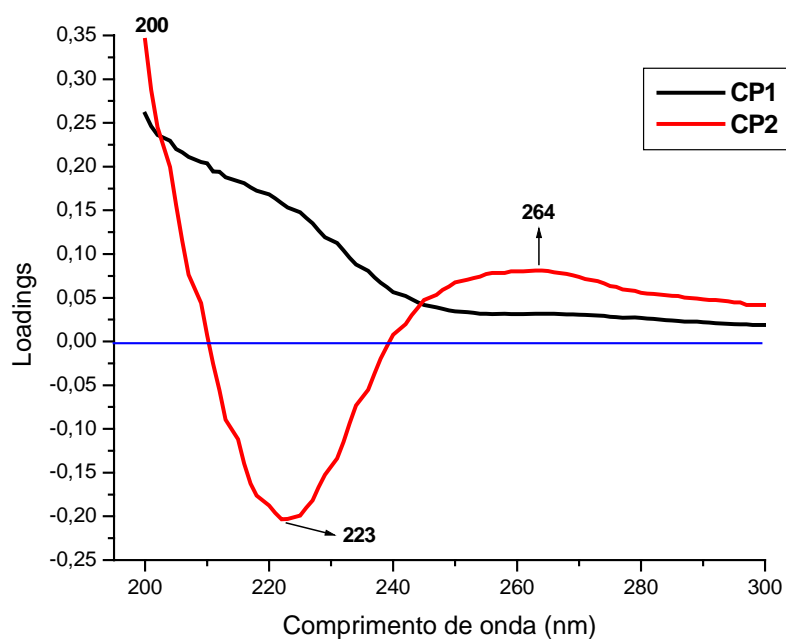
**Figura 33:** Gráfico dos escores das componentes principais 1 e 2 dos espectros obtidos dos cromatogramas das 7 plantas estudadas.

No grupo IV vemos que os espectros dos pares VBr e VRx, e F e F2 com tempo de retenção em 2,36 min ficam agrupados, enquanto que os espectros de F1 e VRs ficam localizados no grupo V, e os espectros de C com esse mesmo tempo de retenção encontram-se ao lado oposto no grupo VI.

O grupo VII separa os espectros das plantas F1, F2, VRs e C com tempo de retenção em 1,81 min, do espectro da planta VBr com mesmo tempo de retenção.

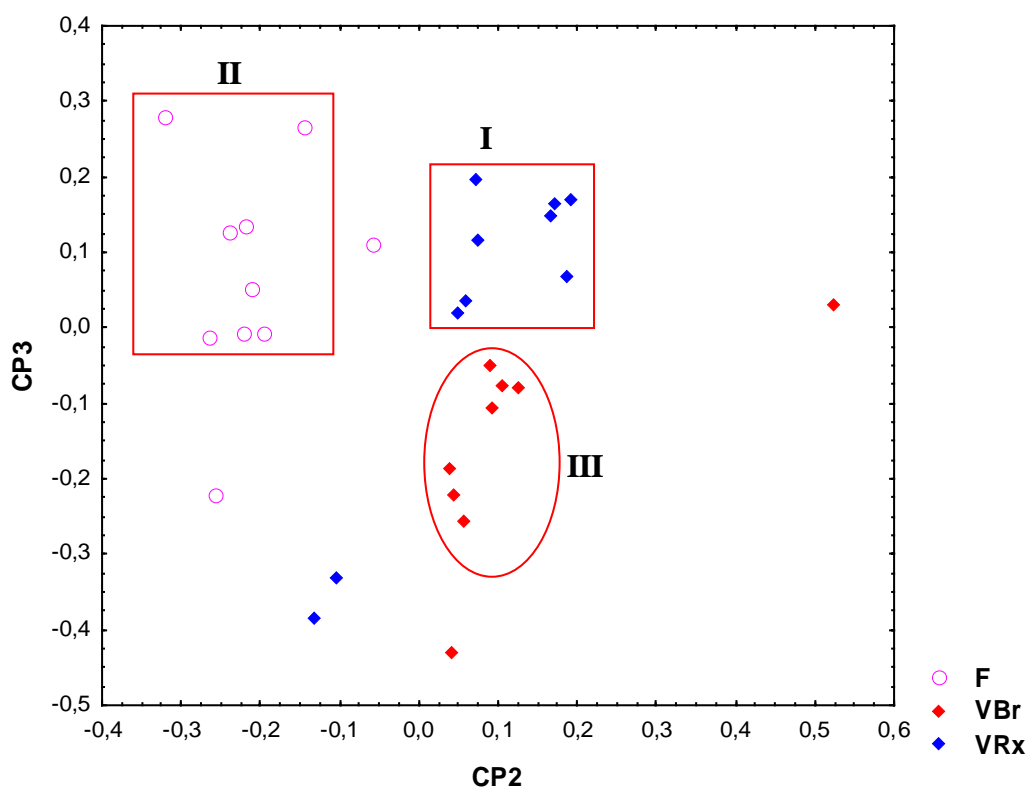
O grupo VIII contém os espectros de VRs com tempo de retenção em 2,58 min e os espectros de F1 em 2,64 min. Existe a possibilidade desses espectros pertencerem à mesma substância, já que estão alocados no mesmo grupo e possuem tempos de retenção tão próximos, pois é muito comum haver deslocamento de picos em CLAE.

A CP2 separa os grupos I, V, VI, VII e VIII, que estão localizados na parte positiva, dos grupos II e IV, enquanto que o grupo III encontra-se numa região intermediária. A Figura 34 mostra o gráfico dos loadings das componentes 1 e 2.



**Figura 34:** Gráfico dos loadings das componentes principais 1 e 2 dos espectros obtidos dos cromatogramas das 7 plantas estudadas.

Todos os loadings da CP1 possuem valores positivos. Já a CP2 possui duas regiões com valores de loadings positivos e uma região com valores negativos. Os grupos localizados na parte positiva da CP2, sofrem maior influência das variáveis com comprimento de onda de 200 e 264 nm e os grupos localizados na parte negativa da variável com comprimento de onda em 223 nm. O grupo IV (Figura 30), discriminado na projeção da CP2 com CP3, foi submetido a ACP do tipo Q com pré-processamento por vetor unitário. O conjunto de dados foi formado por um total de 29 amostras e 326 valores de altura de picos. As três primeiras componentes explicam em torno de 99,23% da variância dos dados originais. A Figura 35 mostra o gráfico dos escores das componentes principais 2 e 3.

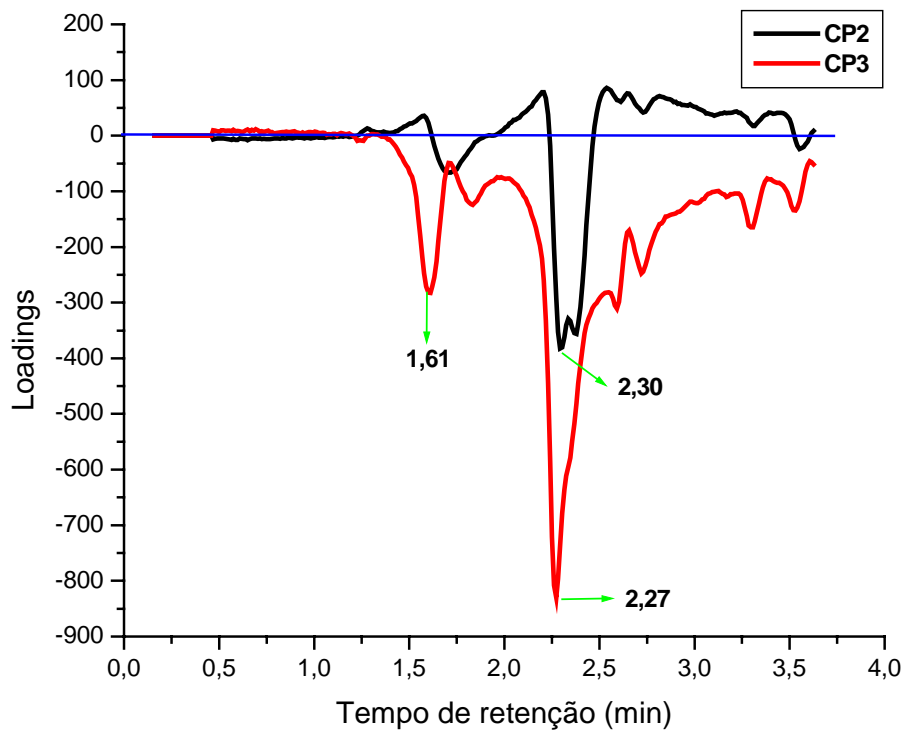


**Figura 35:** Gráfico dos escores da CP2 com a CP3 para as amostras do grupo IV.

Neste gráfico é possível ver a formação de 3 grupos. A CP3 separa os grupos I e II, formados pelas amostras de VRx e F, do grupo III formado pelas amostras de VBr. A CP2 separa os grupos I e III do grupo II, ou seja, separa as amostras com relação à espécie.

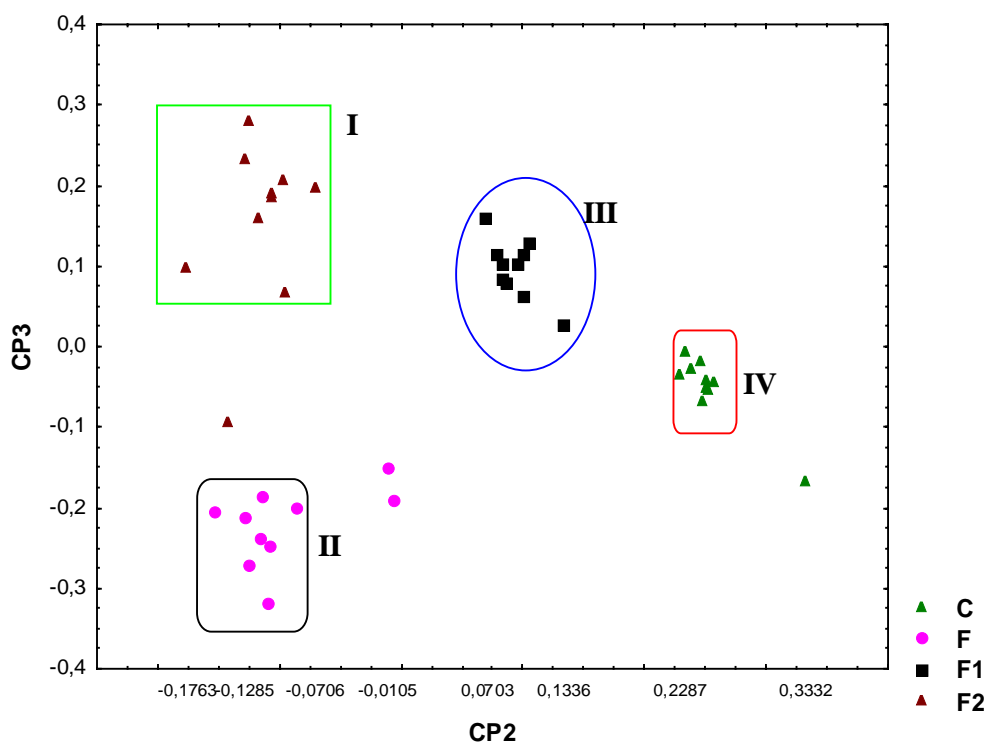
Os loadings das componentes 2 e 3 estão representados na Figura 36. Analisando esta figura, é possível ver que a variável que separa o grupo II, formado pelas amostras de F, dos grupos I (VBr) e III (VRx) na CP2, possui tempo de retenção de 2,30 min, e as variáveis que separam os grupos I e II do grupo III na CP3 possuem tempo de retenção em 1,61 e 2,27 min

Estes resultados estão em concordância com o peso de variância.



**Figura 36:** Gráfico dos loadings das componentes principais 2 e 3 para as amostras do grupo IV.

A ACP do Tipo Q também foi aplicada às plantas classificadas como *Bauhinia forficata Link*, F, F1 e F2 e à amostra comercial C extraídas na condição otimizada, totalizando 40 amostras com 326 valores de altura de picos. As três primeiras componentes explicam em torno de 98,2% da variância dos dados. A Figura 37 mostra a projeção da CP2 com CP3.

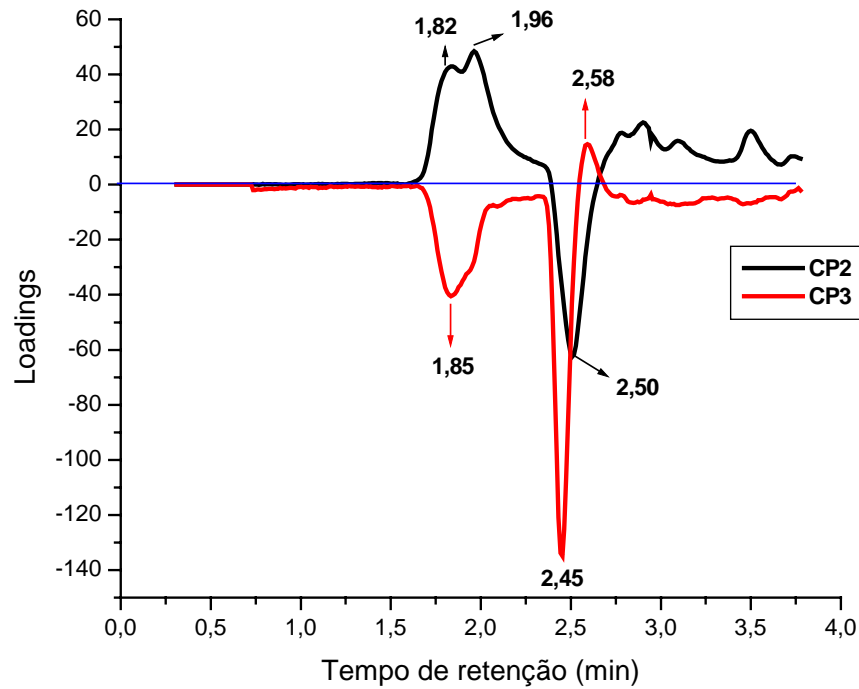


**Figura 37:** Gráfico dos escores das componentes principais 2 e 3 para as amostras classificadas como *Bauhinia forficata* Link e para a amostra comercial.

Esta Figura mostra a formação de 4 grupos. O grupo I é formado pelas amostras de F2, o grupo II pelas amostras de F, o grupo III pelas amostras de F1 e o grupo IV pelas amostras de C. A CP2 separa os grupos I e II dos grupos III e IV. Na CP3, os grupos I (F2) e III (F1) encontram-se na parte mais positiva, enquanto o grupo IV (C) encontra-se na parte menos negativa e o grupo II (F) está localizado na parte mais negativa.

A Figura 38 mostra os loadings da CP2 e CP3. Os grupos III (F1) e IV (C) localizados na parte positiva da CP2 sofrem maior influência das variáveis com tempo de retenção em 1,82 a 1,96, já os grupos I (F2) e II (F) são discriminados devido à variável com tempo de retenção em 2,50 min.

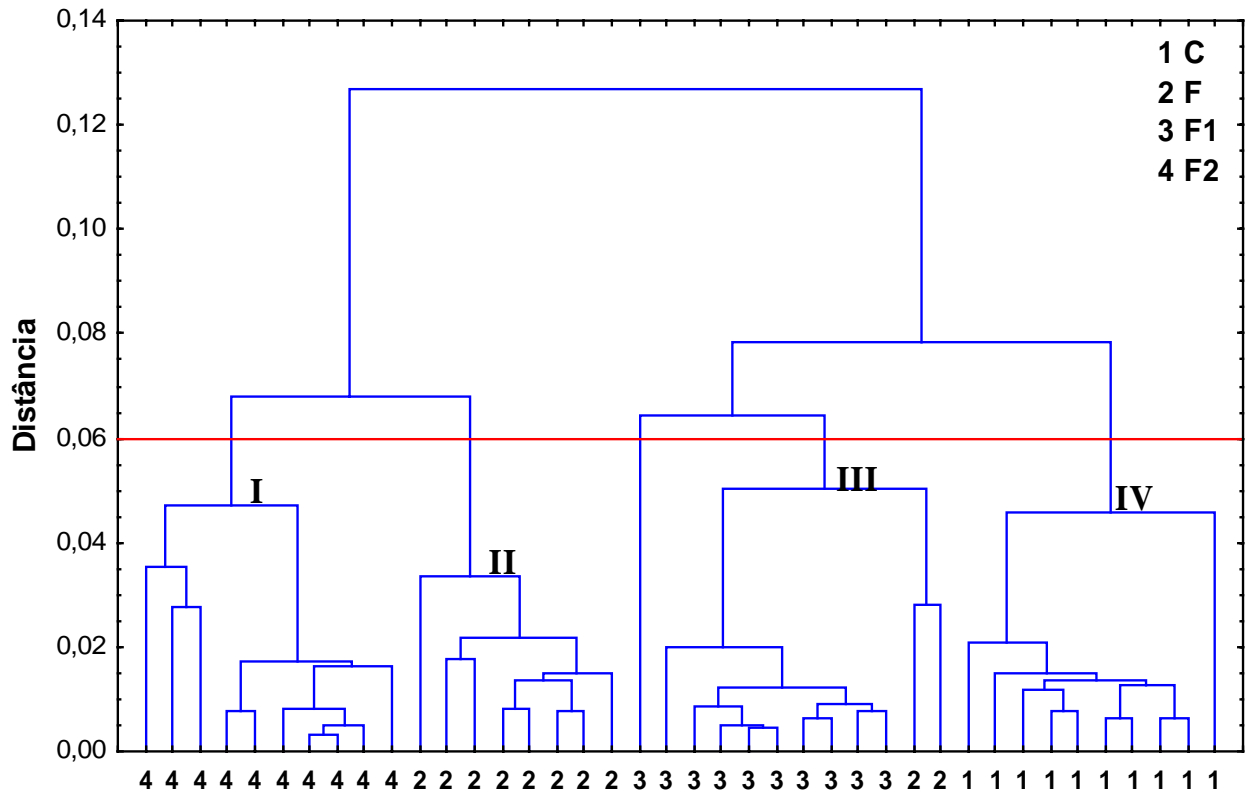
Os loadings da CP3 mostram que os grupos I e III possuem maior influência da variável com tempo de retenção em 2,58 min, já os grupos II e IV sofrem influência das variáveis em 1,85 e 2,45 min.



**Figura 38:** Gráfico dos loadings das componentes principais 2 e 3 para as amostras classificadas como *Bauhinia forficata Link* e para a amostra comercial.

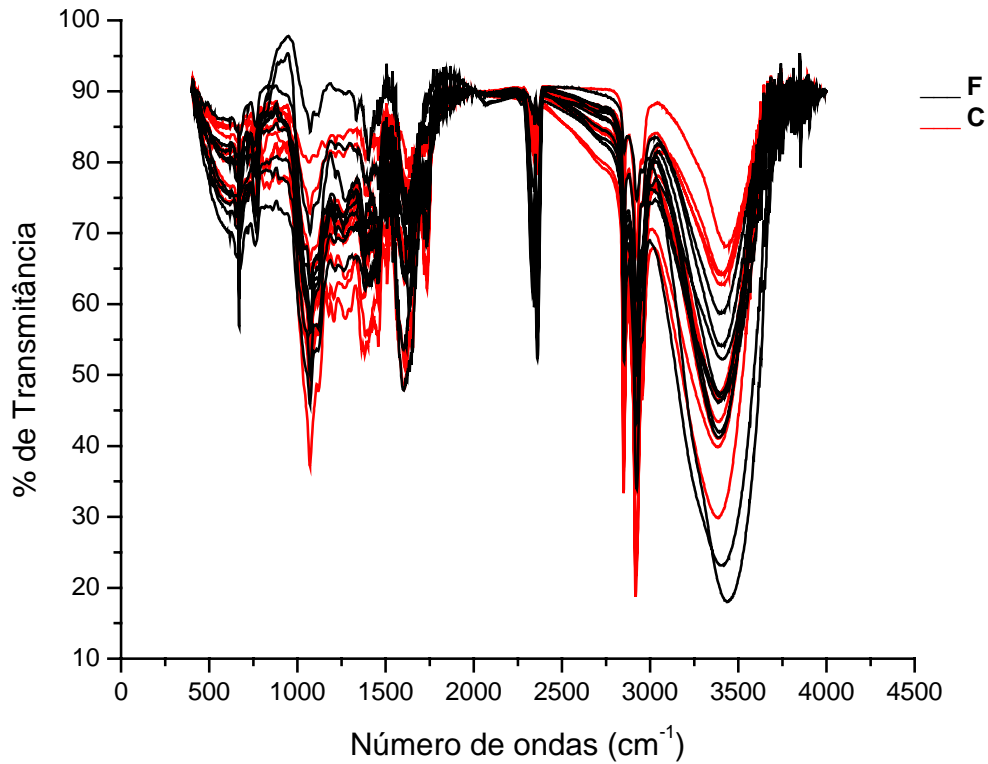
Estes resultados também estão em concordância com o peso de variância. As pequenas diferenças são devidas à forma de localização dos máximos nos loadings.

A AH foi aplicada ao mesmo conjunto de dados, e o dendrograma obtido está apresentado na Figura 39. O resultado da AH concordou com aquele obtido pela ACP mostrados na Figura 35. No valor de similaridade de 0,06, é possível ver os quatro grupos discriminados na ACP.



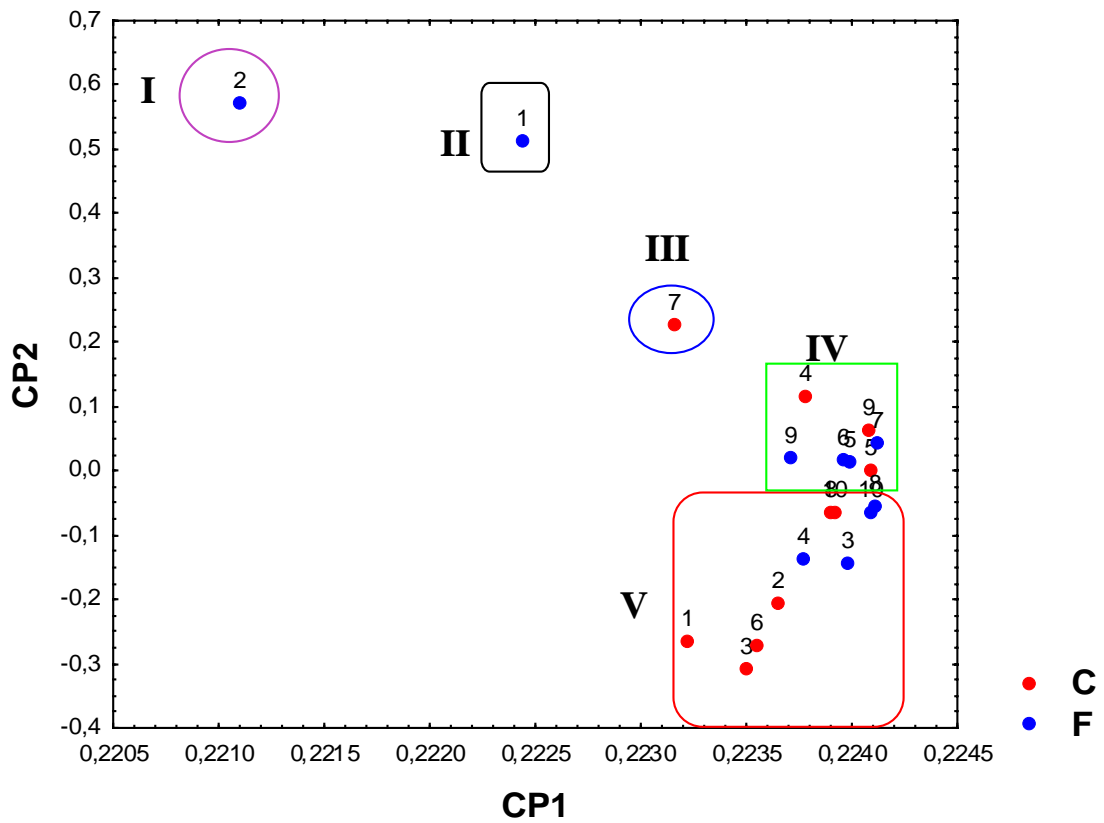
**Figura 39:** Diagrama baseado nos dados cromatográficos das 40 amostras de *Bauhinia*.

Os extratos de C e F preparados com base no planejamento da Figura 7, também foram analisados por FTIR e métodos quimiométricos. A Figura 40 apresenta os espectros dos 20 extratos, sendo 10 para cada espécie, registrados na região entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .



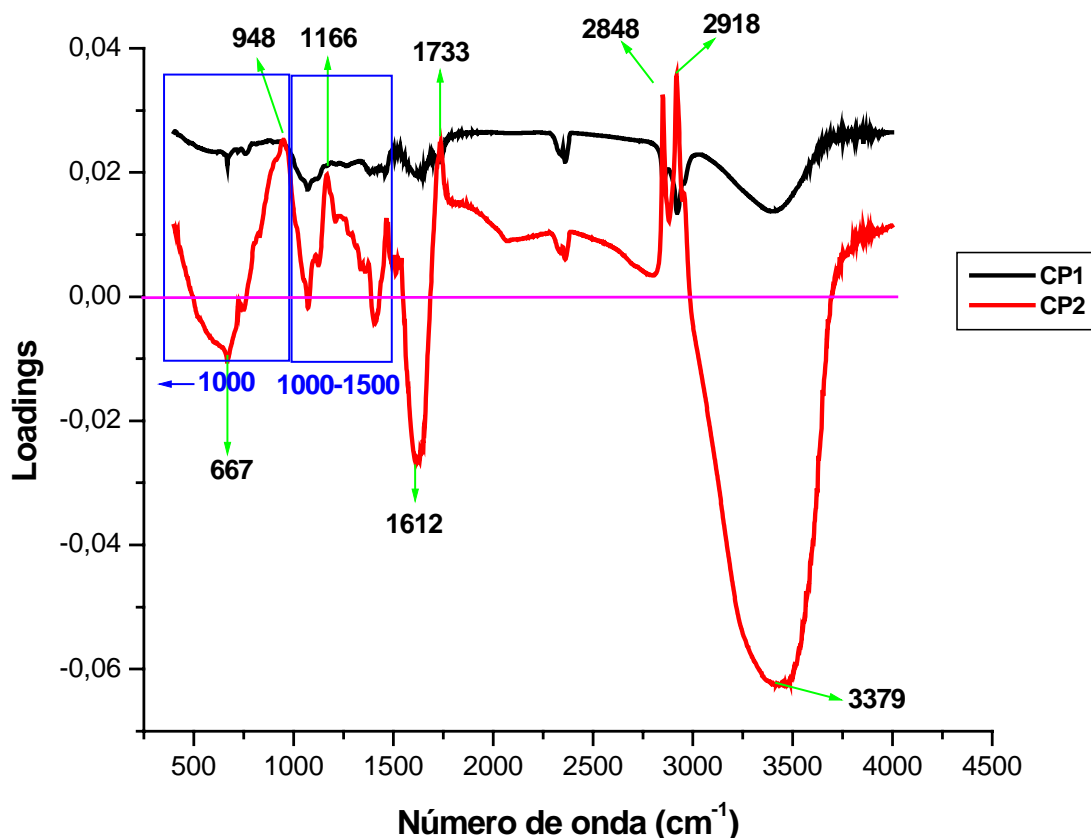
**Figura 40:** Espectros de infravermelho das 20 amostras do planejamento experimental.

Estes espectros foram colocados na forma de uma matriz formada por 20 amostras e 1866 valores de transmitância e submetidos a ACP. O gráfico dos escores das componentes principais 1 e 2 que juntas explicam 99,75% da variância contida nos dados, está apresentado na Figura 41. Neste gráfico é possível observar a formação de 5 grupos distintos. Os grupos I e V, que contém os extratos preparados em etanol puro (2) estão em lados opostos tanto na CP1 quanto na CP2. Os grupos II e V, que contém as amostras 1 (extraídas em diclorometano puro) estão em lados opostos na CP2, e os grupos III e IV, que contém a amostra 7 (ponto central do planejamento) está localizado à direita da CP1 e na parte positiva da CP2.



**Figura 41:** Gráfico dos escores da CP1 e CP2 dos dados espectrais das amostras das duas espécies de *Bauhinia*.

O gráfico dos valores dos loadings das componentes 1 e 2 está apresentado na Figura 42. Esta figura mostra quais os números de onda que explicam a distinção entre os cinco grupos formados na Figura 41, principalmente com relação aos loadings da CP2, pois todos os valores dos loadings da CP1 são positivos.



**Figura 42:** Gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para as 20 amostras do planejamento (Fig 7).

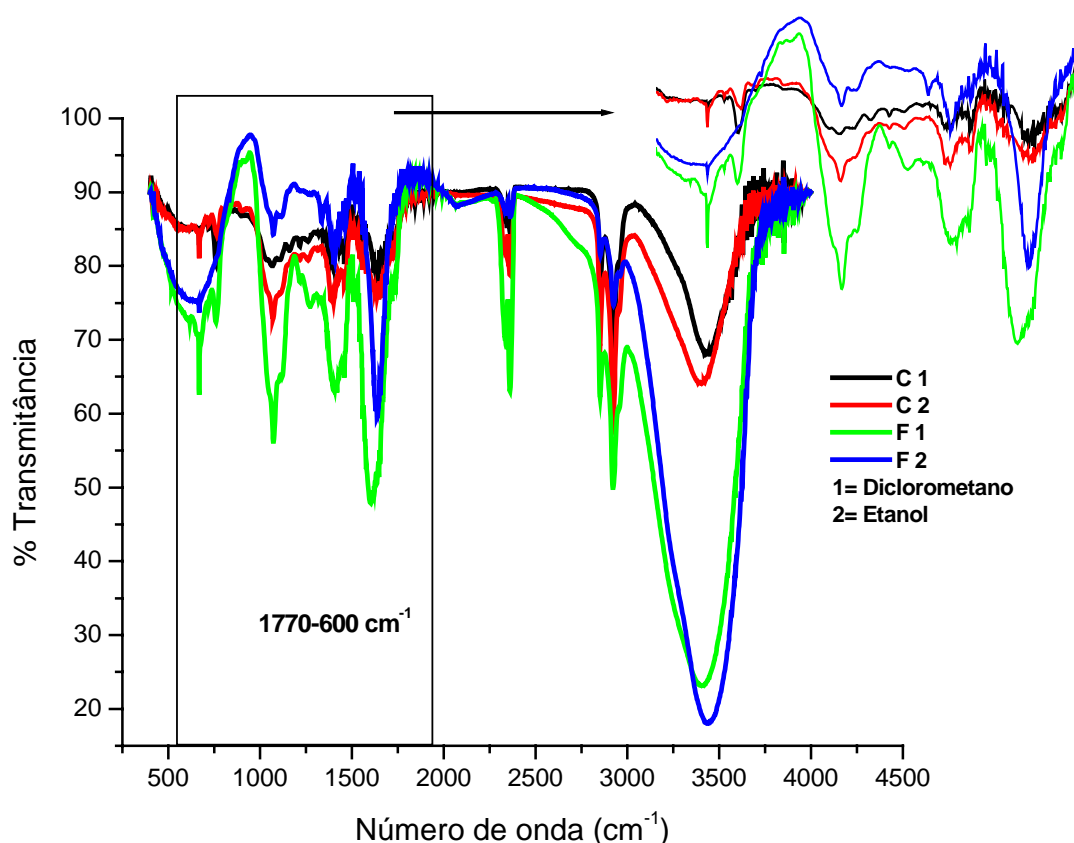
Nos loadings da CP2, existem várias regiões espectrais discriminatórias. As amostras do grupo V estão localizadas na parte negativa da CP2 (Figura 41), isto significa que essas amostras sofrem maior influência das variáveis que apresentam valores de loadings negativos. As regiões espectrais mais significativas que caracterizam essas amostras são os números de onda de 3379, 1612 e 667  $\text{cm}^{-1}$ . Os grupos I, II, III e IV localizados na parte positiva da CP2 sofrem maior influência das variáveis com loadings positivos, sendo que os números de onda mais significativos são 2918, 2848, 1733, 1166 e 948  $\text{cm}^{-1}$ . A região em torno do número de onda de 3379  $\text{cm}^{-1}$  caracteriza a absorção das vibrações de deformação axial ( $\nu$ ) de O-H de álcoois e fenóis (3650-3100  $\text{cm}^{-1}$ ) podendo ter contribuição de absorções de  $\nu$  N-H de amidas (3500-3070  $\text{cm}^{-1}$ ) e aminas (3600-3200  $\text{cm}^{-1}$ ) sobrepostas.

Os picos em 2918 e 2848  $\text{cm}^{-1}$  são compatíveis com  $\nu$  Csp<sup>3</sup>-H de alcanos (3000-2840  $\text{cm}^{-1}$ ) e  $\nu$  O=C-H de aldeídos (2830-2700  $\text{cm}^{-1}$ ). A banda com frequência de absorção em 1733  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de grupamento carbonila ( $\nu$  C=O), que pode estar associada a grupos funcionais como ésteres (1750-1670  $\text{cm}^{-1}$ ), aldeídos (1740-1720  $\text{cm}^{-1}$ ),

cetonas ( $1770-1700\text{ cm}^{-1}$ ), ácidos carboxílicos ( $1760-1660\text{ cm}^{-1}$ ) e outros. O número de onda em  $1612\text{ cm}^{-1}$  pode ser proveniente de  $\nu\text{ C=C}$  de olefinas ( $1680-1630\text{ cm}^{-1}$ ) ou de compostos aromáticos ( $1600-1450\text{ cm}^{-1}$ ). De uma forma geral, na região entre  $1500-1000\text{ cm}^{-1}$  podem ser encontrados picos característicos dos grupos funcionais já citados anteriormente, como;  $\nu\text{ C-N}$  de amida ( $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu\text{ C-O}$  de álcoois ( $1140-1050\text{ cm}^{-1}$ ), fenóis ( $1390-1330$  e  $1260-1180\text{ cm}^{-1}$ ), ésteres ( $1275-1020\text{ cm}^{-1}$ ) e outros. Abaixo da frequência de absorção em  $1000\text{ cm}^{-1}$  também existem muitas possibilidades, como por exemplo, as vibrações de deformação angular ( $\delta$ ) de C-H fora do plano de aromáticos (depende da substituição) e olefinas ( $1000-680\text{ cm}^{-1}$ ).

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. Neste trabalho, os extratos não foram submetidos a fracionamento ou purificação para a devida identificação/caracterização das substâncias, não sendo possível a análise detalhada desses espectros. No entanto, as amostras de C e F extraídas em diclorometano puro (1) e em etanol puro (2) foram discriminadas na ACP, concordando com os resultados encontrados na CLAE (Figura 21).

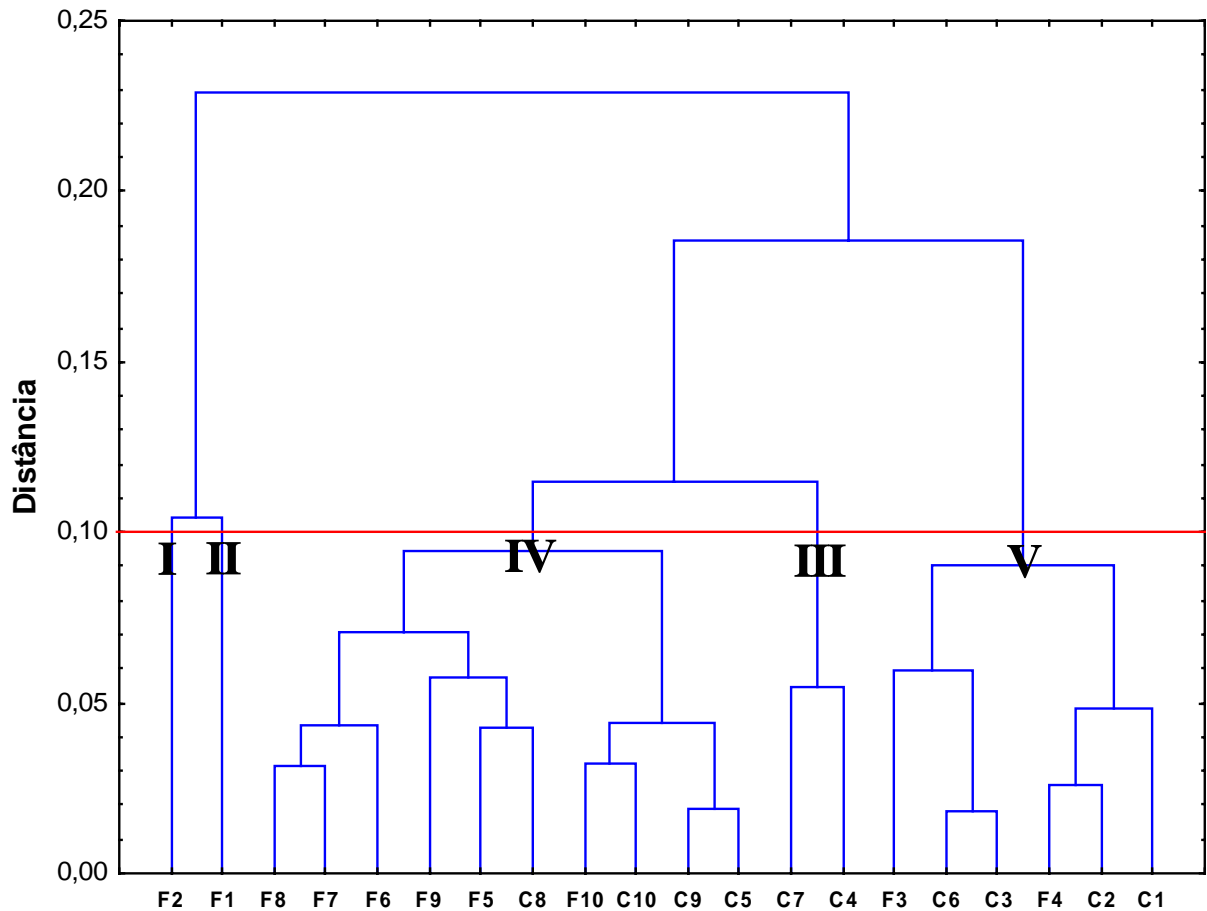
A Figura 43 mostra os espectros das amostras de C e F extraídas em diclorometano puro e etanol puro.



**Figura 43:** Espectros de infravermelho dos extratos 1(diclorometano) e 2 (etanol) de C e F.

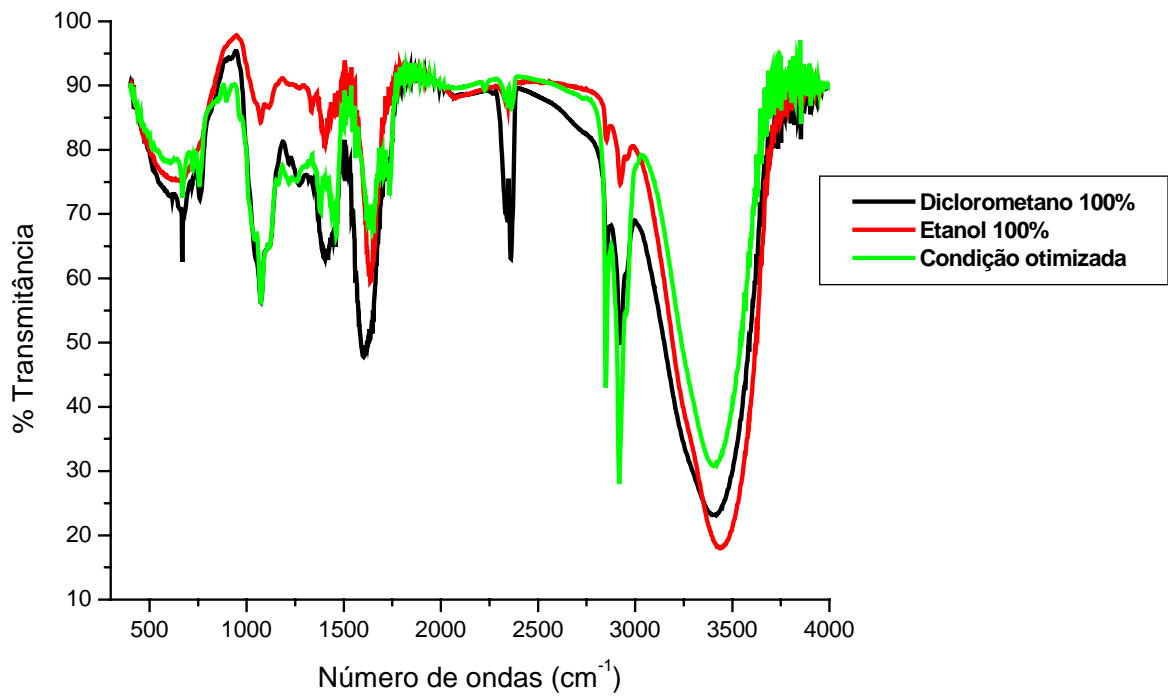
Pelos espectros é possível ver que tanto o etanol quanto o diclorometano puro usados como solvente extrator permitem discriminar as duas espécies. No entanto o diclorometano permite obter maior informação composicional na região de frequência de absorção entre 1770-600 cm<sup>-1</sup>, já que na região compreendida entre 3700 até 2150 cm<sup>-1</sup> a diferença entre os dois solventes extratores é apenas quantitativa.

O dendrograma baseado nos dados espectroscópicos dos 20 extratos obtidos pela AH está apresentado na Figura 44. No valor de similaridade igual a 0,10, são observados os cinco grupos formados na projeção da CP1 com a CP2 (Fig. 41).



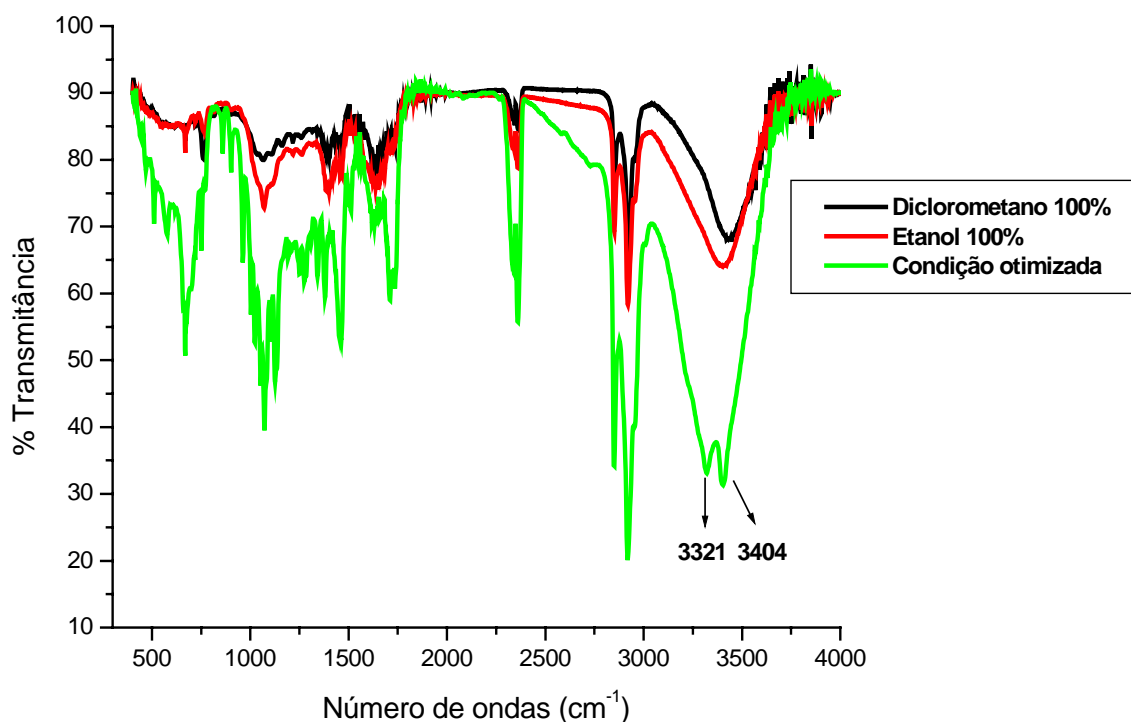
**Figura 44:** Dendrograma obtido pela AH dos extratos das duas espécies de *Bauhinia*.

Analisando os resultados da ACP dos dados de infravermelho da Figura 41, vemos que os extratos preparados em diclorometano ou etanol puro parecem discriminar as espécies *B. forficata* e *B. candicans*. A Figura 45 mostra os espectros da *B. forficata* extraída em diclorometano puro, etanol puro e na condição otimizada na da CLAE (36% de *d*, 17% de *e* e 47% de *a*). Esta figura mostra que o espectro do extrato obtido na condição otimizada traz quase a mesma informação dos extratos obtidos em diclorometano e etanol puro, salvo por apresentar dois picos entre 1500-1250  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 45:** Espectros dos extratos da *B. forficata* obtidos em diclorometano puro, etanol puro e na condição otimizada.

A Figura 46 mostra os espectros da *B. candidans* extraída em diclorometano puro, etanol puro e na condição otimizada. Para a *B. candidans*, o extrato obtido na condição otimizada permite obter mais informação espectral, e neste caso a diferença entre os espectros não é somente quantitativa. Na região abaixo de 2000 cm<sup>-1</sup> e entre 3750-3250 cm<sup>-1</sup> o espectro do extrato obtido na condição otimizada possui maior informação qualitativa.



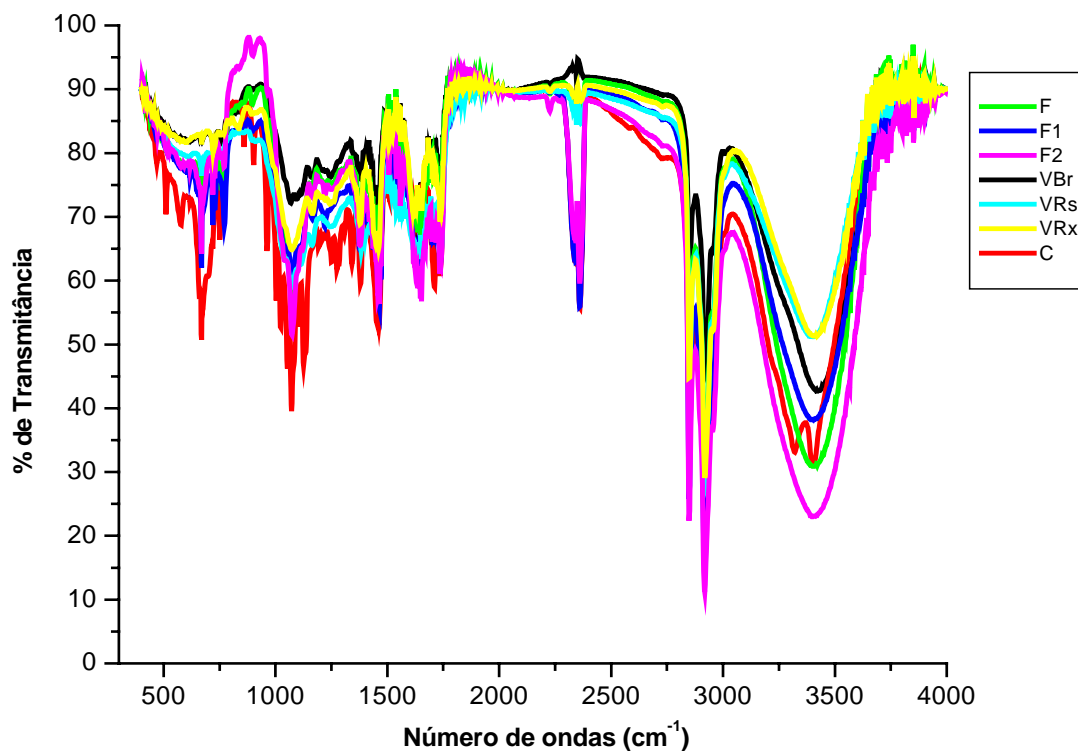
**Figura 46:** Espectros dos extratos da *B. candidans* obtidos em diclorometano puro, etanol puro e na condição otimizada.

Os picos em 3404 e 3321  $\text{cm}^{-1}$  indicam fortemente a presença de grupamento  $\text{NH}_2$  de aminas primárias ( $\sim 3500$  e  $\sim 3300$   $\text{cm}^{-1}$ ). Isso quer dizer que o extrato da *B. candidans* é rico em substâncias contendo este grupamento, mais especificamente os aminoácidos, que são metabólitos secundários. A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico (chiquimato) e o acetato.

O ácido chiquímico pode ser metabolizado em ácido gálico (galato) ou ácido corísmico (corismato). Este último, por sua vez, origina os aminoácidos aromáticos, precursores de vários tipos de alcalóides. Entre os aminoácidos aromáticos formados, estão a fenilalanina e o triptofano, que são considerados nutrientes essenciais na dieta dos animais.

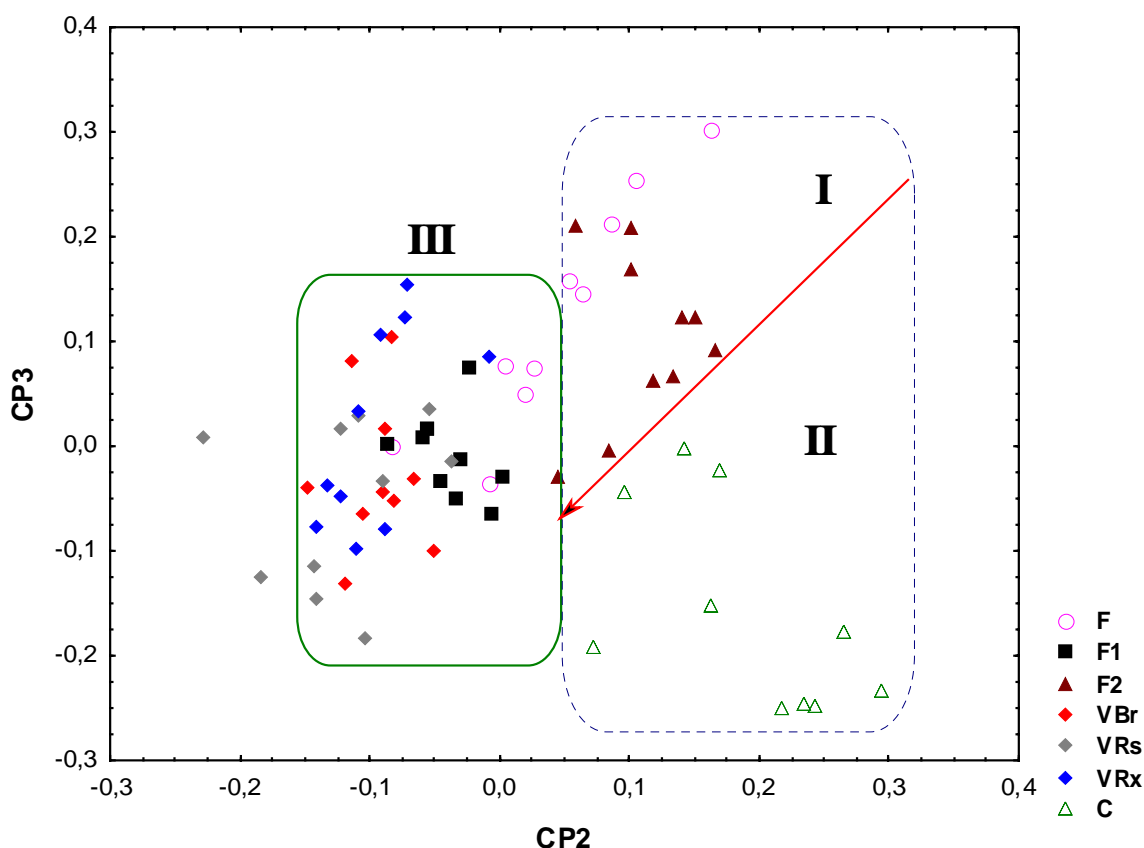
Visto que os 70 extratos preparados na condição otimizada para a CLAE forneceram uma maior informação qualitativa com relação aos extratos obtidos em diclorometano e etanol puro, eles também foram analisados por FTIR sem a necessidade de preparar novos extratos. Os espectros de cada exemplar registrados na região espectral de

4000-400  $\text{cm}^{-1}$  podem ser visualizados na Figura 47. Estes espectros não permitem a discriminação das plantas pela simples análise visual.



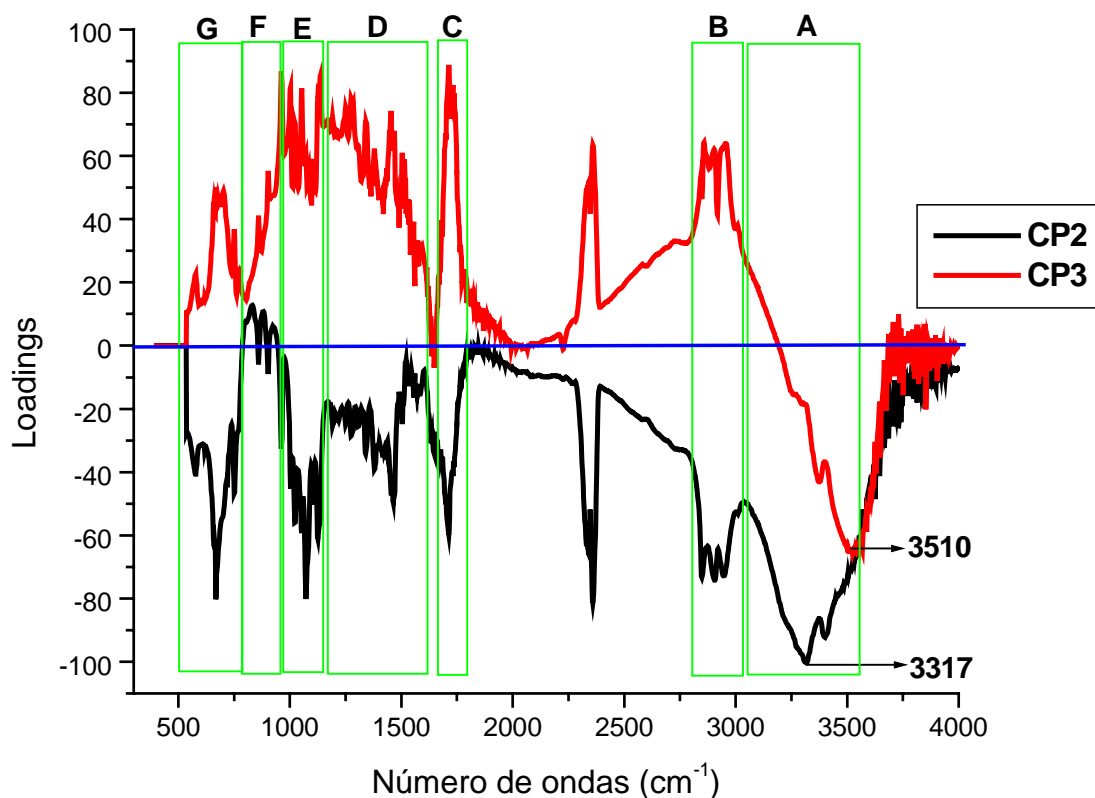
**Figura 47:** Espectros de infravermelho de um exemplar de cada uma das sete plantas obtidas na condição otimizada.

Os dados espectrais dos extratos obtidos por FTIR na condição otimizada foram submetidos a ACP do Tipo Q. O conjunto de dados foi formado por 70 amostras e 1866 valores de transmitância. A ACP permitiu obter um modelo que com três componentes explica 99,92% da variância dos dados originais. A Figura 48 apresenta o gráfico dos escores da CP2 com CP3. A CP2 separa os grupos I e II, localizados na parte positiva, do grupo III localizado na parte negativa. A CP3 separa o grupo I, localizado na parte positiva, do grupo II localizado na parte negativa, já o grupo III encontra-se numa região intermediária da CP3.



**Figura 48:** Gráfico dos escores da CP2 com CP3 dos dados espectroscópicos das 70 amostras obtidas na condição otimizada.

Os loadings das componentes 2 e 3 estão apresentados na Figura 49. Existem 7 regiões discriminatórias tanto na CP2 como na CP3. A região A está compreendida entre  $3633-3151\text{ cm}^{-1}$ , e caracteriza a absorção de  $\nu$  O-H de álcoois ( $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ ) e fenóis ( $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ ) podendo ter contribuição de absorções de  $\nu$  N-H de amidas ( $3500-3070\text{ cm}^{-1}$ ) e aminas ( $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ ) superpostas. A região B entre  $3024-2800\text{ cm}^{-1}$ , é compatível com  $\nu$  Csp<sup>3</sup>-H de alcanos ( $3000-2840\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\nu$  O=C-H de aldeídos ( $2830-2700\text{ cm}^{-1}$ ). A região C entre  $1822-1635\text{ cm}^{-1}$  possui pico em  $1712\text{ cm}^{-1}$ , que indica a presença de grupamento carbonila (C=O), que pode estar associada a grupos funcionais como ésteres ( $1750-1670\text{ cm}^{-1}$ ), aldeídos ( $1740-1720\text{ cm}^{-1}$ ), cetonas ( $1770-1700\text{ cm}^{-1}$ ), ácidos carboxílicos ( $1760-1660\text{ cm}^{-1}$ ) ou outros. A região D entre  $1618-1159\text{ cm}^{-1}$  pode conter picos de  $\nu$  C=C de olefinas ( $1680-1630\text{ cm}^{-1}$ ) ou de compostos aromáticos ( $1600-1450\text{ cm}^{-1}$ ), picos de característicos de alguns grupos funcionais como  $\delta$  de N-H no plano,  $\nu$  C-N de amida ( $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ ), fenóis ( $1390-1330$  e  $1260-1180\text{ cm}^{-1}$ ), ésteres ( $1275-1020\text{ cm}^{-1}$ ) e outros.



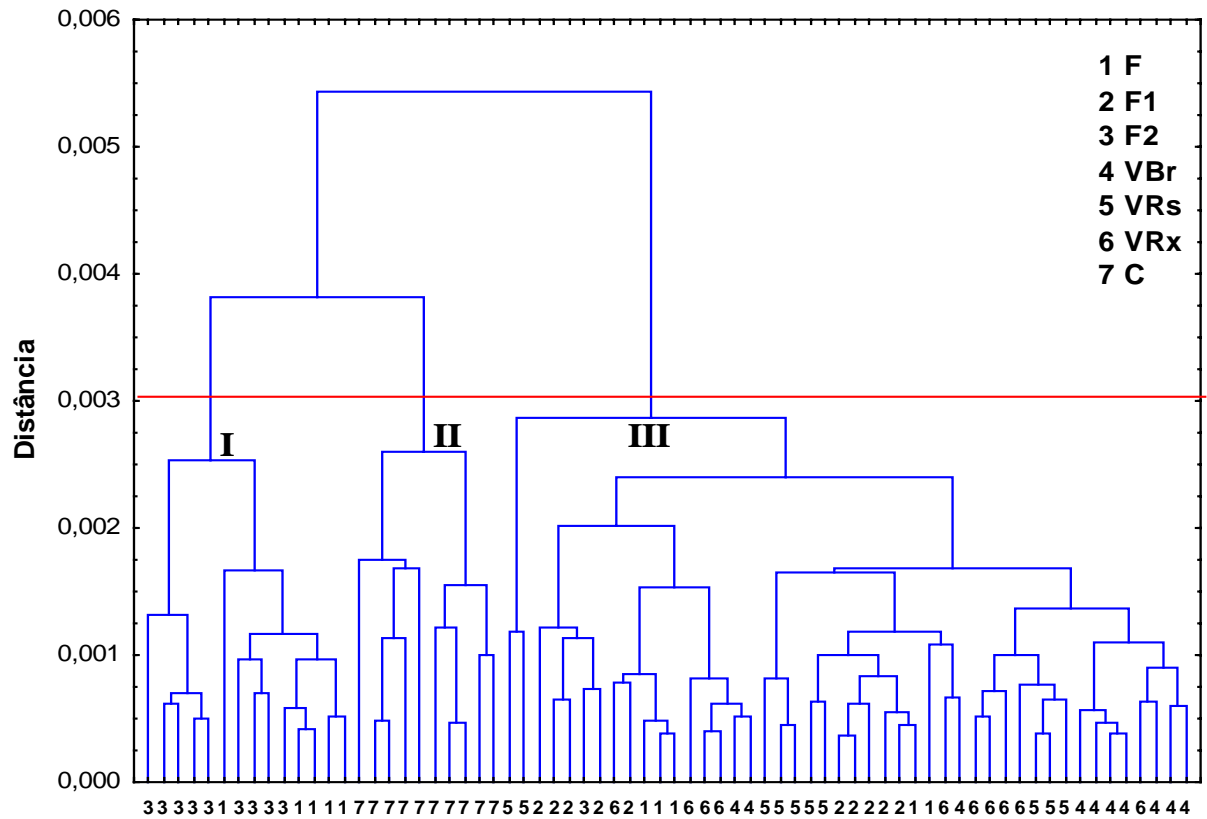
**Figura 49:** Gráfico dos loadings da CP2 com CP3 dos dados espectroscópicos das 70 amostras obtidas na condição otimizada.

A região E está compreendida entre  $1157\text{--}946\text{ cm}^{-1}$ , a região F entre  $945\text{--}788\text{ cm}^{-1}$  e a região G entre  $787\text{--}532\text{ cm}^{-1}$ . Estas três últimas regiões apresentam muitas possibilidades, como por exemplo,  $\nu$  C-O de álcoois ( $1140\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ ),  $\delta$  C-H fora do plano de aromáticos (dependendo da substituição) e olefinas ( $1000\text{--}680\text{ cm}^{-1}$ ).

Na CP2 a única região com valores de loadings positivos é a região F, esta região discrimina os grupos I e II do grupo III. Enquanto que na CP3 a região que separa o grupo II do grupo I é a região A, com máximo em  $3510\text{ cm}^{-1}$ . Na região A na CP2 o pico encontra-se em  $3317\text{ cm}^{-1}$ , e na CP3 em  $3375\text{ cm}^{-1}$ .

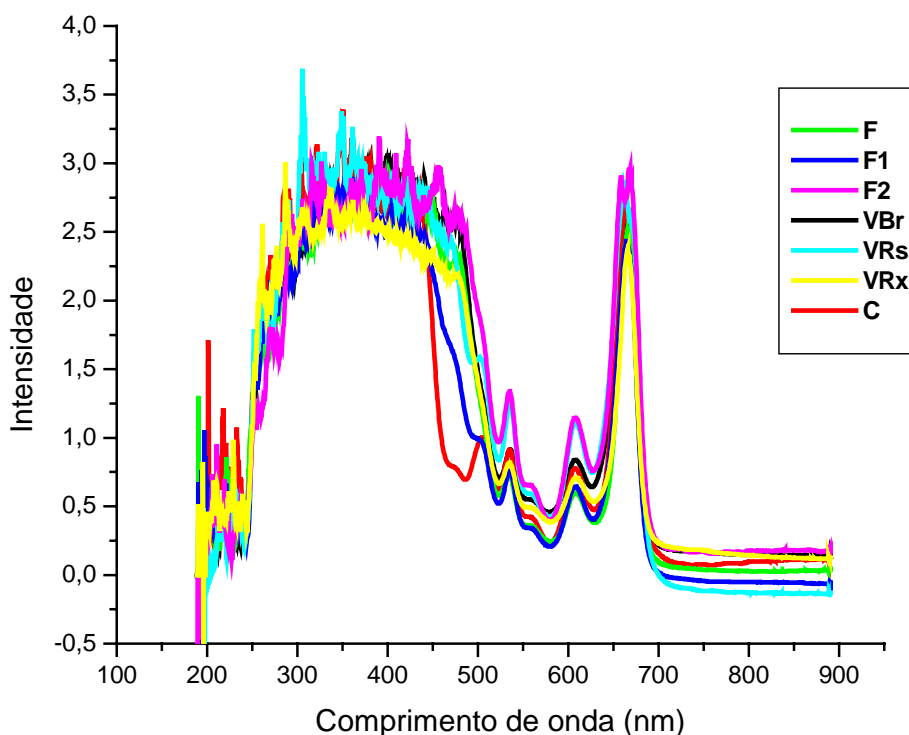
A AH foi aplicada para servir como base de classificação. O dendrograma obtido está apresentado na figura 50. No valor de distância de 0,003 é possível observar os três grupos formados na projeção da CP2 com a CP3 (Fig. 48).

Este resultado também confirma que a *B. candicans* não pode ser sinónimo da *B. forficata*.



**Figura 50:** Dendrograma baseado nos dados obtidos por FTIR para as 7 plantas preparadas na condição otimizada.

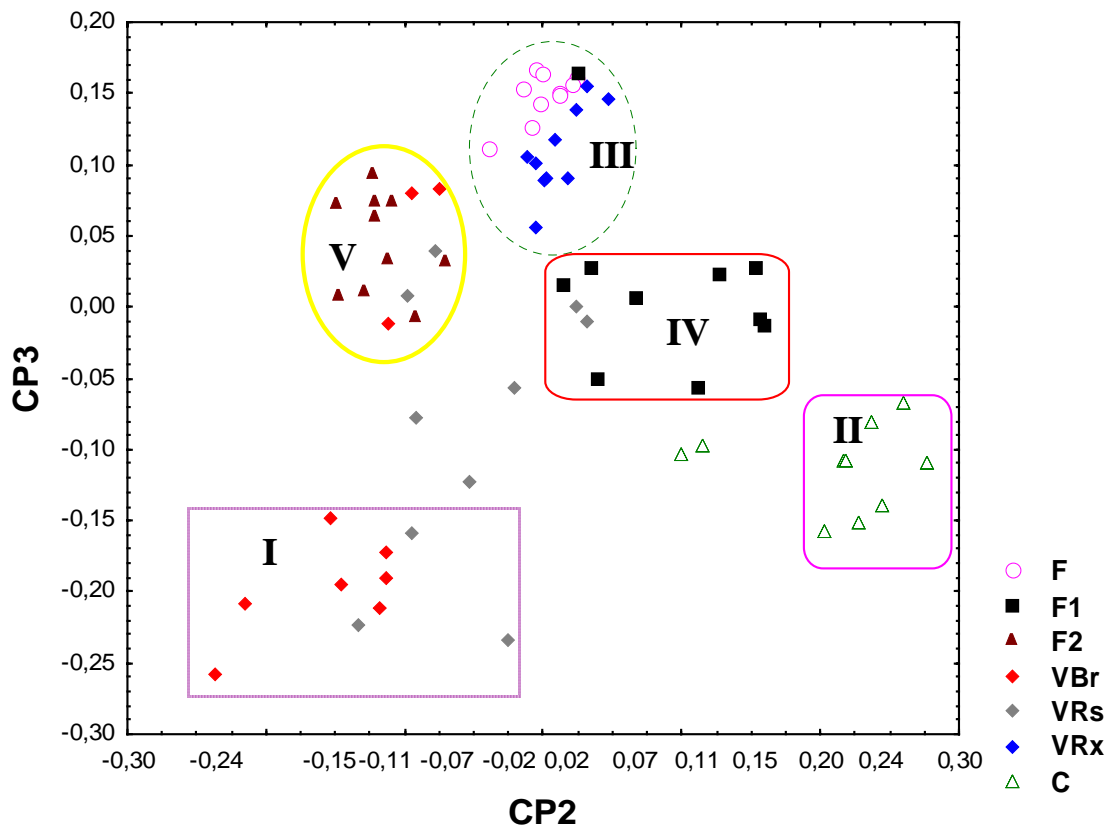
Os 70 extratos obtidos na condição otimizada ainda foram analisados por espectrofotometria no ultravioleta visível. A Figura 51 mostra o espectro de um exemplar de cada uma das 7 plantas pesquisadas.



**Figura 51:** Espectros no ultravioleta visível de um exemplar de cada uma das sete plantas preparadas na condição otimizada.

Os dados dos espectros obtidos na região de 189-891 nm foram dispostos numa matriz formada por 70 amostras e 1300 valores de absorvância. Esses dados foram submetidos a ACP do Tipo Q. Três componentes permitem explicar 99,66% da variância dos dados. A Figura 52 mostra a projeção da componente principal 2 com a componente 3.

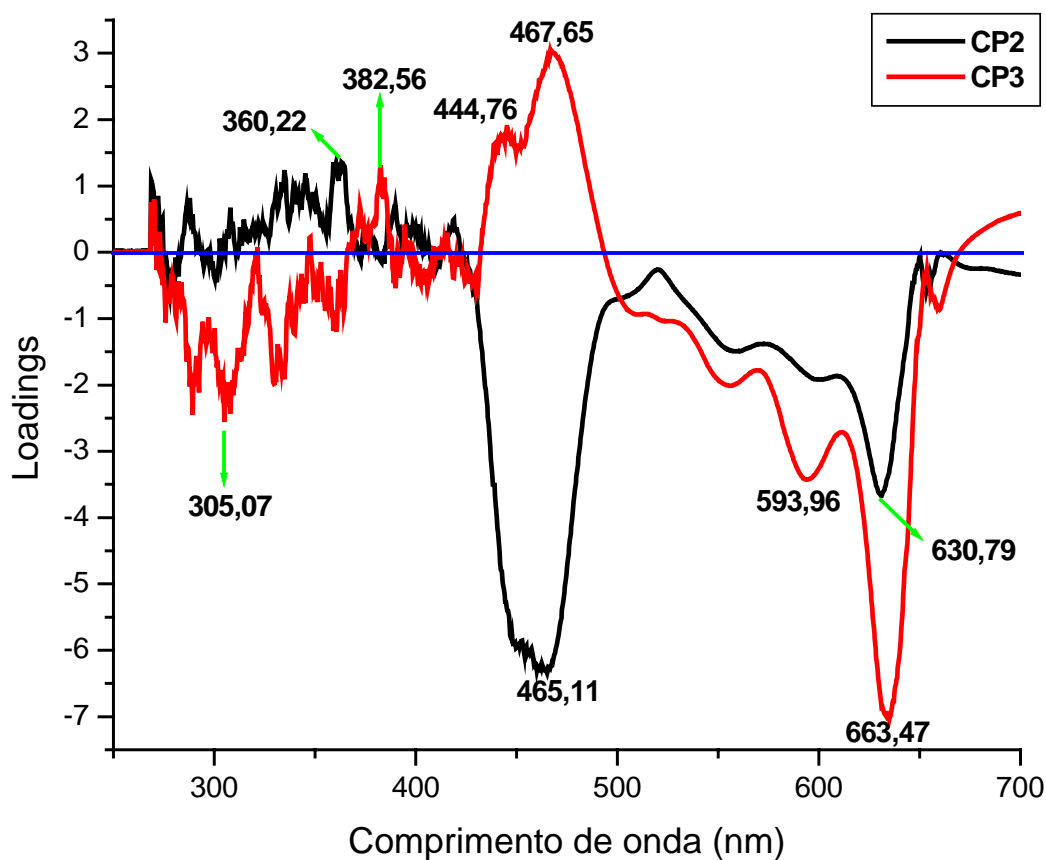
Na figura é possível ver a formação de 5 grupos. O grupo I é formado por amostras de VBr e VRs, o grupo II por amostras de C, o grupo III por amostras de VRx e F, o grupo IV por amostras de F1 e o grupo V por amostras de F2.



**Figura 52:** Gráfico dos escores das componentes principais 2 e 3 dos 70 espectros no ultravioleta visível.

A CP2 separa os grupos I e V, localizados na parte negativa dos grupos II e IV, localizados na parte positiva, enquanto o grupo III encontra-se numa região intermediária. Já a CP3 separa os grupos III e V, localizados na parte positiva, dos grupos I e II, alocados na parte negativa, o grupo IV encontra-se numa região intermediária.

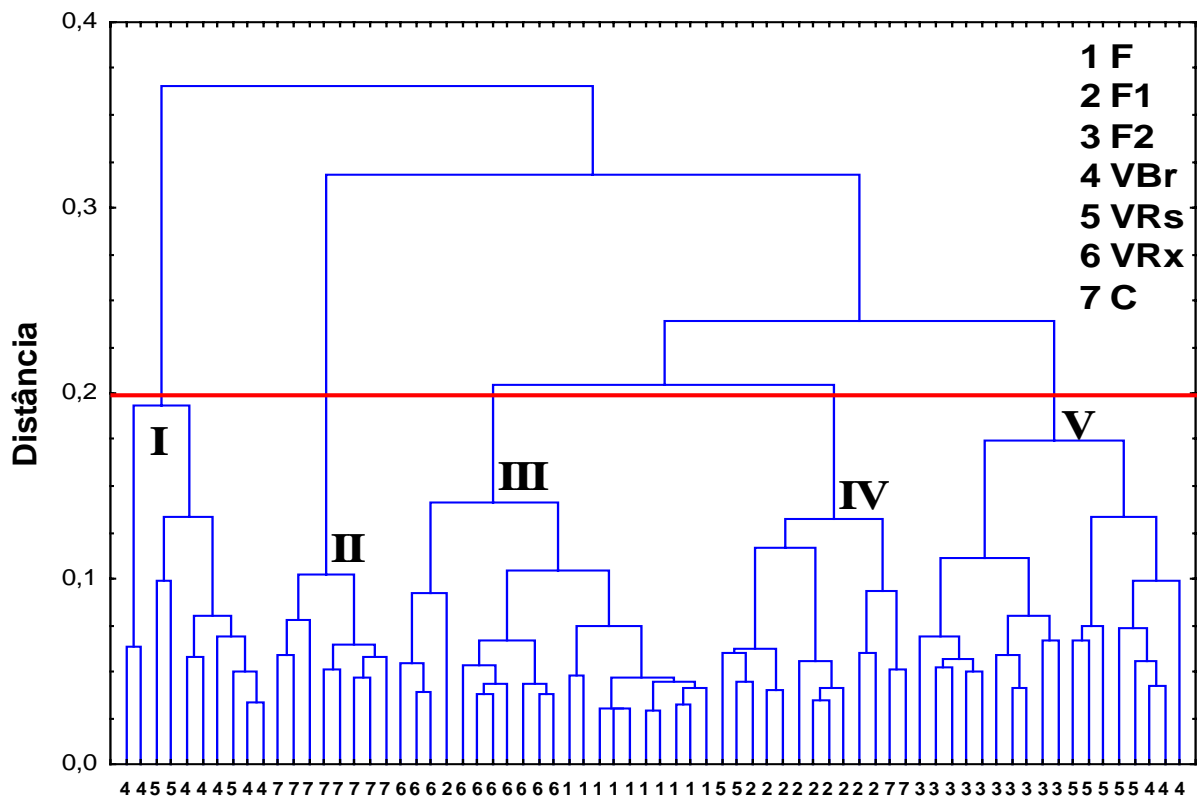
O gráfico dos loadings das componentes principais 2 e 3, Figura 53, mostra quais as variáveis com maior influência na discriminação das amostras.



**Figura 53:** Gráfico dos loadings das componentes principais 2 e 3 dos 70 espectros no ultravioleta visível.

Os valores positivos da CP2 estão localizados comprimento de onda de 300 a 400 nm, e influencia na separação dos grupos II e IV dos outros grupos. Os grupos I e V posicionados na parte negativa da CP2 sofrem maior influência das variáveis com comprimento de onda de 465,11 e 630,79 nm. Já na CP3 as variáveis em 382,56, 444,76 e 467,65 nm exercem maior influência nos grupos III e V, enquanto que os grupos I e II são discriminados devido aos comprimento de onda em 305,07, 593,96 e 663,47 nm.

A AH foi aplicada aos dados de absorvância. O dendrograma obtido está apresentado na Figura 54. No valor de distância de 0,2 é possível observar os cinco grupos formados na projeção da CP2 com a CP3.



**Figura 54:** Dendrograma baseado nos dados dos espectros obtidos no ultravioleta visível para as 7 plantas.

Embora a discriminação não tenha ficado tão clara quanto na CLAE, este resultado também confirma que a composição química da *B. forficata* é diferente da *B. candicans* e que os exemplares de *B. forficata* enviadas para o herbário também são quimicamente diferentes.

Para confirmar estes grupamentos, o SIMCA também foi aplicado, utilizando a matriz 70x1300. Este método foi capaz de classificar as 70 amostras distribuídas em 7 categorias, com uma porcentagem correta de 88,57%. Este resultado pode ser visualizado na tabela 8.

**Tabela 8:** Resultado da classificação das amostras do conjunto de dados espectroscópicos na região UV-Vis, através do SIMCA.

<b>Plantas</b>		<b>n° de amostras</b>	<b>F</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>VBr</b>	<b>VRs</b>	<b>VRx</b>	<b>C</b>
<i>B. forficata Link</i>	<b>F</b>	10	<b>10</b>	-	-	-	-	-	-
<i>B. forficata Link</i>	<b>F1</b>	10	-	<b>9</b>	-	-	-	<b>1</b>	-
<i>B. forficata Link</i>	<b>F2</b>	10	-	-	<b>10</b>	-	-	-	-
<i>B. variegata L.</i>	<b>VBr</b>	10	<b>1</b>	-	<b>2</b>	<b>7</b>	-	-	-
<i>B. variegata L.</i>	<b>VRs</b>	10	-	<b>1</b>	-	<b>1</b>	<b>8</b>	-	-
<i>B. variegata L.</i>	<b>VRx</b>	10	<b>2</b>	-	-	-	-	<b>8</b>	-
<i>B. candicans comercial</i>	<b>C</b>	10	-	-	-	-	-	-	<b>10</b>

As amostras F, F2 e C foram corretamente classificadas, enquanto uma amostra de F1 foi classificada como sendo VRx, duas amostras de VBr foram classificadas como sendo F2 e uma como F, uma amostra de VRs foi classificada como sendo VBr e uma como F1 e duas amostras de VRx foram classificadas como sendo da categoria F.



*Capítulo VI*

## 6 CONCLUSÃO

Mostramos neste trabalho o estudo taxonômico por abordagem metabolômica e métodos quimiométricos para análise e rastreo de plantas do gênero *Bauhinia* por CLAE, FTIR e UV-Vis.

Na primeira etapa do trabalho investigamos os efeitos de três solventes: diclorometano, etanol e acetato de etila no rendimento de extratos obtidos das folhas de duas espécies de *Bauhinia*, a *B. forficata* e *B. candicans*, e a partir deste estudo foi possível concluir que:

O maior rendimento de extrato para a *B. forficata* foi alcançado com uma mistura binária de diclorometano e acetato de etila.

O maior rendimento de extrato para a *B. candicans* foi alcançado com uma mistura de partes iguais de diclorometano, etanol e acetato de etila.

Na segunda etapa com a aplicação dos métodos quimiométricos aos dados cromatográficos foi possível verificar que:

A segunda melhor composição da fase móvel que permitiu obter um bom resultado na separação dos picos por CLAE foi 27% de metanol, 27% de acetonitrila e 46% de água.

A melhor fase móvel para a análise dos extratos foi 15% de metanol, 15% de acetonitrila e 70% de água.

Os extratos da *B. forficata* e *B. candicans* obtidos em etanol puro não são discriminados com base nas substâncias químicas extraídas, sendo assim, o etanol puro não pode ser usado como extrator no rastreamento do perfil metabolômico das duas espécies.

Os extratos da *B. forficata* e *B. candicans* obtidos em diclorometano puro são discriminados pela presença de um pico com intensidade elevada em 1,1 min.

Usando o número de picos como critério de otimização do perfil metabolômico, o solvente que permitiu a extração suficiente de compostos orgânicos para a discriminação das 7 plantas foi uma mistura composta de 36% de diclorometano, 17% de etanol e 47% de acetato de etila.

Na condição otimizada foi possível traçar o perfil metabolômico das espécies sem a necessidade de identificar seus constituintes químicos.

Determinar uma região no cromatograma que foi discriminatória para as espécies de *Bauhinia* estudadas.

A *B. candicans* pode ser discriminada pelo espectro correspondente ao pico com tempo de retenção em 2,36 min..

Os exemplares classificados como *B. forficata* Link e *B. variegata* L. são quimicamente diferentes.

Que a *B. candicans* tida como sinonímia da *B. forficata* não é semelhante à nenhuma das plantas classificadas como *B. forficata*.

Na terceira etapa com a aplicação dos métodos quimiométricos associados à análise por FTIR foi possível:

Traçar o perfil dos diferentes extratos, identificando qualitativamente quatro grupos de composição química diferentes.

Determinar as regiões discriminatórias dos grupos funcionais para discriminar a composição química dos diferentes extratos.

Verificar que o perfil espectral do extrato da *B. candicans* obtido na condição otimizada, apresentou maior diferença quando comparado aos extratos obtidos em diclorometano e etanol puros. Para a *B. forficata* a diferença entre os espectros é mais quantitativa.

Baseado nos grupos funcionais encontrados no perfil espectral da *B. candicans*, foi possível inferir que a mistura composta de 36% de diclorometano, 17% de etanol e 47% de acetato de etila extraiu mais alcalóides derivados de aminoácidos aromáticos.

As amostras puderam ser discriminadas sem a necessidade de etapas de isolamento ou purificação dos extratos.

Os resultados do planejamento de misturas obtidos por FTIR concordaram com aqueles obtidos por CLAE.

Os resultados dos metabólitos secundários encontrados foram coerentes com a literatura.

A análise quimiométrica associada aos espectros obtidos por UV-Vis confirmaram os resultados obtidos por CLAE e FTIR.

Os resultados apontaram para a possibilidade da utilização das técnicas de CLAE, FTIR e UV-Vis juntamente com os métodos quimiométricos no controle de qualidade químico dessas espécies de *Bauhinia* bem como no auxílio da caracterização taxonômica e rastreio de espécies morfológicamente semelhantes.



# *Referências*

## REFERÊNCIAS

Almeida, J. N. D., Negri, G., Salatino A.; **Volatile oils in leaves os *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae)**; *Biochem. Syst. Ecol.*; v.32, p.747-753; 2004.

Beebe, K. R., Pell, R. J., Seasholtz, M. B.; **Chemometrics: a pratical guide**, Editora John Wiley & Sons Ltd, New York, 1998.

Brereton, R. G.; **Chemometrics data analysis for the laboratory and chemical plant**; Editora John Wiley & Sons Ltd, New York, 2003.

Calixto, J. B.; **Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America - A personal view**; *J. of Ethnopharm.*, v.100, p.131–134, 2005.

Chhetri, D. R., Parajuli, P., Subba, G. C.; **Antidiabetic plants used by Sikkim and Darjeeling Himalayan tribes, India**; *J. of Ethnopharm.*, v.99, p.199–202, 2005.

Coenegeracht, P. M. J., Metting, H. J., Smilde, A. K., Coenegeracht-Lamers, P. J. M.; **A chemometric investigation of the selectivity of multisolvent mobile phase systems in RP-HPLC**; *Chromatographia*, v.27, p.135-141, 1989.

Corrêa, A. D., Batista, R. S., Quintas, L. E. M.; **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**; 5<sup>a</sup> ed, editora Vozes Ltda,.Petrópolis, RJ, 1997.

Ellis, D. I., Dunn, W. B., **Metabolomics: current analytical platforms and methodologies**, *Trends in Anal. Chem.*, v.24, p.285-291, 2005.

EllisZhang, J. L., Cui, M., He, Y., Yu, H. L., Guo, D.; **Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC–UV and HPLC–MS methods**; *J. of Pharm. Biomed. Anal.*, v.36, p.1029–1035, 2005

Fuentes, O., Ávila, P. A, Alarcón, J.; **Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits**; *Fitoterapia*, v.75, p. 527-532, 2004.

Gilani, A. H.; Rahmanb, A.; **Trends in ethnopharmacology**; *J. of Ethnopharm.*, v.100, p.43–49, 2005.

Hendriks, M. M. W. B., Juarez, L. C., De Bont, D., Hall, R. D.; **Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts**; *Anal. Chim. Acta*, v.545, p.53-64, 2005.

Heyden, Y. V., Ji, Y. B., Xu, Q. S., Hu, Y. Z.; **Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by HPLC**; *J. of Chromat. A*, v.1066, p.97-104; 2005.

Junior, V. F. V., Pinto, A. C., Maciel, M. A. M.; **Plantas medicinais: cura segura?**, *Química Nova*, v.28, n<sup>o</sup>3, p.519-528, 2005.

Liang, Y. Z., Xie, P., Chan K.; **Quality control of herbal medicines**; *J. of Chromat. B*, v.812, p.53-70, 2004.

Lonni, A. A. S. G.; **Caracterização e identificação química de carquejas do gênero *Baccharis* por métodos quimiométricos**, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

Lopes, W. A., Fascio, M.; **Esquema para interpretação de espectros de substâncias Orgânicas na região do Infravermelho**; *Química Nova*, v.27, n<sup>o</sup>4, p.670-673, 2004.

Lough, W. J., Wainr, I. W.; **High performance liquid chromatography**; Editora: Blackie Academic & Professional, London, 1995.

Massart, D. L., Stanimirova, I., Walczak, B., Simeonov, V.; **A comparison between two robust PCA algorithms**; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, v.71, p.83-95, 2004.

Massart, D., L., Vandeginste, B. G. M., Deming, S. N., Michotti, Y., Kaufman, L.; **Chemometrics: a textbook**, Editora Elsevier, Amsterdam, 1988.

Mok, D. K. W., Chau, F.T.; **Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist**; *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, aceite em 26 de maio de 2005 e disponível on-line desde 21 de setembro de 2005.

Mujica, G. F., Motta, N., Márquez, A. H., Zulueta, J. C; **Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles**; *Fitoterapia* v.74,p.84-90, 2003.

Neto, B. B., Bruns, R. E., Scarminio, I. S.; **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**; 2<sup>a</sup> ed, p.313-319, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.

Neto, J. M. M., Moita, G. C.; **Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados**; *Química Nova*, v.21, n° 4, p.467-469, 1998.

Poppi, R. J., Andrade, J. C., Cerqueira, E. O., Mello, C., **Redes neurais e suas aplicações em calibração multivariada**; *Química Nova*, v.24, n° 6, p.864-873, 2001.

Poppi, R. J., **Calibração multivariada em química analítica**, página acessada em dezembro de 2004; <http://laqqa.iqm.unicamp.br/resumolivreRonei.htm>

Reyment, R, Jöreskog, K. G., **Applied factor analysis in the natural sciences**, Editora, Cambridge University Press, Cambridge,UK, 1996.

Scarminio, I. S., Bruns, R. E.; **An Adaptation of ARTHUR for Microcomputers**; *Trends in Anal. Chem.*, v.8, p.8-9, 1989.

Scarminio, I. S., Ishikawa, D. N., Barreto, W. J., Paczkowski, E. L., Arruda, I. C.; **Calibração multivariada para sistemas com bandas sobrepostas através da análise de fatores do Tipo Q**; *Química Nova*, v.21, n° 5, p.590-596, 1998.

Sena M. M., Poppi, R. J., Frighetto, R. T. S., Valarini, P. J., **Avaliação do uso de métodos quimiométricos de análise de solos**, *Química Nova*, v.23, n° 4, p.547-556, 2000.

Silva, F. R. M. B., Szpoganicz, B., Pizzolatti, G., Willrich, M. A. V., Sousa, E.; **Acute effect of bauhinia forficata on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats**; *J. of Ethnopharm.*, v.83, p.33-37, 2002.

Silva, K. L., Filho, V. C.; **Plantas do gênero bauhinia: composição química e potencial farmacológico**; *Química Nova*, v.25, n° 3, p.449-454, 2002.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L.; **Practical HPLC method development**; 2 ed.; Editora John Wiley & Sons Inc, New York, 1997.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J.; **Introduction to modern liquid chromatography**; 2 ed.; Editora John Wiley & Sons Inc, New York, 1979.

Su, W., Peng, W., Mab, Y.; **Fingerprint quality control of Tianjihuang by HPLC–photodiode array detection**; *J. of Chromat. A*, v.1070, p.35–42, 2005.

Vasconcelos, F., Sampaio, S. V., garófalo, M. A. R., Guimarães, L. F. L., Giglio, J. R., Arantes, E. C.; **Insulin-like effects of Bauhinia forficata aqueous extract upon Tityus serrulatus scorpion envenoming**; *J. of Ethnopharm.*, v.95, p.385-392, 2004.

Vuksan, V., Sievenpiper, J. L.; **Herbal remedies in the management of diabetes: Lessons learned from the study of ginseng Nutrition**; *Metab. & Cardio. Diseases*, v.15, p.149-160, 2005.

Yan, S. K., Xin, W. F., Luo, G. A., Wang, Y. M., Cheng, Y. Y.; **An approach to develop 2D fingerprint for the quality control of Qingkailing injection by high-performance liquid chromatography with diode array detection**; *J. of Chromat. A*, v.1090, p.90-97, 2005.

Zhao, L., Huang, C., Shan, Z., Xiang, B., Mei, L.; **Fingerprint analysis of Psoralea corylifolia L. by HPLC and LC–MS**; *J. of Chromat. B*, v.821, p.67–74, 2005.

Zhou, Q., Sun, S. Q., Zuo, L.; **Study on traditional Chinese Medicine “Qing Kai Ling” injections from different manufactures by 2D IR correlation spectroscopy**; *Vibrational Spectroscopy*, v.36, p.207-212, 2004.