

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E  
QUIMIOMÉTRICAS NO ESTUDO DO CONTROLE DE  
QUALIDADE DAS DROGAS VEGETAIS: EMBAÚBA,  
MALVA E GINSENG BRASILEIRO”**

**Katyúscya Veloso Leão\***

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de  
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira**

**\* bolsista CNPQ**

**São Carlos - SP  
2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

L437at

Leão, Katyúscya Veloso.

Aplicação das técnicas espectroscópicas e quimiométricas no estudo do controle de qualidade das drogas vegetais : embaúba, malva e ginseng brasileiro / Katyúscya Veloso Leão. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 123 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Química orgânica. 2. Ressonância magnética nuclear. 3. Quimiometria. 4. Controle de qualidade. 5. Drogas vegetais. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

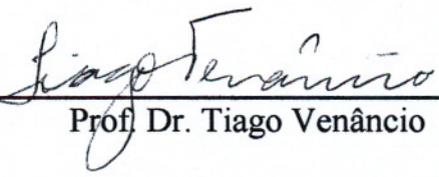
---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Katyúscya Veloso Leão**, realizada em 14 de maio de 2010:*



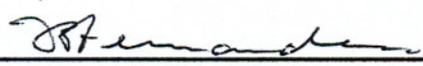
---

Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



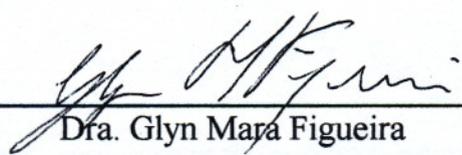
---

Prof. Dr. Tiago Venâncio



---

Prof. Dr. João Batista Fernandes



---

Dra. Glyn Mara Figueira



---

Profa. Dra. Marcia Miguel Castro Ferreira

*Dedico este trabalho...*

*aos meus pais , Marina e Jair, pelo apoio e incentivo incondicional,*

*ao meu irmão Jair Junior e aos meus avós(in memoriam), Maria e José.*

## NÃO SEI...

Não sei... se a vida é curta...

Não sei...

Não sei...

se a vida é curta  
ou longa demais para nós.

Mas sei que nada do que vivemos  
tem sentido,  
se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:  
colo que acolhe,  
braço que envolve,  
palavra que conforta,  
silêncio que respeita,  
alegria que contagia,  
lágrima que corre,  
olhar que sacia,  
amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo:  
é o que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela  
não seja nem curta,  
nem longa demais,  
mas que seja intensa,  
verdadeira e pura...  
enquanto durar.

Cora Coralina

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar a vida, a saúde, a fé e a força. Por me acompanhar em cada instante nesse caminho.

Ao professor Antonio Gilberto Ferreira, pela orientação, pelos ensinamentos e pela amizade construída ao longo destes anos. Contribuindo de maneira singular para meu crescimento pessoal e para minha formação acadêmica.

Aos amigos do laboratório, Glaucia, Cristina, Leila, Maiara, Elisangela, Eduardo, João, Francisco, Luciana, Paulo, Claudimar e Luiz, pela paciência, companheirismo e incentivo.

A Paolla, pela a convivência diária, os sorrisos e as lágrimas e acima de tudo por ter se tornado minha irmã de coração.

Aos meus amigos e irmãos científicos, Renata, Fernando, Tatiane, Eduardo, Osmair.

A professora Glyn Mara Figueira, pelo fornecimento das amostras utilizadas como padrão neste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AQ</b>	Tempo de aquisição
<b>B<sub>0</sub></b>	Campo magnético estático de um espectrômetro
<b>B<sub>loc</sub></b>	Campo magnético experimentado por um determinado núcleo
<b>CPMG</b>	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
<b>CPQBA</b>	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
<b>d1</b>	Tempo de espera antes de cada aquisição
<b>d8</b>	<i>Mixing time</i>
<b>d20</b>	Tempo de intervalo de eco
<b>gCOSY</b>	<i>gradient- Correlation Spectroscopy</i>
<b>gHMBC</b>	<i>gradient- Heteronuclear Multiple Bonds Correlations</i>
<b>gHSQC</b>	<i>gradient –Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>HCA</b>	<i>Hierarchical Clusters Analysis</i>
<b>HRMAS</b>	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>lb</b>	Multiplicação exponencial aplicada no FID para que seja aumentada a relação sinal/ruído do espectro ( <i>Line Broadening</i> )
<b>MAS</b>	<i>Magic Angle Spinning</i>
<b>NS</b>	Número de varreduras ( <i>Number scans</i> )
<b>PC</b>	<i>Principal component</i>
<b>PCA</b>	<i>Principal component Analysis</i>
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>SI</b>	Número de pontos utilizados no processamento do espectro
<b>SWH</b>	Janela espectral em <i>Hertz</i>
<b>T<sub>1</sub></b>	Tempo de relaxação spin-rede (longitudinal)
<b>T<sub>2</sub></b>	Tempo de relaxação spin-spin (transversal)
<b>TD</b>	Número de pontos utilizados na aquisição do espectro ( <i>Time Domain</i> )
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TMSP-d<sub>4</sub></b>	3-trimetilsilil-2,2,3,3-d <sub>4</sub> -propionato de sódio
<b>δ</b>	Deslocamento químico

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Evolução das vendas em reais do mercado farmacêutico no período de 2003 a 2006.....	3
TABELA 3.1.1 - Amostras padrão e comerciais de embaúba, com local de aquisição e código.....	29
TABELA 3.1.2 - Amostras padrão e comerciais de ginseng brasileiro, com local de aquisição e código.....	29
TABELA 3.1.3 - Amostras padrão e comerciais de malva, com local de aquisição e código.....	30
TABELA 4.1 - Dados de RMN para os açúcares encontrados nas duas espécies de embaúba utilizadas como padrão - <i>Cecropia pachistachia</i> e <i>Cecropia Glaziovii</i> .....	45
TABELA 4.2 - Metabólitos primários e seus respectivos sinais observados nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	47
TABELA 4.3 - Dados de RMN para o composto ácido cafeoilquínico encontrado no extrato aquoso das duas espécies de embaúba utilizadas como padrão - <i>Cecropia pachistachia</i> e <i>Cecropia Glaziovii</i> .....	50
TABELA 4.4 – Dados de RMN para os açúcares encontrados na espécie de <i>Sida cordifolia</i> .....	92
TABELA 4.5 - Dados de RMN para a substância malvona A encontrada no extrato aquoso da espécie <i>Malva silvestris</i> .....	96
TABELA 4.6 - Dados de RMN para a substância efedrina encontrada no extrato aquoso da espécie <i>Sida cordifolia</i> .....	98

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Gráfico representa a porcentagem de empresas detentoras de registro de fitoterápicos por regiões.....	4
FIGURA 1.2 - Foto da espécie vegetal embaúba.....	6
FIGURA 1.3 - Principais compostos isolados das espécies de <i>C. Pachistachia</i> . ....	7
FIGURA 1.4 - Principais compostos isolados das espécies de <i>C. glaziovii</i> .....	8
FIGURA 1.5 - Fotos das espécies vegetais a: <i>Panax Ginseng</i> e b: <i>Pfaffia glomerata</i> .....	9
FIGURA 1.6 - Espécie a) <i>P. glomerata</i> e b) <i>P. paniculata</i> .....	10
FIGURA 1.7 - Saponinas isoladas da espécie <i>P. paniculata</i> : ácido páfico (1), pfafosídeos A (2), B (3), C (4), D(5), E (6) e F (7).....	11
FIGURA 1.8 - Principais compostos isolados da espécie <i>P. glomerata</i> .....	12
FIGURA 1.9 - Espécie a) <i>Malva silvestris</i> e b) <i>Sida cordifolia</i> .....	13
FIGURA 1.10 - Principais compostos isolados da espécie <i>Malva silvestris</i> .....	14
FIGURA 1.11 - Principais compostos isolados da espécie <i>Sida Cordifolia</i> .....	15
FIGURA 1.12 - Esquema ilustrativo do giro do rotor no ângulo mágico (sonda HR-MAS).....	17
FIGURA 1.13 - Ilustração da seqüência de pulsos CPMG empregada na análise de RMN HR-MAS <sup>1</sup> H.....	19
FIGURA 1.14 - Ilustração da seqüência de pulsos CPMG com pré-saturação empregada na análise de RMN HR-MAS de <sup>1</sup> H. ....	20
FIGURA 1.15 - Ilustração da seqüência de pulsos noesypr1d, empregada para a supressão do sinal referente ao hidrogênio da água.....	20

FIGURA 1.16 - Esquema ilustrativo do tratamento quimiométrico aplicado aos dados de RMN de $^1\text{H}$ .....	23
FIGURA 3.1 - Esquema ilustrativo do empacotamento das amostras para a aquisição dos espectros de RMN $^1\text{H}$ por HRMAS...	31
FIGURA 4.1 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução aquosa sem supressão, seqüência zg, e com supressão utilizando a seqüência de pulso zgcprr e a noesypr1d.....	39
FIGURA 4.2 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução aquosa das espécies A- <i>Cecropia glaziovii</i> e B- <i>Cecropia pachistachia</i> .....	40
FIGURA 4.3 - Metabólitos primários presentes no extrato aquoso das duas espécies de embaúba.....	42
FIGURA 4.4 - Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no experimento de gHSQC da espécie <i>Cecropia pachistachia</i> - destacando a complexidade da região referente aos sinais de açúcares.	43
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do extrato aquoso da amostra da espécie <i>C. pachistachia</i> .....	43
FIGURA 4.6 - Ampliação da região $\delta$ 93,4 a 107,6 do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do extrato aquoso da amostra da espécie <i>C. pachistachia</i> , em destaque os sinais referente aos carbonos anoméricos da sacarose, $\alpha$ -glucose e $\beta$ -glucose.....	44
FIGURA 4.7 - Ampliação da região $\delta$ 62,1 a 88,3 do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do extrato aquoso da amostra da espécie <i>C. pachistachia</i> .....	44
FIGURA 4.8 - Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no experimento de gHSQC da espécie <i>Cecropia pachistachia</i> - destacando as correlações observadas para os aminoácidos.....	46
FIGURA 4.9 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ com as atribuições do ácido cafeoilquínico.....	48

FIGURA 4.10 - Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas no experimento de gHSQC do extrato aquoso da espécie <i>C. glaziovii</i> , evidenciando os sinais do ácido cafeoilquínico.....	49
FIGURA 4.11 - Correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas no experimento de gHMBC do extrato aquoso da espécie <i>C. glaziovii</i> evidenciando os sinais do ácido cafeoilquínico.....	49
FIGURA 4.12 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução para amostras de <i>C. pachistachia</i> coletadas nos períodos de chuva (A) e estiagem (B).....	51
FIGURA 4.13 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução para amostras de <i>C. glaziovii</i> coletadas nos períodos de chuva (A) e estiagem (B).....	52
FIGURA 4.14 - Visualização dos gráficos de linhas dos dados RMN de $^1\text{H}$ em solução após as exclusões necessárias.....	53
FIGURA 4.15 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução de todas as amostras de embaúba.....	54
FIGURA 4.16 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução das amostras de embaúba, após a exclusão da amostra E1.....	55
FIGURA 4.17 - Gráfico de linhas e gráfico de <i>loadings</i> com as regiões em valores negativos em PC1 sombreados, e em destaque os sinais em $\delta$ 2,31(t) e 3,02(t) do ácido 4-aminobutanóico.....	56
FIGURA 4.18 - Dendrograma dos dados de RMN de $^1\text{H}$ em solução de todas as amostras de embaúba.....	57
FIGURA 4.19 - Espectros de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ para amostras padrão de embaúba; A e B - <i>C. pachistachia</i> e C e D - <i>C. glaziovii</i> , períodos chuvoso e seco respectivamente.....	58
FIGURA 4.20 - Visualização dos gráficos de linhas dos dados RMN HRMAS de $^1\text{H}$ das amostras intactas de embaúba após as exclusões necessárias.....	60

FIGURA 4.21 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ de todas as amostras de embaúba.....	61
FIGURA 4.22 - Ampliação do gráfico de linhas dos dados de RMN HRMAS $^1\text{H}$ , mostrando a ausência do sinal em $\delta$ 5,4. As linhas em vermelho referem-se amostras de <i>C. glaziovii</i> e em preto, as amostras de <i>C. pachistachia</i> .....	61
FIGURA 4.23 - Gráfico de linhas e gráfico de <i>loadings</i> PC1 x PC2, destacando a região responsável pela discriminação por PC1.....	62
FIGURA 4.24 - Dendrograma dos dados de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ de todas as amostras de embaúba.....	63
FIGURA 4.25 - Visualização dos espectros de IV das amostras padrão e comercial de embaúba.....	64
FIGURA 4.26 - Gráfico de linhas dos dados de IV das amostras padrão e comercial de embaúba, com as regiões excluídas em destaque.....	65
FIGURA 4.27 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de IV de todas as amostras de embaúba.....	66
FIGURA 4.28 - Gráfico de <i>loadings</i> dos dados de IV, destacando as variáveis de maior peso para a discriminação da amostra E1.....	67
FIGURA 4.29 - Dendrograma dos dados de IV de todas as amostras de embaúba.....	67
FIGURA 4.30 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução aquosa das espécies A - <i>Pffafia glomerata</i> e B - <i>Pffafia.paniculata</i> .....	70
FIGURA 4.31 - Ampliação de $\delta$ 0,67 a 3,13 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato aquoso da espécie <i>P. Paniculata</i> .....	72
FIGURA 4.32 - Ampliação de $\delta$ 4,46 a 5,51 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato aquoso da espécie <i>P. Paniculata</i> .....	72
FIGURA 4.33 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do extrato aquoso da espécie <i>P. Paniculata</i> , em destaque ampliações das regiões de açúcares, $\delta$ 94 a 108 e $\delta$ 62 a 84.....	73

FIGURA 4.34 – Visualização dos gráficos de linhas dos dados RMN de $^1\text{H}$ em solução após as exclusões necessárias.....	74
FIGURA 4.35 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução de todas as amostras de ginseng brasileiro.....	75
FIGURA 4.36 - Ampliação de $\delta$ 0,6 a 4,5 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução das amostras G6, G2 e da amostra padrão <i>P. paniculata</i> (GPP).....	76
FIGURA 4.37 - Dendrograma dos dados de RMN de $^1\text{H}$ em solução das amostras de ginseng brasileiro.....	77
FIGURA 4.38 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ HRMAS para amostras padrão de ginseng brasileiro, A - <i>Pffafia paniculata</i> e B - <i>Pffafia glomerata</i> .....	78
FIGURA 4.39 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ de todas as amostras de ginseng brasileiro.....	79
FIGURA 4.40 – Dendrograma dos dados de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ das amostras de ginseng brasileiro.....	80
FIGURA 4.41 – Visualização de todos os espectros de IV das amostras padrão e comercial de ginseng brasileiro.....	81
FIGURA 4.42 – Destaque para as regiões excluídas dos espectros de IV obtidos para as amostras de ginseng brasileiro.....	82
FIGURA 4.43 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de IV de todas as amostras de ginseng brasileiro.....	83
FIGURA 4.44 - Gráfico de escores PC2 x PC3 dos espectros de IV de todas as amostras de ginseng brasileiro.....	83
FIGURA 4.45 - Gráfico de <i>loadings</i> PC2 x PC3 dos dados de IV, destacando as variáveis de maior peso para a discriminação das amostras G2 e G6, ou seja, as variáveis com valores positivos de PC2.....	84

FIGURA 4.46 - Gráfico de <i>loadings</i> PC1 x PC2 dos dados de IV, destacando as variáveis de maior peso para a discriminação das amostras G9 e G10 e G11, ou seja, as variáveis com valores negativos em PC1 e PC2.....	84
FIGURA 4.47 - Dendrograma dos dados de IV das amostras de ginseng brasileiro.....	85
FIGURA 4.48 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução aquosa das espécies, A- <i>Malva silvestris</i> e B- <i>Sida cordifolia</i> .....	88
FIGURA 4.49 - Ampliação de $\delta$ 0,6 a 3.1 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução aquosa das espécies A- <i>Sida cordifolia</i> e B - <i>Malva silvestris</i> , destacando os aminoácidos comuns as duas espécies: 1 – Valina, 2 – Treonina, 3 – Alanina.....	89
FIGURA 4.50 - Ampliação de $\delta$ 2,2 a 5,5 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ em solução aquosa da espécie <i>Sida cordifolia</i> .....	90
FIGURA 4.51 - Correlações heteronucleares $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no experimento de <i>g</i> HSQC dos aminoácidos presentes na amostra da espécie <i>Sida cordifolia</i> em solução.....	91
FIGURA 4.52 - Correlações heteronucleares $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no experimento de <i>g</i> HSQC dos aminoácidos presentes na amostra da espécie <i>Malva silvestris</i> em solução.....	91
FIGURA 4.53 - Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ dos açúcares observadas no experimento de <i>g</i> HSQC na amostra da espécie <i>Sida cordifolia</i> em solução.....	93
FIGURA 4.54 - Estrutura das substâncias A- malvona A e B – efedrina.	93
FIGURA 4.55- Ampliação de $\delta$ 6,70 a 7,90 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato aquoso da espécie <i>Malva silvestris</i> .....	94
FIGURA 4.56 - Ampliação de $\delta$ 2,20 a 4,60 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato aquoso da espécie <i>Malva silvestris</i> .....	94
FIGURA 4.57 - Ampliação de $\delta$ 147,7 a 183,3 do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do extrato aquoso da espécie <i>Malva silvestris</i> .....	95
FIGURA 4.58 Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no experimento de <i>g</i> HMBC do extrato aquoso da espécie <i>Malva silvestris</i> , evidenciando as correlações da malvona A.....	95

FIGURA 4.59 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato aquoso da espécie <i>Malva silvestris</i> - em destaque a ampliação das regiões $\delta$ 6,70 a 7,30 e $\delta$ 0,80 a 3,10.....	97
FIGURA 4.60 - Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no experimento de <i>g</i> HMBC do extrato aquoso da espécie <i>Sida cordifolia</i> , evidenciando as correlações da efedrina.....	98
FIGURA 4.61 - Visualização dos gráficos de linhas dos dados RMN de $^1\text{H}$ em solução após as exclusões necessárias.....	99
FIGURA 4.62 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução das amostras de “malva”.....	100
FIGURA 4.63 - Dendrograma dos dados de RMN de $^1\text{H}$ em solução das amostras de “malva”.....	101
FIGURA 4.64 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução das amostras de “malva”, após a exclusão das amostras M1, M5 e M6.....	102
FIGURA 4.65 - Gráfico de <i>loadings</i> PC1 x PC2 dos dados de RMN de $^1\text{H}$ em solução para amostras de malva, destacando as variáveis com maior peso para a discriminação em valores negativos PC1.....	103
FIGURA 4.66 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução da amostra M7 e da amostra padrão <i>M. silvestris</i> .....	103
FIGURA 4.67 - Dendrograma dos dados de RMN de $^1\text{H}$ em solução das amostras de “malva”, após a exclusão das amostras M1, M5 e M6.....	104
FIGURA 4.68 - Espectros de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ para amostras padrão de “malva”; A – <i>Sida cordifolia</i> e B- <i>Malva silvestris</i> .....	105
FIGURA 4.69 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ de todas as amostras de “malva”.....	106
FIGURA 4.70 - Dendrograma dos dados de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ das amostras de “malva”.....	107

FIGURA 4.71 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ em solução das amostras de “malva”, após a exclusão das amostras M1, M5 e M6.....	108
FIGURA 4.72 - Dendograma dos dados de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ das amostras de “malva, após a exclusão das amostras M1, M5 e M6.....	108
FIGURA 4.73 - Espectros de IV das amostras padrão <i>Malva silvestris</i> e <i>Sida cordifolia</i> .....	109
FIGURA 4.74 - Gráfico de linhas dos dados de IV de todas as amostras de “malva” após a exclusão das regiões de $\nu^{\text{cm}^{-1}}$ 4000 a 3001 e $\nu^{\text{cm}^{-1}}$ 2827 a 1747.....	110
FIGURA 4.75 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de IV de todas as amostras de “malva.....	111
FIGURA 4.76 – Dendrograma dos dados de IV das amostras de “malva”.....	112
FIGURA 4.77 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de IV de todas as amostras de “malva”, após a exclusão das amostras M5 e M6 .....	113

## Resumo

### APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E QUIMIOMÉTRICAS NO CONTROLE DE QUALIDADE DAS DROGAS VEGETAIS: EMBAÚBA, MALVA E GINSENG BRASILEIRO

Nos últimos anos a fitoterapia tem ressurgido como uma forma medicamentosa bem aceita e acessível, causando o aumento na demanda por medicamentos a base de plantas, por todo o mundo. Tornando-se um atrativo para a indústria farmacêutica, conseqüentemente os investimentos em controle de qualidade passaram a ser de fundamental importância, a fim de garantir segurança e eficácia dos produtos. Entre as várias drogas vegetais disponíveis no mercado, o presente trabalho, avaliou amostras comerciais de embaúba, ginseng brasileiro e malva, empregando as técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  em solução, RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  e IV aliadas a métodos quimiométricos. Para as amostras de embaúba, observou-se através das análises quimiométricas dos dados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  em solução e IV, que a maioria das amostras comerciais se agrupou com a espécie *Cecropia glaziovii*. Por RMN  $^1\text{H}$  em solução, experimentos 2D e comparação com dados da literatura foi possível a identificação da sacarose,  $\alpha$ -glucose e  $\beta$ -glucose,  $\beta$ -frutofuranose e  $\beta$ -frutopiranosose, valina, alanina, treonina, ácido 4-aminobutanóico, glutamina e do ácido cafeoilquínico. Para as amostras comerciais de ginseng brasileiro observou-se que pelas três técnicas empregadas, a maioria das amostras comerciais se agruparam com a espécie *Pfaffia glomerata* e por RMN em solução foi possível a identificação valina, alanina treonina, o ácido 4-aminobutanóico e os açúcares: sacarose,  $\beta$ -glucose e  $\alpha$ -glucose. Para as amostras comerciais de malva, observou-se a existência de duas amostras adulteradas e o agrupamento da maioria das amostras comerciais com a espécie *Sida cordifolia*. Por RMN em solução foi possível identificar a valina, treonina, alanina, sacarose,  $\alpha$ -glucose e  $\beta$ -glucose, o 4-aminobutanóico e a efedrina na espécie *Sida cordifolia* e na espécie *Malva silvestris* identificou-se a valina, treonina, alanina e a malvona A. Contudo cabe ressaltar que as técnicas de RMN aliada a quimiometria mostraram-se mais eficientes do que a técnica de IV, apresentando um grande potencial para o controle de qualidade, possibilitando avaliar perfil químico de um extrato vegetal como um todo, evidenciando os compostos com maior contribuição para a discriminação de espécies bem como a indicação de um marcador químico.

## Abstract

APPLICATION OF SPECTROSCOPIC AND CHEMOMETRIC TECHNIQUES IN THE QUALITY CONTROL OF HERBAL DRUGS: EMBAÚBA, MALVA AND BRAZILIAN GINSENG.

In the last few years the phytotherapy has emerged as a drug form well accepted and accessible, causing the increase in demand for drugs based on plants throughout the world, becoming an attraction for the pharmaceutical industry. Therefore the investment in quality control have become of extreme importance to ensure safety and efficacy of products. Among many herbal drugs available on the market, this study evaluated commercial samples of embaúba, Brazilian ginseng and mallow, using NMR spectroscopic techniques,  $^1\text{H}$  NMR in solution, HRMAS  $^1\text{H}$  and IR allied to chemometric methods. For commercial samples of embaúba, observed by chemometric analysis of data obtained by  $^1\text{H}$  NMR in solution and IR, most commercial samples were grouped with the species *Cecropia glaziovii*. By  $^1\text{H}$  NMR in solution and 2D experiments and comparisons with literature data, it was possible the identification of  $\alpha$ -glucose e  $\beta$ -glucose,  $\beta$ -frutofuranose and  $\beta$ -frutopyranose, valine, alanine, threonina, 4-aminobutanoic acid, glutamine and caffeoylquinic acid. For commercial samples of Brazilian ginseng, analyzed by the three techniques, it was observed that most commercial samples were grouped with the species *Pfaffia glomerata* and by  $^1\text{H}$  NMR in solution it was possible to identify valine, alanine, threonine and 4-aminobutanoic acid and the sugars: sucrose,  $\beta$ -glucose e  $\alpha$ -glucose. For commercial samples of mallow two adulterated samples were detected and grouping of most commercial samples with specie *Sida cordifolia*. By NMR in solution it was possible to identify valine, threonine, alanine, sucrose,  $\alpha$ -glucose and  $\beta$ -glucose, 4-aminobutanoic acid and the ephedrine compound in the aqueous extract of specie *Sida cordifolia* and in aqueous extract the of specie *Malva silvestris* valine, threonine, alanine and the malvone A compound were identified. It was found that NMR techniques combined with chemometrics where more efficient than infrared, demonstrating a great potential for quality control, enabling the evaluation of the chemical profile of a extract vegetable as a whole and highlighting the compounds with a greater contribution to the discrimination of species and the indication of a chemical marker.

## Sumário

1- Introdução.....	1
1.1– Plantas medicinais.....	1
1.2 – Drogas vegetais utilizadas.....	6
1.2.1 - Embaúba.....	6
1.2.2 - Ginseng brasileiro.....	9
1.2.3 - Malva.....	12
1.3 – Técnicas espectroscópicas.....	15
1.3.1 - Ressonância Magnética Nuclear.....	16
1.3.1.1 - HR-MAS ( <i>High Resolution – Magic Angle Spinning</i> ).....	17
1.3.1.2- Seqüência CPMG com supressão do sinal da água.....	20
1.3.1.3- Seqüência noesypr1d.....	20
1.3.2 – Infravermelho.....	21
1.4 – Quimiometria.....	22
1.4.1- Análises exploratórias.....	23
2- Objetivos.....	25
3- Materiais e Métodos.....	27
3.1 - Drogas vegetais.....	28
3.2 - Preparo das amostras para RMN.....	30
3.2.1 - Amostras para análise de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos aquosos.....	30
3.2.2 - Amostras para medidas RMN de <sup>13</sup> C e experimentos bidimensionais.....	31
3.2.3 - Amostras para análise de RMN HRMAS de <sup>1</sup> H.....	31
3.3 - Preparo das amostras para IV.....	32
3.4 - Aquisição dos espectros de RMN.....	32
3.4.1 – Espectros de hidrogênio do extrato aquoso.....	32
3.4.2 - Espectros de RMN <sup>1</sup> H por HR-MAS .....	33
3.4.3 – Espectros de <sup>13</sup> C e bidimensionais dos extratos aquosos liofilizados.....	33
3.5 – Aquisição dos espectros na região do infravermelho.....	34
3.6 - Análises quimiométricas.....	34
4 - Resultados e Discussão.....	36
4.1- Embaúba.....	37

4.1.1- Análise dos extratos aquosos por RMN em solução.....	38
4.1.1.1. Caracterização dos metabólitos em mistura.....	40
4.1.1.2 - Análise quimiométrica dos dados de RMN de <sup>1</sup> H das amostras em solução.....	51
4.1.2. - Análise das amostras intactas por RMN HRMAS de <sup>1</sup> H.....	58
4.1.2.1 - Análise quimiométrica dos dados de RMN HRMAS de <sup>1</sup> H das amostras intactas.....	59
4.1.3. - Análise das amostras intactas por infravermelho.....	63
4.1.4 – Conclusões.....	68
4.2- Ginseng Brasileiro.....	69
4.2.1- Análise dos extratos aquosos por RMN em solução.....	70
4.2.1.1 - Caracterização dos metabólitos em mistura.....	71
4.2.1.2.- Análise quimiométrica dos dados de RMN de <sup>1</sup> H das amostras em solução.....	74
4.2.2 - Análise das amostras intactas por RMN HRMAS de <sup>1</sup> H.....	77
4.2.2.1 - Análise quimiométrica dos dados de RMN HRMAS de <sup>1</sup> H das amostras intactas.....	78
4.2.3 - Análise das amostras intactas por infravermelho.....	80
4.2.4 – Conclusões.....	86
4.3- Malva Silvestris.....	87
4.3.1- Análise dos extratos aquosos por RMN em solução.....	88
4.3.1.1. Caracterização dos metabólitos em mistura.....	89
4.3.1.2 - Análise quimiométrica dos dados de RMN de <sup>1</sup> H das amostras em solução.....	99
4.3.2. - Análise das amostras intactas por RMN HRMAS de <sup>1</sup> H.....	104
4.3.2.1 - Análise quimiométrica dos dados de RMN HRMAS de <sup>1</sup> H das amostras intacta.....	105
4.3.3 - Análise das amostras intactas por infravermelho.....	109
4.3.4 - Conclusões .....	114
4.4- Considerações finais.....	115
5- Referências bibliográficas.....	116

# Introdução

## 1- Introdução

### 1.1 – Plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais é quase tão antiga quanto a própria humanidade, de maneira que nos primórdios da existência das comunidades primitivas, as plantas desempenhavam dois papéis fundamentais: o de complemento alimentar essencial e o místico/religioso/curativo, que ainda hoje pode ser visto preservado em algumas comunidades indígenas (CORREIA JUNIOR *et al*, 1991; DI STASI, 1996). O conhecimento relativo às propriedades tóxicas ou curativas das plantas era adquirido através da experimentação e observação, e foi sendo acumulado e transmitido através de várias gerações e entre diversas etnias.

Até o século XVII, as plantas eram o principal recurso no tratamento de doenças das mais diversas origens. Neste momento da história, a área da química desenvolveu técnicas que permitiram isolar e determinar a estrutura dos constituintes ativos de algumas plantas que apresentavam propriedades medicinais. A partir de então estas substâncias isoladas, passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais, e por fim, deste a Segunda Guerra Mundial a produção de fármacos via síntese química foi impulsionada e sustentada pelo crescimento econômico das indústrias farmacêuticas. A ausência de comprovações científicas e a dificuldade no controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais, é o que restringe a credibilidade dos fitoterápicos e mantêm o mercado de fármacos sintéticos (TUROLLA *et al*, 2006).

Atualmente, apesar dos grandes avanços da indústria farmacêutica, a fitoterapia tem ressurgido como uma forma medicamentosa bem aceita e acessível, causando a alta na demanda por medicamentos à base plantas por todo o mundo. Nos últimos anos estima-se que o mercado mundial de fitoterápicos tem girado uma receita em torno de 30 bilhões de dólares (MELO *et al*, 2007) e, aliado a isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% das pessoas dependam essencialmente da medicina tradicional, em especial a população dos países em desenvolvimento (ASCHWANDEN, 2000).

No que diz respeito ao Brasil, que é um país rico em diversidade de biomas, os quais incluem a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal e a Caatinga; e possuidor de uma vasta tradição no uso popular de plantas medicinais, apresenta este potencial pouco explorado. Entre as inúmeras plantas utilizadas popularmente, já há alguns estudos, alicerçado na importância terapêutica atribuída pela população, através da comprovação da sua eficácia e entre estas se destacam o boldo (*Peumus boldus*), macela (*Acchyroclines satureioides*) quebra-pedra (*Phyllanthus niurii* e *Phyllanthus urinaria*), jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*), guaraná (*Paulínia cupana*), camomila (*Matricaria chamomilla*), entre outras (BORRAS, 2003; SIMÕES *et al*, 2001).

Atenta ao crescimento da demanda desse segmento, a indústria farmacêutica tem investido de maneira considerável em produtos a base de espécies vegetais. Estima-se que o faturamento do mercado interno gire em torno de US\$ 160 milhões por ano, apresentando um crescimento de mais 15% ao ano, em contra partida aos 4% das vendas dos medicamentos sintéticos. Em toda cadeia produtiva calcula-se que somente o setor fitoterápico movimente anualmente cerca de R\$ 1 bilhão de reais. Como exemplo, a tabela a seguir apresenta o faturamento do segmento de fitoterápicos brasileiro no período de 2003 a 2006, totalizando quase dois bilhões de reais (FREITAS, 2007).

TABELA 1.1: Evolução das vendas em reais do mercado farmacêutico no período de 2003 a 2006.

Mercado	2003	2004	2005	2006
	(R\$1.000)	(R\$1.000)	(R\$1.000)	(R\$1.000)
Total	14.813973	17.220.802	19.228.537	21.684.868
Fitoterápicos	364.116	422.683	489.969	543.261

Outro aspecto, de relevância na produção de fitoterápicos, é que as empresas detentoras de registros de fitoterápicos concentram-se na região Sudeste do país com 62%, seguida pela região Sul com 22%, e uma pequena participação das regiões norte, nordeste e centro-oeste, que juntas possuem 16% dos registros. Nota-se que a indústria de fitoterápicos acompanha um padrão de desenvolvimento e distribuição bem próximo ao da indústria de medicamentos sintéticos (CARVALHO *et al*, 2008) (FIGURA 1.1).

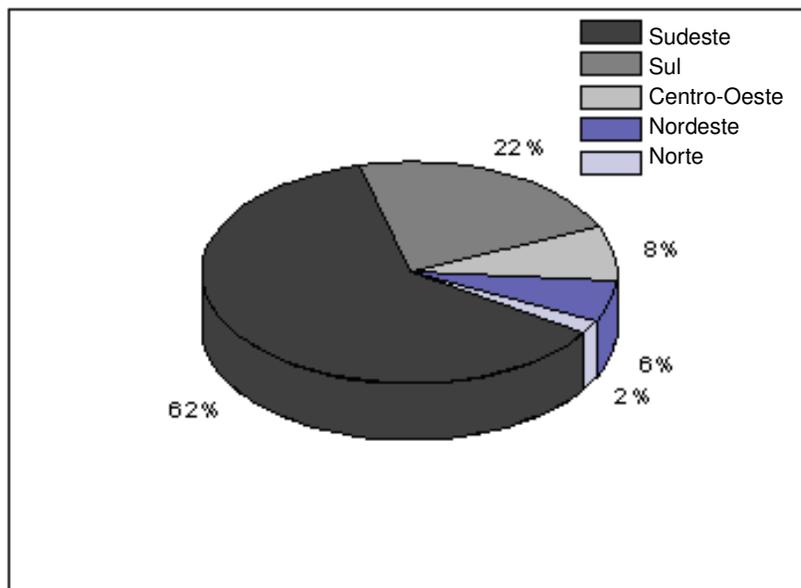


FIGURA 1.1- Gráfico representa a distribuição percentual de empresas detentoras de registro de fitoterápicos por regiões (CARVALHO *et al*, 2008).

Com base nestes dados, pode-se dizer que o Brasil apresenta um enorme potencial na área dos fitoterápicos e, por isso, a cada dia, têm-se colocado à disposição no mercado um maior número de produtos a base de plantas. Porém, devido à carência de pesquisas científicas, a segurança da sua utilização passa a ser questionada por causa da falta de controle de qualidade, desde a aquisição da matéria prima até o produto acabado, além da escassez de metodologias adequadas para a avaliação destes produtos. Conseqüentemente, muito dos produtos fitoterápicos apresentam riscos diversos, como por exemplo: identificação errônea da planta, presença de constituintes tóxicos, preparação inadequada e estocagem do material vegetal,

adulteração durante o condicionamento, presença de contaminantes biológicos e abióticos, etc. (VICTORIO e LAGE, 2008).

Para tentar minimizar estes problemas a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas com o intuito de regulamentar estes produtos, sejam eles drogas vegetais (planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada) ou fitoterápicos (medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais) a fim de garantir qualidade aos mesmos. As principais resoluções nesse sentido são a RDC n° 17 de 2000, RDC n° 48 de 16 de março de 2004 e a RDC n° 9 de março de 2010 (BRASIL, 2000, 2004 e 2010), as quais só permitem certificação de produtos à base de plantas, desde que consigam comprovar a eficácia terapêutica da planta ou derivado de planta, para o qual se pleiteie o registro. Além disso, exige-se a comprovação tanto do grau de toxicidade do produto, como a validação dos processos de produção de forma a garantir a qualidade do produto final.

Mesmo diante de tais exigências, a própria legislação, por meio de subterfúgios, possibilita o registro de determinadas plantas como medicamentos fitoterápicos tradicionais, cujo uso estaria baseado apenas na tradição popular, sem apresentar evidências conhecidas ou informações de risco à saúde do usuário. A sua eficácia é validada apenas por levantamentos etnofarmacológicos de sua utilização e de outras documentações tecnocientífica (FREITAS, 2007).

Considerando todas as dificuldades encontradas para padronizar e definir parâmetros de qualidade de uma droga vegetal, (CALIXTO, 2000), nos últimos anos uma nova metodologia tem sido investigada e aplicada, a qual consiste em utilizar o *fingerprint* das espécies em estudo. Com isso se pretende não só identificar os marcadores químicos, mas também os diversos compostos presentes em sua totalidade, a fim de relacionar o sinergismo existente entre os mesmos. Esta nova metodologia é denominada de *metabolic profile*, a qual pertence à nova linha de análise de *metabolomics* (DAOLIO, 2006).

## 1.2 – Drogas vegetais utilizadas

### 1.2.1- Embaúba

A família Cecropiaceae é representada por seis gêneros, sendo o mais importante gênero *Cecropia*, o qual é formado por 75 espécies. Geralmente são encontradas em planícies baixas e em torno de florestas densas, lagos e áreas devastadas. Esta espécie é considerada secundária, pois cresce em torno de áreas devastadas como uma proteção da floresta.

No Brasil, as espécies comumente encontradas são *C. glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. leucocoma*, *C. liratiloba*, *C. obtusa*, *C. pachistachia* (sinonímia *C. Adenopus*) e *C. scabra* (TANAE *et al*, 2007) e são conhecidas popularmente como embaúba ou umbaúba (FIGURA 1.2). Na medicina popular é comum utilizar os extratos aquosos das espécies *C. glaziovii* e *C. pachistachia* no tratamento da tosse, asma, bronquite, também como cardiotônico e diurético (LORENZI *et al*, 2002) .



FIGURA 1.2- Foto da espécie vegetal embaúba.

Alguns trabalhos vêm sendo realizados a fim de verificar, através de ensaios farmacológicos, a existência das atividades biológicas indicadas pela medicina tradicional. Desta forma para *C. glaziovii* foi comprovado às atividades anti-hipertensiva (NINAHUAMAN *et al*, 2007), broncodilatadora (DELARCINA *et al*, 2007), antidepressiva (ROCHA *et al*, 2007) e controle da secreção antiácida (SOUCCAR *et al*, 2008). Os extratos de *C. pachistachia* também apresentaram ensaios farmacológicos positivos para a atividade anti-hipertensiva (CONSOLINI *et al*, 2005), além da atividade antioxidante (VELÁSQUEZ *et al*, 2003).

Em um estudo realizado por Tanae e colaboradores, utilizando CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), foram quantificados e purificados os constituintes majoritários presentes na espécie *C. glaziovii*, e a elucidação foi feita via experimentos de RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Segundo este estudo a fração alcoólica era constituída de 1% de açúcares, 1,5% de ácido clorogênico, 12,6% de catequinas, 22% de procianidinas e 23% de flavonóides. O extrato aquoso era constituído de 9% de uma mistura de açúcares, 2,4% de ácido clorogênico e os demais compostos em uma quantidade cinco vezes mais diluída que o apresentado na fração alcoólica (TANAE *et al*, 2007).

Em outros trabalhos há relatos de isolamento de algumas substâncias da *C. pachistachia*, como sitosterol,  $\alpha$ -amirina e  $\alpha$ -hidroxi- $\alpha$ -amirina e os ácidos ursólico, pomólico e oleanólico (JUAN HIKAWCZUK *et al*, 1998, LACAILLE-DUBOI *et al*, 2001 e NEIDLEIN *et al*, 1980). Na figura 1.3 e 1.4 encontram-se as estruturas dos principais compostos já isolados das espécies *C. pachistachia* e *C. glaziovii*.

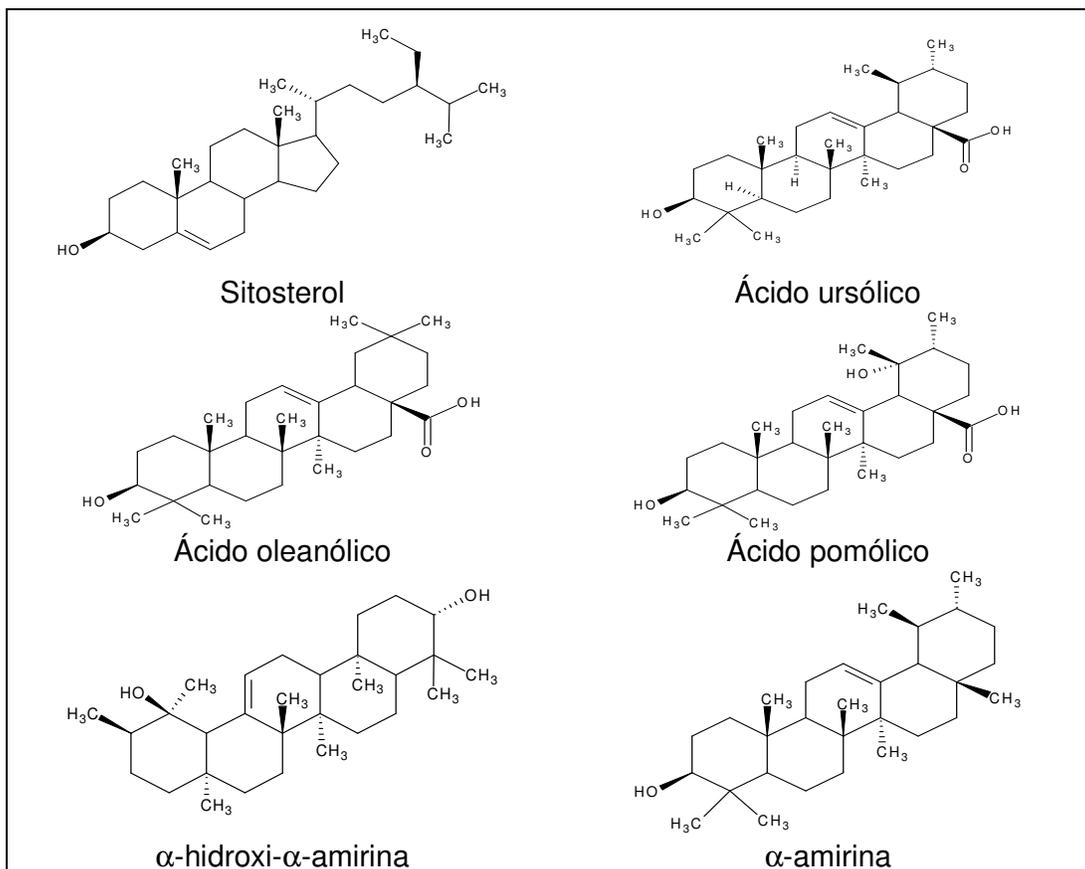


FIGURA 1.3 - Principais compostos isolados das espécies de *C. Pachistachia*.

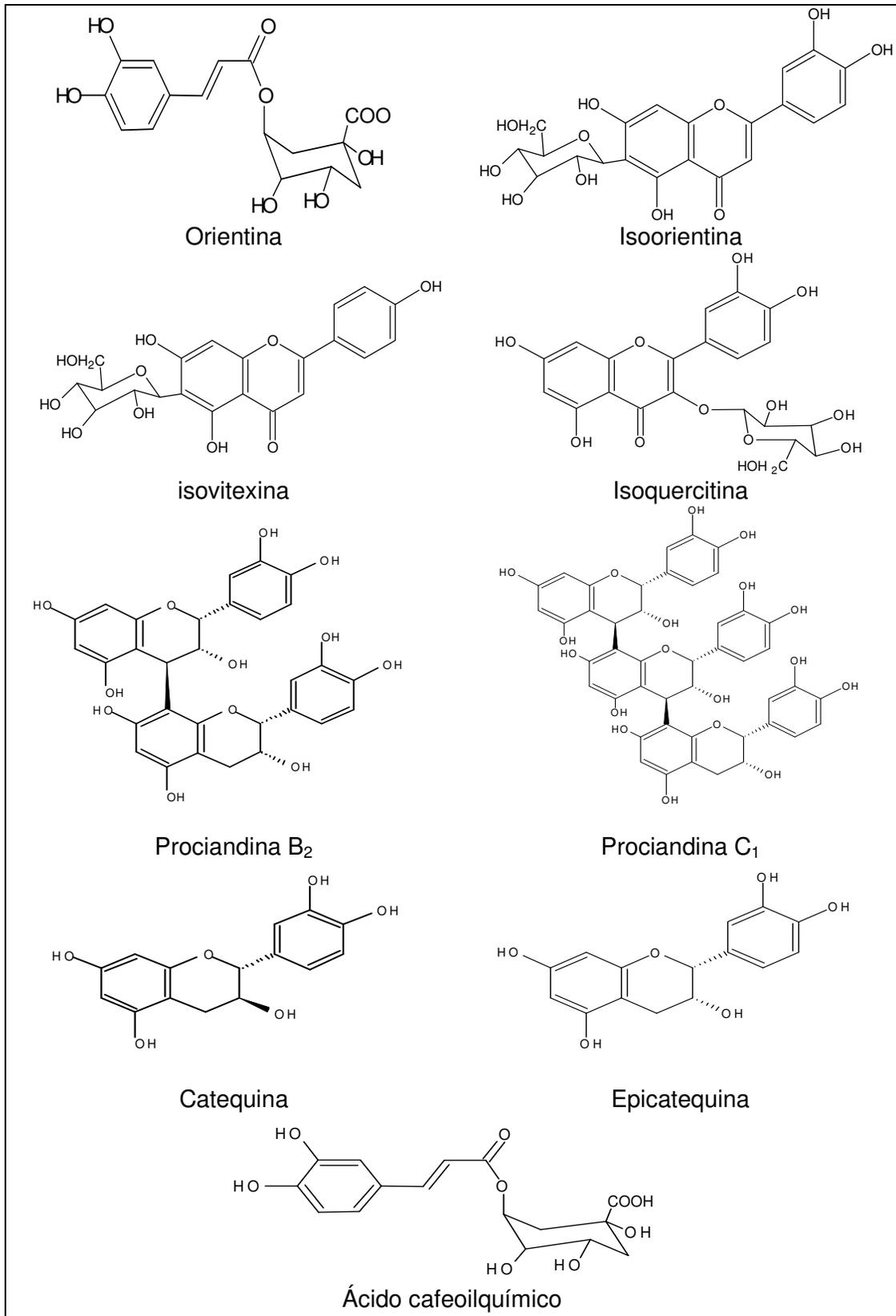


FIGURA 1.4 - Principais compostos isolados das espécies de *C. glaziovii*.

Todavia até o momento não há nenhum estudo que associe a atividade biológica a um princípio ativo ou a um complexo fitoterápico, ou mesmo caracterizar se a atividade é resultado da sinergia entre os compostos. Desta forma, estudos baseados em seu *fingerprint* talvez sejam a melhor alternativa para o controle de qualidade dessa droga vegetal.

### 1.2.2– Ginseng brasileiro

O gênero *Pfaffia*, da família Amaranthaceae, é constituído por cerca de 90 espécies que estão distribuídas pela América Central e América do Sul. No Brasil, foram descritas cerca 27 espécies que são encontradas nos estados da Amazônia, Mato Grosso, Goiás, São Paulo e Paraná (VIDAL e VIDAL, 1967).

As raízes da "fáfia" são utilizadas há séculos pelos índios brasileiros na cura e prevenção de várias doenças e estudos recentes têm confirmado a sua eficiência. Na medicina popular são utilizadas como tônicos afrodisíacos, antidiabético, antitumorais, para o tratamento de distúrbios gástricos e reumatismo (OLIVEIRA *et al*, 1980).

As espécies *P. glomerata*, *P. paniculata* (Sin.: *Hebanthe paniculata*) (VILELA, 2009) e *P. iresinoides* são popularmente conhecidas como "ginseng brasileiro" devido à semelhança morfológica de suas raízes com as raízes do ginseng coreano (*Panax ginseng* - Araliaceae) (FIGURA 1.5) (ZIMMER, *et al*, 2005).

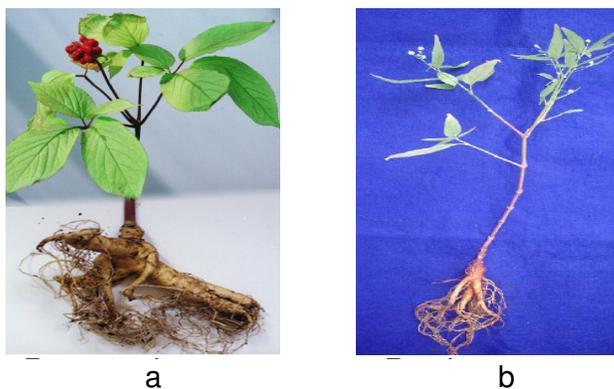


FIGURA 1.5 - Fotos das espécies vegetais a: *Panax Ginseng* (Ginseng coreano) e b: *Pfaffia glomerata* (Ginseng brasileiro).

Devido a esta semelhança, a *P. glomerata* tem sido a espécie mais empregada e comercializada como um substituto para o *Panax ssp.* e nos últimos anos estima-se que o consumo de fáfia tenha aumentado cerca de 17% ao ano (Corrêa Júnior, 2004). Entretanto, a substituição da *P. glomerata* pela *P. paniculata* também é comum devido à identificação botânica errônea, causada pela semelhança morfológica de suas raízes. Na figura 1.6 estão ilustradas as duas espécies.

Nos registros da ANVISA encontra-se apenas o registro da espécie *P. glomerata*, e como esta espécie é comercializada na forma de raízes pulverizada a fiscalização é difícil, e assim facilita as prováveis adulterações.



FIGURA 1.6 - Espécie a) *P. glomerata* e b) *P. paniculata*.

Alguns trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de facilitar a diferenciação das espécies, bem como encontrar as diferenças interespecíficas na composição química, de maneira que, possam definir perfis farmacológicos e toxicológicos, de ambas as espécies. Até o momento já foram isoladas e identificadas várias substâncias, mas a correlação entre a atividade e os compostos presentes nestas espécies ainda não foi comprovada, sendo apenas sugerida.

Para a espécie *P. paniculata* já foram isolados o ácido páfico, os páfosídeos A, B, C, D, E e F, uma mistura de esteróides (sitosterol, estigmasterol e seus glicosídeos) e alantoína (FIGURA 1.7). A avaliação farmacológica desta espécie demonstrou atividade anti-inflamatória, analgésica, estimulante sexual e antitumoral.

Para a espécie *P. glomerata* foram isolados o ácido glomérico, ácido pfámerico, rubrosterona e ecdisterona (FIGURA 1.8). Os estudos farmacológicos apresentaram atividades: hipoglicemiante, depressivo do sistema nervoso central, anti-inflamatória e analgésica. Na área cosmética a ecdisterona ou  $\beta$ -ecdisona são amplamente empregadas por apresentarem função hidratante.

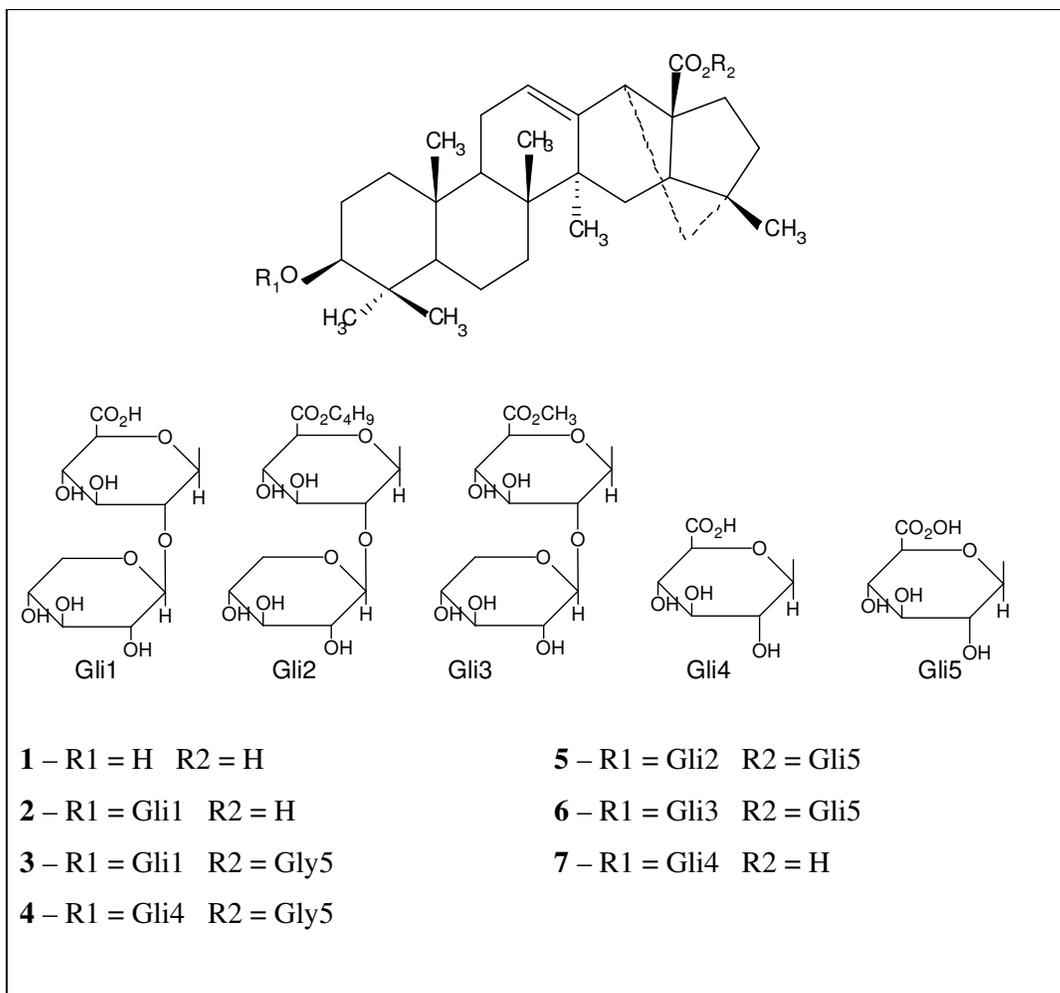


FIGURA 1.7 - Saponinas isoladas da espécie *P. paniculata*: ácido pfárico (1), pfafosídeos A (2), B (3), C (4), D(5), E (6) e F (7).

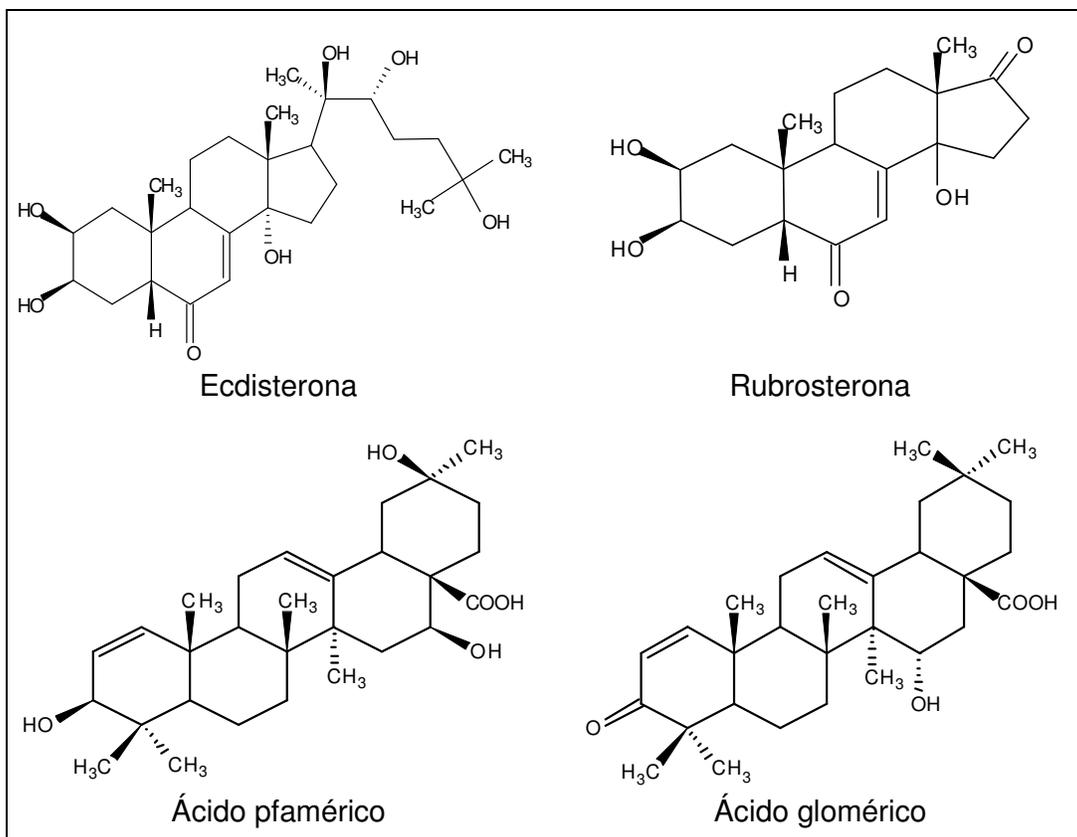


FIGURA 1.8 - Principais compostos isolados da espécie *P. glomerata*.

### 1.2.3 – Malva

A família Malvaceae possui cerca de 119 gêneros (BRUMMITT, 1992) e aproximadamente 1500 espécies que estão amplamente distribuídas em todo o mundo, ocorrendo predominantemente nas regiões tropicais (CRONQUIST, 1981). No Brasil estima-se a ocorrência de 31 gêneros e 200 espécies incluindo ervas, arbustos e algumas árvores (BARROSO *et al*, 1977). Os principais gêneros com espécies medicinais são *Gossypium*, *Hibiscus*, *Sida*, *Urena*, *Abutilon*, *Pavonia* e *Malva*.

Entre as espécies que compõe estes gêneros, chama a atenção as espécies *Malva silvestris* e *Sida cordifolia* (FIGURA 1.9), ambas conhecidas popularmente como malva, e amplamente usadas na fitoterapia.



FIGURA 1.9 - Espécie a) *Malva sylvestris* e b) *Sida cordifolia*.

A espécie *Malva sylvestris* é originária da Europa, pode atingir até cerca de 1 metro de altura, com regime perene, e floresce uma vez ao ano (LORENZI *et al*, 2002).

Em geral, na espécie *Malva sylvestris*, são isolados e identificados, pentoses, hexoses, ácidos galacturônicos, ácidos fenólicos (clorogênico, caféico, *p*-cumárico), antocianinas (malvina, malvidina), flavonóides, taninos, vitamina A, B1, B2, C, oxalato de cálcio, resinas, aminoácidos (lisina e leucina) (FIGURA 1.10), conferindo propriedades farmacológicas que atuam protegendo os tecidos inflamados e irritados, favorecendo a recuperação e cicatrização de lesões nas mucosas, e também funciona como lenitivo nas afecções dos brônquios, auxiliando na eliminação de tosse e catarro. Os taninos, por serem adstringentes, reduzem secreções e erupções e, em doses elevadas, funcionam como purgativo suave (FARINA *et al*, 1995; GANAI *et al*, 1997; BILLETER, *et al*, 1991).

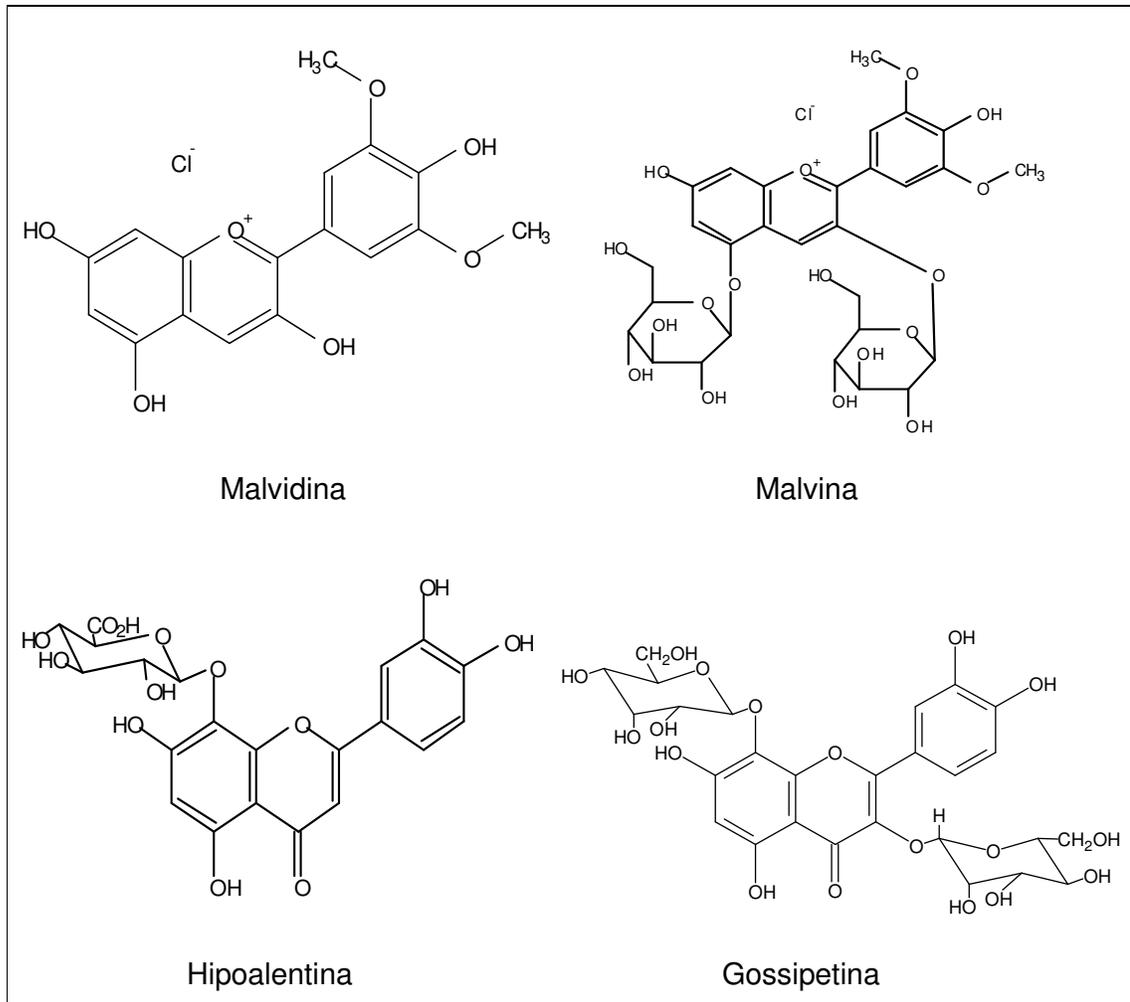


FIGURA 1.10 - Principais compostos isolados da espécie *Malva silvestris*.

A espécie *S. cordifolia* é encontrada em todo o país, principalmente na região nordeste, e usada na medicina popular para o tratamento de dor no estômago, asma e congestão nasal, como antipirético, doenças infecciosas e também como um afrodisíaco (BALDACH, A, 1978). No ocidente ela é considerada por ter atividades diaforética, diurética e estimulante do sistema nervoso central.

Esta planta contém principalmente alcalóides, ácidos graxos, esteróides, resinas ácidas e nitrato de potássio (DIWAN e KANTH, 1999). Do extrato desta planta já foram isolados o alcalóide efedrina, em quantidades que varia de 0,8 a 1,2%, e outros compostos biologicamente ativos como: nimboesterol, vasicina, vascinol, hipaforina (FIGURA 1.11) (SANKAR *et al*, 2001; GHOSAL *et al*, 1975, SILVEIRA *et al*, 2003, SUTRADHAR *et al*, 2008).

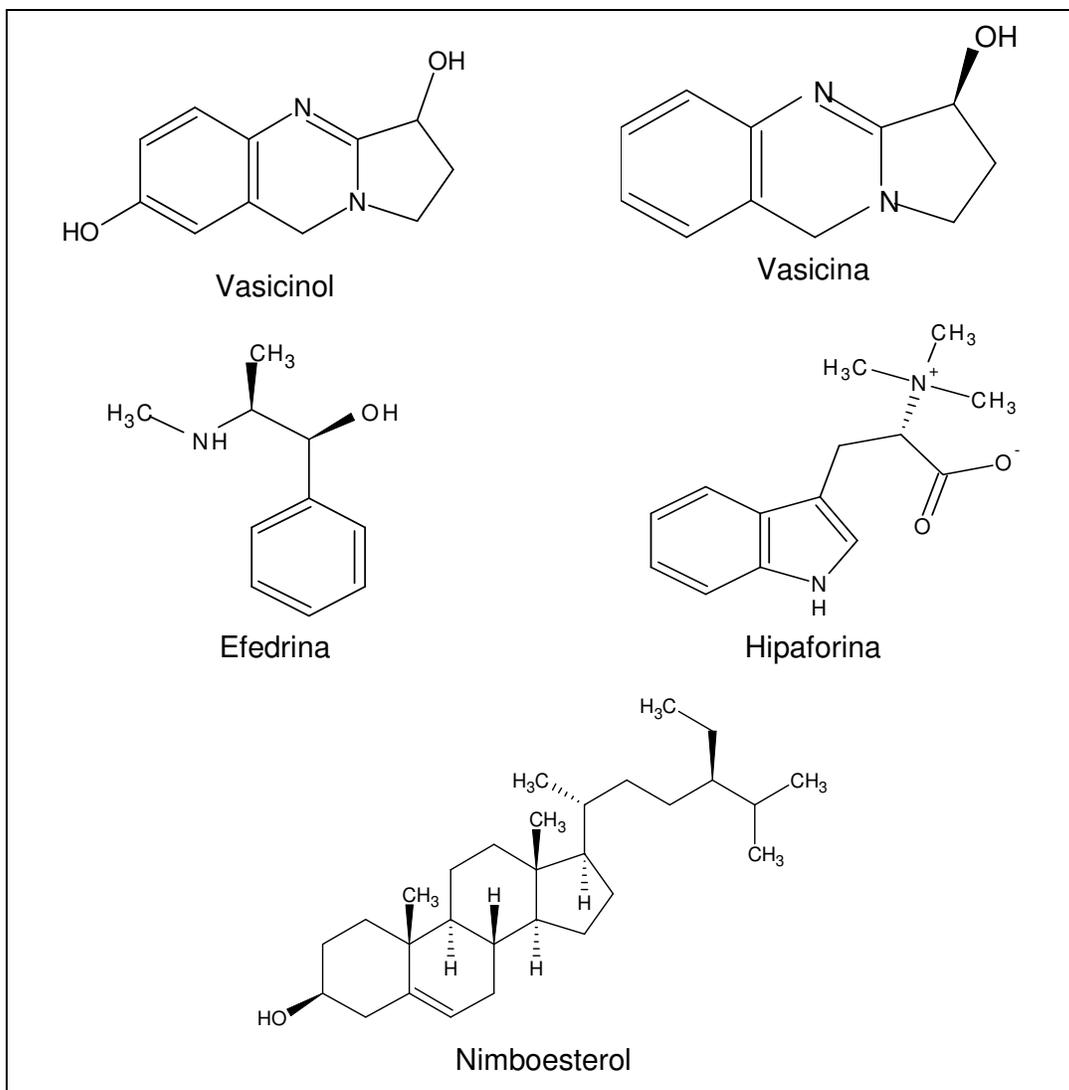


FIGURA 1.11 - Principais compostos isolados da espécie de *Sida Cordifolia*.

### 1.3 – Técnicas espectroscópicas

Atualmente o conceito *fingerprint* de plantas medicinais, tem se tornando essencial, principalmente pelo fato de que algumas plantas medicinais têm sua atividade biológica atribuída ao sinergismo existente entre os vários compostos presentes na sua composição, e não a um número restrito de compostos bioativos.

Na busca de perfis químicos, várias técnicas analíticas vêm sendo utilizadas, uma vez que a identificação e quantificação de todos os metabólitos presentes é um problema complexo, devido à grande quantidade de

metabólitos e as suas diferentes características como volatilidade, polaridade, solubilidade e comportamento cromatográfico.

Neste contexto, as técnicas comumente empregadas são as técnicas cromatográficas: cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência, espectrométrica como a espectrometria de massa e espectroscópicas como: ultravioleta, infravermelho e ressonância magnética nuclear.

### 1.3.1 – Ressonância Magnética Nuclear

Para obter o *metabolic fingerprinting* completo (análise global, realizada de maneira rápida, de um conjunto de amostras que permita uma classificação) é necessário o uso de técnicas que sejam rápidas, reprodutíveis e estáveis no decorrer do tempo, e que envolva uma preparação simples de amostra (DAOLIO, 2006)

Atendendo a essas especificações, a RMN apresenta-se como uma ferramenta ideal, pois se trata de uma técnica não destrutiva, que não necessita de métodos elaborados de preparação de amostra. Permite obter informações a respeito da maioria dos compostos presentes em um extrato, considerando a sua sensibilidade, em um único espectro, utilizando um mínimo de amostra e requerendo um tempo relativamente curto.

Recentemente, com o avanço tecnológico, a RMN vem agregando vantagens em relação às demais técnicas. Entre elas destaca-se o advento da técnica HR-MAS (*High Resolution – Magic Angle Spinning*) que possibilita a análise de amostras heterogêneas sem o seu pré-tratamento, ou seja, sem a necessidade de extração e purificação, com a obtenção de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  com resolução semelhante à encontrada para líquidos, propiciando a análise de misturas complexas em um tempo menor e com o uso mínimo de reagentes, evitando alterações na composição.

A RMN tem-se mostrado uma ferramenta útil em diversos estudos, tais como a detecção de adulteração de produtos alimentícios, como: sucos de frutas (BELTON *et al*, 1998; VOGELS *et al*, 1996), vinhos (BRESCIA *et al*, 2002), queijo (SHINTU e CALDARELLI, 2005), café (TAVARES *et al*,

2005), entre outros e definição de perfis químicos de sistemas biológicos em geral possibilitando a identificação metabólitos primários e secundários (KRISHNAN *et al*, 2005; KIM *et al*, 2005).

### 1.3.1.1- HR-MAS (*High Resolution – Magic Angle Spinning*)

A RMN de Alta Resolução com Rotação em torno do Angulo Mágico é uma técnica empregada no estudo de amostras heterogêneas. Este técnica apresenta resolução espectral limitada (largura de linha à meia altura), devido a fatores inerentes de amostras sólidas ou heterogêneas, como o movimento molecular restrito, que provoca interações dipolares acentuadas e deslocamento químico anisotrópico, e a heterogeneidade da amostra, que provoca diferenças de susceptibilidade magnética.

As interações dipolares ou acoplamentos dipolares, ocorrem devido à interação magnética dos spins nucleares através do espaço, dependendo da posição que cada núcleo ocupa no espaço. Assim, o spin de um dado núcleo gera um campo magnético que pode-se somar ou subtrair à força do campo magnético local ( $B_{loc}$ ) ao qual um núcleo vizinho está sujeito, fazendo com que um único núcleo apresente uma extensa faixa de frequências. No caso de amostras líquidas este efeito é anulado ou minimizado, devido ao movimento molecular rápido e isotrópico das moléculas, deste modo este efeito não é observado em RMN de líquido.

Pelo fato também do movimento molecular restrito, os núcleos correspondentes apresentam deslocamentos químicos distintos, causado pelas diversas orientações que a molécula pode assumir em relação ao campo magnético principal ( $B_0$ ). Ressaltando que o campo magnético experimentado por um núcleo e seu deslocamento químico, depende da orientação da ligação em relação ao campo magnético principal, ou seja, é anisotrópico.

Já a susceptibilidade magnética é causada pela heterogeneidade física da amostra, ou seja, diferenças de susceptibilidade magnética criada por interfaces da amostra, entre as partículas sólidas, o solvente e o ar, causando

perdas na homogeneidade magnética local, o que resulta no alargamento dos sinais.

O princípio da técnica RMN de HR-MAS é minimizar consideravelmente todos os efeitos citados anteriormente, de maneira a se ter um espectro com qualidade semelhante ao de RMN de líquido.

O efeito causado pelo acoplamento dipolar é consideravelmente reduzido quando se inclina a amostra exatamente a  $54,74^\circ$  em relação ao campo magnético principal ( $B_0$ ), pois os campos magnéticos locais estão relacionados ao momento magnético dos spins segundo a equação  $B_{loc} = \pm \mu_S r_{IS}^{-3} (3\cos^2\theta - 1)$ . O  $B_{loc}$  corresponde ao campo magnético local experimentado por um núcleo I gerado por um núcleo S,  $\mu_S$  ao momento magnético do núcleo do núcleo S,  $r_{IS}$  à distância intermolecular,  $\theta$  ao ângulo entre o vetor intermolecular e o campo  $B_0$  e o sinal  $\pm$  a orientação dos spins em relação ao campo. Quando o ângulo for igual a  $54,74^\circ$ , o termo  $3\cos^2\theta - 1$  torna-se zero, anulando o momento magnético nuclear. Por este motivo este ângulo é chamado de “ângulo mágico” (FIGURA 1.12).

Os efeitos do deslocamento químico anisotrópico são superados adicionando ao ângulo mágico uma alta frequência de rotação que seja ao menos comparável ao deslocamento por anisotropia e os efeitos causados pelas diferenças de susceptibilidade magnética são minimizados, primeiramente por uma fina moagem da amostra e utilizando rotores especiais que confere a amostra, na cavidade do rotor, uma forma esférica, além da adição de  $D_2O$  que também diminui a susceptibilidade magnética.

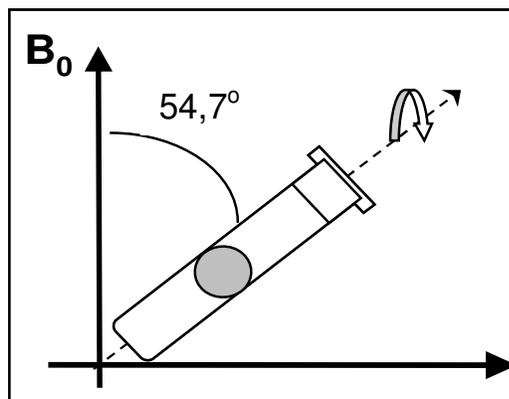


FIGURA 1.12 – Esquema ilustrativo do giro do rotor no ângulo mágico (sonda HR-MAS).

Outro inconveniente que há na análise de material heterogêneo, principalmente na análise de material vegetal, é a presença de matérias poliméricas como: membranas, paredes celulares, ligninas, celulose, etc que possuem tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) curto, resultando também no alargamento dos sinais e dificultando a observação dos sinais de moléculas com massa molar pequena.

Quando se trabalha com moléculas de massas molar baixa ( $< 800\text{Da}$ ), em solventes pouco viscosos e com grande mobilidade molecular as velocidades de relaxação spin-rede (relaxação longitudinal –  $T_1$ ) e spin-spin (relaxação transversal –  $T_2$ ) são muito próximas, mas a restrição do movimento molecular, faz com que o tempo de relaxação spin - spin seja curto devido ao aumento na eficiência da relaxação entre os spins.

A seqüência CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), originalmente desenvolvida para determinar os tempos de relaxação transversal ( $T_2$ ), tem sido utilizada com algumas modificações, para eliminar os sinais oriundos de moléculas de  $T_2$  curto, facilitando a visualização dos sinais de baixa massa molar. A seqüência CPMG, conhecida como filtro de  $T_2$ , consiste na aplicação de um pulso de  $90^\circ_x$  seguido por sucessivos pulsos de  $180^\circ_y$  e seguido por um intervalo de tempo  $\tau$ , propiciando que a refocagem dos ecos seja mantida em  $+y$  (FIGURA 1.13).

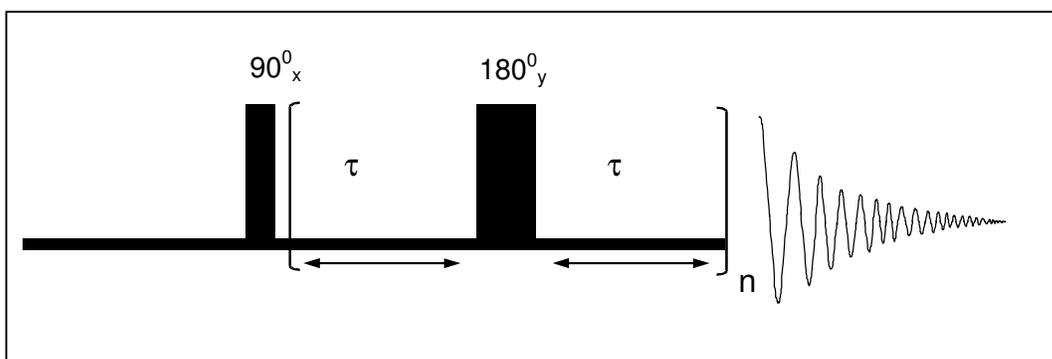


FIGURA 1.13 – Ilustração da seqüência de pulsos CPMG empregada nas análises de RMN HR-MAS  $^1\text{H}$ .

### 1.3.1.2- Seqüência CPMG com supressão do sinal da água

Neste trabalho utilizou a seqüência de pulso CPMG editada, ou seja, uma seqüência de CPMG modificada e com pré-saturação (FIGURA 1.14), de maneira que o sinal a ser suprimido é irradiado com uma fonte de radiação por ondas contínuas, propiciando um melhor ajuste do ganho do receptor do equipamento. Assim, se consegue, em uma única aquisição minimizar os sinais das moléculas que possuem  $T_2$  curto, e pré-saturar o sinal da água presente na amostra.

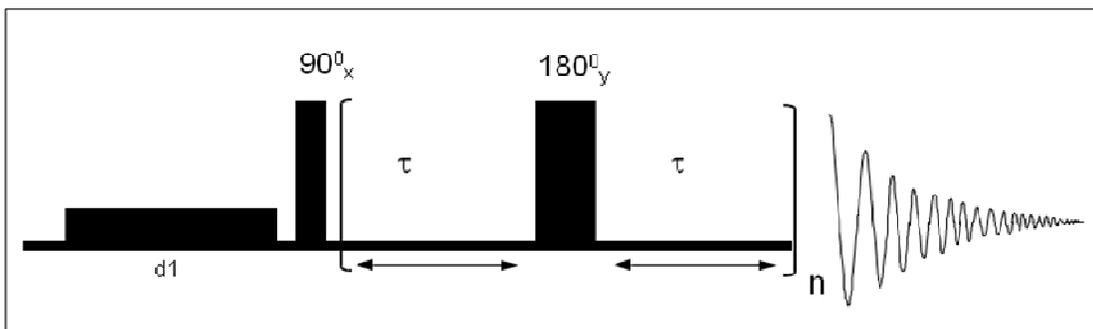


FIGURA 1.14 – Ilustração da seqüência de pulsos CPMG com pré-saturação empregada na análise de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ .

### 1.3.1.3- Seqüência noesypr1d

Para o estudo de misturas complexas diversas técnicas de RMN em solução aquosa, já foram aplicadas com o intuito de se obter uma melhor resolução e sensibilidade aos espectros. Entre as técnicas empregadas a supressão do sinal referente aos hidrogênios da molécula de água, é necessário, para uma melhor detecção dos sinais dos compostos minoritários ou menos intenso, uma seqüência que tem sido empregada com eficiência, com esse intuito, e a seqüência que consiste na saturação do sinal da água por irradiação de ondas contínuas, durante o tempo de relaxação e no *mixing time* (seqüência Bruker - noesypr1d) (FIGURA 1.15).

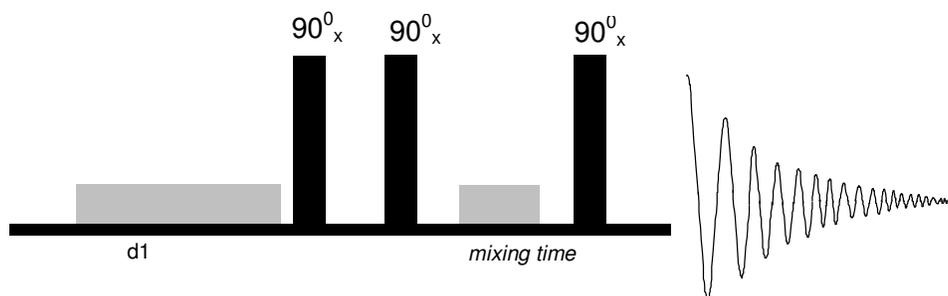


FIGURA 1.15 - Ilustração da seqüência de pulsos noesypr1d, empregada para a supressão do sinal referente ao hidrogênio da água.

### 1.3.2 – Infravermelho

Outra ferramenta muito empregada na obtenção de *metabolic fingerprinting* é a espectroscopia na região do infravermelho (IV), entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , que apresenta como principais vantagens o baixo custo e a fácil obtenção das medidas, além de não requerer pré-tratamento das amostras.

Esta técnica consiste, na absorção da radiação infravermelha na faixa de 10.000 a 100  $\text{cm}^{-1}$ , que converte-se em energia de vibração molecular. O espectro vibracional aparece como uma série de bandas ao invés de linhas, pois a cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional. As linhas sobrepõem dando lugar às bandas de vibração-rotação (número de ondas,  $\text{cm}^{-1}$ ) observadas. Essa energia vibracional pode ser classificada como: deformação axial (simétrica ou assimétrica) e deformação angular (no plano – simétrica ou assimétrica e fora do plano – simétrica ou assimétrica). As deformações axiais, e para o mesmo grupo funcional, requerem mais energia que as deformações angulares, assim como as deformações simétricas – axiais ou angulares, requerem menos energia que as assimétricas.

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 freqüência, independente da estrutura da molécula, o que permite a obtenção de informações estruturais úteis (SILVERSTEIN *et al*, 1998).

Neste contexto a utilização da técnica de IV, na forma de pastilhas de KBr, para o controle de qualidade de fitoterápicos é uma técnica importante até para efeito comparativo com outras técnicas empregadas para o mesmo fim.

#### **1.4 – Quimiometria**

Um dos métodos comumente utilizados pela indústria para o controle de qualidade de materiais vegetais é a verificação da presença de marcadores químicos conhecidos da planta. No entanto a presença de marcadores químicos específicos nem sempre é garantia de identificação do material vegetal, especialmente se o produto foi enriquecido com estes. Além disso, dependendo da técnica utilizada, não se observa a presença de outras impurezas, como por exemplo, outros vegetais contaminantes presentes no fitoterápico.

Diante deste fato, a melhor maneira de analisar materiais vegetais é utilizando o *fingerprint* químico. Uma das técnicas que tem sido bastante empregada, com este intuito é a RMN, pois apresenta a vantagem de mostrar em um único espectro todas as possíveis classes de substâncias presentes e em quantidades detectáveis. Entretanto, em geral, os espectros obtidos de material vegetal apresentam uma grande quantidade de informações, muitas vezes com sinais sobrepostos e com alto grau de semelhança entre amostras distintas, o que dificulta a interpretação dos dados pela simples análise visual.

Com o intuito de auxiliar a análise deste tipo de dados, a quimiometria apresenta-se como uma ferramenta muito útil, pois reduz a complexidade e evidencia as informações relevantes, tornando possível avaliar as similaridades e as diferenças na composição química das amostras.

A definição de quimiometria, mais comumente conhecida, diz que quimiometria é uma disciplina química que utiliza métodos matemático-estatísticos para planejar e selecionar condições ótimas de medidas e experimentos, e extrair o máximo de informações de dados químicos (BEEBE,1998).

A RMN aliada à quimiometria está sendo utilizada com sucesso na análise de matérias vegetais, e vários trabalhos já foram publicados, envolvendo a análise *metabolic profiling* obtidos através da RMN e quimiometria como no trabalho de Fédérich, no qual se mostra a discriminação de três diferentes espécies de *Strychnos* de diversas origens, através da análise multivariada, e espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de extratos brutos (FRÉDÉRICH *et al*, 2004). O trabalho de Kim indica que a quimiometria aliada a RMN seja um método eficiente para a análise quimiotaxonômica de espécies de *Ephedra*, incluindo controle de qualidade de materiais vegetais (KIM, *et al*, 2005).

Para analisar um conjunto de dados espectroscópicos obtidos, é necessário construir uma matriz de dados, onde as linhas se referem ao número de espectros obtidos para as amostras e as colunas aos pontos, de cada espectro, utilizados para o processamento dos mesmos, de forma que, eles correspondam aos deslocamentos químicos, no caso de dados de RMN, e as absorvâncias em cada comprimento, no caso dos dados de IV, como pode ser observado no esquema a seguir (FIGURA 1.16).

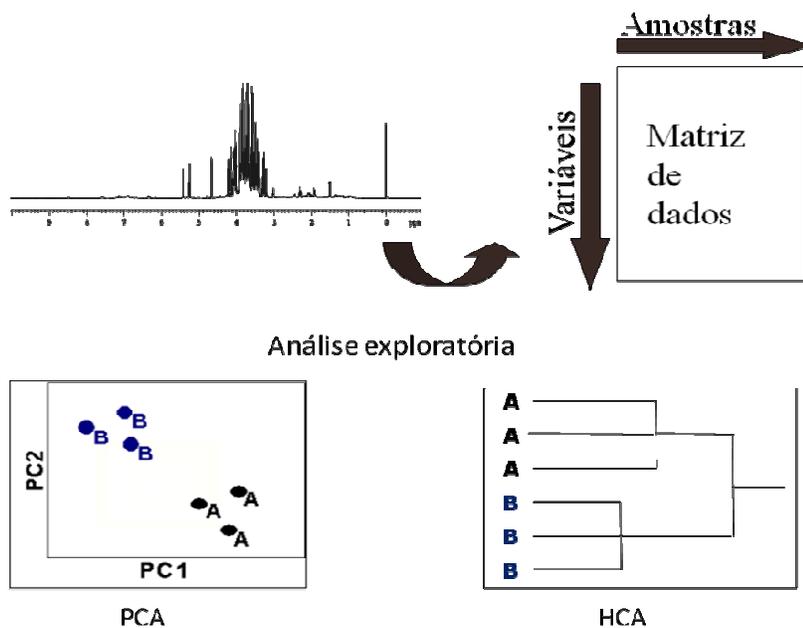


FIGURA 1.16 - Esquema ilustrativo do tratamento quimiométrico aplicado aos dados de RMN de  $^1\text{H}$ .

### 1.4.1- Análises exploratórias.

A análise exploratória dos dados destina-se a agrupar as amostras que possuam características comuns em um mesmo grupo, e distinguí-las daquelas com características diferentes, auxiliando na identificação de amostras não usuais ou *outliers*.

As análises exploratórias podem ser realizadas através da análise por componentes principais (*Principal Components Analysis – PCA*), e/ou a análise hierárquica de agrupamentos (*Hierarchical Clusters Analysis – HCA*) (BEEBE *et al*, 1998). Ambas as técnicas são baseadas na suposição de que quanto mais semelhantes forem as amostras entre si, mais próximas estas estarão em um espaço multidimensional.

A análise de componentes principais é um método de análise multivariada utilizado para projetar dados n-dimensionais em um espaço com poucas dimensões, normalmente duas ou três. Em uma análise de componentes principais, é possível verificar o agrupamento das amostras que são semelhantes entre si e a discriminação em classes daquelas diferentes. Através de gráficos de escores e *loadings* é possível verificar tanto a composição das amostras como a relação entre as variáveis. Como as PCs são ortogonais entre si, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis, através dos gráficos dos escores e dos *loadings*. Desta forma, é possível estimar a influência de cada variável em cada amostra e verificar quais as informações de maior ou menor importância (BEEBE *et al*, 1998).

O método de HCA consiste em um processo hierárquico, o qual, tem como objetivo exibir os dados em um espaço bidimensional, na forma de dendrogramas, de maneira que enfatize o agrupamento natural das amostras, revelando similaridade ou discrepância entre as amostras.

Para a construção deste dendrograma é feito o cálculo da distância entre os pares de amostras e sua posterior comparação. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade ou o índice de similaridade de suas propriedades e, portanto, quanto mais próximos estiverem os pontos no espaço amostral mais similar eles são.

O índice de similaridade varia de 1,0 a 0,0. De maneira que 1,0 corresponde às amostras idênticas e 0,0 às amostras sem similaridade.

# Objetivos

## 2 - Objetivos

Os objetivos do presente trabalho são:

Utilização das técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  de líquido, RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  e IV para obtenção de “*fingerprints*” das drogas vegetais: “embaúba”, “ginseng-brasileiro” e “malva”.

Analisar os *fingerprints* obtidos das respectivas drogas utilizando métodos quimiométricos (PCA e HCA) para a investigação de adulteração e/ou autenticidade de produtos comerciais.

Fazer uma avaliação comparativa do potencial das três técnicas espectroscópicas empregadas.

Caracterização dos metabólitos primários e secundários, em maior quantidade, presentes nos extratos não fracionados, utilizando as técnicas de RMN 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e 2D (*g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC).

# Materiais e métodos

### 3 – Materiais e Métodos

#### 3.1 - Drogas vegetais

Todas as drogas vegetais utilizadas como padrões, neste trabalho, foram cultivadas, coletadas, identificadas botanicamente e fornecidas pela Dra. Glyn Mara Figueira do CPQBA/UNICAMP, que é uma das parceiras do laboratório, e vem contribuindo de maneira singular em vários trabalhos nesta linha de fitoterápicos e drogas vegetais.

Os espécimes de *Cecropia glaziovii*, *Cecropia pachistachia* (Família Cecropiaceae) foram coletadas em dois períodos durante o ano, uma coleta foi feita no mês de janeiro de 2006 e outra no mês de agosto de 2006. Já os espécimes *Pfaffia paniculata*, *Pfaffia glomerata* (Família Amanrantaceae), *Malva silvestris* e *Sida cordifolia* (Família Malvaceae) foram coletadas no período de maturação da planta (após 1 ano, no fim do inverno, para espécimes de *pfáfia* e na floração para as espécimes de *M. silvestris* e *S. cordifolia*). As amostras comerciais foram adquiridas em diversas farmácias, feiras e mercados de diferentes regiões do Brasil.

As amostras de embaúba e malva vieram sob a forma de folhas previamente secas em uma estufa de ventilação forçada a 40°C por um período de 48 horas. Para as análises de RMN de HRMAS e IV esse material foi moído em um moinho de facas da Tecnal, modelo TE- 631, a 10000 rpm durante 2 minutos, em seguida, passadas em uma peneira granulométrica Granutest com abertura de 0.350 mm. O mesmo procedimento de moagem também foi empregado para as amostras comerciais e que também foram adquiridas em forma de folhas.

As amostras de ginseng brasileiro vieram sob a forma de raízes intactas, previamente lavadas e secas em uma estufa de ventilação forçada a 40°C por um período de 48 horas. Este material foi fatiado e aplicado o mesmo procedimento de moagem utilizado anteriormente. As amostras comerciais quando adquiridas sob a forma de cápsulas foram apenas desencapsuladas, todas as amostras foram passadas pela mesma peneira citada anteriormente a fim de manter a mesma granulometria.

A seguir, encontram-se as tabelas com as amostras padrão e comerciais e seus respectivos códigos e locais de aquisição.

Tabela 3.1.1 - Amostras padrão e comerciais de embaúba, com local de aquisição e código.

<b>Amostra</b>	<b>Local de aquisição</b>	<b>Código</b>
<i>Cecropia Pachystachya</i> - janeiro	Campinas - SP	ECP1
<i>Cecropia Glazioui</i> - janeiro	Campinas - SP	ECG1
<i>Cecropia Pachystachya</i> - agosto	Campinas - SP	ECP2
<i>Cecropia Glazioui</i> - agosto	Campinas - SP	ECG2
Comercial 1	São Carlos - SP	E1
Comercial 2	São Carlos - SP	E2
Comercial 3	Rio Verde - GO	E3
Comercial 4	Rio Verde - GO	E4
Comercial 5	Rio Verde-GO	E5
Comercial 6	Cuiabá - MT	E6

Tabela 3.1.2 - Amostras padrão e comerciais de ginseng brasileiro, com local de aquisição e código.

<b>Amostra</b>	<b>Local de aquisição</b>	<b>Código</b>
<i>Pfaffia paniculata</i>	Campinas - SP	GPP
<i>Pfaffia glomerata</i>	Campinas - SP	GPG
Comercial 1	São Carlos - SP	G1
Comercial 2	São Carlos - SP	G2
Comercial 3	São Carlos - SP	G3
Comercial 4	São Carlos - SP	G4
Comercial 5	Rio Verde - GO	G5
Comercial 6	Rio Verde - GO	G6
Comercial 7	Rio Verde - GO	G7
Comercial 8	Rio Verde - GO	G8
Comercial 9	Dourado - MS	G9
Comercial 10	Goiânia - GO	G10
Comercial 11	Cuiabá - MT	G11

Tabela 3.1.3: Amostras padrão e comerciais de malva, com local de aquisição e código.

<b>Amostra</b>	<b>Local de aquisição</b>	<b>Código</b>
<i>Malva Silvestris</i>	Campinas - SP	MMS
<i>Sida Cordifolia</i>	Campinas - SP	Sida
Comercial 1	São Carlos - SP	M1
Comercial 2	São Carlos - SP	M2
Comercial 3	São Carlos - SP	M3
Comercial 4	São Carlos - SP	M4
Comercial 5	Rio Verde - GO	M5
Comercial 6	Rio Verde - GO	M6
Comercial 7	Goiânia - GO	M7
Comercial 8	Uberlândia - MG	M8
Comercial 9	Dourado - MS	M9

### 3.2 - Preparo das amostras para RMN

#### 3.2.1 - Amostras para análise de RMN de $^1\text{H}$ dos extratos aquosos.

Para a obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de líquidos foi feito um extrato aquoso (chá), tanto para os padrões como para as amostras comerciais. Para embaúba e malva, os chás foram obtidos através da infusão de 1 g de folhas secas, para o ginseng brasileiro, foi através da infusão de 300 mg do pó, em 50 mL de água fervente por um período de 10 minutos. Após esse período, os infusos foram filtrados, esperou-se que os mesmos atingissem a temperatura ambiente (25 °C), e uma alíquota de 600  $\mu\text{L}$  foi transferida para o tubo de ressonância. Adicionando a este 3 gotas de uma solução TMSP- $d_4$  (3-trimetilsilil-2,2,3,3- $d_4$ -propionato de sódio) em  $\text{D}_2\text{O}$  para a calibração dos espectros e o ajuste da homogeneidade do campo magnético local,

respectivamente. O modo de preparo dos “chás” foi de acordo com as indicações de uso.

### 3.2.2 - Amostras para medidas RMN de $^{13}\text{C}$ e experimentos bidimensionais.

Para obter os espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  e experimentos bidimensionais utilizou os extratos aquosos descritos no item 3.2.1, porém estes extratos foram liofilizados em um liofilizador E-C Modulyo. Depois de secos foram redissolvidos em 600  $\mu\text{L}$  de água deuterada, em seguida foi transferida para o tubo de ressonância e adicionando a este 3 gotas da mesma solução de TMSP- $\text{d}_4$  em  $\text{D}_2\text{O}$ , utilizada no preparo das amostras para análise de RMN de  $^1\text{H}$ .

### 3.2.3 - Amostras para análise de RMN HRMAS de $^1\text{H}$

Para a aquisição dos espectros de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$ , foram utilizadas as amostras previamente moídas sem nenhum outro pré-tratamento. Para cada análise as amostras foram inseridas em um rotor de zircônio de 4 mm de diâmetro externo, com a adição de 3 gotas de uma solução de TMSP- $\text{d}_4$  (3-trimetilsilil-2,2,3,3- $\text{d}_4$ -propionato de sódio) em  $\text{D}_2\text{O}$ , para a calibração dos espectros e ajuste da homogeneidade do campo magnético local.

A figura 3.1 mostra o esquema utilizado para o empacotamento das amostras, 1 - rotor, 2- rotor com a amostra, 3- espaçador 4, inserção do espaçador para que a amostra adquira volume esférico, 5 – inserção do parafuso de vedação e 6 – inserção da tampa.

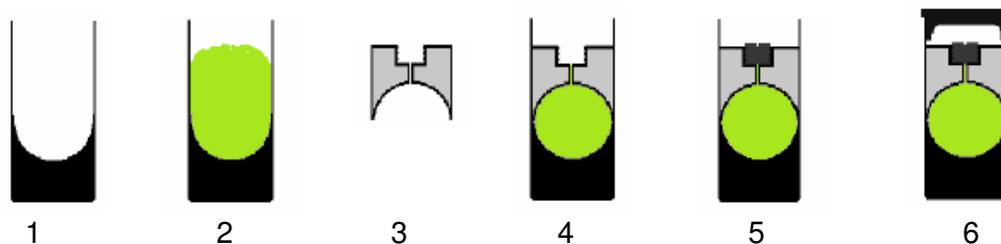


FIGURA 3.1 – Esquema ilustrativo do empacotamento das amostras para a aquisição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  por HRMAS.

### 3.3 - Preparo das amostras para IV

Para a aquisição dos espectros na região do infravermelho, prepararam-se pastilhas, pesando-se 2mg do material vegetal previamente moído e 98 mg de KBr (Brometo de potássio) seco e pulverizado, da VETEC Química fina para espectroscopia. A amostra foi misturada ao KBr utilizando um gral de ágata liso e a mistura amostra e KBr foi prensada sob uma pressão de 7500 tons (10000 psi) por 1 minuto, obtendo-se uma pastilha em formato de disco translúcido.

### 3.4 - Aquisição dos espectros de RMN

Na aquisição dos espectros de RMN foi utilizado um equipamento de 9.4 Tesla (400,21 MHz para frequência do hidrogênio), marca BRUKER, modelo DRX400.

Para os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos aquosos, usados na aplicação dos métodos quimiométricos, e os demais espectros de *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC, foi utilizada a sonda de 5 mm com detecção inversa (BBI) equipadas com gradiente de campo no eixo z, e para a aquisição dos espectros de  $^{13}\text{C}$  utilizou a sonda de detecção direta (BBO).

Para a obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do material heterogêneo foi utilizada a sonda de HR-MAS de 4 mm de diâmetro, rotores de zircônio de 4 mm de diâmetro interno com espaçador e unidade de controle pneumática para inserção e injeção da amostra e o giro no ângulo mágico.

#### 3.4.1 – Espectros de hidrogênio do extrato aquoso

Para as medidas de  $^1\text{H}$  dos extratos aquosos foi utilizada a seqüências de pulso noesypr1d, pois a mesma proporcionou uma supressão satisfatória do sinal da água. Foram realizadas 128 varreduras (NS) com 64 k pontos (TD) durante o processo de aquisição (AQ), com um tempo de espera antes de cada aquisição (d1) de 1,8s, aplicando uma atenuação de potência para a pré-saturação (PL9) de 50 dB e com *mixing time* (d8) de 50 ms. Os espectros foram processados com 64 k pontos para o processamento (SI) e

utilizando-se uma multiplicação exponencial com um fator  $lb = 0,3$  Hz. Ressaltando que estes parâmetros foram mantidos para todas as amostras.

### 3.4.2- Espectros de RMN $^1\text{H}$ por HRMAS

Para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  foi utilizada a seqüência de pulso CPMG com pré-saturação e filtro de T2 (zgT2pr), com um tempo de intervalo de eco (d20) de 1,0 ms e potência de pré-saturação (PL9) de 60dB. O tempo de espera antes de cada aquisição (d1) foi de 1,8s. O giro foi ajustado para 5000 Hz, e utilizou-se  $\text{D}_2\text{O}$  como solvente e TMS- $\text{d}_4$  como referência interna. Os espectros foram processados utilizando 32k pontos e  $lb = 1$  Hz.

Adicionalmente, para as amostras de embaúba os espectros de RMN  $^1\text{H}$  por HRMAS, foram adquiridos com acúmulo de (ns) 128 FIDs, para as amostras de malva os espectros foram adquiridos com o acúmulo de (ns) 256 FIDs e finalmente, para as amostras de ginseng brasileiro foram acumulados (ns) 64 FIDs, os demais parâmetros foram mantidos.

### 3.4.3 – Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ e bidimensionais dos extratos aquosos liofilizados

Os experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram realizados empregando a seqüência de pulso *zgpg30* com  $d1 = 0,1$ s,  $\text{TD} = 32$ k, e com o processamento com  $\text{SI} = 32$ k e  $lb = 3,0$  Hz.

Os espectros de bidimensionais de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (*g*COSY) foram adquiridos empregando a seqüência de pulsos *cosygpprgf* com largura espectral em F2 (SWHF2) de 4401 Hz e em F1(SWHF1) 4401 Hz, tempo de aquisição (AQ) de 0,23s, tempo de espera antes de cada aquisição (d1) 1,0s e número de pontos na aquisição de 4k em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1), e no processamento foram utilizados 1k e 1k de pontos em F2 e F1 respectivamente.

Os espectros bidimensionais de correlação heteronuclear  $^1J$   $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (*g*HSQC) foram adquiridos pelo emprego da seqüência de pulsos *hsqcetprgp* com os seguintes parâmetros na aquisição: SWHF2 de 4401Hz e SWHF1 de 25160Hz, AQ= 0,46s, d1=1,0s, TDF2 de 4K, TDF1 de 256 e com um tempo para evolução de acoplamento de uma ligação de 1,7ms ( $^1J_{\text{CH}}$  igual a 145 Hz). No processamento foi utilizado, 2k e 1k de pontos em F2 e F1 respectivamente.

Os espectros de bidimensionais de correlação heteronuclear  $^nJ$   $^1\text{H}$  - $^{13}\text{C}$  (*g*HMBC) foram adquiridos empregando a seqüência de pulsos *hmbcgp1pndprqf* com os seguintes parâmetros na aquisição: SWHF2 de 4401Hz e SWHF1 de 25160Hz, AQ= 0,46s, d1=1,0s, TDF2 de 4K, TDF1 de 256 e com um tempo para evolução de acoplamento à longa distância de 65 ms ( $^nJ_{\text{CH}}$  igual a 10 Hz). No processamento utilizou-se 2k e 1k de pontos em F2 e F1.

Todas as seqüências de pulsos aplicadas na aquisição dos experimentos estão disponíveis no equipamento Bruker.

### 3.5 - Aquisição dos espectros na região do infravermelho

As medidas espectroscópicas na região do infravermelho médio foram realizadas em um equipamento marca BOMEM modelo da série MB operando na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando pastilhas amostra/KBr (Brometo de potássio) na relação 2/98 mg. Os espectros foram obtidos, no modo transmitância, a partir da realização de 16 varreduras com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 20 scans/min, utilizando a função coseno para apodização e aplicando transformada de Fourier.

### 3.6 - Análises quimiométricas

A análise quimiométrica dos dados foi efetuada através do programa computacional *Pirouette*<sup>®</sup>, versão 3.11 (Infometrix, Woodinville, Washington, USA). A matriz dos dados de RMN para a análise neste programa foi construída com todos os espectros armazenados na extensão "dx". Esses espectros foram importados para o programa Origin<sup>®</sup>, armazenados com a

extensão “dat”, e por fim inseridos no programa quimiométrico. O mesmo procedimento foi realizado para a construção da matriz dos dados de IV, porém eles foram armazenados na extensão “prn” antes de serem importados para o programa Origin<sup>®</sup>. Na matriz final, após sua transposição, as amostras referem-se às linhas; os comprimentos de onda e os deslocamentos químicos, referem-se às colunas.

Para realizar as análises exploratórias dos dados por PCA e HCA, os dados de RMN foram transformados empregando a primeira derivada em um intervalo de 25 pontos e normalizando cada espectro pela norma  $l_1$ , (a área sob cada espectro é considerada igual a 1). Cada coluna dos espectros de RMN foi autoescalada para certificar-se que os sinais mais intensos não minimizem a influência dos sinais menos intensos, desta forma atribuir a mesma importância a todas variáveis. Para os espectros de IV cada coluna foi centrada na média, ou seja, cada elemento de uma coluna da matriz foi subtraída pelo seu valor médio.

# Resultados e discussão

# Embaúba

## 4 - Resultados e Discussão

### 4.1 - Embaúba

#### 4.1.1 - Análise dos extratos aquosos por RMN em solução.

A análise de RMN em solução foi feita utilizando extratos aquosos preparados da maneira usual de ingestão, ou seja, chás resultantes de infusão das folhas. Desta maneira, analisou-se o que realmente era ingerido pelo consumidor, além da vantagem de ser um método rápido e prático.

Com este método de preparo, como a quantidade de água nos extratos era muito grande, foi necessário utilizar uma seqüência de pulso que suprimisse de maneira eficiente o sinal referente ao hidrogênio da água.

Varias seqüências de supressão foram testadas empregando a otimização dos parâmetros de aquisição e de processamento em busca dos melhores resultados. Na figura 4.1, apresenta a comparação entre um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido sem supressão e com supressão utilizando a seqüência zgcprr e a noesypr1d.

Como se pode observar o ganho na sensibilidade é relevante, considerando a eficiência na supressão do sinal referente aos hidrogênios da água, favorecendo a visualização de sinais pouco intensos na região de sinais aromáticos.

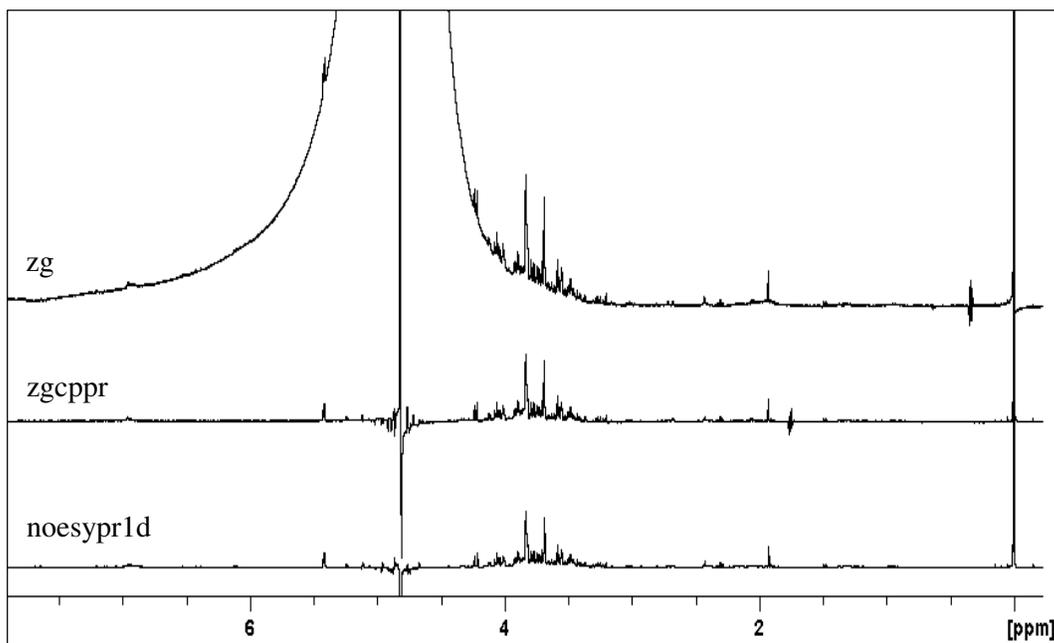


FIGURA 4.1 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução aquosa sem supressão, seqüência zg, e com supressão utilizando a seqüência de pulso zgcppr e a noesypr1d.

Selecionada a seqüência de pulso, adquiriram-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos aquosos das duas espécies (*C. pachistachia* e *C. glaziovii*), utilizadas como padrão neste trabalho. Verificou-se que os espectros foram muito semelhantes entre si, com sinais compreendidos na região espectral de 0,8 a 9,4 ppm, apresentando majoritariamente sinais característicos de açúcares e aminoácidos (FIGURA 4.2).

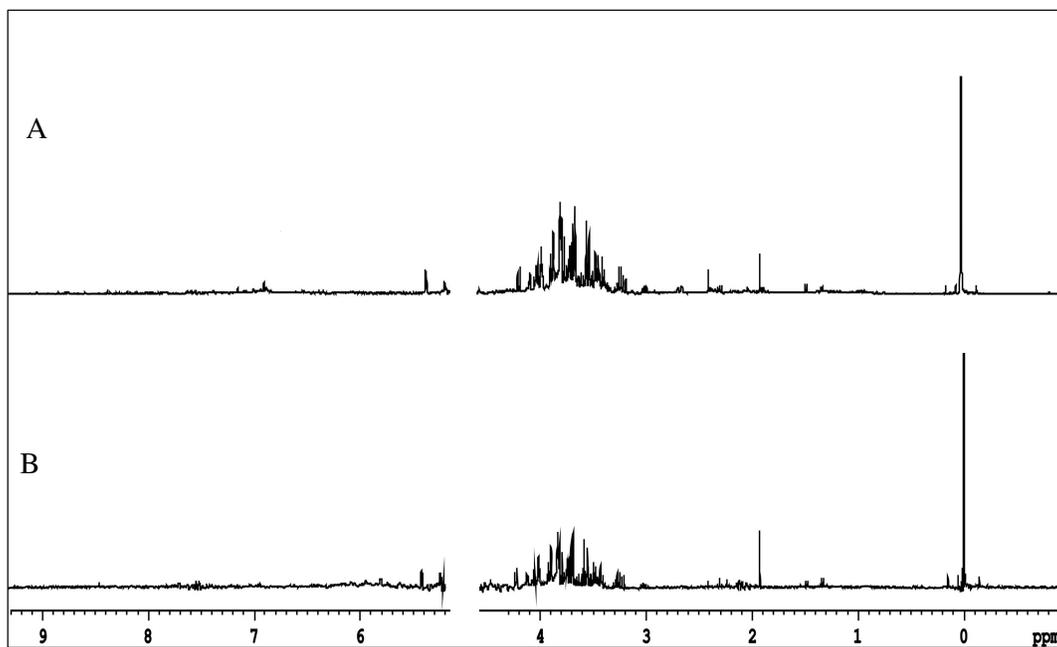


FIGURA 4.2 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução aquosa das espécies A- *Cecropia glaziovii* e B- *Cecropia pachistachia*.

#### 4.1.1.1. Caracterização dos metabólitos em mistura

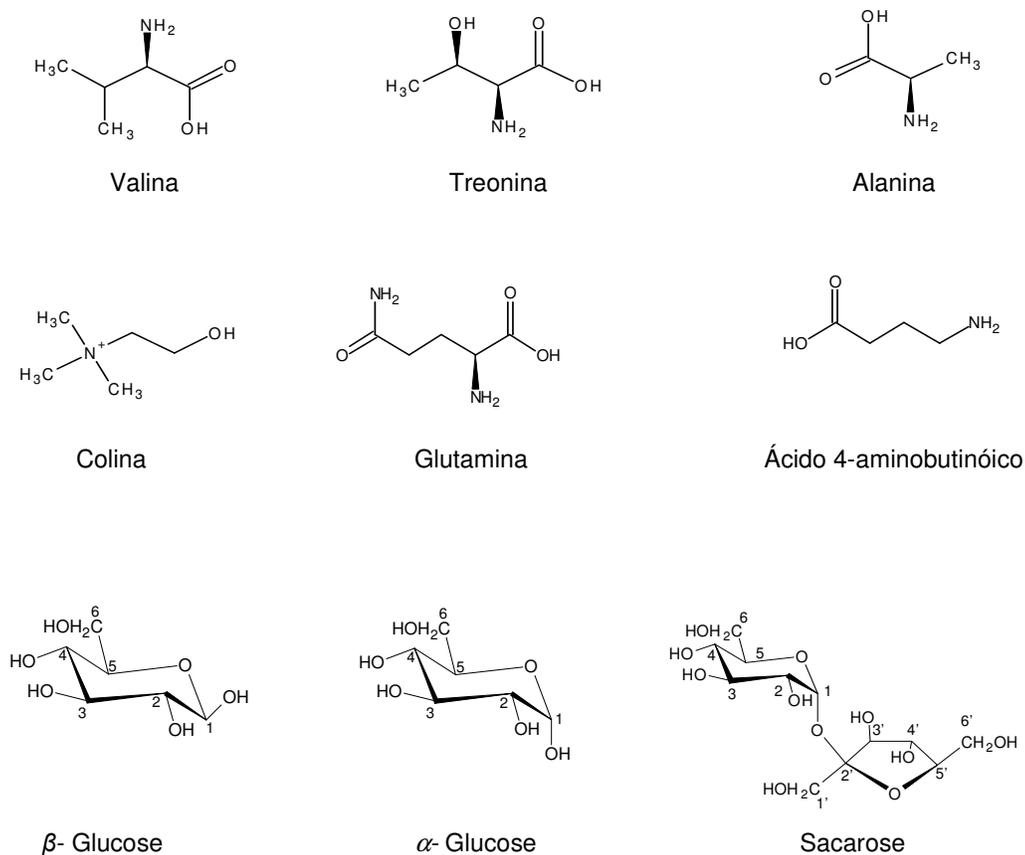
A atribuição dos sinais de RMN e a caracterização estrutural das substâncias presentes no extrato aquoso foram feitas sem nenhum processo de purificação ou isolamento, apenas concentraram-se os extratos, liofilizando e redissolvendo em solvente deuterado. A partir de então obtiveram-se os espectros de RMN necessários para a caracterização dos compostos majoritários, como açúcares, aminoácidos e para estes espécimes, um ácido clorogênico.

Todos os compostos caracterizados neste trabalho já foram estudados isolados e quantificados nestas espécies, e descritos na literatura (TANAE *et al*, 2007; SOBOLEV *et al*, 2003; NI *et al*, 1993), porém não foi encontrado nenhum estudo em que tenha sido feito a análise diretamente do extrato aquoso, como realmente é ingerido.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , foi possível identificar a presença de sinais comuns às duas espécies padrão, como sinais característicos de açúcares como os *doubletos* em  $\delta$  4,65, 5,24 e 5,42, referente aos hidrogênios

anoméricos das unidades de  $\beta$ -glucose,  $\alpha$ -glucose e sacarose respectivamente, além dos sinais característicos de aminoácidos como os *dubletos* em  $\delta$  1,00 e 1,05 referente aos hidrogênios das metilas da valina, que estão acoplado com seu o hidrogênio  $\beta$ ; os *dubletos* em  $\delta$  1,33 e 4,25, que se referem aos hidrogênios da metila da treonina, que acoplam com seu hidrogênio  $\beta$  e ao acoplamento do hidrogênio  $\alpha$  com hidrogênio  $\beta$ ; o *dublete* em  $\delta$  1,49 que se refere aos hidrogênios da metila da alanina que acoplam com o hidrogênio  $\alpha$ ; o *triplete* em  $\delta$  3,78 e que se refere aos hidrogênios da metila da glutamina que se acopla com seu hidrogênio  $\alpha$  e um *mutiplete* em  $\delta$  2,14 referente ao acoplamento do hidrogênio  $\beta$  com os hidrogênios  $\alpha$  e  $\gamma$ ; os *tripletos* em  $\delta$  2,31 e 3,02 se referem aos acoplamentos dos hidrogênios  $\alpha$  com  $\beta$  e  $\gamma$  com  $\beta$  do ácido 4-aminobutanóico e um *singlete* referente às metilas da colina.

Na figura 4.3 estão mostrados os sinais citados anteriormente na espécie *C. pachistachia*.



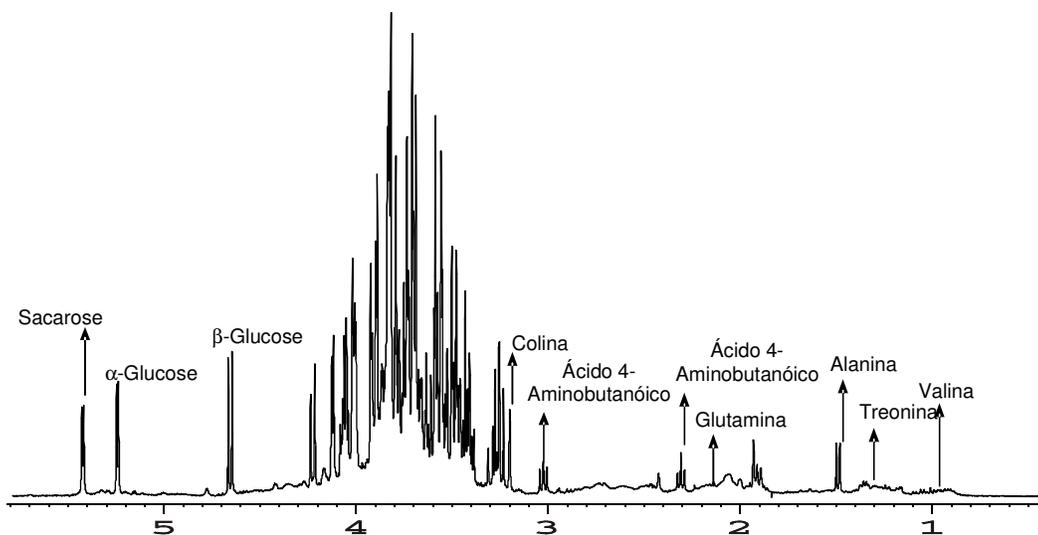


FIGURA 4.3 - Metabólitos primários presentes no extrato aquoso das duas espécies de embaúba.

A confirmação dos compostos mencionados anteriormente foi feita após a aquisição dos experimentos de RMN de *g*COSY e *g*HSQC, com o auxílio da literatura (SOBOLEV *et al*, 2003; NI *et al*, 1993).

Para os açúcares, os experimentos bidimensionais não permitiram a identificação de alguns sinais, devido à sobreposição de alguns deslocamentos químicos, causada principalmente pela proximidade desses, de maneira que a realização dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi necessária. A figura 4.4 mostra o espectro de *g*HSQC, destacando a complexidade dos sinais na região dos açúcares.

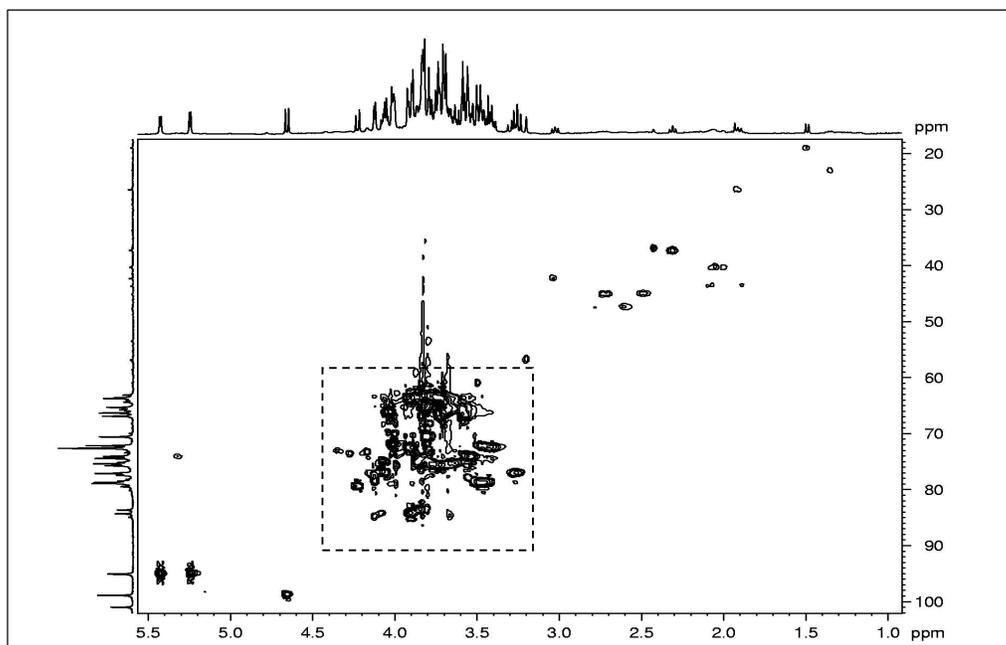


FIGURA 4.4 - Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no experimento de gHSQC da espécie *Cecropia pachistachia*.- destacando a complexidade da região referente aos sinais de açúcares

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , foi possível observar principalmente os sinais referentes aos açúcares conforme mostra figura 4.5

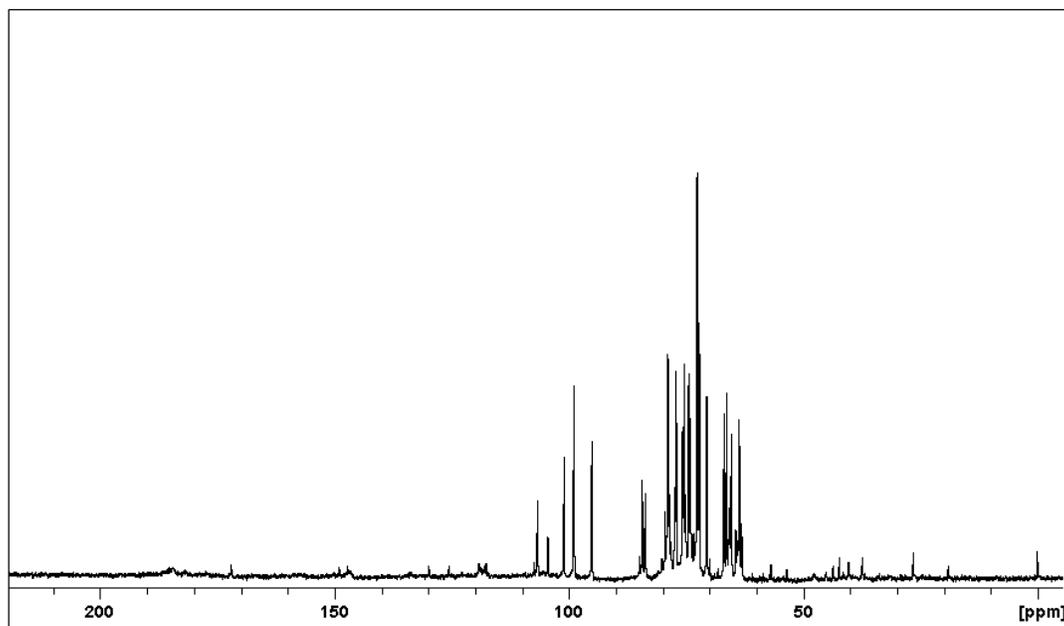


FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato aquoso da amostra da espécie *C. pachistachia*.

Fazendo uma análise detalhada do espectro de  $^{13}\text{C}$ , foi possível confirmar a presença dos açúcares já citados e da  $\beta$ -frutopiranosose e  $\beta$ -frutofuranose, através de alguns deslocamentos químicos característicos, como dos carbonos anoméricos e outros baseando-se em dados da literatura (SOLOBEV, 2003) (FIGURA 4.6 e 4.7).

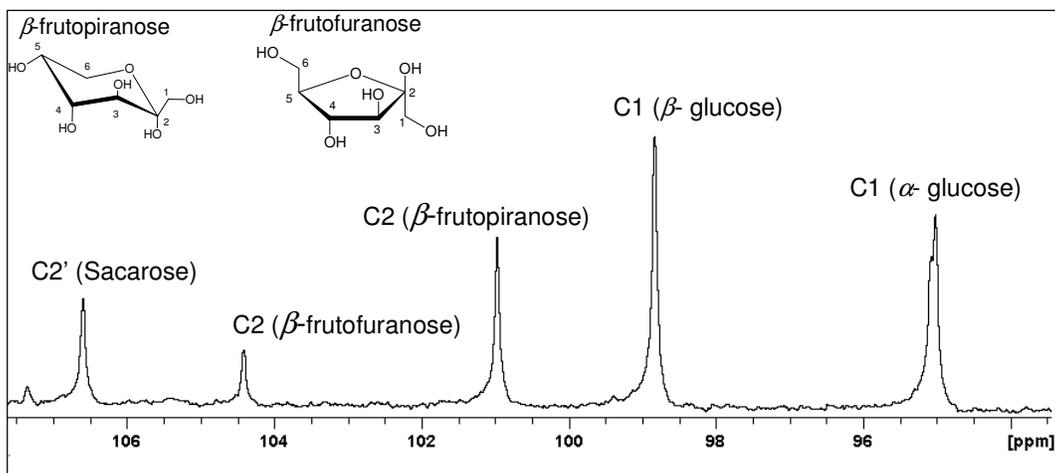
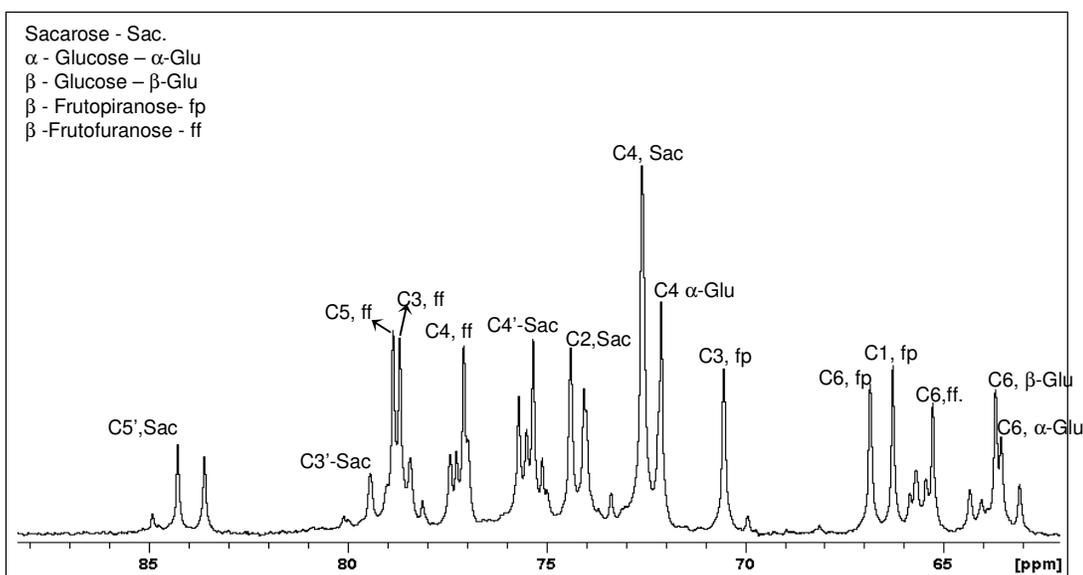


FIGURA 4.6 – Ampliação da região  $\delta$  93,4 a 107,6 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato aquoso da amostra da espécie *C. pachistachia*, em



destaque os sinais referente aos carbonos anoméricos da sacarose,  $\alpha$ -glucose e  $\beta$ -glucose.

FIGURA 4.7 – Ampliação da região  $\delta$  62,1 a 88,3 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato aquoso da amostra da espécie *C. pachistachia*.

Na tabela 4.1 estão apresentadas as demais atribuições dos deslocamentos químicos dos açúcares presentes nos extratos aquosos das duas espécies de embaúba utilizada neste trabalho.

TABELA 4.1 – Dados de RMN para os açúcares encontrados nas duas espécies de embaúba utilizadas como padrão - *Cecropia pachistachia* e *Cecropia Glaziovii*.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (mult., J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	gHCSC	gHMBC
<i><math>\alpha</math>-glucose</i>				
1	5,23 (d 3,75)	94,9	C1	C1, C2 e C3
2	3,51 - 3,59 m	74,3	C2	C3
3	3,71 - 3,78 m	75,4	C3	C2, C4 e C5
4	3,46 - 3,49 m	72,1	C4	C2 e C5
5	3,51 - 3,59 m	73,9	C5	C4
6	3,66 - 3,70 m	63,4	C6	C4 e C5
<i><math>\beta</math>-glucose</i>				
1	4,65 (d 7,96)	98,8	C1	C1, C2 e C3
2	3,23 (dd; 8,24 e 9,34)	76,9	C2	C1, C2 e C5
3	3,41 - 3,53 m	78,3	C3	C1, C2 e C4
4	3,35 - 3,46 m	72,1	C4	C3 e C5
5	3,41 - 3,53 m	78,4	C5	C1, C2 e C4
6	3,63 - 3,75 m	63,5	C6	C4
<i>Sacarose</i>				
1	5,42 (d 3,87)	95,0	C1	C3, C2', C4'
2	3,54 - 3,60 m	74,6	C2	-
3	3,73 - 3,78 m	75,5	C3	C4
4	3,37 - 3,44 m	72,6	C4	C3, C6
6	3,86	63,4	C6	C5'
1'	3,68	64,3	C1'	-
2'	-	106,6	C2'	-
3'	4,22 (d 8,76)	79,3	C3'	-
4'	4,07 (s)	75,3	C4'	C3', C5'
5'	3,90 (s)	84,2	C5'	C3', C2'
<i><math>\beta</math>-frutopirranose</i>				
1	3,51 - 3,55 m	66,2	C1	C2, C3 e C4
2	-	100,9	-	-
3	3,68 - 3,74 m	70,5	C3	C1, C2 e C4
4	3,85 - 3,90 m	72,2	C4	C1, C3 e C5
5	3,91 - 3,92 m	72,1	C5	C3
6	3,99 - 3,01 m	66,8	C6	C2 e C5
<i><math>\beta</math>-frutofuranose</i>				
1	3,62 - 3,65 m	65,4	C1	C2
2	-	104,1	-	-
3	4.10 - 4.13 m	78,7	C3	C4, C5 e C6
4	3,99 - 4,02 m	77,2	C4	C5 e C6
5	4,03 - 4,08 m	78,8	C5	C2
6	3,80 - 3,84 m	65,2	C6	C5

Para os aminoácidos não foi possível fazer a atribuição completa para as estruturas, pois além da grande quantidade de polissacarídeos presente no extrato, o que torna um espectro bastante congestionado, a concentração de aminoácidos era muito baixa.

Desta forma, foram feitas as atribuições através das correlações homonucleares  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  (*g*COSY), das correlações heteronucleares  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  (*g*HSQC) e com o auxílio da literatura.

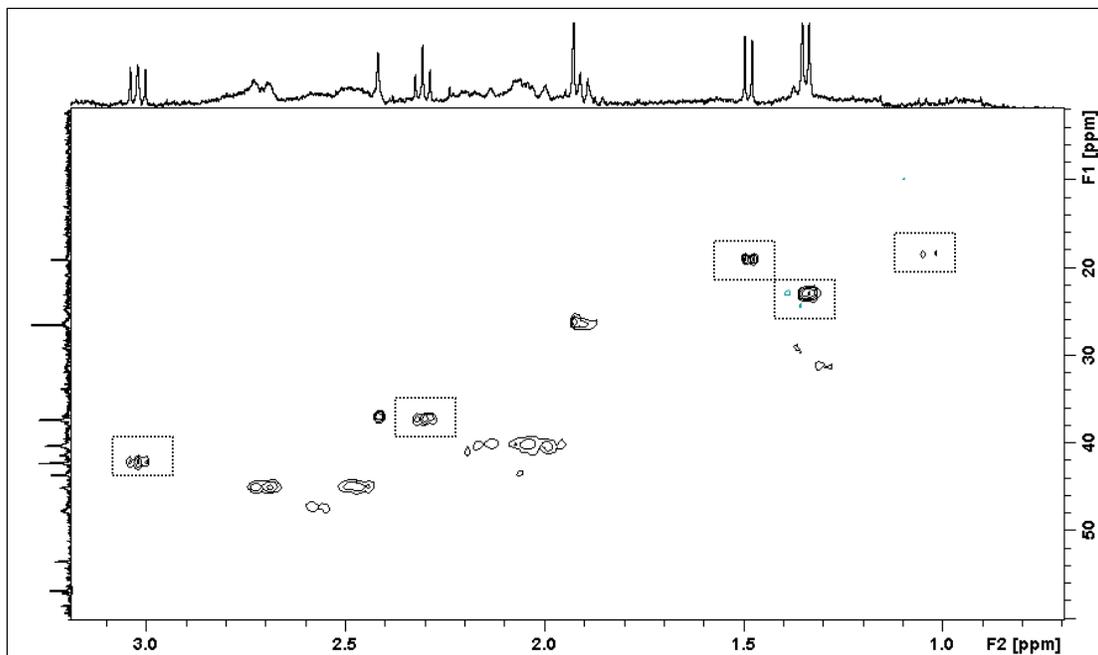


FIGURA 4.8 - Correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  observadas no experimento de *g*HSQC da espécie *Cecropia pachistachia*.- destacando as correlações observadas para os aminoácidos.

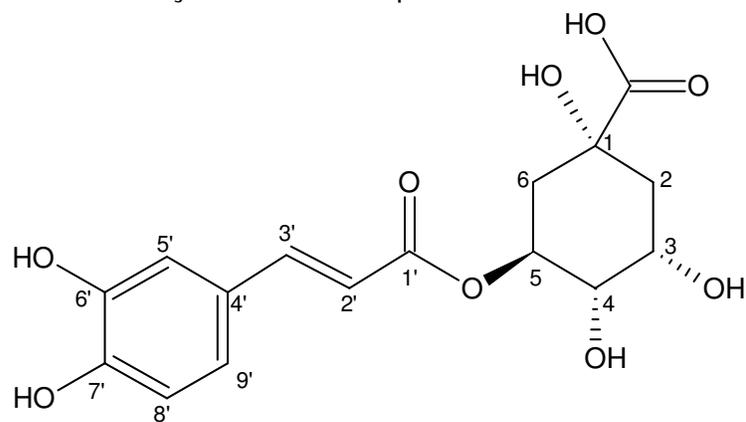
No experimento de *g*HSQC, foi possível atribuir parte dos valores do deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$ , através das correlações  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ , como mostra a figura 4.8.

A seguir está apresentada a tabela com as atribuições dos sinais de RMN que foram possíveis de serem observadas.

TABELA 4.2 - Metabólitos primários e seus respectivos sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., $J$ em Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$
Valina		
1	1,00 ( <i>d</i> 7,18)	
2	1,05 ( <i>d</i> 7,18)	
3		
Treonina		
1	1,33 ( <i>d</i> 6,66)	23,0
2	4,22	
3		
Alanina		
	1,49 ( <i>d</i> 7,28)	
Glutamina		
	3,78 <i>m</i>	-
	2,14 <i>m</i>	26,5
Ácido 4-aminobutanóico		
	2,31 ( <i>t</i> 7,20)	37,3
	3,02 ( <i>t</i> 7,41)	40,3
Colina		
	3,21 <i>s</i>	56,8

Além destes compostos, foi possível identificar o ácido cafeoilquínico, que já foi isolado e elucidado em ambas as espécies de embaúba empregadas nesse trabalho, e já está descrito na literatura, e aqui também a sua caracterização no extrato aquoso.



Ácido cafeoilquínico

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foi possível verificar sinais característicos do ácido cafeoilquínico como os *dubletos* em  $\delta$  6,93 e 7,06 e o *singlete* em  $\delta$  7,10 que corresponde aos hidrogênios aromáticos H-8', H-9' e H-5' além dos dois *dubletos* em  $\delta$  7,63 e 6,37 que corresponde aos H-3' e H2' referente aos hidrogênios da dupla ligação da cadeia lateral (FIGURA 4.9)

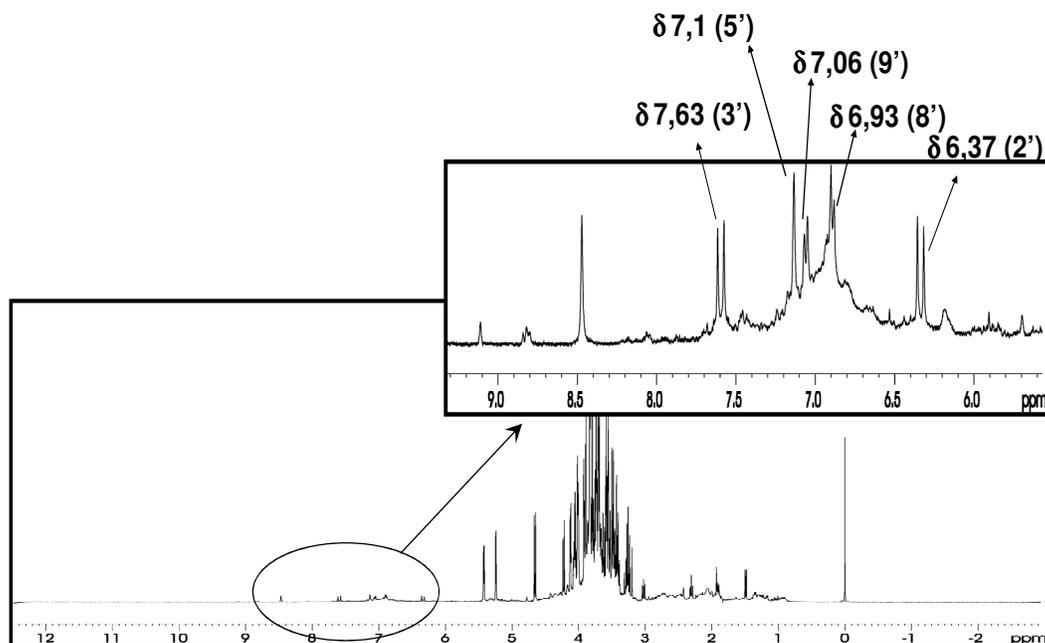


FIGURA 4.9 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com as atribuições do ácido cafeoilquínico.

Nos experimentos de *g*HSQC e *g*HMBC (FIGURA 4.8 e 4.9) foi possível obter as informações sobre as correlações  $^1J_{\text{CH}}$  e  $^nJ_{\text{CH}}$ , permitindo confirmar a estrutura do ácido cafeoilquínico. No *g*HSQC, foi possível verificar as correlações dos hidrogênios aromáticos com os seus respectivos carbonos, como o *dubletos* em  $\delta$  6,36, 7,63 e 7,10 referente aos hidrogênios H-2' H-3' e H-5', correlacionado-se com os carbonos C-2' ,C-3' e C5' em  $\delta$  117,6, 148,8 e 118,0, respectivamente. No experimento de *g*HMBC, verificou-se as correlações a longa distância do hidrogênio em  $\delta$  7,63 com os carbonos C-8', C6' e C9'. No espectro de  $^{13}\text{C}$ , caracterizou-se os carbonos quartenários C1' C6' e C7' em  $\delta$  172,0, 147,1 e 150,0 respectivamente, além do carbono C7 em  $\delta$  181,8. As demais atribuições encontram-se na tabela 4.3

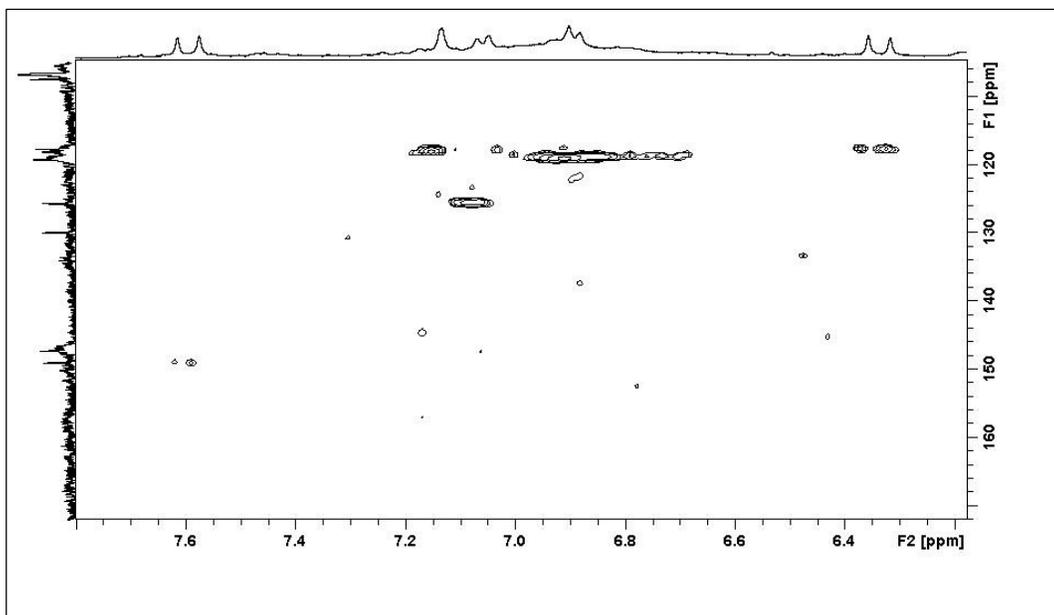


FIGURA 4.10 – Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no experimento de gHSQC do extrato aquoso da espécie *C. glaziovii*, evidenciando os sinais do ácido cafeoilquínico.

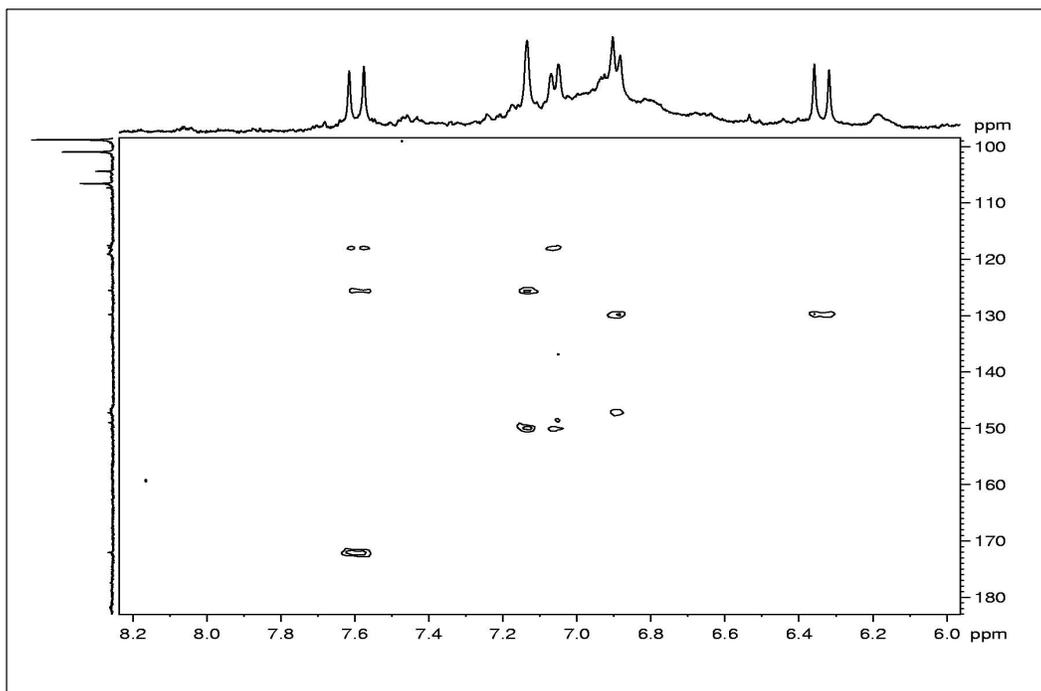


FIGURA 4.11 – Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no experimento de gHMBC do extrato aquoso da espécie *C. glaziovii*, evidenciando os sinais do ácido cafeoilquínico

TABELA 4.3 - Dados de RMN para o composto ácido cafeoilquínico encontrado no extrato aquoso das duas espécies de embaúba e utilizadas como padrão - *Cecropia pachistachia* e *Cecropia Glaziovii*.

Posição	$\delta$ <sup>1</sup> H (mult., J em Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	gCOSY	gHSQC	gHMBC
1'	-	172,0	-	-	-
2'	6,37 ( <i>d</i> 8,29)	117,6		C2'	C4'
3'	7,63 ( <i>d</i> 15,99)	148,8	6,36	C3'	C1'; C5' e C9'
4'	-	129,8	-	-	-
5'	7,13 ( <i>d</i> 1,52)	118,0	-	C5'	C9' e C3'
6'	-	147,1		-	-
7'	-	150,0	-	-	-
8'	6,93 ( <i>d</i> 3,12)	119,1	-	C8'	C4' e C6'
9'	7,06 ( <i>dd</i> 8,29 e 1,52)	125,5	6,93	C9'	C3'e C5'
1	-	77,0	-	-	-
2	1,98 - 2,08 ( <i>m</i> )	40,1		C2	C7
3	3,2( <i>s</i> )	70,5	-	C3	C4
4	3,95-4,10 ( <i>m</i> )	72,6	3,5	C4	C3
5	5,15 ( <i>d</i> 3.65)	72,1	-	-	-
6	1,98 - 2,08 ( <i>m</i> )	37,3	-	C6	C7
7	-	181,8	-	-	-

#### 4.1.1.2 - Análise quimiométrica dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras em solução.

Para a análise quimiométrica, utilizaram-se os dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução, o que corresponde ao “chá” na sua forma usual de ingestão, o qual foi obtido tanto para as amostras comerciais como para os padrões.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos padrões coletados em diferentes estações do ano (períodos de chuva e estiagem) são mostrados nas figuras 4.12 e 4.13. Porém não se observou diferença significativa entre estes espectros.

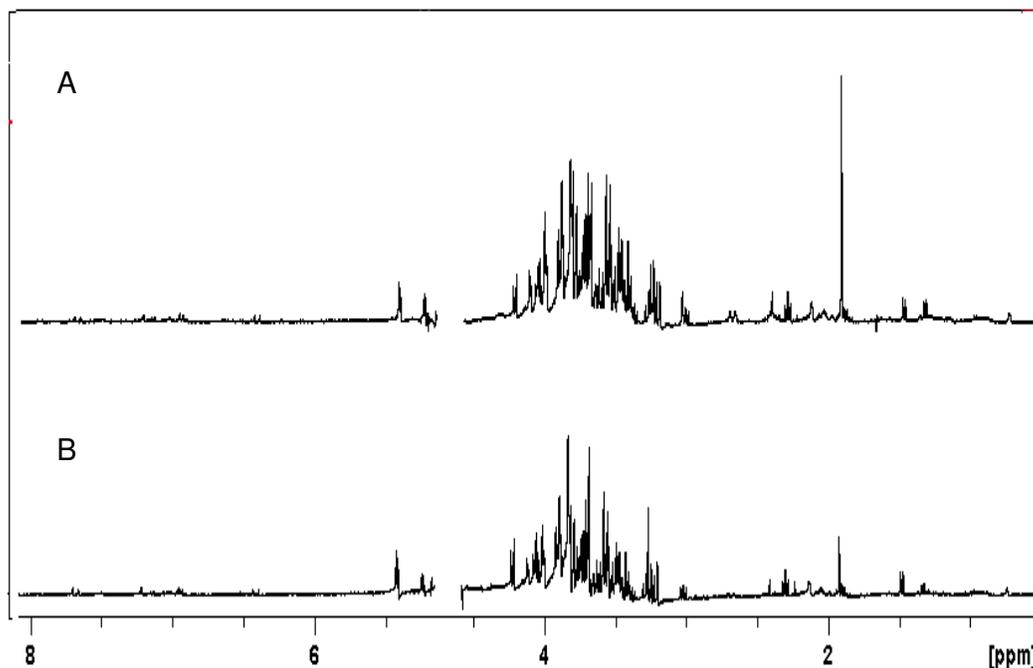


FIGURA 4.12 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução para amostras de *C. pachistachia* coletadas nos períodos de chuva (A) e estiagem

(B).

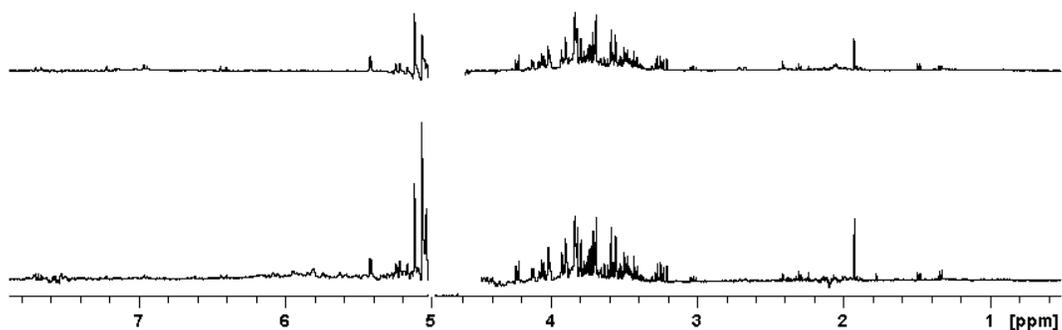


FIGURA 4.13 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução para amostras de *C. glaziovii* coletadas nos períodos de chuva (A) e estiagem (B).

Para a análise quimiométrica, foram utilizadas as duas amostras padrão (*C. pachistachia* e *C. glaziovii*) coletadas em períodos diferentes (estiagem e chuvoso) e as seis amostras comerciais. Inicialmente foi excluída a região espectral referente ao resíduo do sinal da água, ainda presente, e o sinal referente ao TMS- $\text{d}_4$  e todas as regiões sem sinais (FIGURA 4.14). Desta forma evita-se que essas variáveis interferissem na análise e para que os dados pudessem ser autoescalados durante o pré-processamento. Esse procedimento permite que os sinais menos intensos tenham a mesma importância que os mais intensos, assim, dando-se o mesmo peso aos constituintes minoritários, e que tem conseqüentemente baixa intensidade.

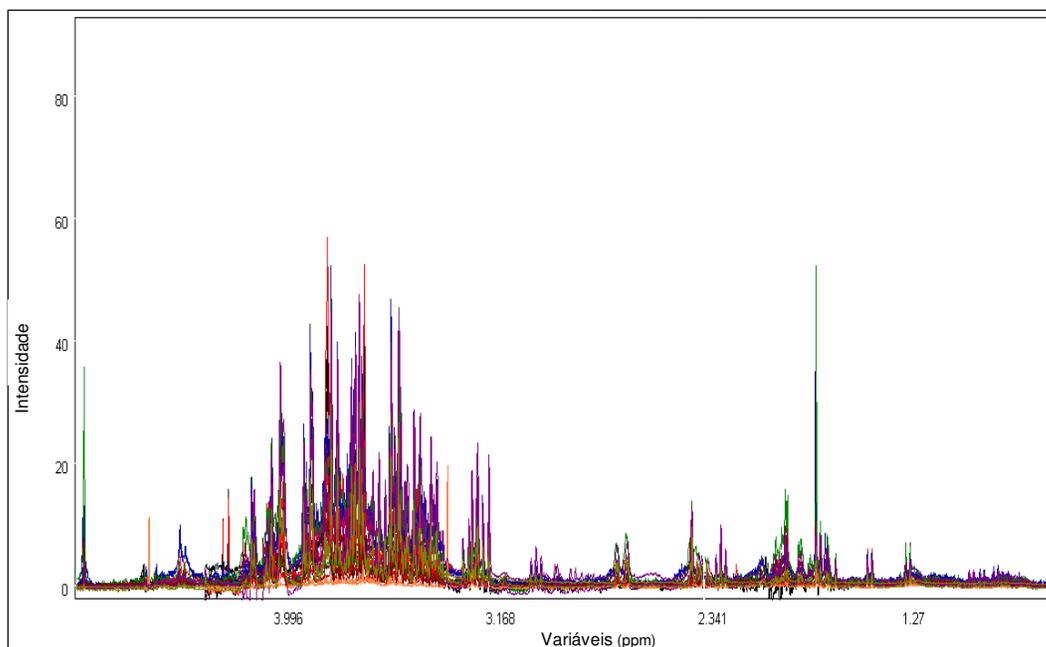


FIGURA 4.14 – Visualização dos gráficos de linhas dos dados RMN de  $^1\text{H}$  em solução após as exclusões necessárias das amostras de embaúba

Em busca da discriminação entre os padrões, e desta maneira relacionar as amostras comerciais com os mesmos, fez-se a análise por componentes principais (PCA).

A melhor discriminação obtida pela PCA dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução foi obtida quando os dados foram normalizados, para corrigir eventuais erros nas concentrações, e usada a primeira derivada em um intervalo de vinte cinco pontos, para corrigir eventuais erros na linha de base.

Desta maneira foi possível fazer a análise dos componentes principais utilizando 82,9% dos dados originais descritos por cinco componentes principais. O gráfico de escores obtido está na figura 4.15.

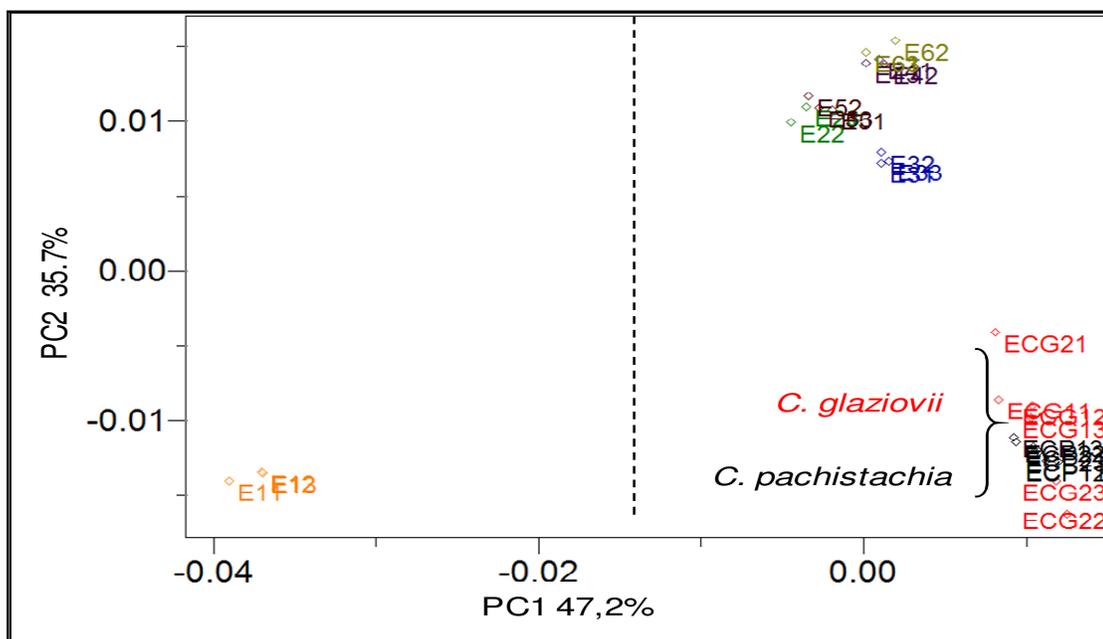


FIGURA 4.15 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução de todas as amostras de embaúba

Analisando-se o gráfico de escores, obtido da análise por PCA selecionado as duas primeiras PCs, com a PC1 descrevendo 47,2% de variância do conjunto de dados e com a PC2 descrevendo 35,7%, pode-se observar que não há discriminação entre os padrões, e que uma amostra comercial apresenta-se distinta das demais em valores negativos de PC1 e agrupadas aos padrões por valores negativos de PC2.

Fez novamente a análise, porém excluindo-se a amostra E1, e obteve-se um novo gráfico de escores que está apresentado na figura 4.16, com PC1 descrevendo 45,2% de variância do conjunto de dados e com PC2 descrevendo 34,4%. Neste novo gráfico de escores observa a discriminação das amostras comerciais por valores positivos de PC1.

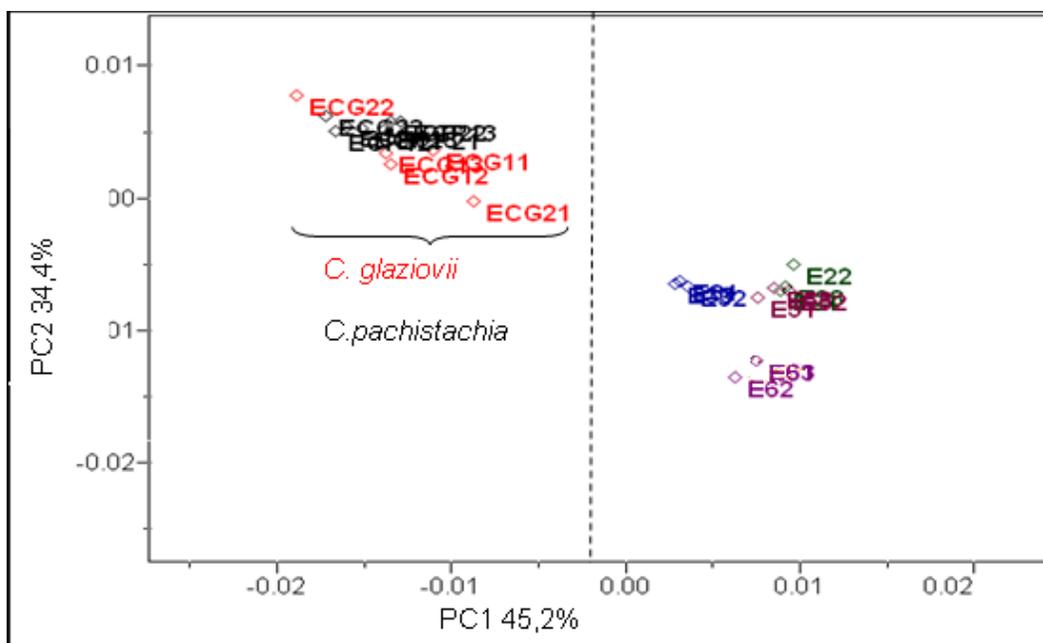


FIGURA 4.16 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução das amostras de embaúba, após a exclusão da amostra E1.

Relacionado o gráfico de escores e o gráfico de *loadings* (FIGURA 4.17) foi possível identificar, nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , algumas substâncias relacionadas com a discriminação obtida no gráfico de escores.

A amostra E1 se distingue das demais em valores negativos de PC1 devido ausência dos sinais em  $\delta$  2,31 e 3,02 do ácido 4-aminobutanóico e do sinal em  $\delta$  5,42 da sacarose e a presença de um sinal em  $\delta$  7,72 que não foi possível ser identificado (FIGURA 4.17). As demais amostras se distinguem por valores positivos de PC2, apenas pela ausência dos sinais referente à sacarose. Feita esta análise, pode-se suspeitar que a amostra E1 seja uma provável adulteração ou amostra pertencente à outra espécie.

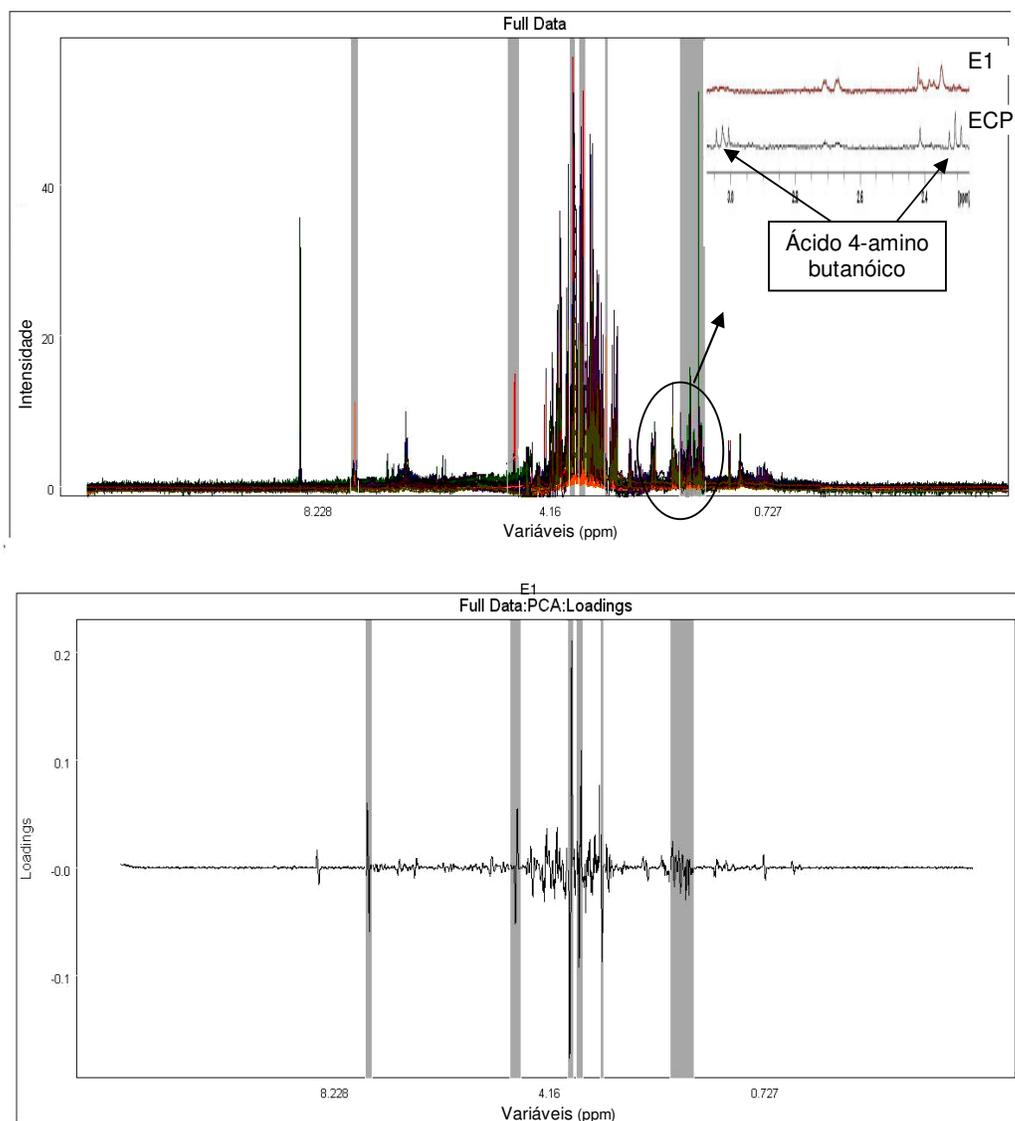


FIGURA 4.17 - Gráfico de linhas e gráfico de *loadings* com as regiões em valores negativos em PC1 sombreados, e em destaque os sinais em  $\delta$  2,31(t) e 3,02(t) do ácido 4-aminobutanóico.

Na análise por agrupamentos hierárquicos (HCA) foram usados os mesmos parâmetros quimiométricos aplicados na PCA, onde o cálculo da distância entre as amostras foi feito aplicando a distância Euclidiana e o método de conexão foi o incremental, o qual utiliza a média ponderada no cálculo da distância entre os grupos. O dendrograma obtido está apresentado na figura 4.18.

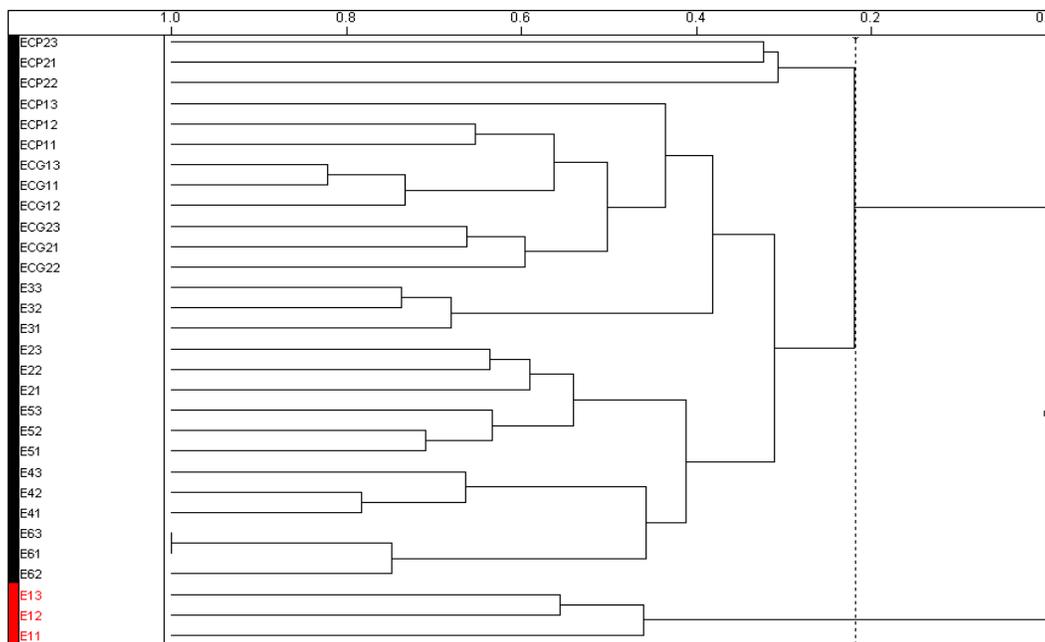


FIGURA 4.18 – Dendrograma dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução de todas as amostras de embaúba

Neste dendrograma, obteve-se a mesma discriminação obtida pela PCA com um índice de similaridade igual a 0,218, ou seja, a amostra E1 discrimina-se das demais, e o restante das amostras se agrupam com os padrões, e estes por sua vez não apresenta discriminação por sazonalidade.

#### 4.1.2. - Análise das amostras intactas por RMN HRMAS de $^1\text{H}$

Os espectros de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  foram obtidos diretamente do material vegetal intacto previamente moído, tanto para as amostras comerciais bem como para os padrões, utilizando a sequência de pulso CPMG editada, que proporcionou uma melhora na resolução espectral comparado com as sequências convencionais, pois sinais alargados das macromoléculas com tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) curto são eliminados não ocorrendo assim a sobreposição de sinais e suprime o sinal da água presente na amostra.

Assim como para RMN de  $^1\text{H}$  em solução, foram obtidos espectros dos padrões coletados em diferentes estações do ano (períodos de chuva e estiagem), os quais estão apresentados na figura 4.19.

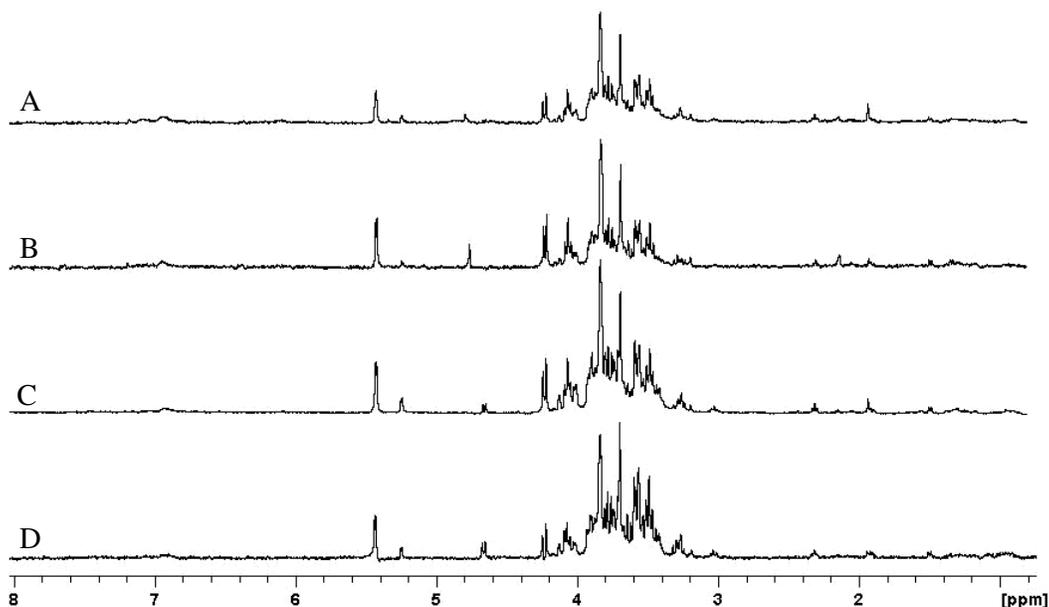


FIGURA 4.19 - Espectros de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  para amostras padrão de embaúba; A e B - *C. pachistachia*, C e D - *C. glaziovii*, períodos chuvoso e seco respectivamente

Os espectros obtidos para as amostras padrões apresentaram um alto grau de similaridade, tanto entre as espécies quanto ao período de coleta das amostras.

Observou-se também que os espectros apresentaram majoritariamente sinais de açúcares como sacarose,  $\alpha$ -glucose e a  $\beta$ -glucose, e

que foram caracterizados pela presença dos *dubletos* em  $\delta$  5,42; 5,24 e 4,65, referentes aos hidrogênios ligados aos seus carbonos anoméricos respectivamente. O alto grau de similaridade entre os espectros de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  já era esperado, isto em decorrência de se analisar material vegetal intacto, onde a quantidade de metabólitos primários sobressai aos metabólitos secundários.

#### **4.1.2.1 - Análise quimiométrica dos dados de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ das amostras intactas.**

Para a análise dos dados de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  excluíram-se as regiões espectrais referentes ao sinal do TMS- $d_4$ , ao resíduo do sinal da água e todas as regiões sem sinais (FIGURA 4.20). Para a PCA escalou-se os dados e aplicaram-se as transformadas necessárias (normalização e primeira derivada em um intervalo de 25 pontos).

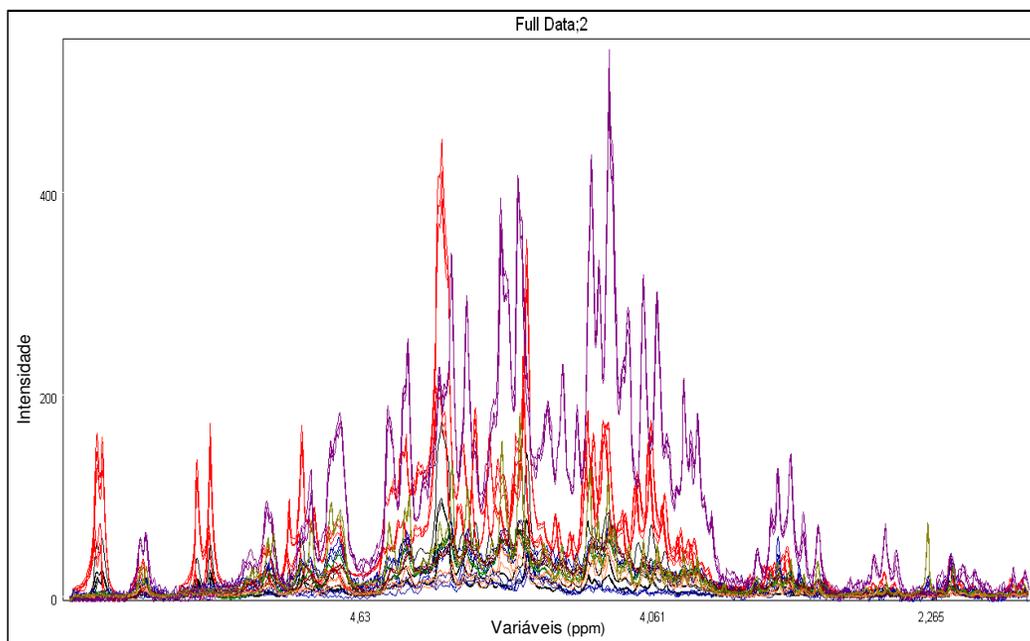


FIGURA 4.20 – Visualização dos gráficos de linhas dos dados RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  das amostras intactas de embaúba após as exclusões necessárias.

O gráfico de escores de PC1 x PC2 de todas as amostras está apresentado na figura 4.21, o qual utiliza 63,5% das informações originais, descritos por cinco componentes principais. Selecionado as duas primeiras PCs, com a PC1 descrevendo 23,6% de variância do conjunto de dados, e com a PC2 descrevendo 12,3%, verifica-se que as amostras comerciais se discriminam dos padrões em valores negativos de PC1 e a amostra E3 discrimina das demais em valores negativos de PC2 e PC1. Nota-se também a dispersão na triplicada das amostras E2 e E3, causada pela dificuldade que a técnica HRMAS proporciona, como a de inserir a mesma quantidade de amostra no rotor para todas as análises.

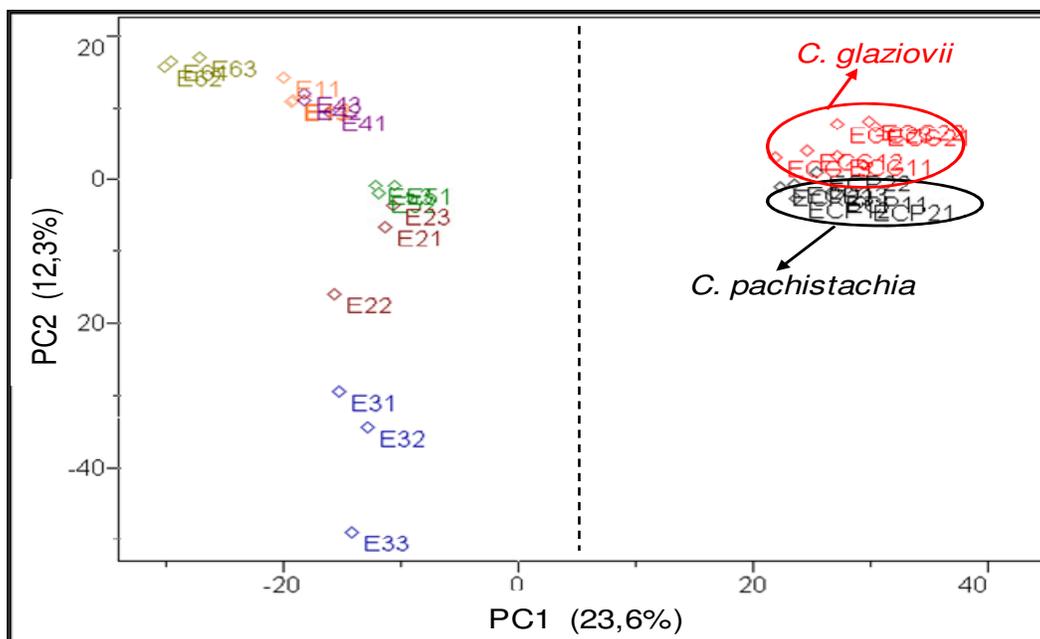


FIGURA 4.21 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  de todas as amostras de embaúba.

Relacionado os valores das componentes principais dos gráficos de escores aos valores do gráfico de *loadings*, foi possível verificar que a discriminação observada em PC1 foi causada pela ausência do sinal em  $\delta$  5.42, referente às unidades de sacarose e dos demais sinais na região de  $\delta$  3,0 a 4,2 (FIGURA 4.22 e 4.23). Na análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução, também foi possível verificar a ausência dos sinais citados anteriormente, porém os sinais dos aminoácidos observados, aproximaram as amostras comerciais dos padrões, e agora como estes não foram detectados, todas as amostras se discriminam.

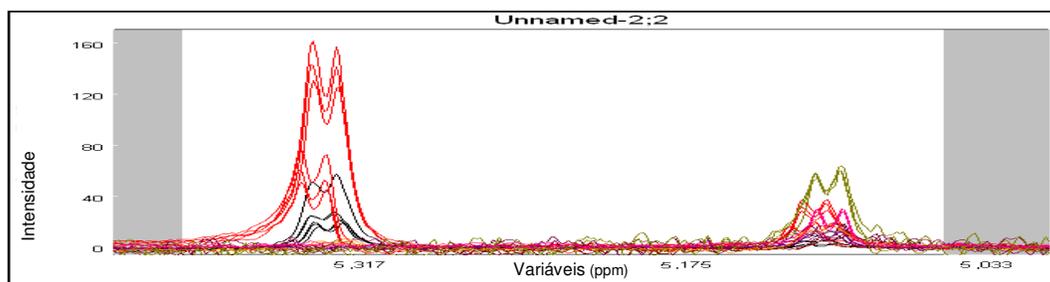


FIGURA 4.22 – Ampliação do gráfico de linhas dos dados de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$ , mostrando a ausência do sinal em  $\delta$  5,4. As linhas em vermelho referem-se amostras de *C. glaziovii* e em preto, as amostras de *C. pachistachia*.

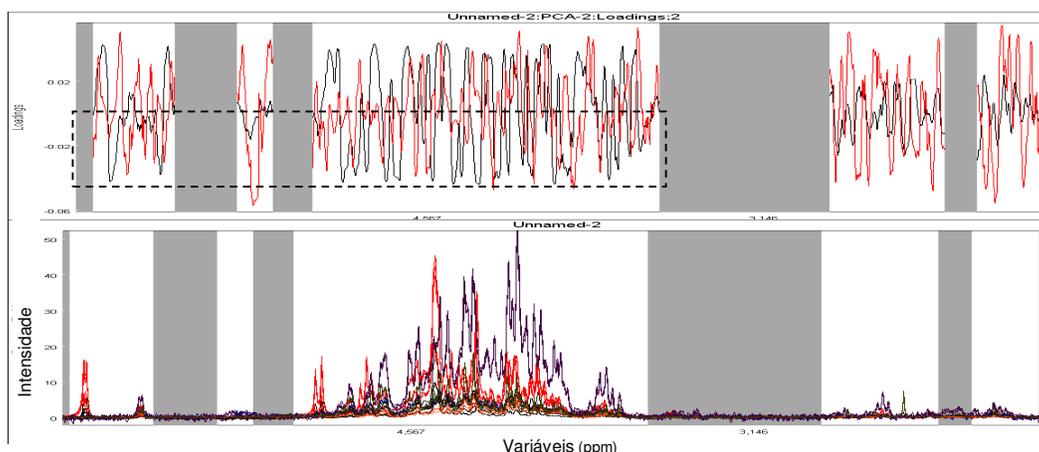


FIGURA 4.23 - Gráfico de linhas e gráfico de *loadings* PC1 x PC2, destacando a região responsável pela discriminação por PC1.

Fez-se também a análise por HCA, utilizando os mesmos parâmetros aplicados para PCA, e utilizando a distância Euclidiana e o método de conexão incremental, e obteve-se o dendrograma apresentado na figura 4.24. Nesta figura pode-se observar que com um índice de similaridade igual a 0,433, onde três amostras comerciais se agrupam com o padrão *C. Pachistachia* e não se observa nenhum outro agrupamento.

Diante os resultados obtidos pela análise dos dados de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$ , nota-se que esta não é uma boa ferramenta para o controle de qualidade, pois detectou apenas os sinais de açúcares, não permitindo fazer uma análise conclusiva a respeito da sazonalidade, e muito menos para a distinção entre as espécies, sendo que estas apresentam basicamente os mesmos metabólitos primários.

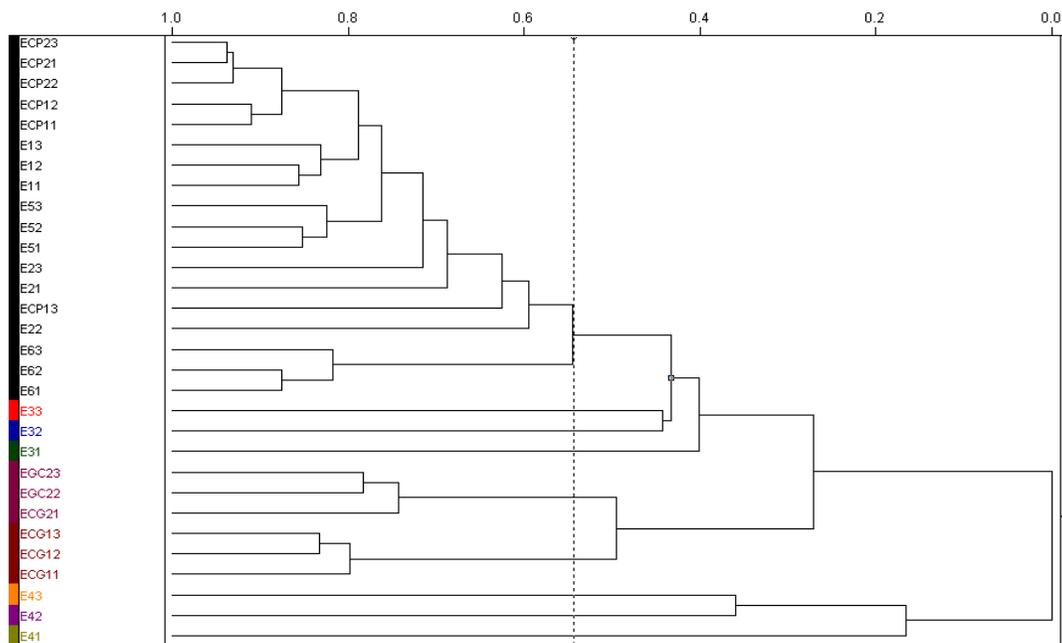


FIGURA 4.24 – Dendrograma dos dados de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  de todas as amostras de embaúba

#### 4.1.3. - Análise das amostras intactas por infravermelho

Para as análises espectroscópicas na região do infravermelho, assim como nas análises dos dados de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$ , utilizaram-se amostras apenas previamente moídas. Os espectros de IV foram obtidos em absorbância para a aplicação da quimiometria, pois a transmitância não varia linearmente com a concentração, e os métodos quimiométricos são desenvolvidos para considerar essa variável.

Todos os espectros foram analisados e as absorções foram identificadas mediante a comparação com dados da literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER,1998). Os espectros apresentaram absorções características de estiramento de O–H em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  3375. Porém, como estas podem ser provenientes de moléculas de água presente devido a higroscopicidade do KBr e da amostra, pelo menos em parte, essa absorção foi

desconsiderada nas análises. Observou-se também a presença de absorções características devido ao estiramento de C–H de metilenos em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  2850 e 2920, deformação axial das ligações C-C de carbonilas em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1600, deformação angular assimétrica fora do plano de C–H de metilas em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1200-1500, C–O de ésteres/éter em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1100 e em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1050 referentes às deformações axiais simétricas de C-O-H açúcares (FIGURA 4.25).

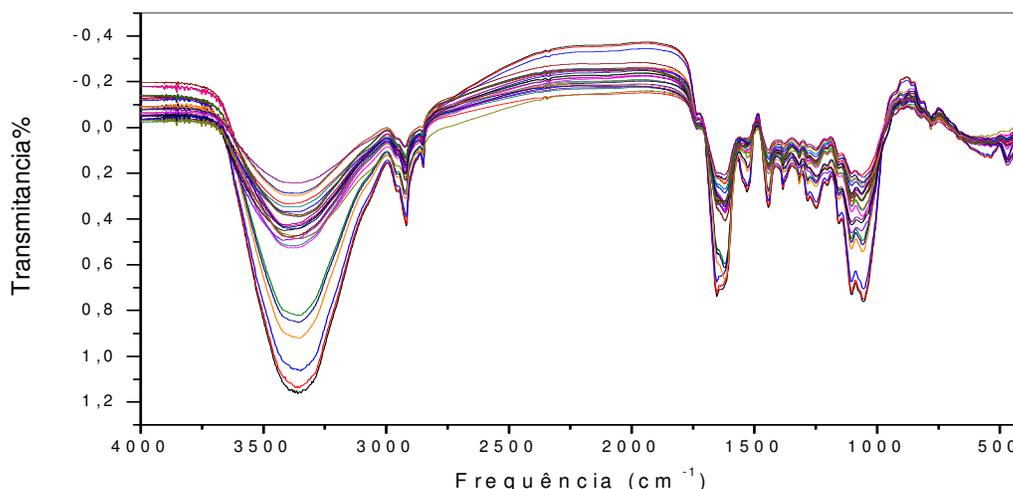


FIGURA 4.25 – Visualização dos espectros de IV das amostras padrão e comercial de embaúba.

Para a análise foram excluídas regiões de  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  4000 a 3001, referentes à absorção de OH e a região de  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  2827 a 1747, que não possuíam informações relevantes para a discriminação das amostras. (FIGURA 4.26)

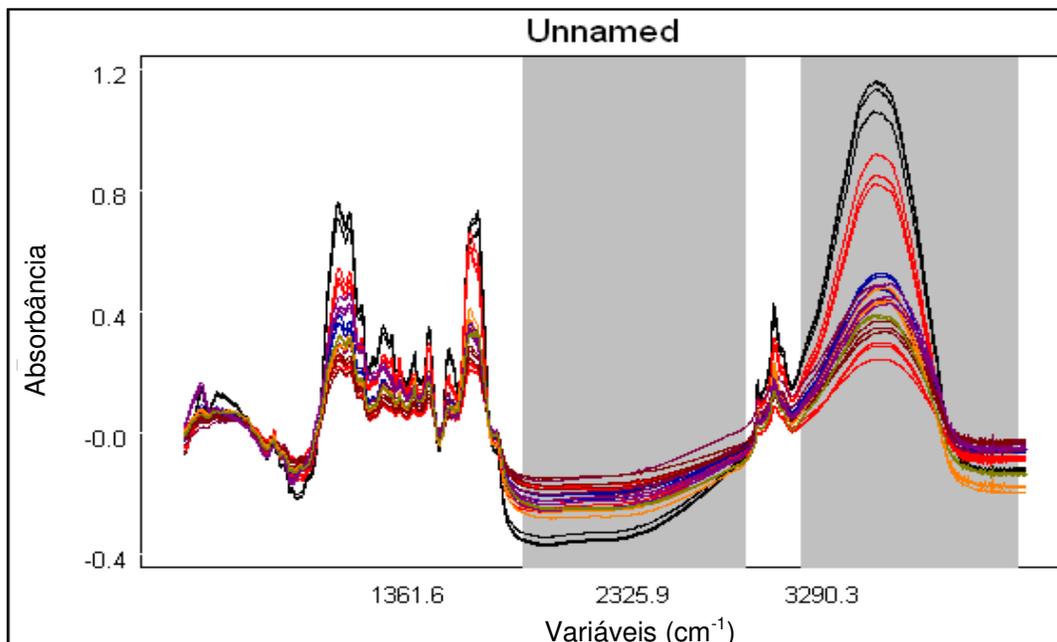


FIGURA 4.26 – Gráfico de linhas dos dados de IV das amostras padrão e comercial de embaúba, com as regiões excluídas em destaque.

A análise dos componentes principais (PCA) foi feita, centrando os dados na média, ou seja, emprega-se um pré-processamento que trás a origem dos eixos para zero, e facilita a visualização das correlações entre as amostras (BEEBE *et al*, 1998). Para as transformações utilizaram-se a normalização dos dados, e a primeira derivada em um intervalo de vinte cinco pontos.

Nestas condições foram utilizados 93 e 89% dos dados originais descritos por cinco componentes principais. Selecionando a PC1 que descreve 27,5% da variância do conjunto de dados e a PC2 que descreve 35,4%, obteve-se o gráfico de escores apresentado na figura 4.27.

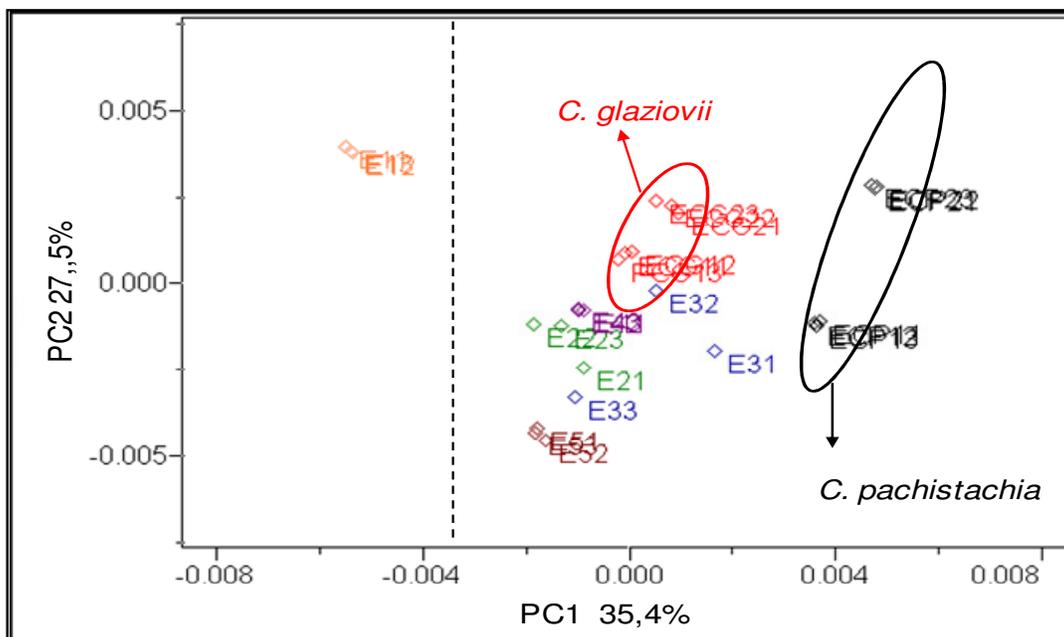


FIGURA 4.27- Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de IV de todas as amostras de embaúba.

Analisando o gráfico de escores, observou-se a discriminação da amostra E1 por valores negativos de PC1 e positivos PC2, uma proximidade da maioria das amostras comerciais com a amostra padrão *C. glaziovii* (ECG) e uma discriminação das amostras padrão (ECP) em valores positivos de PC1. Nota-se também que há uma discriminação por PC2 entre os períodos de coleta das amostras padrão, de maneira que as amostras coletadas no período chuvoso (EP1) têm valores menores de PC2 do que os coletados no período de seca (EP2).

Relacionado o gráfico de *loadings* com o gráfico de escores (FIGURA 4.28), foi possível correlacionar algumas absorvâncias com as discriminações obtidas. Nota-se que as absorvâncias em  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1670 (def. axial C=O), 1550 (def. angular C-H) e 940 (def. axial C-C) tiveram maior peso para a discriminação em valores negativos de PC1, e a absorvância em  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  2940 (deformação axial de C-H), para valores positivos em PC2 para a amostra E1.

Mesmo identificando as absorções com maior peso para a discriminação, não foi possível relacionar com os compostos já identificados anteriormente. Podemos apenas dizer que se teve uma discriminação semelhante à obtida com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução.

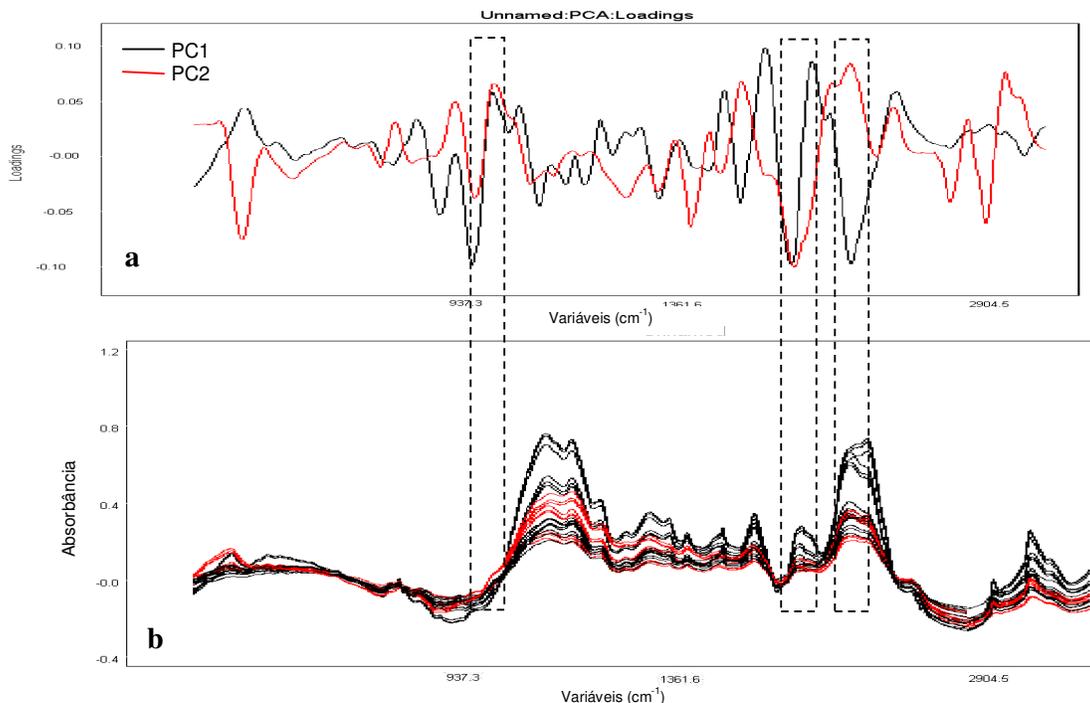


FIGURA 4.28 - Gráfico de *loading* (a) dos dados de IV (b), destacando as variáveis de maior peso para a discriminação da amostra E1

A discriminação da amostra E1 também se observa pela análise por HCA com índice igual a 0,263, utilizando o método incremental e a distância Euclidiana. O dendrograma resultante está representado na figura 4.29.

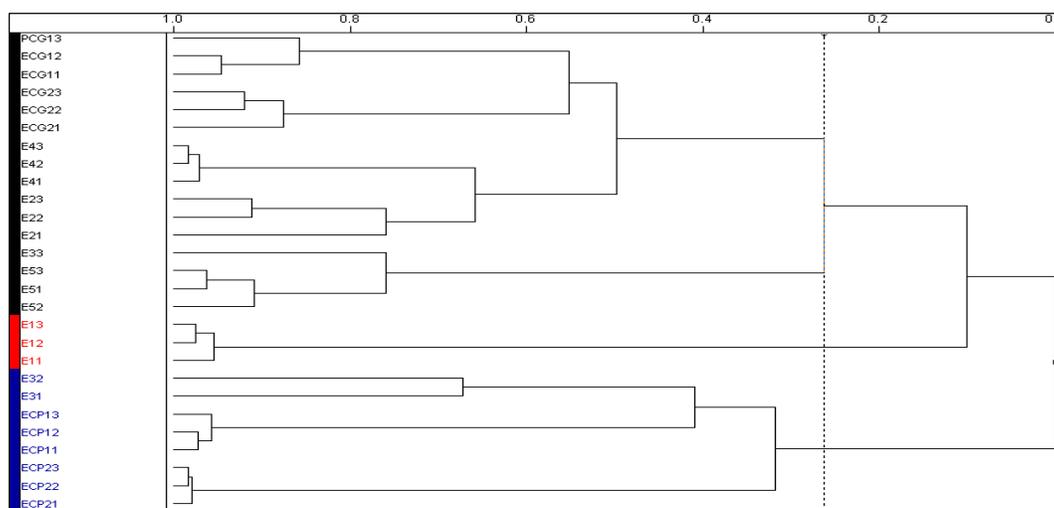


FIGURA 4.29 - Dendrograma dos dados de IV de todas as amostras de embaúba.

#### 4.1.4 - Conclusões

Pelas três técnicas foi possível obter o *fingerprint* de maneira rápida e eficiente. Através dos espectros de RMN foi possível caracterizar alguns compostos majoritários como os açúcares: sacarose,  $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose,  $\beta$ -frutofuranose e  $\beta$ -frutopiranosose; dos aminoácidos: valina, alanina, treonina, ácido 4-aminobutanóico, glutamina e do ácido clorogênico (ácido cafeoilquínico).

A análise exploratória dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução mostrou que a amostra E1 é uma provável adulteração, pois discriminou das demais. Relacionando-se o gráfico de escores com o gráfico de *loadings*, verificaram-se várias diferenças na composição desta amostra como: a ausência do açúcar sacarose e do ácido 4-aminobutanóico, além da presença de um sinal em  $\delta$  7,72 que não foi possível ser identificado

Para os dados de RMN de HRMAS de  $^1\text{H}$ , a discriminação obtida pela quimiometria evidenciou apenas as diferenças nos açúcares presentes nas amostras, já que não foi possível detectar os compostos minoritários, como os aminoácidos. Desta forma a amostra E1 se agrupada com as demais amostras comerciais, porém distante dos padrões.

Para efeito comparativo analisaram-se os dados de IV por quimiometria e os resultados obtidos foram semelhantes aos apresentados para RMN de  $^1\text{H}$  em solução, porém não pode-se associar nenhum composto com a discriminação obtida para estes dados.

Apesar de não ter obtido a discriminação entre as espécies pode se concluir que resultados obtidos foram satisfatórios, e apresenta um grande potencial no emprego de controle de qualidade, principalmente empregando RMN de  $^1\text{H}$  em solução, o qual permitiu caracterizar um maior número de compostos e correlacionar estes com a discriminação apresentada na análise quimiométrica.

# Ginseng brasileiro

## 4.2- Ginseng Brasileiro

### 4.2.1- Análise dos extratos aquosos por RMN em solução

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  de líquido foi feita utilizando o mesmo procedimento empregado para obtenção dos extratos aquosos de embaúba, ou seja, chás resultantes de infusão, porém neste caso empregaram-se as raízes do ginseng brasileiro, que é a parte da planta, segundo a literatura, que contém os compostos com atividade biológica.

Assim, quando as amostras comerciais eram adquiridas sob a forma de cápsulas, estas foram apenas desencapsuladas e peneirada, e quando adquiridas sob a forma de raiz intacta ou fatiada, estas foram previamente pulverizadas em um moinho de facas, e em seguida os chás foram obtidos.

Para a obtenção das medidas foi necessário, também o emprego da sequência de pulso noesypr1d para supressão do sinal da água, que é bastante intenso, por se tratar de um extrato aquoso.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução das amostras utilizadas como padrão neste estudo (*Pfaffia panicula* e *Pfaffia glomerata*) foram adquiridos e estão apresentados na figura 4.30.

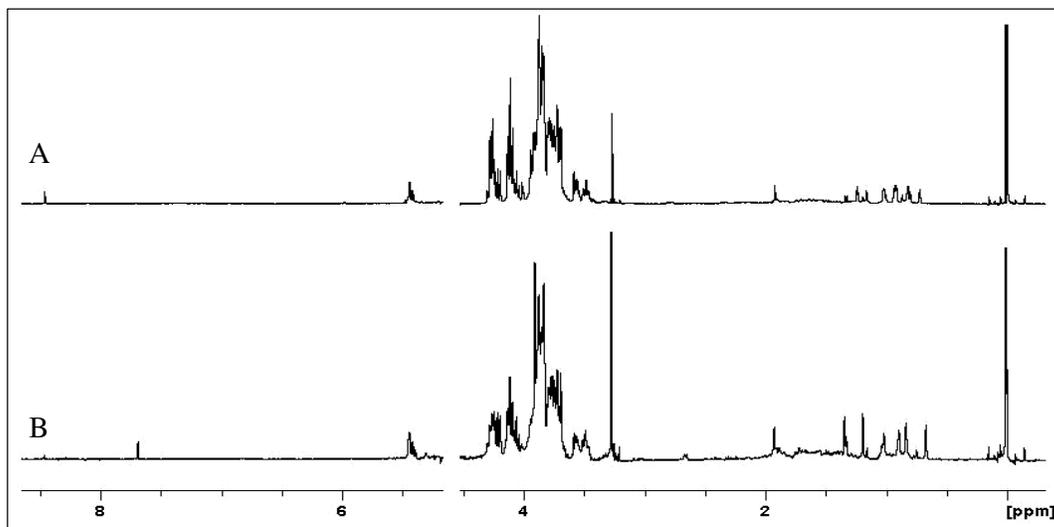


FIGURA 4.30 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução aquosa das espécies A - *Pfaffia glomerata* e B - *Pfaffia paniculata*.

Os sinais observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  compreendem a região espectral de  $\delta$  0,6 a 8,5, apresentando sinais distintos na região alifática para as duas espécies, o que permite a diferenciação visual das espécies.

#### 4.2.1.1- Caracterização dos metabólitos em mistura

A caracterização dos compostos presentes no extrato aquoso foi feita após liofilização e redissolução os extratos em solvente deuterado, com o intuito de concentrar as amostras e possibilitar a detecção do maior número possível de compostos.

Com o auxílio da literatura (SOBOLEV *et al*, 2003; SHIOBARA *et al*, 1993; ) e baseado nos compostos já isolados e elucidados destas espécies, foi possível reconhecer nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  sinais característicos da presença de alguns metabólitos primários majoritários, comuns as duas espécies padrão, como os *dubletos* em  $\delta$  1,00 e 1,05 referente aos hidrogênios das metilas da valina, o *dublete* em  $\delta$  1,33 que se refere aos hidrogênios da metila da treonina que acoplam com seu hidrogênio  $\beta$  e ao acoplamento do hidrogênio  $\alpha$  com hidrogênio  $\beta$ ; o *dublete* em  $\delta$  1,49 que se refere aos hidrogênios da metila da alanina que acoplam com o hidrogênio  $\alpha$ ; os *tripletos* em  $\delta$  2,31 e 3,02 referem-se aos acoplamentos dos hidrogênios  $\alpha$  com  $\beta$  e  $\gamma$  com  $\beta$  do ácido 4-aminobutanóico.

Também foi caracterizados os sinais característicos das unidades de açúcar, como os *dubletos* em  $\delta$  4,65, 5,24, 5,42, referente aos hidrogênios anoméricos da  $\beta$ -glucose,  $\alpha$ -glucose, e sacarose respectivamente.

Como feito anteriormente para a embaúba, todos compostos identificados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURAS 4.31 a 4.32) foram confirmados com o auxílio dos experimentos complementares,  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 4.30), *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC. Os aminoácidos comuns entre as espécies padrão de embaúba e ginseng brasileiro e os açúcares apresentaram os mesmos deslocamentos mostrados anteriormente.

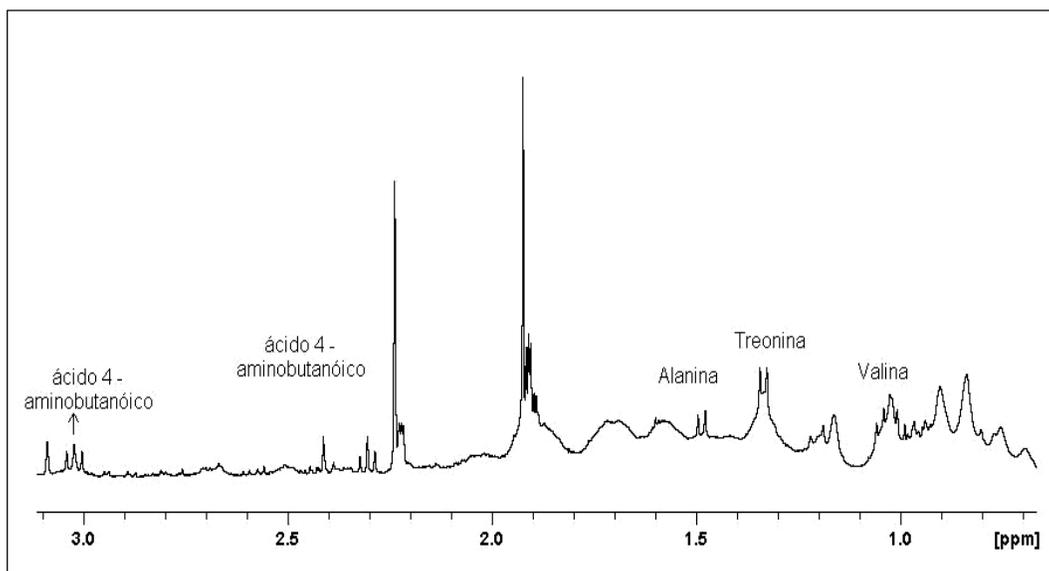


FIGURA 4.31 – Ampliação de  $\delta$  0,67 a 3,13 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato aquoso da espécie *P. Paniculata*.

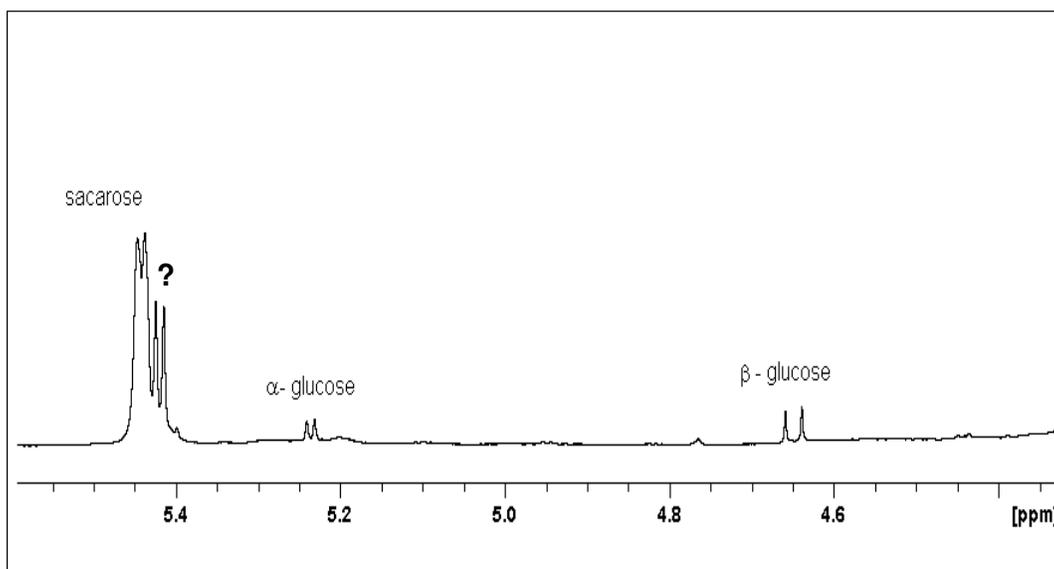


FIGURA 4.32 – Ampliação de  $\delta$  4,46 a 5,51 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato aquoso da espécie *P. Paniculata*.

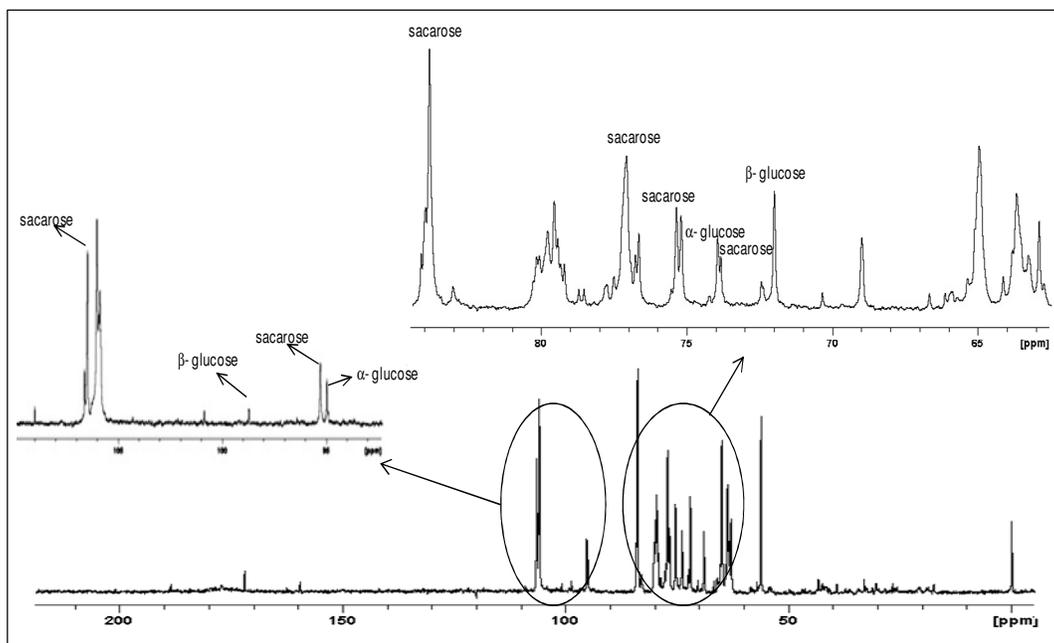


FIGURA 4.33 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato aquoso da espécie *P. paniculata*, em destaque ampliações das regiões dos açúcares,  $\delta$  94 a 108 e  $\delta$  62 a 84.

Infelizmente não foi possível a identificação de nenhum outro composto, seja pela ausência de sinais, causada pela baixa concentração presente no extrato aquoso, ou pela sobreposição dos sinais dos açúcares.

#### 4.2.1.2 - Análise quimiométrica dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras em solução.

Pela análise visual dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de líquido, observou-se uma grande semelhança entre os espectros dos padrões e das amostras comerciais, o que reforçou a necessidade do uso de um método de comparação.

Para a análise quimiométrica foi excluída a região espectral referente ao resíduo do sinal da água ainda presente, o sinal referente ao TMS- $\text{d}_4$  e todas as regiões sem sinais para não acarretarem erros e para que os dados pudessem ser autoescalados (FIGURA 4.34).

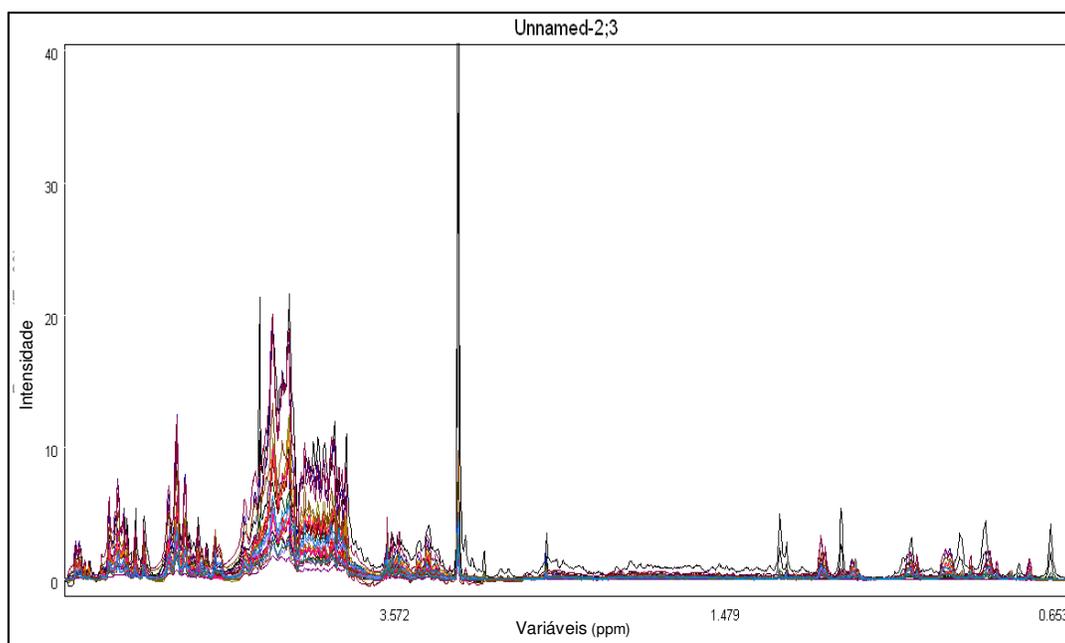


FIGURA 4.34 – Visualização dos gráficos de linhas dos dados RMN de  $^1\text{H}$  em solução após as exclusões necessárias.

A melhor discriminação entre as amostras de ginseng brasileiro, utilizando a análise de componentes principais, foi obtida quando os dados foram autoescalados e aplicadas às seguintes transformações: normalização e primeira derivada em um intervalo de vinte cinco pontos.

O gráfico de escores de PC1 x PC2 está mostrado na figura 4.35, com PC1 descrevendo 56,7% de variância do conjunto de dados e PC2 14,4% de variância.

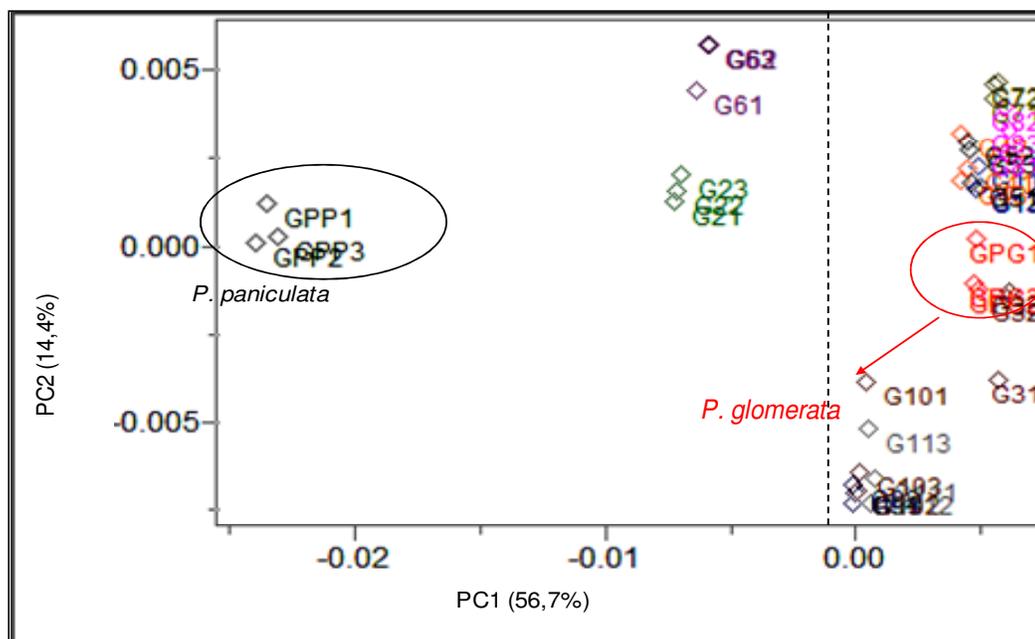


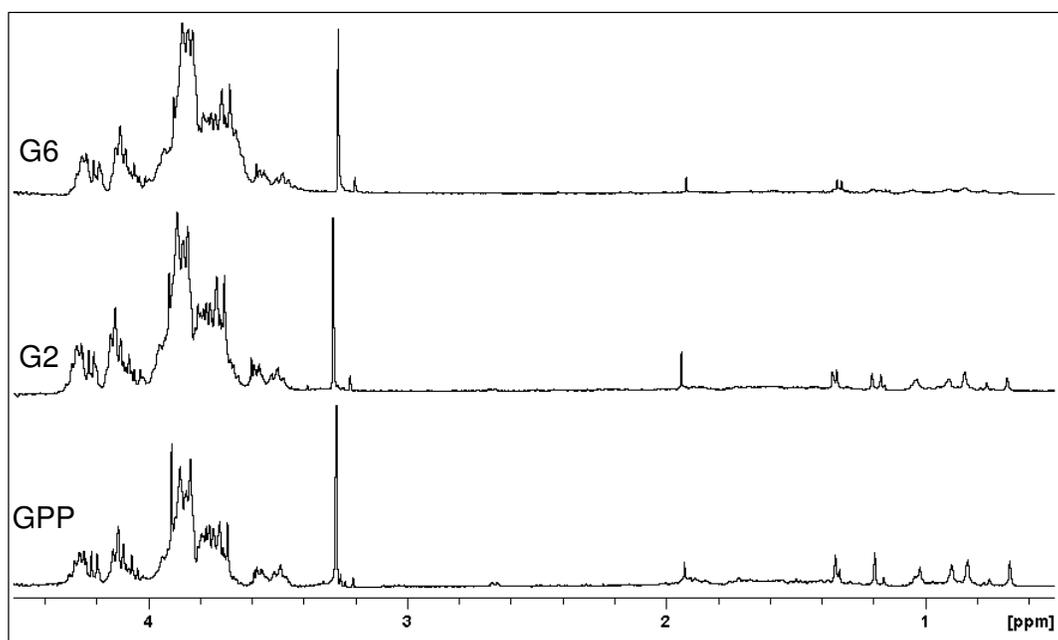
FIGURA 4.35 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução de todas as amostras de ginseng brasileiro.

Neste gráfico verifica-se que as amostras padrão, identificadas como GPG e GPP, discriminaram-se por valores positivos e negativos respectivamente. A maioria das amostras comerciais se agrupa por PC1 com a amostra padrão *P. glomerata*, porém os rótulos das embalagens apresentavam o produto como pertencente à espécie *P. paniculata*.

Verifica-se também que as amostras G2 e G6, têm comportamento diferente das demais, dispendo-se entre os padrões. Estas amostras foram adquiridas nos estados de São Paulo e Goiás, respectivamente; e a princípio não apresentando nenhuma relação entre si. Porém, há a hipótese de que foram fornecidas pelo mesmo produtor, pois como já mencionado na introdução os maiores produtores de fitoterápicos concentram-se no estado de São Paulo, o qual abastece boa parte do Brasil. Desta forma justificaria o agrupamento observado. A discriminação das amostras G9, G10 e G11 em valores negativos de PC2 provavelmente esta relacionada com a

regionalidade, pois estas amostras foram adquiridas nos estados de Mato Grosso do Sul, Goiás e Mato Grosso, respectivamente.

Analisando o espectro da amostra G2 verifica-se um alto grau de similaridade com o espectro do padrão *P. paniculata*, apresentando apenas algumas variações na intensidade de alguns sinais, sugerindo que esta amostra realmente seja pertencente à espécie *P. paniculata*. Já o espectro da amostra G6 apresenta-se distinto apenas na região de  $\delta$  0,56 a 1,53, região característica de aminoácidos, porém não se pode dizer que seja uma adulteração, pois a variação desta classe de compostos pode ser causada por



diversos fatores, como o tipo de secagem e o período de coleta das raízes. (FIGURA 4.36).

FIGURA 4.36 - Ampliação de  $\delta$  0,6 a 4,5 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução das amostras G6, G2 e da amostra padrão *P. paniculata* (GPP).

O dendrograma resultante da análise das amostras de ginseng brasileiro por HCA está mostrado na figura 4.37. Foram usados os parâmetros do PCA, juntamente com a distância Euclidiana e o método de conexão incremental. Com um índice de similaridade igual a 0,572 verificou-se a mesma discriminação obtida anteriormente, ou seja, as amostras G2 e G6 está mais próximas do padrão *P. Paniculata* e próximas entre si.

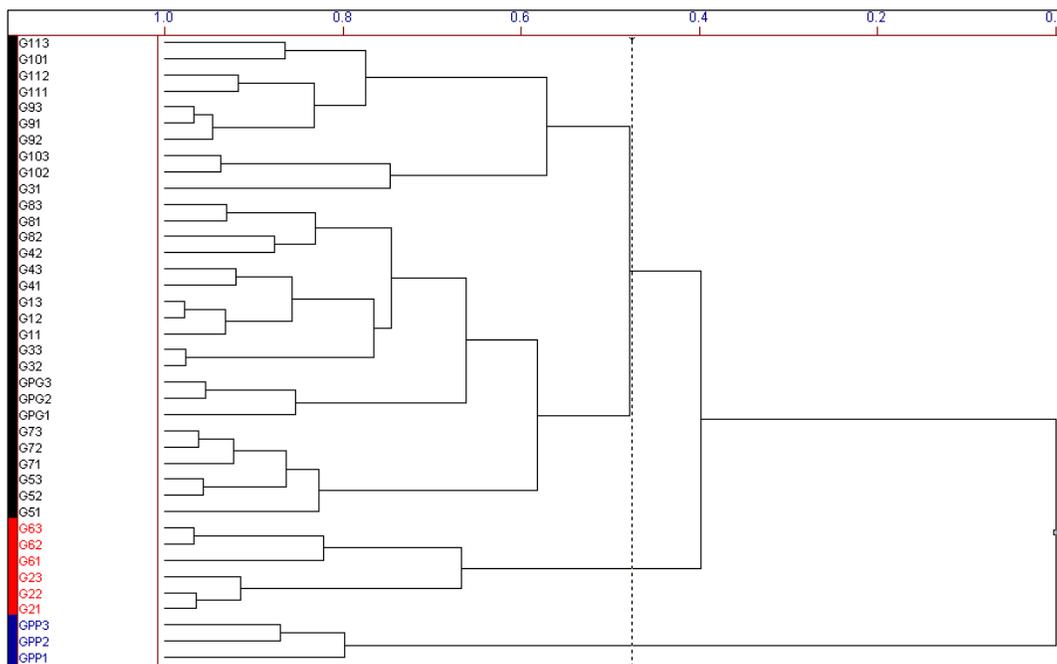


FIGURA 4.37 – Dendrograma dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução das amostras de ginseng brasileiro.

#### 4.2.2. - Análise das amostras intactas por RMN HRMAS de $^1\text{H}$

Como para a embaúba, os espectros de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  foram obtidos diretamente do material vegetal intacto, tanto para as amostras comerciais como para os padrões, e utilizando também a sequência de pulso CPMG editada. Os espectros obtidos para as amostras padrão são apresentados na figura 4.38

Os espectros apresentados são bastante similares, contendo basicamente os sinais na região dos açúcares. A simples análise visual não permitiu a obtenção de nenhum resultado conclusivo.

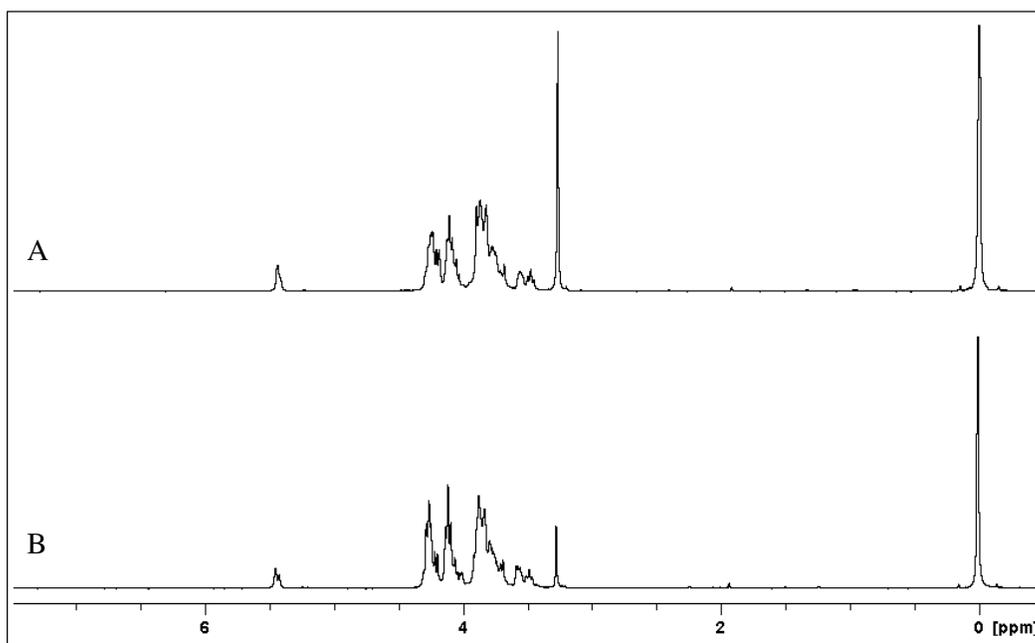


FIGURA 4.38 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  HRMAS para amostras padrão de ginseng brasileiro, A - *Pffafia paniculata* e B - *Pffafia glomerata*.

#### 4.2.2.1 - Análise quimiométrica dos dados de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ das amostras intactas.

Desta maneira, a aplicação da análise quimiométrica tornou - se necessária, e como anteriormente, fez-se a análise exploratória através da PCA. Para isso foi excluída a região espectral referente ao sinal do TMS- $\text{d}_4$ , ao resíduo do sinal da água e todas as regiões sem sinais, para evitar que interferissem na discriminação, e para que os dados fossem autoescalados.

Também foram utilizadas transformações como: normalização e primeira derivada em um intervalo de 25 pontos, obtendo o gráfico de escores apresentado na figura 4.39.



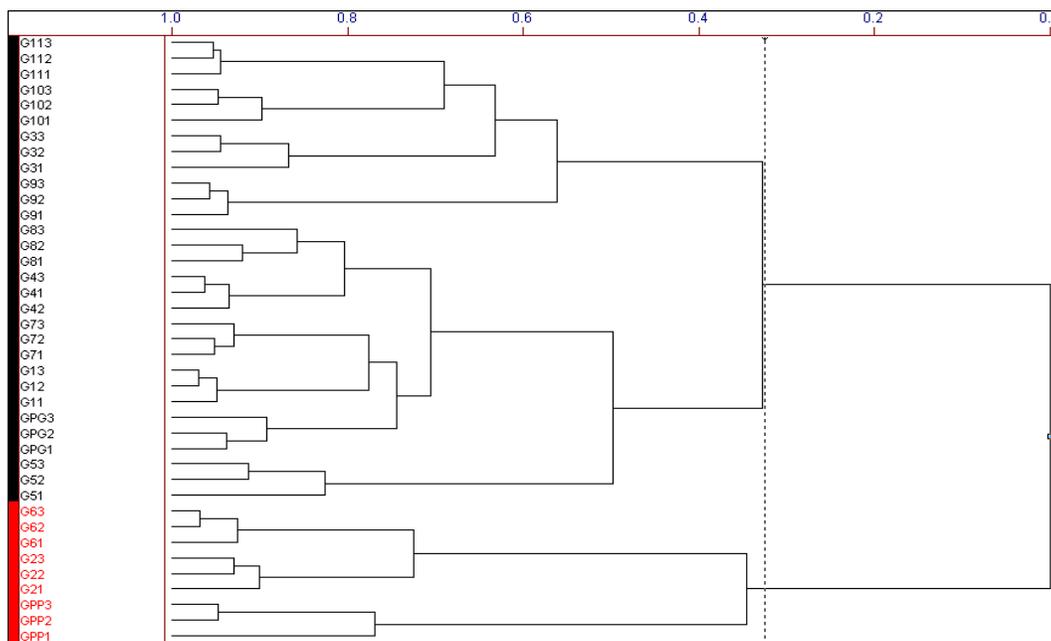


FIGURA 4.40 – Dendrograma dos dados de RMN HRMAS de <sup>1</sup>H das amostras de ginseng brasileiro.

#### 4.2.3. Análise das amostras intactas por infravermelho

Para as análises espectroscópicas na região do infravermelho os espectros foram obtidos em absorbância, e apresentaram perfil espectral similar, verificando apenas diferenças de intensidades em duas regiões de absorção, em  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1630 e 1050-1030, para todas as amostras de ginseng brasileiro (FIGURA 4.41).

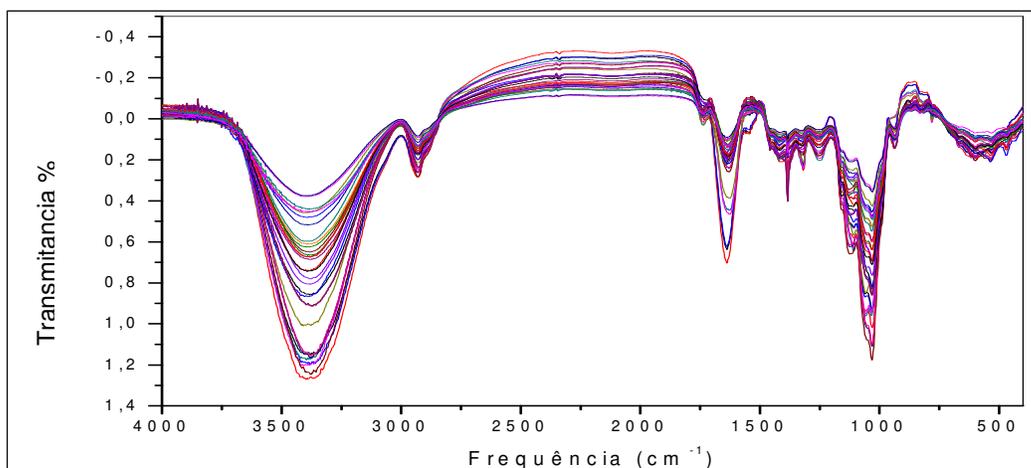


FIGURA 4.41 – Visualização de todos os espectros de IV das amostras padrão e comercial de ginseng brasileiro.

Todos os espectros apresentaram absorções características de deformações axiais O–H em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  3375, deformações axiais C–H em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  2900, deformação axial C=C em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1630, deformações axiais C-O de ésteres em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1380, deformação angular no plano de C-H em  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1050-1030 e outras absorções de baixa intensidade na região de aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  750-480.

A análise visual nos espectros de IV, não foi muito conclusiva, pois apresentaram poucas diferenças no espectro como um todo. Devido a este fato e também para efeito de comparação com as demais técnicas, a análise quimiométrica foi empregada.

Para a análise quimiométrica foram excluídas as regiões destacadas na figura 4.42, que correspondem à região de absorção de OH ( $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  3000 a 4000) e a regiões de ruído. Os dados foram centrados na média e como transformações utilizaram-se a normalização dos dados e a primeira derivada em um intervalo de 15 pontos.

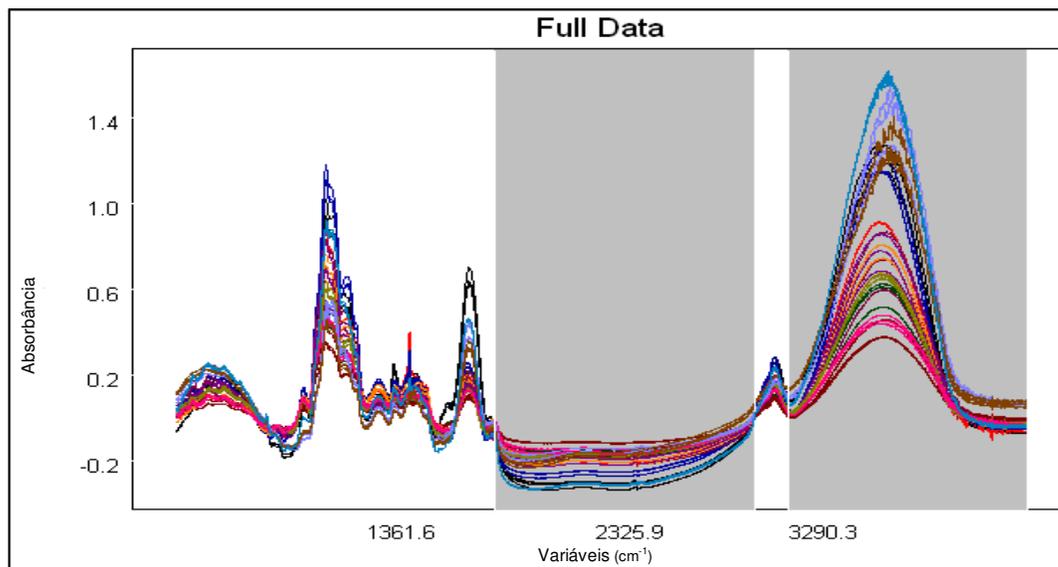


FIGURA 4.42 – Destaque para as regiões excluídas dos espectros de IV obtidos para as amostras de ginseng brasileiro

A figura 4.43 mostra o gráfico de PC1 x PC2 descrevendo 70,0% da variância total do conjunto de dados. Analisando este gráfico observou-se a discriminação de três amostras (G9, G10 e G11) por valores negativos de PC1 e PC2. Observou-se ainda o agrupamento da maioria das amostras comerciais com o padrão *P. glomerata* em valores positivos de PC1 e negativos de PC2, e mais uma vez as amostras G2 e G6 dispendo-se entre os padrões.

O gráfico de escores de PC2 x PC3 (FIGURA 4.44), que descreve 20,3% da variância total do conjunto de dados, apresentou discriminação semelhante às obtidas pelas técnicas de RMN, ou seja, as amostras G2 e G6 discriminaram-se do restante das amostras comerciais.

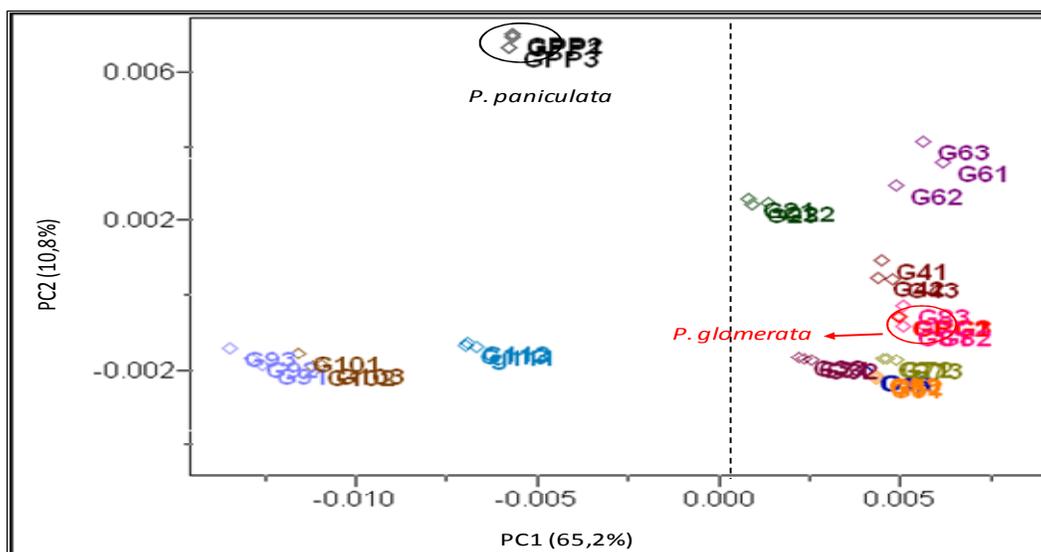


FIGURA 4.43 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de IV de todas as amostras de ginseng brasileiro.

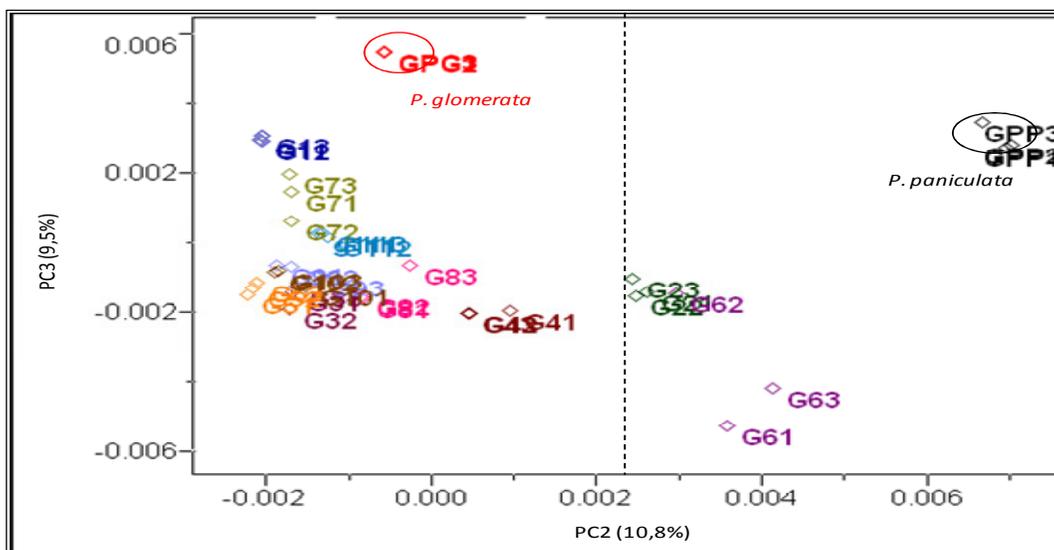


FIGURA 4.44 - Gráfico de escores PC2 x PC3 dos espectros de IV de todas as amostras de ginseng brasileiro.

Por essas análises, verifica-se que as amostras G2 e G6, já mencionadas anteriormente, mantêm-se distintas das demais e relacionando o gráfico de *loadings* com o gráfico de escores, foi possível verificar que as absorções em destaque na figura 4.45, exercem maior peso para a discriminação destas; e na figura 4.46 podem-se observar as absorções responsáveis pela discriminação das amostras G9, G10 e G11.

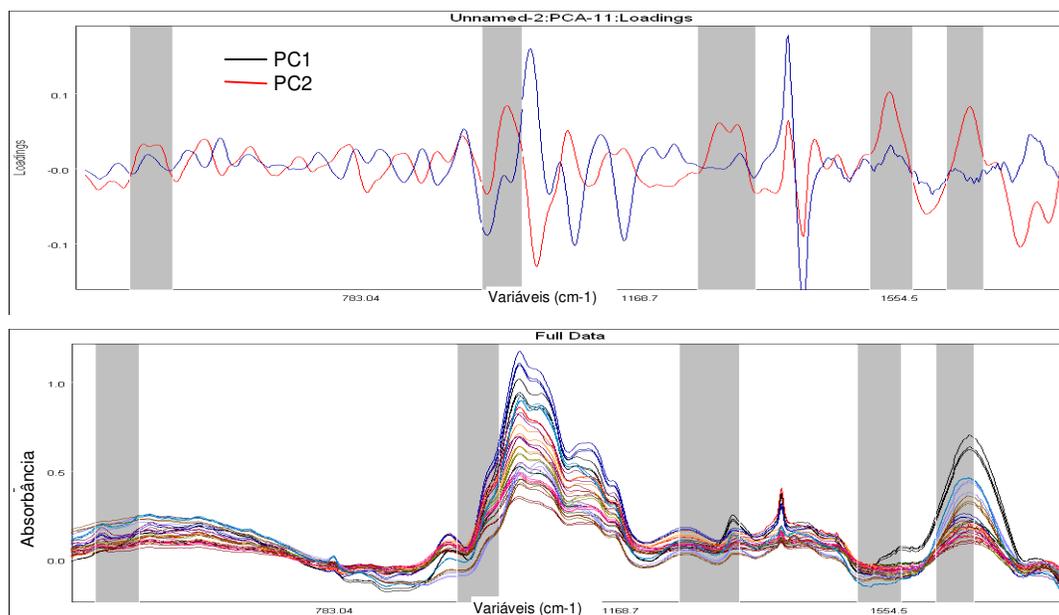


FIGURA 4.45 - Gráfico de *loadings* PC2 x PC3 dos dados de IV, destacando as variáveis de maior peso para a discriminação das amostras G2 e G6, ou seja, as variáveis com valores positivos de PC2.

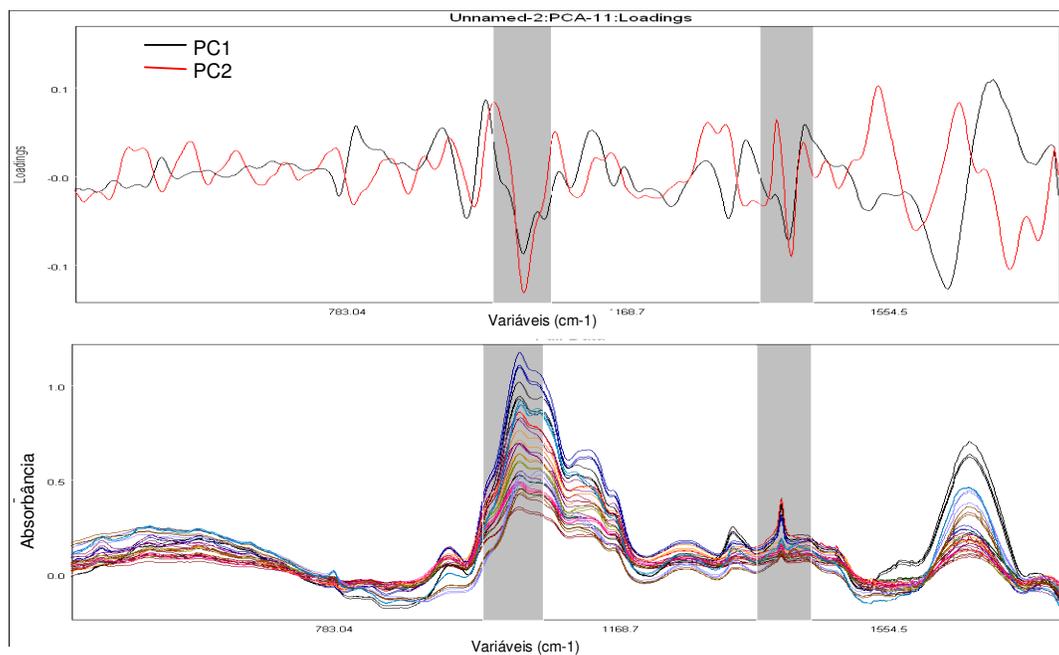


FIGURA 4.46 - Gráfico de *loadings* PC1 x PC2 dos dados de IV, destacando as variáveis de maior peso para a discriminação das amostras G9 e G10 e G11, ou seja, as variáveis com valores negativos em PC1 e PC2.

Contudo, mesmo identificando as variáveis responsáveis pelas discriminações apresentadas no gráfico de escores, não foi possível atribuí-las aos compostos presentes.

Por HCA verificou o agrupamento das amostras G9, G10 e G11 com o padrão *P. Paniculata*, com um índice de similaridade de 0.407, diferentemente dos resultados obtidos pelas duas outras técnicas empregadas anteriormente, que agrupava as amostras G2 e G6 com este padrão (FIGURA 4.47).

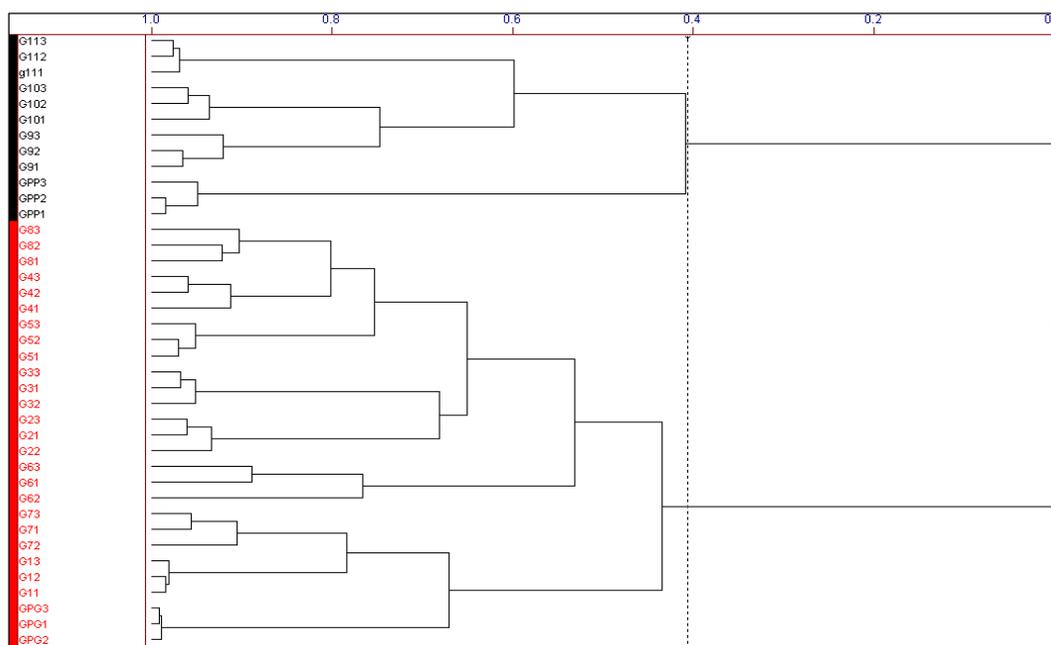


FIGURA 4.47 – Dendrograma dos dados de IV das amostras de ginseng brasileiro.

#### 4.2.4 - Conclusões

A discriminação entre as duas espécies *P. paniculata* e *P. glomerata*, foi obtida com sucesso pelas três técnicas empregadas (RMN de  $^1\text{H}$  em solução, RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  e IV) aliada à análise por PCA e HCA. Além de possibilitar a visualização do agrupamento natural das amostras comerciais, ou seja, permitiu concluir que a maioria das amostras comerciais analisadas provavelmente pertencia à espécie *P. glomerata*, a qual é indicada pela Farmacopéia Brasileira, mesmo com os rótulos indicando a espécie de *P. paniculata*.

Pelas três técnicas foi possível verificar que duas amostras G2 e G6 por PCA encontravam-se entre as duas espécies padrão, sugerindo tratarem-se de amostras compostas de uma mistura das duas espécies, porém a amostra G2 apresentou maior similaridade com a espécie *P. paniculata*, indicando ser a única amostra comercial pertencente ou composta majoritariamente desta espécie.

RMN de  $^1\text{H}$  em solução foi possível identificar os aminoácidos: valina, alanina, treonina e o ácido 4-aminobutanóico e os açúcares: sacarose,  $\beta$ -glucose e  $\alpha$ -glucose.

# Malva

### 4.3 - Malva

#### 4.3.1- Análise dos extratos aquosos por RMN em solução

Neste estudo utilizaram-se como padrões a espécies *Malva silvestris*, a qual é a indicada pela Farmacopéia Brasileira; e a espécie *Sida cordifolia*, que é comumente usada como substituta da primeira espécie e conhecida popularmente como “malva branca”.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução foram obtidos utilizando o mesmo procedimento empregado anteriormente, ou seja, fez-se o “chá” na sua forma usual de ingestão utilizando as folhas, tanto para as amostras comerciais bem como para os padrões. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução para as duas espécies está apresentado na figura 4.48.

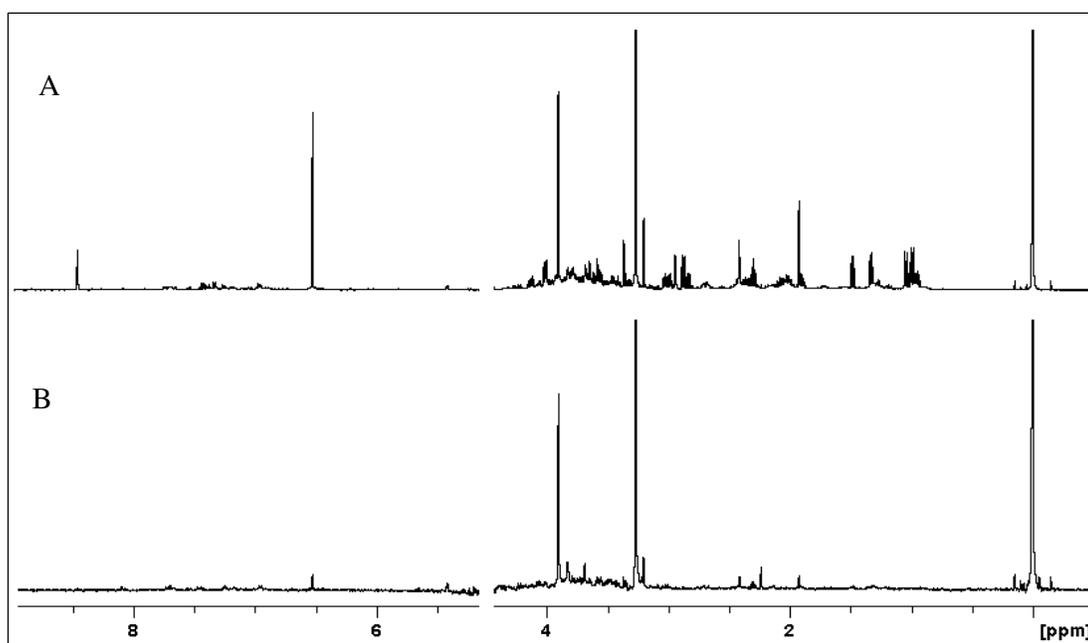


FIGURA 4.48 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução aquosa das espécies, A- *Malva silvestris* e B- *Sida cordifolia*.

Com uma análise visual dos espectros obtidos, diferentemente dos outros estudos, estes se apresentaram muito distintos, podendo observar essas diferenças em toda a extensão do espectro.

#### 4.3.1.1. Caracterização dos metabólitos em mistura

Feita a análise visual entre as espécies, iniciou-se a caracterização dos metabólitos presentes nos extratos aquosos, primeiramente buscando sinais comuns às duas espécies. Desta maneira com uma análise detalhada dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foi possível reconhecer alguns sinais característicos de aminoácidos pela presença dos *dubletos* em  $\delta$  1,00 e 1,05 referente aos hidrogênios das metilas da valina(3); do *dublete* em 1,33 que se refere ao hidrogênio da metila da treonina (2) e do *dublete* em 1,49 que se refere aos hidrogênios da metila da alanina (1) (FIGURA 4.49). Foi possível reconhecer também os *dubletos* em  $\delta$  4,65, 5,24 e 5,42 referente aos hidrogênios anoméricos da  $\beta$ -glucose,  $\alpha$ -glucose e sacarose, respectivamente, porém a intensidades destes na espécie *Malva silvestris* é muito baixa, não permitindo atribuir todos os sinais destes açúcares.

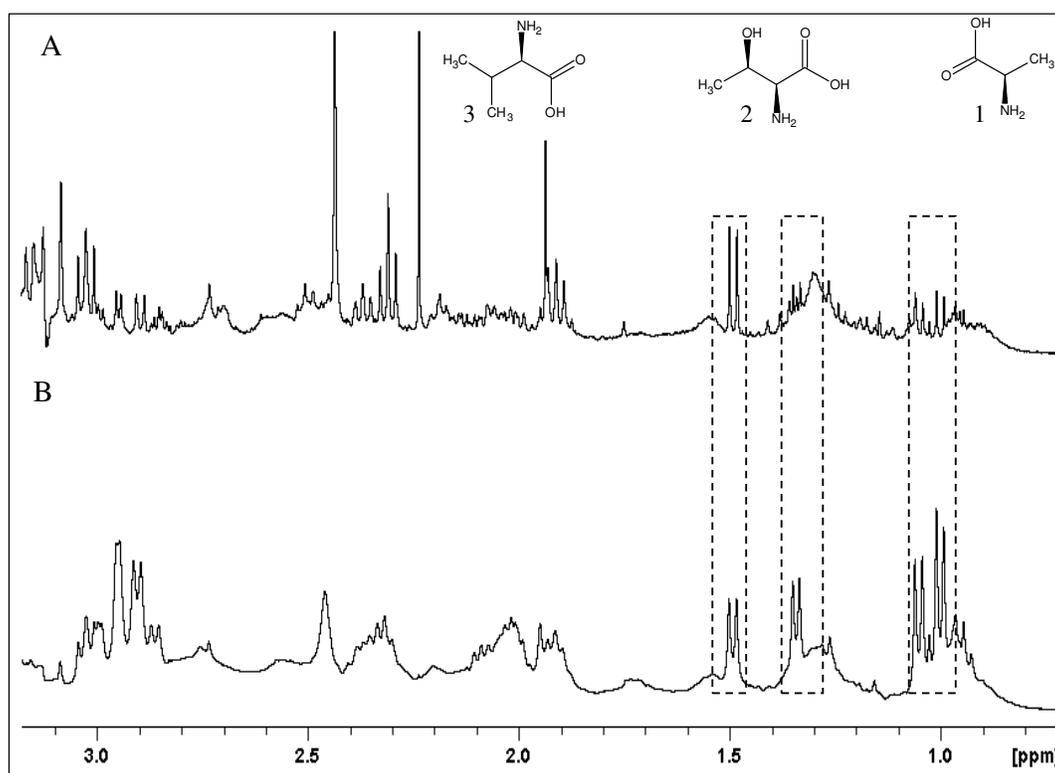


FIGURA 4.49 – Ampliação de  $\delta$  0,6 a 3,1 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução aquosa das espécies A- *Sida cordifolia* e B - *Malva silvestris*, destacando os aminoácidos comuns as duas espécies: 1 – Valina, 2 – Treonina, 3 - Alanina.

Na espécie *Sida cordifolia* foi possível reconhecer os *tripletos* em  $\delta$  2,31 e 3,02 que se referem aos acoplamentos dos hidrogênios  $\alpha$  com  $\beta$  e  $\gamma$  com  $\beta$  do ácido 4-aminobutanóico (FIGURA 4.50).

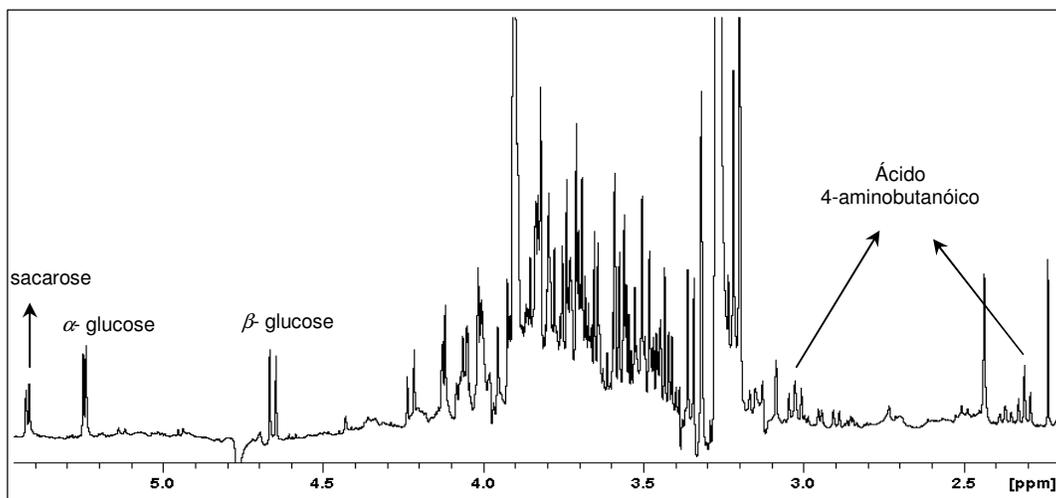


FIGURA 4.50 – Ampliação de  $\delta$  2,2 a 5,5 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em solução aquosa da espécie *Sida cordifolia*.

Para a confirmação e identificação dos compostos citados anteriormente, foi necessário concentrar os extratos aquosos, liofilizando e redissolvendo em solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Desta maneira pode-se obter os experimentos complementares,  $^{13}\text{C}$ , *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC com melhor sensibilidade e permitir comparação com os dados da literatura.

A identificação dos aminoácidos reconhecidos pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi confirmado através das correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no experimento de *g*HSQC. Nas figuras 4.51 e 4.52 pode-se observar, em destaque, as correlações para os hidrogênios da metila da valina com sinais em  $\delta$  1,00 e 1,05 com os carbonos em  $\delta$  19,1 e 20,8 respectivamente; correlação do sinal em  $\delta$  1,33 com o carbono  $\delta$  22,3 (sinais da metila da treonina) e a correlação do sinal em  $\delta$  1,49 com o carbono em  $\delta$  19,05 (sinais das metilas da alanina). Para a amostra da espécie *Sida cordifolia*, pode-se observar também a correlação dos sinais em  $\delta$  2,30 e 3,02 com os carbonos  $\delta$  37,2 e 42,4.

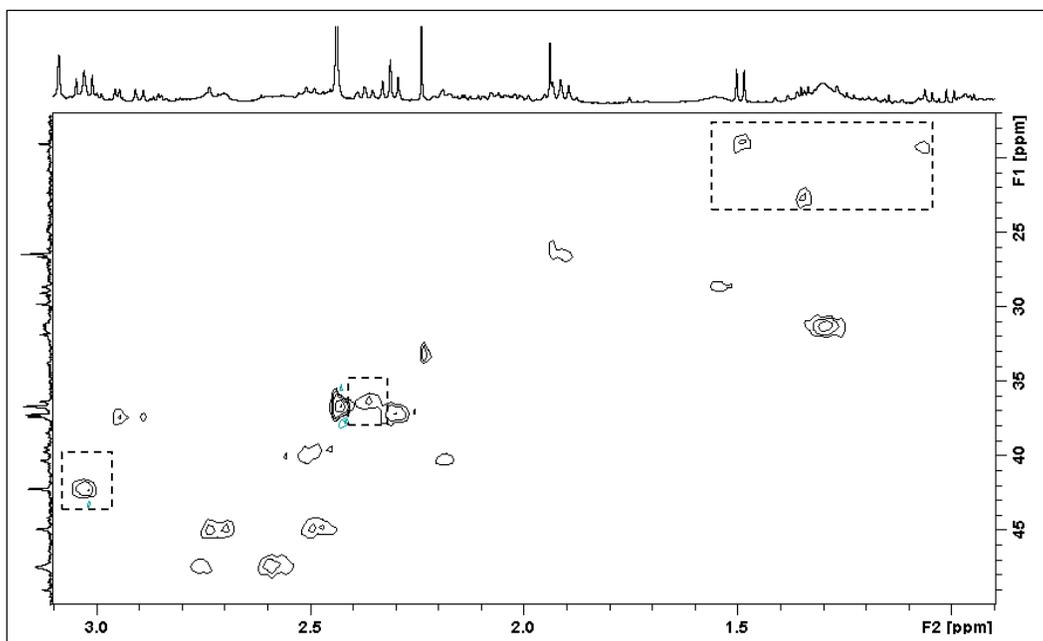


FIGURA 4.51 - Correlações heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no experimento de gHSQC dos aminoácidos presentes na amostra da espécie *Sida cordifolia* em solução.

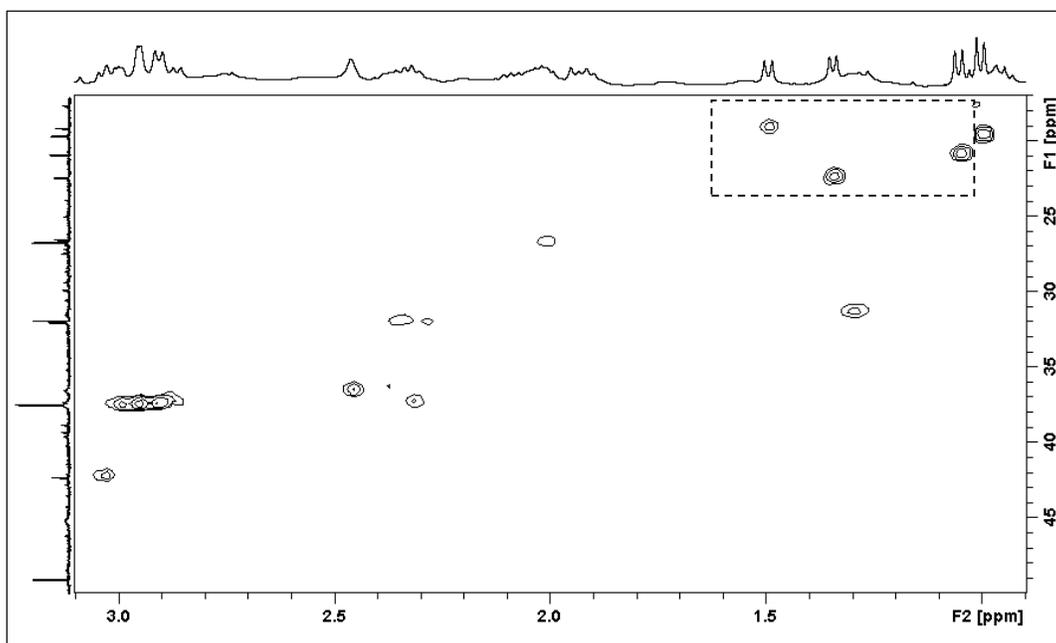


FIGURA 4.52 - Correlações heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no experimento de gHSQC dos aminoácidos presentes na amostra da espécie *Malva silvestris* em solução

As correlações referentes aos açúcares ( $\alpha$ -glucose,  $\beta$ -glucose e sacarose) só foram observadas nos espectros obtidos do extrato aquoso da amostra *S. codifolia*, pois no extrato da *M. silvestres*, estes sinais estão com baixa intensidade, não permitindo visualizar as correlações.

No experimento de gHSQC pode-se observar, principalmente, as correlações dos hidrogênios anoméricos dos respectivos carbonos (FIGURA 4.53). As demais atribuições foram feitas e os valores estão na tabela 4.4

TABELA 4.4 – Dados de RMN para os açúcares encontrados na espécie de *Sida cordifolia*.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (mult., J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	gHCSC	gHMBC
$\alpha$ -glucose				
1	5,23 (d 3,75)	94,9	C1	C1, C2 e C3
2	3,51 - 3,59 m	74,3	C2	C3
3	3,71 - 3,78 m	75,4	C3	C2, C4 e C5
4	3,46 - 3,49 m	72,13	C4	C2 e C5
5	3,51 - 3,59 m	73,9	C5	C4
6	3,66 - 3,70 m	63,4	C6	C4 e C5
$\beta$ -glucose				
1	4,65 (d 7,96)	98,8	C1	C1, C2 e C3
2	3,23 (dd; 8,24 e 9,34)	76,9	C2	C1, C2 e C5
3	3,41 - 3,53 m	78,3	C3	C1, C2 e C4
4	3,35 - 3,46 m	72,1	C4	C3 e C5
5	3,41 - 3,53 m	78,4	C5	C1, C2 e C4
6	3,63 - 3,75 m	63,5	C6	C4
Sacarose				
1	5,42 (d 3,87)	95,0	C1	C3, C2', C4'
2	3,54 - 3,60 m	74,6	C2	-
3	3,73 - 3,78 m	75,5	C3	C4
4	3,37 - 3,44 m	72,6	C4	C3, C6
6	3,86 (s)	63,4	C6	C5'
1'	3,68 (s)	64,3	C1'	-
2'	-	106,6	C2'	-
3'	4,22 (d 8,76)	79,3	C3'	-
4'	4,07 (s)	75,3	C4'	C3', C5'
5'	3,90 (s)	84,2	C5'	C3', C2'

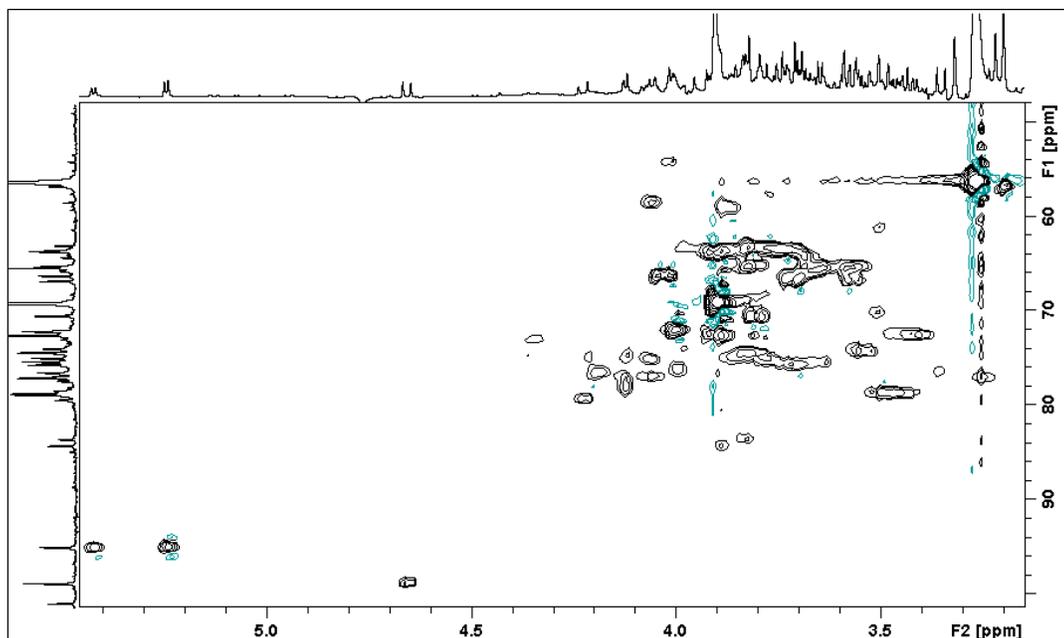


FIGURA 4.53 - Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  dos açúcares observadas no experimento de gHSQC na amostra da espécie *sida cordifolia* em solução.

Além dos aminoácidos e dos açúcares, e apesar da complexidade dos espectros, foi possível também obter informações as respeito de alguns metabólitos secundários majoritários de ambas as espécies.

Baseando-se na literatura, e tendo o conhecimento prévio dos compostos já isolados para estas espécies, foi possível caracterizar o composto malvona A, nos extratos da espécie *Malva silvestres* e o composto efedrina, nos extratos da espécie *Sida cordifolia*. As estruturas são apresentadas na figura 4.54 (VESHKUROVA *et al*, 2006; KHATOON *et al*, 2005).

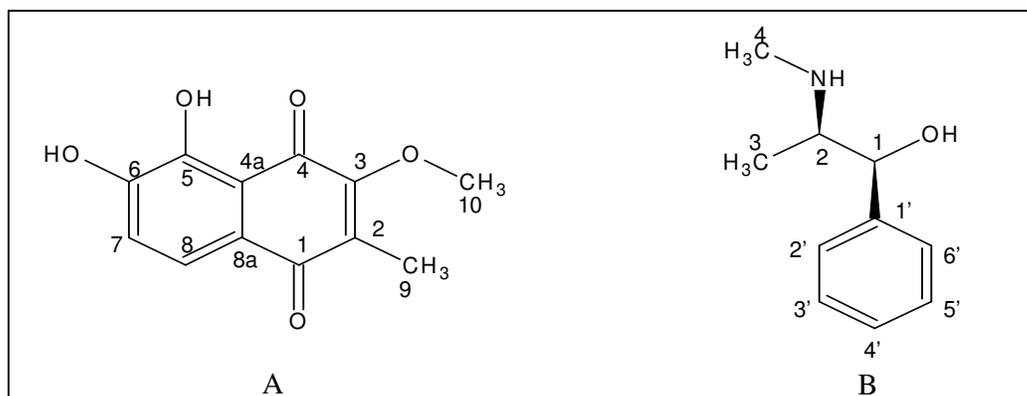


FIGURA 4.54 – Estrutura das substâncias A- malvona A e B – efedrina.

O espectro obtido do extrato da amostra de *Malva silvestris* apresentou sinais de RMN de  $^1\text{H}$  característico do metabólito secundário malvona A, confirmado pelos experimentos bidimensionais *g*HSQC e *g*HMBC e, para completa atribuição, foi adquirido também o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , observaram-se os *dubletos* em  $\delta$  7,32 e 7,41 referente aos H-7 e H-8, respectivamente, com constante de acoplamento  $J = 7,38$  Hz (FIGURA 4.55), os singletos em  $\delta$  4,43 e 2,46 referentes aos hidrogênios grupo metoxila (H-10) e aos hidrogênios da metila (H-9) (FIGURA 4.56).

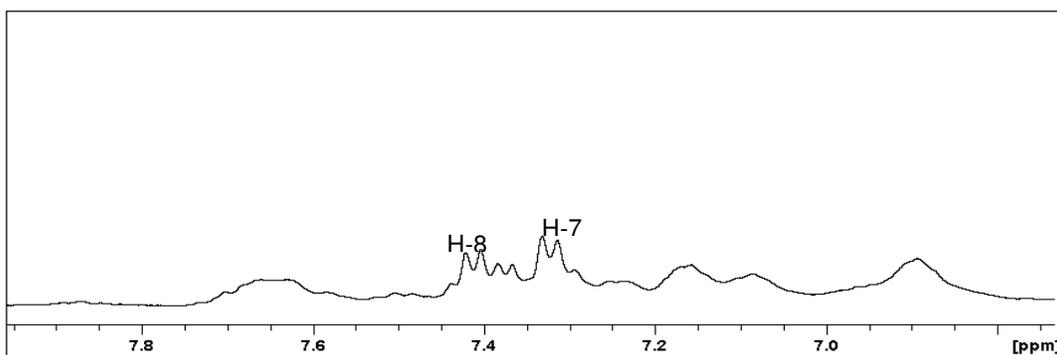


FIGURA 4.55- Ampliação de  $\delta$  6,70 a 7,90 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato aquoso da espécie *Malva silvestris*.

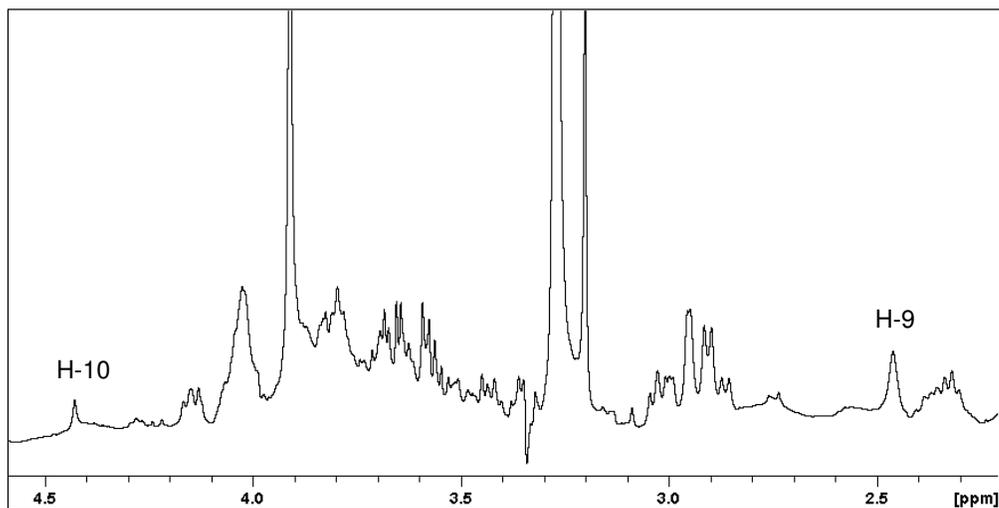


FIGURA 4.56- Ampliação de  $\delta$  2,20 a 4,60 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato aquoso da espécie *Malva silvestris*.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , observaram-se dois sinais em  $\delta$  171,6 e 177,4 referente aos carbonos C-1 e C-4 dos grupos carbonila e os sinais em  $\delta$  158,1, 150,0, e 149,3 que se referem aos carbonos C-3, C-5 e C-6, ligados a oxigênio por ligação simples (FIGURA 4.57).

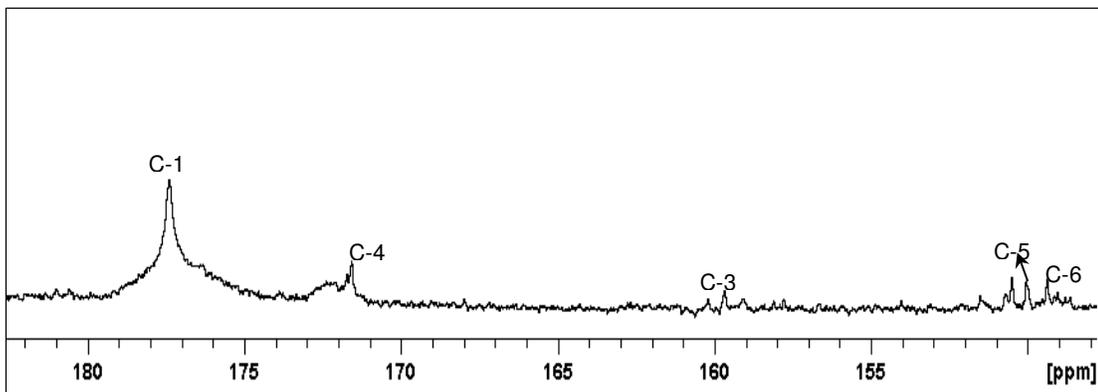


FIGURA 4.57 - Ampliação de  $\delta$  147,7 a 183,3 do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato aquoso da espécie *Malva silvestris*.

A confirmação das atribuições, citadas anteriormente, e a atribuição dos demais sinais de carbonos, foi feita com o auxílio dos experimentos *g*HSQC e *g*HMBC (FIGURA 4.58) e os dados encontram-se resumidos na tabela 4.4.

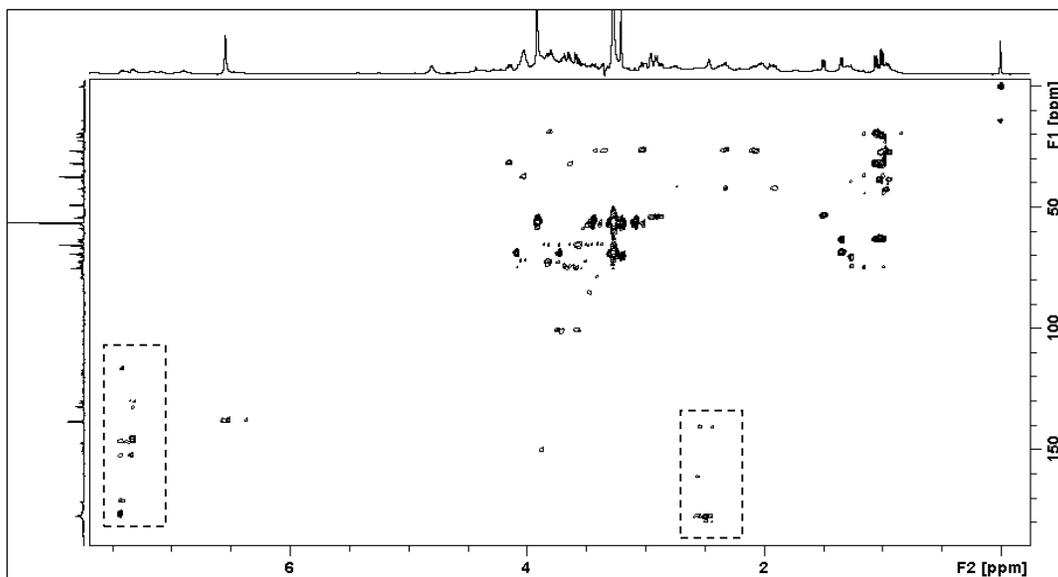


FIGURA 4.58 Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no experimento de *g*HMBC do extrato aquoso da espécie *Malva silvestris*, evidenciando as correlações da malvona A.

TABELA 4.5 - Dados de RMN para a substância malvona A encontrada no extrato aquoso da espécie *Malva silvestris*.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., $J$ em Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$g\text{HSQC}$	$g\text{HMBC}$
1	-	171,6	-	C8
2	-	138,0	-	C9
3	-	159,6	-	C9
4	-	177,4	-	C8
4a	-	117,1	-	C8
5	-	149,3	-	C7
6	-	150,0	-	C7
7	7,32 ( <i>d</i> ; 7,38)	132,2	C7	C8
8	7,41 ( <i>d</i> ; 7,38)	132,0	C8	C7
8a		124,9	-	C7
9	2,46 ( <i>s</i> )	27,9	C9	-
10	4,43 ( <i>s</i> )	68,9	C10	-

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato aquoso da amostra de *Sida cordifolia*, observaram-se os sinais característicos do metabólito secundário efedrina, que foi identificada pela presença dos sinais em  $\delta$  7,18, 7,10 e 6,92 referente aos hidrogênios do anel aromáticos; o *dubleto* em  $\delta$  4,01 com  $J = 3,87$  Hz, referente ao H-1 e os singletos referentes às metilas (H-4 e H-3) em  $\delta$  2,43 e 0,80 a 0,90 (FIGURA 4.59).

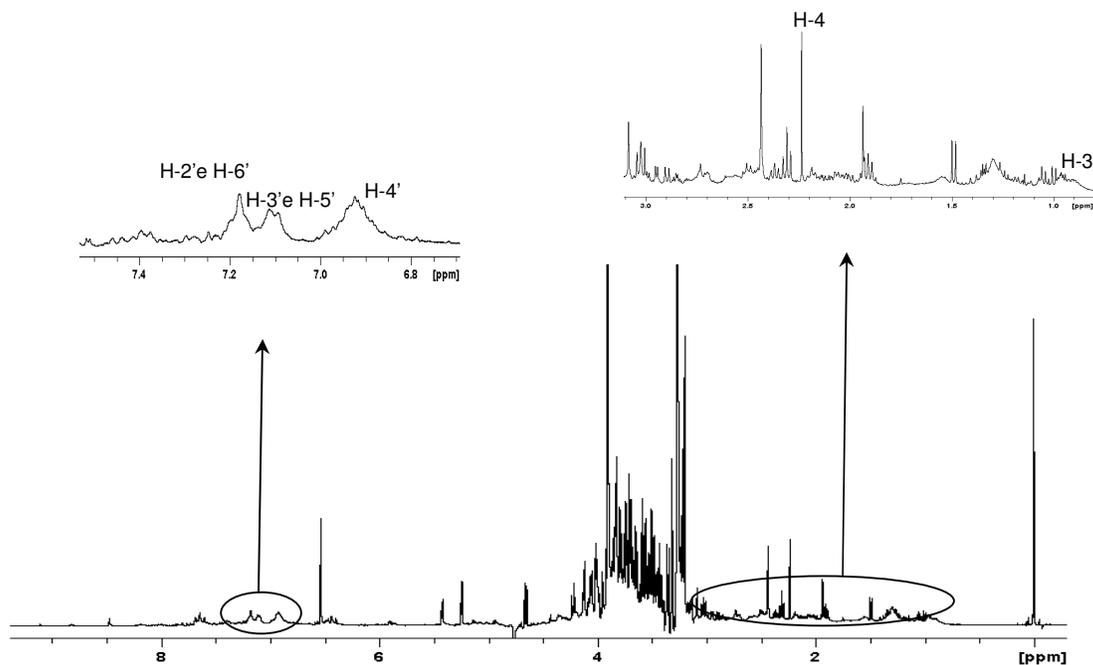


FIGURA 4.59 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do extrato aquoso da espécie *Malva silvestris* - em destaque a ampliação das regiões  $\delta$  6,70 a 7,30 e  $\delta$  0,80 a 3,10.

No experimento de gHSQC, verificou-se a correlação direta dos hidrogênios aromáticos (H-2' e H-6', H-3' e H-5' e H-4) com os carbonos em  $\delta$  de 133,1 125,5 e 119,1 respectivamente, e a correlação do sinal  $\delta$  2,43 referente ao H-4 com o sinal em  $\delta$  34,12 (FIGURA 4.60). As demais atribuições e correlações estão na tabela 4.6

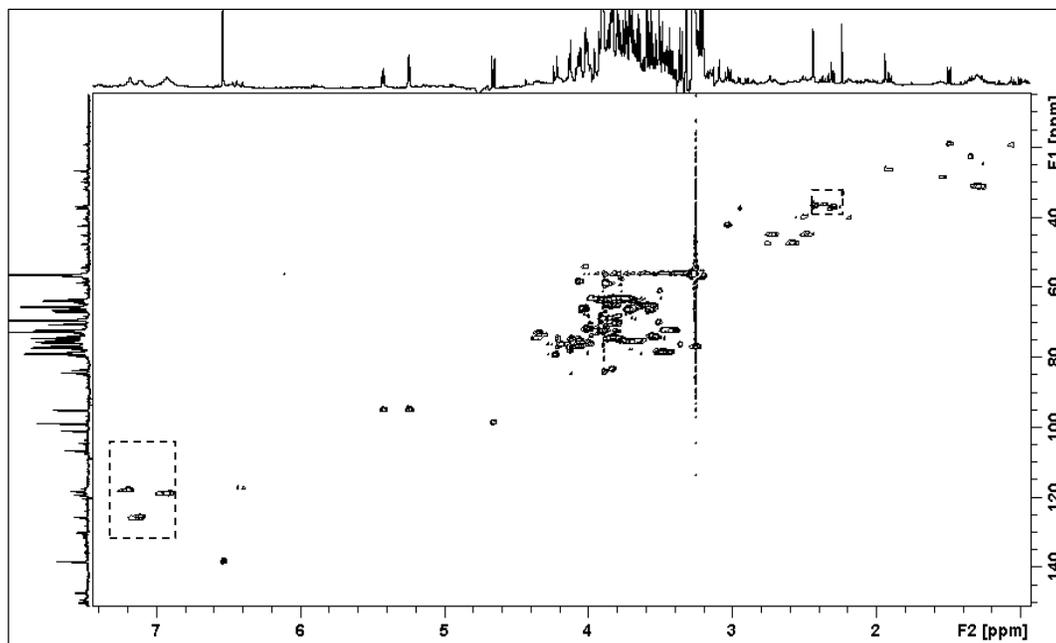


FIGURA 4.60 Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no experimento de *g*HMBC do extrato aquoso da espécie *Sida cordifolia*, evidenciando as correlações da efedrina.

TABELA 4.6 - Dados de RMN para a substância efedrina encontrada no extrato aquoso da espécie *Sida cordifolia*.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (mult., <i>J</i> em Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	<i>g</i> HSQC	<i>g</i> HMBC
1'	-	147,1	-	-
2'	7,15 - 7,22 ( <i>m</i> )	125,5	C2' e C6'	-
3'	7,07 - 7,13 ( <i>m</i> )	133,1	C3' e C5'	C2' e C6'
4'	6,86 - 6,99 ( <i>m</i> )	119,1	C4'	-
5'	7,07 - 7,13 ( <i>m</i> )	133,1	C3' e C5'	-
6'	7,15 - 7,22 ( <i>m</i> )	125,6	C2' e C6'	-
1	4,01 ( <i>s</i> )	71,2	C1	-
2	2,73 ( <i>d</i> , 3,87)	44,9	C2	-
3	0,80 - 0,90 ( <i>m</i> )	15,5	C3	-
4	2,43 ( <i>s</i> )	34,1	C4	-

#### 4.3.1.2 - Análise quimiométrica dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras em solução

Com o conhecimento prévio de que os perfis espectrais das amostras padrão são distintos, fez-se a análise quimiométrica, com o intuito de avaliar a eficiência desta análise aplicada aos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução, além de verificar a autenticidade das amostras comerciais. Ressaltando que todos os rótulos, das amostras adquiridas, indicavam a espécie *Malva silvestris*.

Para realizar a análise quimiométrica utilizaram-se os mesmos procedimentos para a obtenção dos extratos aquosos, bem como os mesmos processamentos dos dados de RMN  $^1\text{H}$ , já empregados no estudo das espécies anteriores deste trabalho (embaúba e ginseng brasileiro).

Desta forma gerou-se uma matriz com os espectros das amostras comerciais e padrão. Excluíram-se a região referente ao sinal do TMS- $\text{d}_4$  e as regiões com ruído, obtendo-se o gráfico de linhas apresentado na figura 4.61.

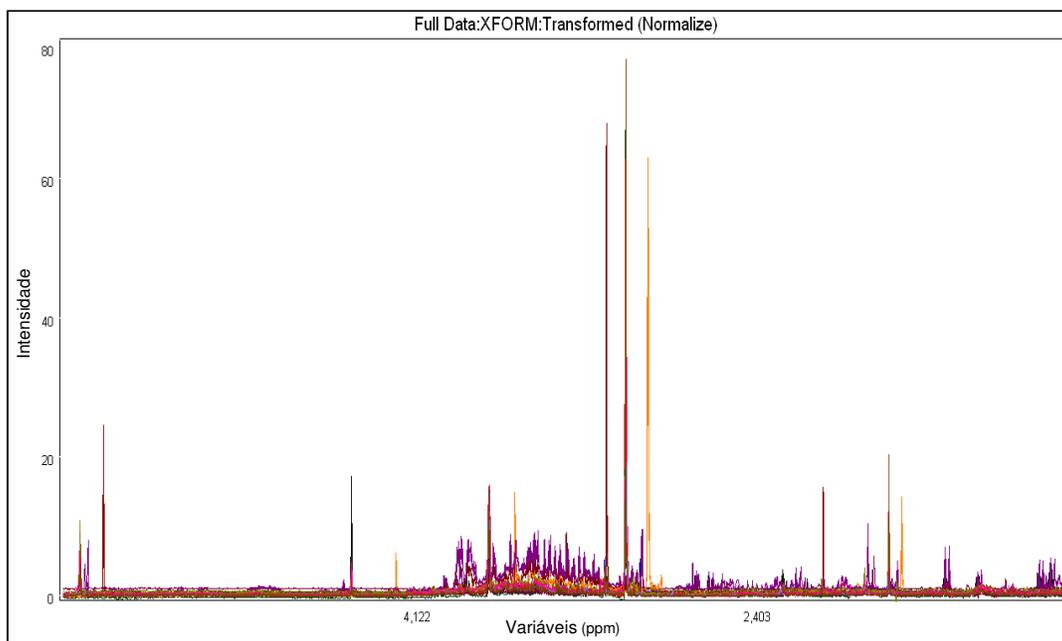


FIGURA 4.61 - Visualização dos gráficos de linhas dos dados RMN de  $^1\text{H}$  em solução após as exclusões necessárias.

A análise dos componentes principais foi realizada pelo autoescalamento dos dados e aplicando as seguintes transformadas: normalização e primeira derivada em um intervalo de 15 pontos. O gráfico de escores PC1 x PC2 está apresentado na figura 4.62, e descreve 87,5% de variância do conjunto de dados.

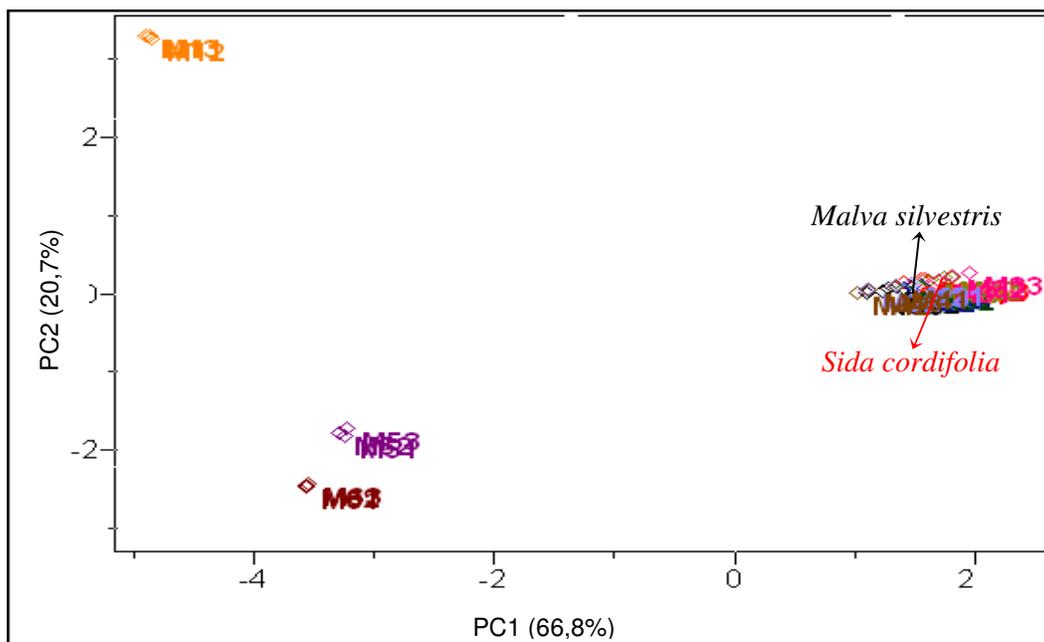


FIGURA 4.62 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução das amostras de “malva”.

Observando-se o gráfico de escores obtido, verifica-se que os padrões não estão discriminados, o que não era esperado, pois o perfil espectral para cada padrão é bastante singular. Porém nota-se que três amostras M1, M5 e M6 estão discriminadas das demais por valores negativos de PC1, apresentando comportamento atípico.

Este mesmo comportamento foi obtido por HCA, como mostrado pelo dendograma na figura 4.63, de maneira que com um índice de similaridade igual a 0,761 as três amostras também estão discriminadas das demais.

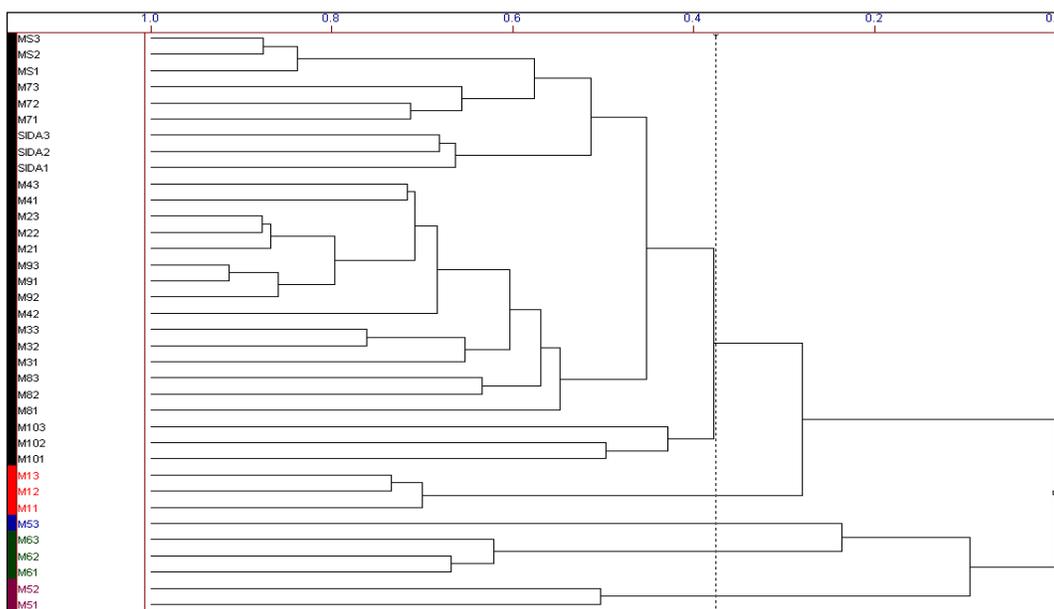


FIGURA 4.63 – Dendrograma dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução das amostras de “malva”.

Desta forma, excluíram-se as três amostras da matriz gerada e processou-se novamente a PCA, utilizando os mesmos pré-processamentos e transformadas, e obteve-se um novo gráfico de escores que está apresentado na figura 4.64, com PC1 descrevendo 21,04% de variância do conjunto de dados e com a PC2 descrevendo 14,7%.

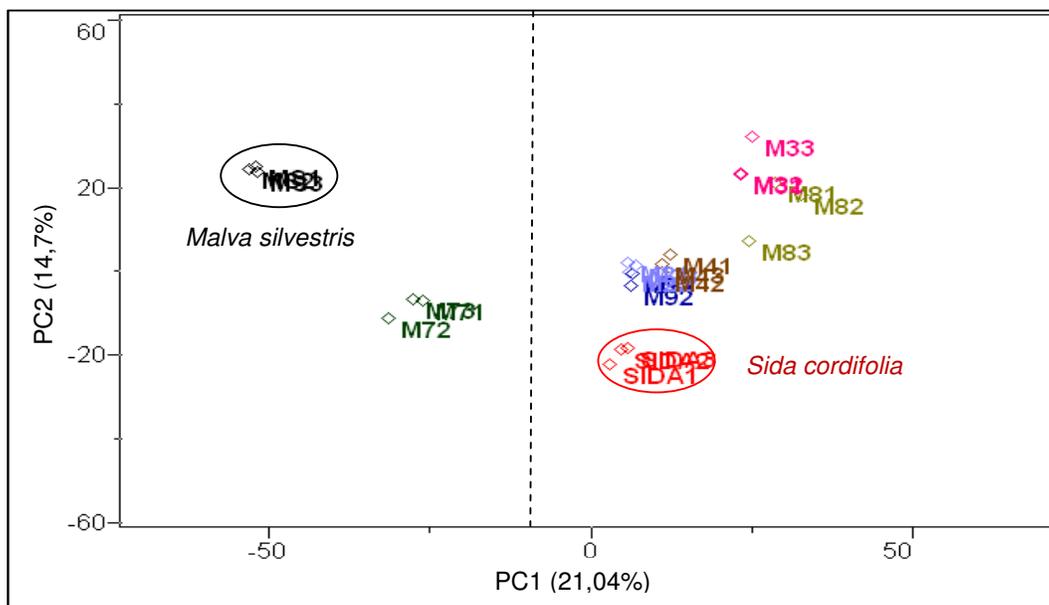


FIGURA 4.64 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H em solução das amostras de "malva", após a exclusão das amostras M1, M5 e M6

Nestas condições, foi observado que os padrões estão discriminados por PC1, *Malva silvestre* em valores negativos, *Sida cordifolia* em valores positivos e a maioria das amostras comerciais estão dispostas em valores positivos de PC1, agrupando com *S. cordifolia*. Observa-se também que a amostra M7 está discriminada das demais amostras comerciais em valores negativos de PC1 e PC2.

Relacionando os valores obtidos pelo gráfico de escores aos valores do gráfico de *loadings*, verificou-se que as variáveis de maior peso para a discriminação em valores negativos de PC1 são as regiões com sinais característicos da *Malva silvestris*, principalmente os sinais em  $\delta$  7,32 e 7,41 característicos da malvona A, como mostrado na figura 4.65,

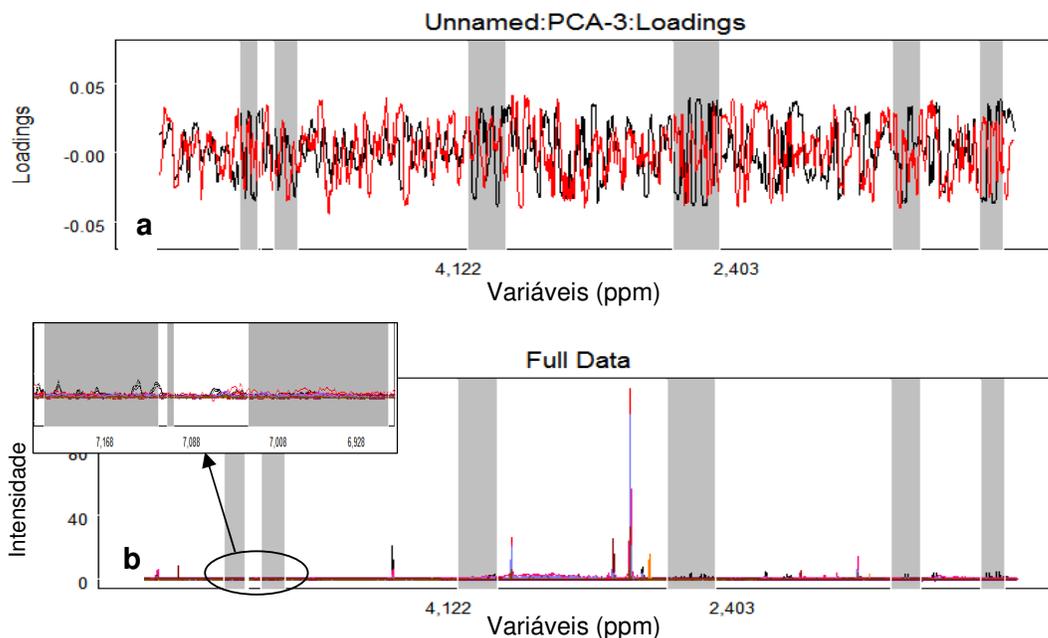


FIGURA 4.65 - Gráfico de *loadings* PC1 x PC2 dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução para amostras de malva (a), RMN de  $^1\text{H}$  destacando as variáveis com maior peso para a discriminação em valores negativos PC1 (b).

Analisando o espectro da amostra M7 observa-se um alto grau de similaridade com o padrão *Malva silvestris*, apresentando apenas algumas diferenças de intensidade e ausência de sinais na região aromática (FIGURA 4.66), o que influenciou os valores negativos de PC2. Desta maneira, pode-se sugerir que seja a única amostra que tem os mesmos constituintes químicos desta espécie.

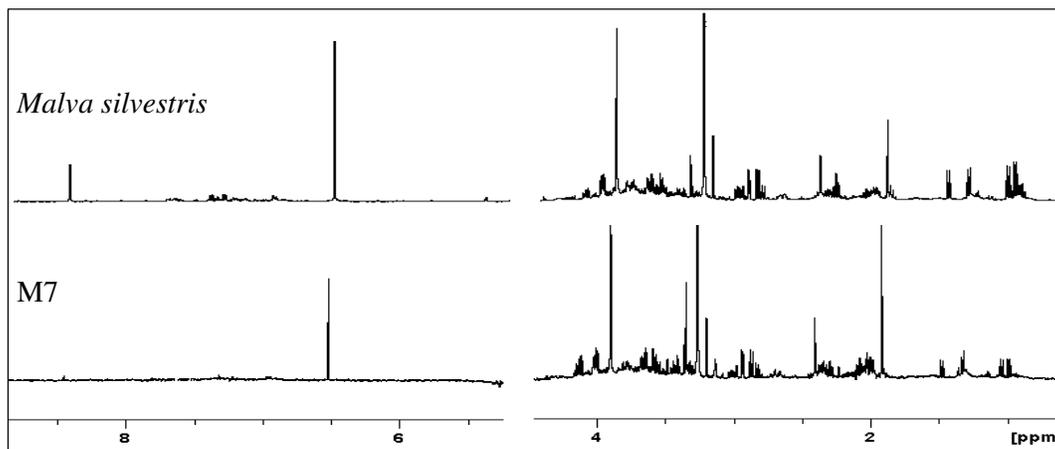


FIGURA 4.66 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em solução da amostra M7 e da amostra padrão *M. silvestris*.

Por HCA obteve a mesma discriminação obtida por PCA com um grau de similaridade igual a 0,177 ou seja o agrupamento da amostra M7 com a espécie *Malva silvestris*.(FIGURA 4.67)

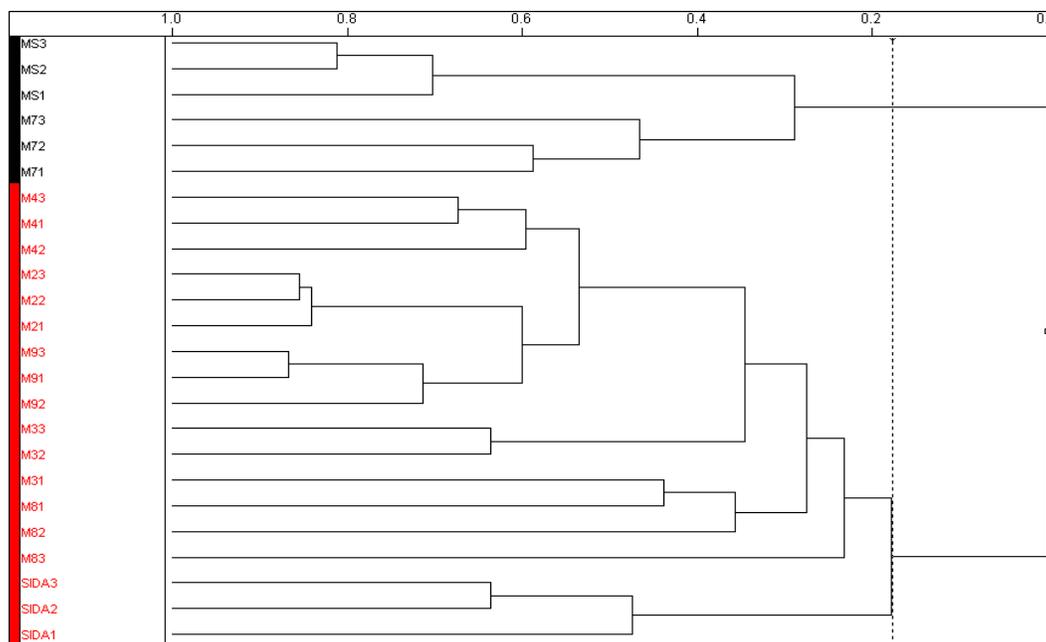


FIGURA 4.67 - Dendrograma dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução das amostras de “malva”, após a exclusão das amostras M1, M5 e M6.

#### 4.3.2. - Análise das amostras intactas por RMN HRMAS de $^1\text{H}$

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  HRMAS foram obtidos utilizando o material intacto sem nenhum tratamento prévio, apenas moído, tanto para as amostras comerciais bem como para os padrões.

Os espectros obtidos para dos padrões de *Malva silvestris* e *Sida cordifolia* apresentaram resolução semelhante aos espectros obtidos por RMN em solução, isso deve-se ao fato das folhas das espécies de “malva” absorverem bem a água adicionada (3 gotas de uma solução de TMS- $d_4$  em  $\text{D}_2\text{O}$ ), conferindo um aspecto pastoso, o que proporcionou maior movimento molecular minimizando as interações dipolares e reduzindo consideravelmente a susceptibilidade magnética causada pela heterogeneidade da amostra. É importante ressaltar que esta foi uma característica particular para as amostras

de “malva”. Na figura 4.68 está apresentado os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  HRMAS, obtido para as duas espécies

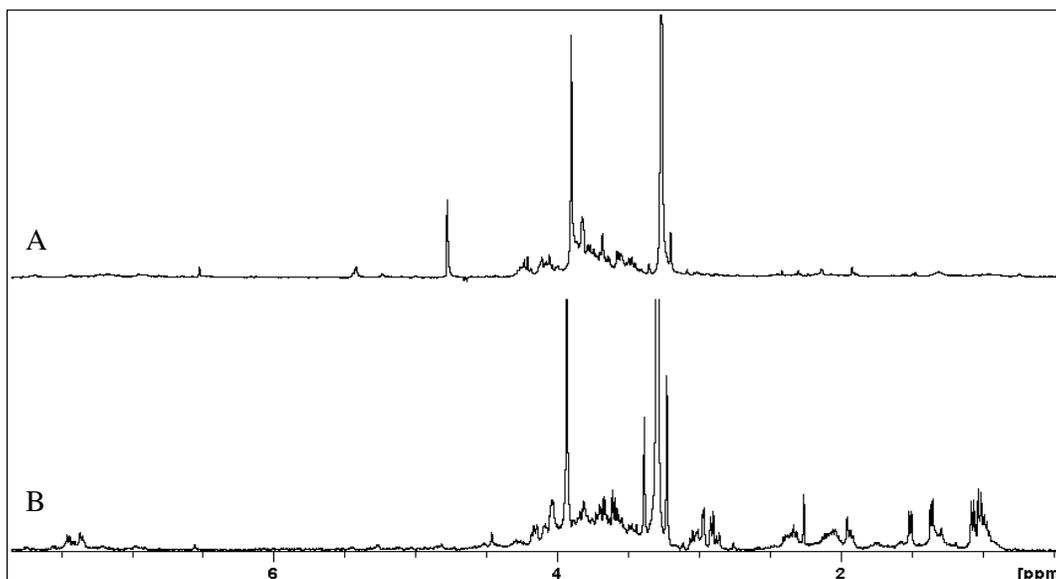


FIGURA 4.68 - Espectros de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  para amostras padrão de “malva”; A – *Sida cordifolia* e B- *Malva silvestris*.

Os espectros de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$ , apresentaram quase todos os sinais já identificados por RMN de  $^1\text{H}$  em solução, apresentando apenas a ausência de alguns sinais de compostos minoritários. Feita esta constatação fez-se a análise quimiométrica dos dados de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$ .

#### 4.3.2.1 - Análise quimiométrica dos dados de RMN HRMAS de $^1\text{H}$ das amostras intactas

Para a análise quimiométrica foi excluída a região espectral referente ao sinal ao TMS- $d_4$  e todas as regiões sem sinais, para que os dados fossem autoescalados.

Também foram utilizadas transformações como: normalização e primeira derivada em um intervalo de 25 pontos, obtendo o gráfico de escores apresentado na figura 4.69



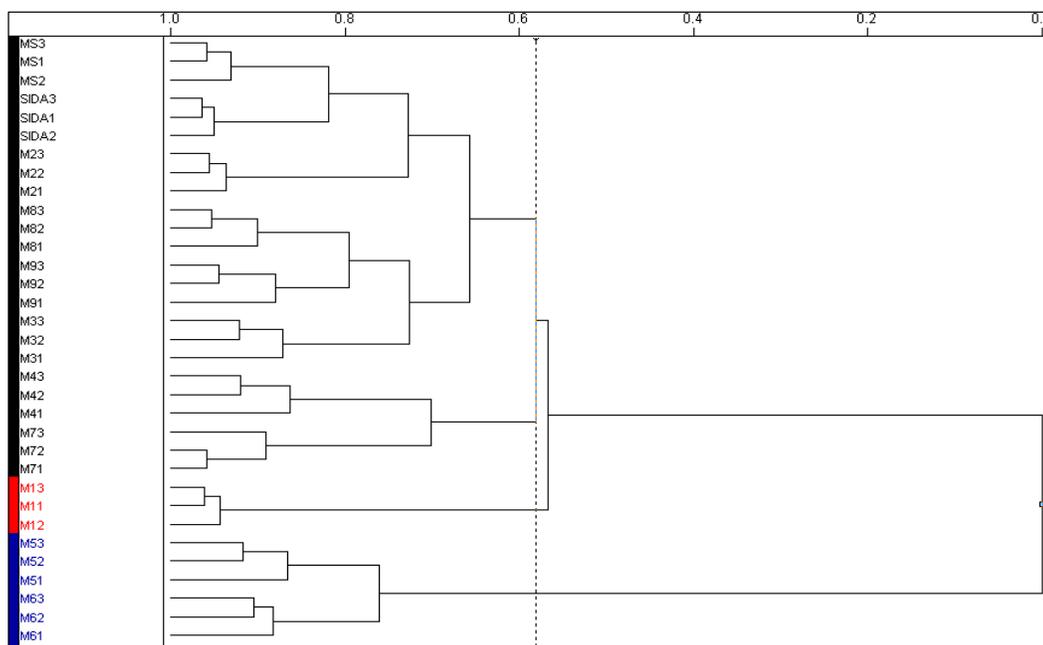


FIGURA 4.70 - Dendrograma dos dados de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  das amostras de “malva”

Fez-se novamente as análises de PCA, utilizando os mesmos parâmetros empregados anteriormente, excluindo as amostras M1, M5 e M6. O gráfico de escores obtido está apresentado na figura 4.71, e observa-se que a amostra M7 se agrupa com o padrão *Malva silvestris* em valores negativos de PC1, sendo que a maioria das amostras comerciais se agrupa em valores positivos de PC1 e com o padrão *Sida cordifolia*. Observa-se também a discriminação das amostras M3 e M8, em valores positivos de PC2, causada pela ausência dos sinais em  $\delta$  1,00e 1,05 (valina),  $\delta$  1,33 (treonina e  $\delta$  1,44 (alanina).

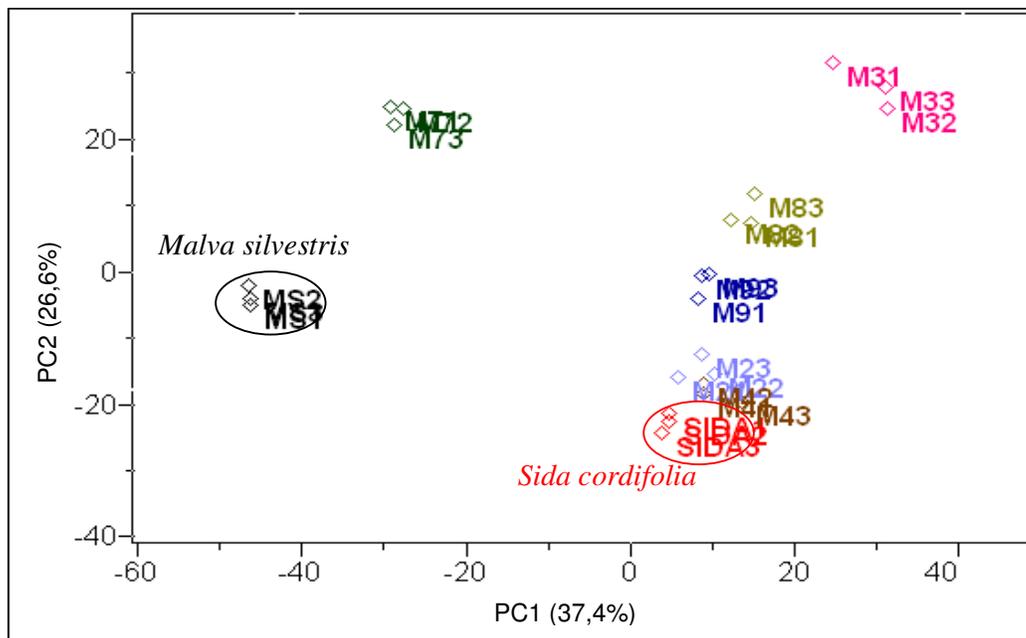


FIGURA 4.71 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H em solução das amostras de "malva", após a exclusão das amostras M1, M5 e M6

Por HCA com índice de similaridade igual a 0,206 obteve-se o mesmo agrupamento, como mostrado na figura 4.72.

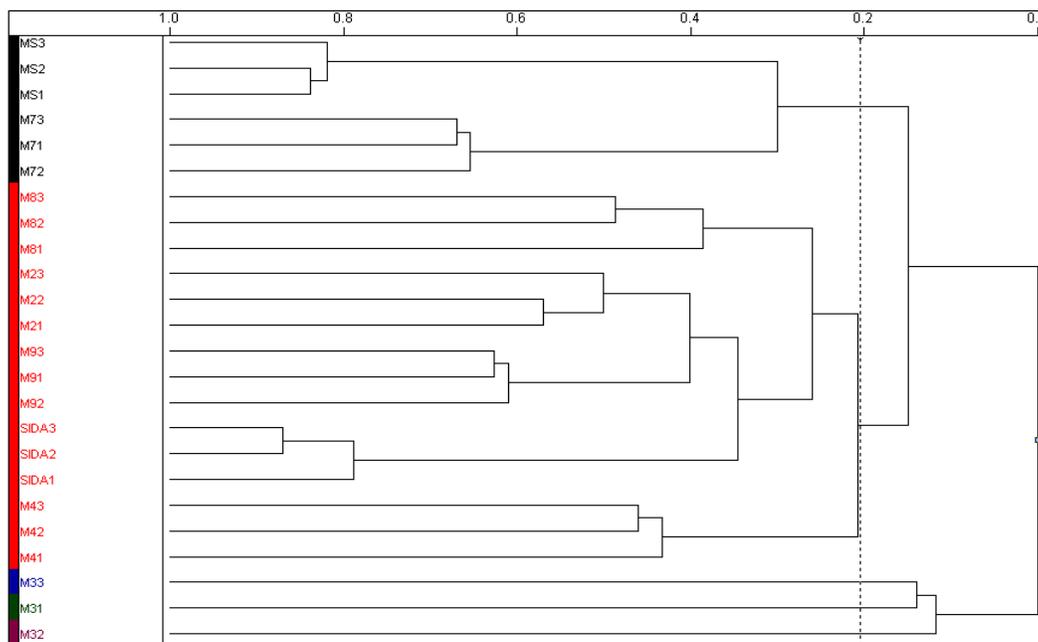


FIGURA 4.72 - Dendrograma dos dados de RMN HRMAS de <sup>1</sup>H das amostras de "malva", após a exclusão das amostras M1, M5 e M6.

Os resultados obtidos para os dados de RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  mostraram-se similares aos resultados das análises com os dados de RMN de  $^1\text{H}$  em solução, o que corrobora com a suspeita de que as amostras M1, M5 e M6 sejam amostras adulteradas, possivelmente, por se tratar de amostras que pertence a outra espécie vegetal não utilizada neste trabalho.

Mostra-se também que a maioria das amostras comerciais pertence à espécie *Sida cordifolia*, e não à espécie *Malva silvestris* como indicado nos rótulos.

#### 4.3.3. - Análise das amostras intactas por infravermelho

As análises de IV apresentaram perfis espectrais com absorções similares, porém com intensidades distintas para as duas amostras padrão (*Malva silvestris* e *Sida cordifolia*), como mostrado na figura 4.73.

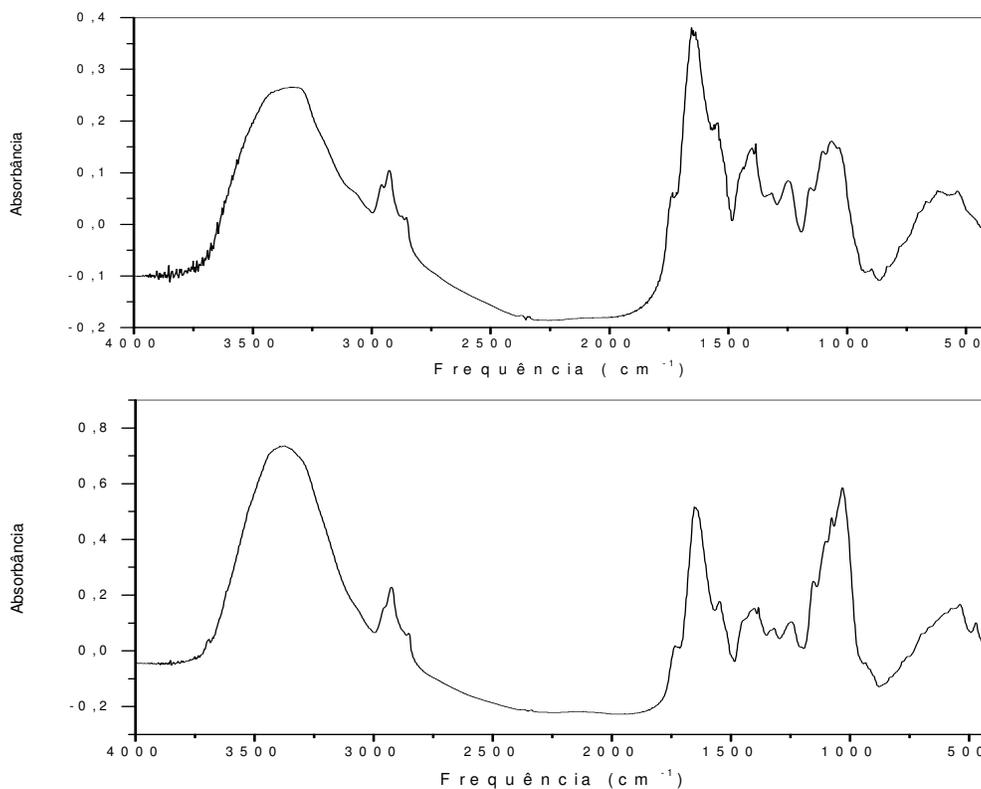


FIGURA 4.73 – Espectros de IV das amostras padrão *Malva silvestris* e *Sida cordifolia*.

Os espectros apresentaram absorções características de deformações axiais O–H, em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  3450, vibração de estiramento de C–H em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  2850 e 2920, deformação de C=O em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1650, deformação de C-H de metilas em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1390, deformação C–N em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1250, mais intenso no espectro de *Sida cordifolia* e absorções em aproximadamente  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  1050 referentes às deformações axiais simétricas de C–O–C.

Como para as outras técnicas, aplicou-se a quimiometria para os dados de IV, sendo antes excluídas regiões de  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  4000 a 3001 e 2827 a 1747 que não possuíam informações relevantes para a discriminação das amostras e foi mantido o restante do espectro (FIGURA 4.74).

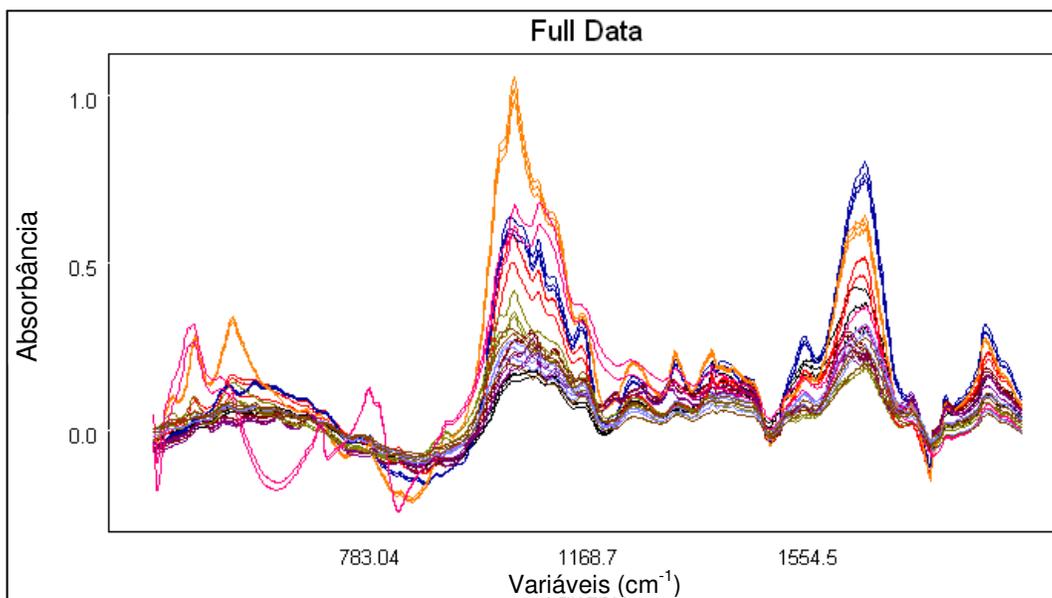


FIGURA 4.74 Gráfico de linhas dos dados de IV de todas as amostras de “malva” após a exclusão das regiões de  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  4000 a 3001 e  $\nu^{\text{cm}^{-1}}$  2827 a 1747.

Para análise de PCA os dados foram normalizados, aplicada a primeira e segunda derivada em um intervalo de 25 pontos e no pré-processando, centrou-se os dados na média.

O gráfico de escores de PC1 x PC2 está mostrado na figura 4.75. PC1 que descreve 48,6% da variância do conjunto de dados e a PC2 que descreve 21,2%. Neste gráfico observa-se a discriminação das amostras, M5 e M6, por valores negativos de PC1 e M7 positivos de PC1 e negativos em PC2

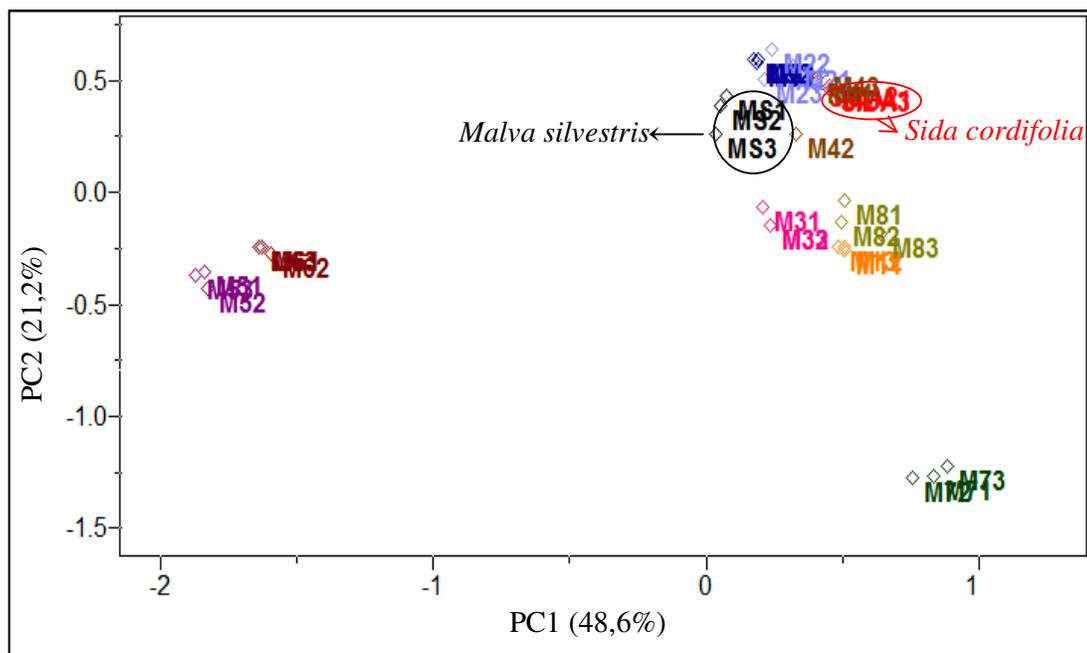


FIGURA 4.75 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de IV de todas as amostras de “malva”.

O dendograma resultante da análise dos dados de IV de todas as amostras de “malva” por HCA está mostrado na figura 4.76 Ressaltando que foram utilizados os mesmos parâmetros do PCA, juntamente com a distância Euclidiana e o método de conexão incremental. Com um índice de similaridade igual a 0,268 as amostras M5 e M6 se discriminam das demais, porém, a amostra M1 fica agrupada com as demais amostras e a amostra M7 discriminada em positivos de PC1 e negativos em PC2

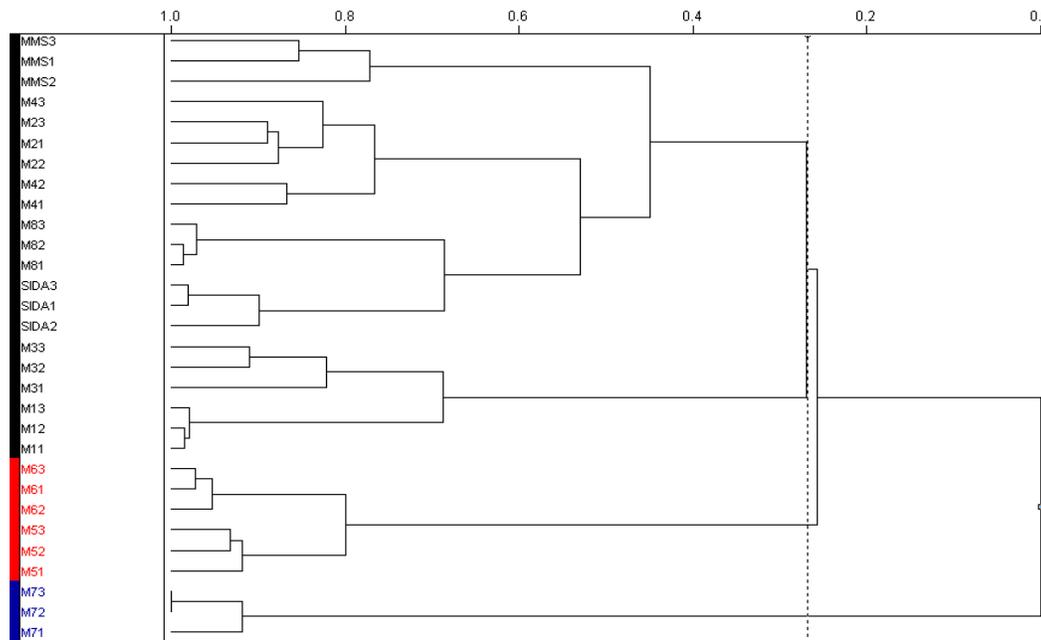


FIGURA 4.76 – Dendrograma dos dados de IV das amostras de “malva”.

Em seguida fez-se novamente a análise de PCA utilizando os mesmos parâmetros, porém excluindo as amostras M5 e M6, que se comportaram de maneira distinta e foram consideradas *outlier*. O gráfico de escores mostra a maioria das amostras comerciais se agrupando com o padrão *Sida cordifolia*, em valores negativos de PC2; e a mostra M7 discriminado em valores positivos de PC2 juntamente com o padrão *Malva silvestris* (FIGURA 4.77).

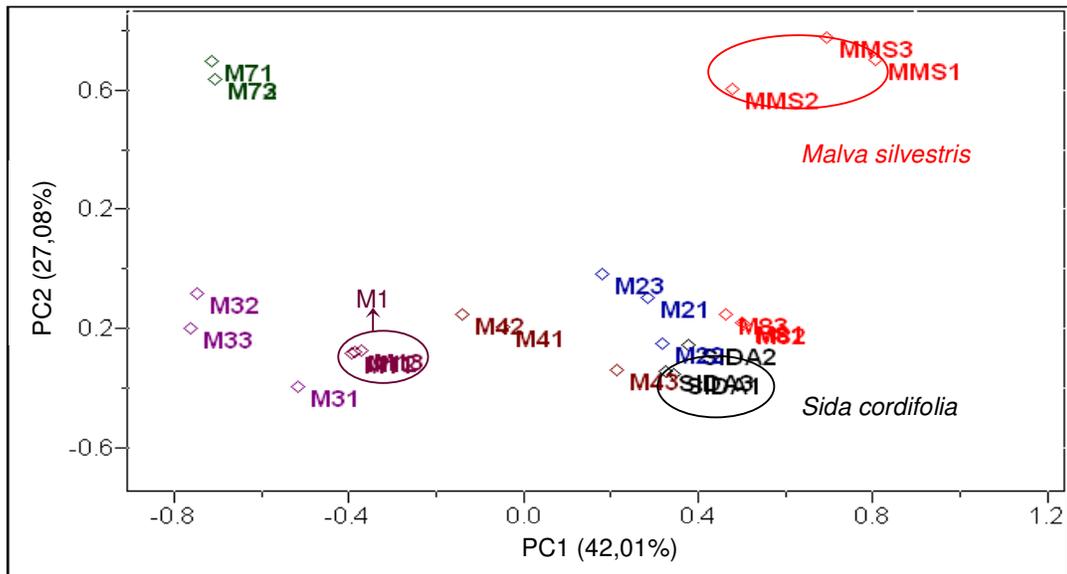


FIGURA 4.77 - Gráfico de escores PC1 x PC2 dos espectros de IV de todas as amostras de "malva", após a exclusão das amostras M5 e M6

#### 4.3.4 - Conclusões

Nos extratos aquosos das espécies *Malva silvestris* e *Sida cordifolia* foi possível caracterizar os aminoácidos: valina, treonina e alanina. No extrato de *Sida cordifolia* caracterizou-se também o aminoácido ácido 4-aminobutanóico e os açúcares: sacarose,  $\alpha$ -glucose e  $\beta$ -glucose e o composto efedrina. No extrato de *Malva silvestris* foi caracterizado o composto malvona A.

Aliando as análises quimiométricas de PCA e HCA aos dados obtidos pelas técnicas empregadas neste trabalho, RMN de  $^1\text{H}$  em solução, RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  e IV, verificou que duas amostras M5 e M6 provavelmente pertença uma espécie diferente das estudadas neste trabalho, e que a amostra M1 apresentou resultados contraditórios, ou seja, pela análise de IV está agrupada com *Sida cordifolia* e pelos dados de RMN esta amostra está discriminada juntamente com as amostras M5 e M6. Pode-se dizer também que a amostra M7, é a única amostra pertencente à espécie *Malva silvestris*.

Comparando os resultados obtidos, pode concluir que os melhores resultados foram apresentados quando aliou-se RMN de  $^1\text{H}$  em solução com quimiometria, pois apresentou uma boa reprodutibilidade entre as triplicatas, além de permitir relacionar os compostos com discriminação obtida.

#### 4.4 – Considerações finais

Neste trabalho mostrou-se que o controle de qualidade de drogas vegetais via RMN e IV, aliado a ferramentas estatísticas como a quimiometria é bastante viável, já que os espectros contêm um grande número de informação, e que, isoladamente não fornece dados conclusivos. Além disso, permitiu obter resultados com o mínimo de tratamento das amostras evitando alterações na composição das mesmas.

Através das análises dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  (HRMAS e em solução) foi possível discriminar as espécies empregadas como padrão, bem como as amostras comerciais, além de evidenciar as principais diferenças em suas composições.

Entretanto os dados de IV aliado a quimiometria mostraram-se pouco satisfatórios, pois apresentaram resultados de PCA com as amostras muito dispersas, e não permitiram correlacionar os compostos com as discriminações apresentadas.

Contudo, este trabalho apresentou apenas um indicativo das diferenças e semelhanças químicas entre as amostras e a sua relação com a qualidade das drogas vegetais comercializadas nas regiões estudadas. Para obter um método eficaz de controle de qualidade é necessário incluir um maior número de amostras e considerar outras variáveis, como sazonalidade e regionalidade abrangendo uma faixa bem maior da estudada. Além disso, obter informações de através de outras técnicas, como por exemplo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas a fim de se avaliar a convergência ou não dos resultados aqui obtidos.

# Referências bibliográficas

## 5 - Referências bibliográficas:

ASCHWANDEN, C.; Herbs for health, but how safe are they? *Bulletin of the World Health Organization*, **79** (7), 691-692, 2001.

BILLETER, M.; MEIER, B.; STICHER, O.; Hydroxyflavonoid glucuronides from *Malva sylvestris*, *Phytochemistry*, **30** (3), 987-90, 1991.

BALBACH A.; Flora medicinal na medicina doméstica, vol. 2. MVP, Itaquaquecetuba-SP, 703, 1978.

BARROSO, G. M., PEIXOTO, A. L., ICHASO, C. L., COSTA, C. G., GUIMARÃES, E. F.; *Sistemática de angiospermas do Brasil*. São Paulo: Edusp. v. 1, 255, 1977.

BEEBE, K.; PELL, J. R.; SEAHOLTS, N. B.; *Chemometrics: A practical guide*. Ed. John Wiley & Sons, New York, 348, 1998.

BELTON, P. S.; COLQUHON, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, K.; SPRAUL, M.; Application of chemometrics to the <sup>1</sup>H NMR spectra of Apple juices: discrimination between apple varieties. *Food Chemistry*, **61**(2), 207-213, 1998.

BORRAS, M. R. L.; Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas? Editora Valer, Manaus, 322, 2003.

BRASIL 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução de Diretoria Colegiada n.º 48 de 16 de março de 2004*. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 20 agosto de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas Públicas. Áreas de Atuação. Medicamentos. Legislação. Resoluções. Resolução – RDC n.º 17 de 24 de fevereiro de 2000. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm>. Acesso em 18 setembro de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas Públicas. Áreas de Atuação. Medicamentos. Legislação. Resoluções. Resolução – RDC n.º 9 de 10 de março de 2010. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 30 março de 2010.

BRESCIA, M. A.; CALDAROLA, V.; DE GIGLIO, A.; BENEDETTI, D.; FANIZZI, F. P.; SACCO, A.; Characterization of geographical origin of Italian red wines

based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Analytical Chimica acta*, **458**(1), 177-186, 2002.

BRUMMITT, R. K.; *Vascular plant families and genera*. Royal Botanic Gardens, Kew, 804, 1992.

BOVINI, M. G.; CARVALHO-OKANO, R. M.; VIEIRA, M. F.; Malvaceae A. Juss. no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Revista Rodriguésia*, **52**(81), 17-47, 2001.

CALIXTO, J. B.; Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents), *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **33**, 179 -189, 2000.

CALIXTO, J. B.; Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America, A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 131-134, 2005.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S.; Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmagnosia*, **18** (2), 314-319, 2008.

CLARIDGE, T. D. W.; *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, tetrahedron Organic Chemistry, Series, Volume 19*, Oxford, Pergamon, 381,1999.

CRONQUIST, A.; *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press. 1262, 1981.

CONSOLINI, A. E.; MIGLIORI, G. N.; Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **96**, 417-422, 2005.

CORDELL, G. A.; Changing strategies in natural products chemistry, *Phytochemistry*, **40**, 1585-1612, 1995.

CORREA JUNIOR, C.; LIN, M. C.; SCHEFFER, C. M.; Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. 1ª edição Curitiba: EMATER, 166-167, 1991.

CORREA JÚNIOR, C.; MING, L. C.. Fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen: o ginseng brasileiro.. In: Miguel N. Alexiades; Patricia Shanley. (Org.). Productos florestales, medios de subsistencia y conservacion: estudios de caso sobre sistemas de manejo de produtos florestales no maderables. Jacarta: CIFOR, **3**, 349-363, 2004.

DAOLIO, C.; BELTRAME, F. L; FERRERIA, A. G.; CASS, Q. B.; CORTEZ, D. A. G.; FERRERIA, M. M C.; Classification of commercial catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics. *Phytochemical Analysis*, **19**, 218-228, 2007.

- DELARCINA Jr, S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R. M.; TANAE, M. M.; LAPA, A. J.; Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the in vivo activity in tracheal muscles. *Phytomedicine*, **14**, 328-332, 2007.
- DI STASI, L. C.; Arte, ciência e magia In: Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 15-21, 1996.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª Edição revisada e ampliada. São Paulo: Editora UNESP, 604, 2002.
- DIWAN, P.V. KANTH,V. R.; Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic activities of *Sida Cordifolia*. *Phytotherapy Research*, **13**, 75-77, 1999.
- FARINA, A.; DOLDO, A.; COTICHINI, V.; RAJEVIC, M.; QUAGLIA, M. G.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F; HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva Silvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **14**(1/2), 203-211, 1995.
- FRÉDÉRICH, M.; CHOI, Y. H., ANGENOT, L.; HARNISCHFEGER, G.; LEFEBER, A. W. M.; VERPOORTE, R.; Metabolomic analysis of *Strychnos nux-vomica*, *Strychnos icaia* and *Strychnos ignatii* extracts by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate analysis techniques. *Phytochemistry*, **65**, 1993-2001, 2004.
- FREITAS, A.; Estrutura de Mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. 2007. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo\\_fitoterapicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf), acessado em 24-09-2009.
- GANAI, B. A.; MASOOD, A.; BAIG, M. A.; Isolation, purification and partial characterization of sulfite oxidase from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry*, **45**(5), 879-880, 1997.
- GHOSAL, S.; CHAUHAN, R. B. P. S.; MEHTA, R.; Chemical constituents of *Malvaceae*. I. Alkaloids of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry*, **14**(3), 830-832, 1975.
- GOSMANN, G; GATTUSO, S; GATTUSO, M; FENNER, R; PACHECO, E. F.; FERRAZ, A.; SAVI, L. A.; BARARDI, C. R. M.; SIMOES, C. M. O.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.; GNERRE, C.; TESTA, B.; RATES, S. M. K.; Botanical (morphological, micrographic), chemical and pharmacological characteristics of *Pfaffia* species (*Amaranthaceae*) native to South Brazil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **39**(2), 141-147, 2003.
- GUTIERREZ DE GOTERA, O.; MARTINEZ, M.; SANABRIA, G. L. P.; IGARTUBURU, J. M.; 1D- and 2D- NMR spectroscopy studies of the

polysaccharide gum from *Spondias purpurea* var. *lutea*. *Food Hydrocolloids*, **19**, 37-43, 2005.

JUAN HIKAWCZUK, V.; SAAD, J. R.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GIORDANO, O. S.; Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. *Anales de la Asociacion Quimica Argentina- San Luis/ Argentina*, **86**(3-6), 167-170,1998.

KRISHNAN, P.; KRUGER, N. J.; RATCLIFFE, R. G.; Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany*, **56**(410), 255-265, 2005.

KHATOON, S.; SRIVASTAVA, M.; RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S.; HPLC method for chemical standardization of *Sida* species and estimation of the alkaloid ephedrine. *Journal of Planar Chromatography*, **18**, 364-367, 2005.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; ERKELENS, C.; LEFEBER, A. W. M., VERPOORTE, R.; Metabolic Fingerprinting of *Ephedra* Species Using <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Chemical. Pharmaceutical Bulletin*, **53**(1), 105-109, 2005.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; FRANCK, U.; WAGNER, H; Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, **8**(1), 47-52, 2001.

LIMA-LANDMAN, M. T. R.; BORGES, A. C. R.; CYSNEIROS, R. M.; DE LIMA, T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine*, **14**, 314–320, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. . *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Nova Odessa. Ed. Plantarum, 512, 2002.

MELO, J. G.; MARTINS, J. D. G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Acta Botânica Brasileira*, **21**(1), 27-36, 2007.

NI, Q. W.; EADS, T. M.; Liquid-phase composition of intact fruit tissue measured by high- resolution proton NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 1026-1034, 1993.

NEIDLEIN, R.; KOCH, E.; Structure of constituents from *Cecropia adenopus* Martius, Part 3. *Archiv der Pharmazie*, **313**(6), 498 - 508, 1980.

NINAHUAMAN, M. F. M. L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: A comparative study to captopril effects in rats. *Phytomedicine*, **14**, 321-327, 2007.

- NISHIMOTO, N.; Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. *Phytochemistry*, **27**(6), 1665-1668, 1988.
- NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y.; Pfaffosides and norriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry*, **23**(1), 139-142, 1984.
- OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M. K.; Contribuição para o estudo farmacognóstico do ginseng brasileiro *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. *Anais de farmácia e química*, **20**, 261-277, 1980.
- PHILLIPSON, J. D.; 50 years of medicinal plant research- every progress in methodology is a progress in science. *Planta medica*, **69**, 491-495, 2003.
- PINTO, A. C.; Silva, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, **25** Supl.1, 45-61, 2002.
- ROCHA, F. F.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C.; TANAE, M. M.; DE LIMA, T. C. M.; LAPA, A. J.; Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents – *In vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism. *Phytomedicine*, **14**, 396 - 402, 2007.
- SANKAR, M. A.; NAIR, G. S.; AUGUSTINE, A.; Ephedrine synthesis in vitro cultures of *Sida* species through precursor feeding. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, **22/4A-23/1A**, 248-251, 2001.
- SATOMI, L. C.; SORIANI, R. R.; PINTO, T. J. A.; Descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama óxido de etileno: aspectos microbianos e químicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **41**(4), 445-450, 2005.
- SILVEIRA, A. L.; GOMES, M. A. S.; SILVA FILHO, R. N.; SANTOS, M.R.V; MEDEIROS, L.A. BARBOSA FILHO, J. M.; Evaluation of cardiovascular effects of vasicine, na alkaloid isolated from the leaves of *Sida cordifolia*. *Revista Brasileira de Farmagnosia*, **14**, 37-39, 2003.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, LCT – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 6<sup>a</sup> Ed., 460, 1998.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 3 ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFSC, 833, 2001.
- SHINTU, L.; CALDARELLI, S.; High-Resolution MAS NMR and chemometrics: characterization of the ripening of Parmigiano reggiano cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4026-4031, 2005.

- SHIOBARA, Y.; A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. *Phytochemistry*, **32**(6), 1527-1530, 1993.
- SOLOLEV, A. P.; SEGRE, A.; LAMANNA, R.; Proton high-field NMR study of tomato juice. *Magnetic Resonance Chemistry*, **41**, 237-245, 2003.
- SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R. M.; TANAE, M. M.; TORRES, L. M. B.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J.; Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. *Phytomedicine*, **15**, 462-469, 2008.
- SUTRADHAR, R. K.; RAHMAN, A. K. M. M.; AHMAD, M. U.; BACHAR, S. C.; Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry Letters*, **1**(4), 179-182, 2008.
- TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; ODASHIMA, S.; WADA, Y.; Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze, *Tetrahedron Letters*, **24**, 1057-1060, 1983.
- TANAE, M. M.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; DE LIMA, T. C. M., SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. *Phytomedicine*, **14**, 309-313, 2007.
- TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G.; FERREIRA, M. M.; CORREA, A.; MATTOSO, L.; Analysis of blends of raw coffees of Arábica and Robusta varieties by <sup>1</sup>H NMR and chemometric Methods. *Magnetic Resonance in Food Science*, 80-88, 2005.
- TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S.; Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **42**(2), 289-306, 2006.
- VELÁSQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; MORDUJOVICH de BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R.; Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, **74**, 91-97, 2003.
- VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.; Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, **28**(3), 519-528, 2005.
- VEIGA JR, V. F.; MELLO, J. C.; As monografias sobre planta medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **18**(3), 464-471, 2008.
- VESHKUROVA, O.; GOLUBENKO, Z.; PSHENICHNOV, E.; ARZANOVA, I.; UZBEKOV, V.; SULTANOVA, E.; SALIKHOV, S.; WILLIAMS, H. J.; REIBENSPIES, J. H.; PUCKHABER, L. S.; STIPANOVIC, R. D.; Malvone A, a phytoalexin found in *Malva sylvestris* (family Malvaceae). *Phytochemistry*, **67**, 2376-2379, 2006.

