

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

**Estudo da Viabilidade do Uso de Métodos de Segunda  
Ordem e RMN na Elaboração de Fingerprint de Bauhinia  
Forficata baseado em seu Extrato Bruto**

**Priscylla Rodrigues Assis**

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do título  
de MESTRE EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador: Renato Lajarim Carneiro**  
**Co-Orientador: Tiago Venâncio**

**\*bolsista Capes 08/2012-07/2013**

**São Carlos - SP**  
**2014**

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

A848ev Assis, Priscylla Rodrigues.  
Estudo da viabilidade do uso de métodos de segunda ordem e RMN na elaboração de *fingerprint* de *bauhinia* forficata baseado em seu extrato bruto / Priscylla Rodrigues Assis. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
52 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Química analítica. 2. *Bauhinia*. 3. Ressonância magnética nuclear. 4. Quimiometria. I. Título.

CDD: 543 (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 Mestrado Acadêmico**

---

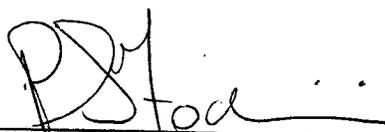
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata Priscylla Rodrigues Assis, realizada em 30 de outubro de 2014:*



Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



Prof. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira



Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini

## **DEDICATÓRIA**

“Dedico este trabalho ao meu pai Jânio Rodrigues da Silva, a minha mãe Maria de Fátima de Assis Rodrigues, às minhas irmãs Maria Luiza e Karolyne e ao meu namorado Carlos Juliano da Silva”

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao professor Renato e ao Tiago, pela orientação, atenção, paciência e compreensão, que possibilitaram o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus pais, Jânio e Fátima, pelo apoio e todo esforço e investimento que fizeram na minha formação.

Ao Juliano, por estar por perto o tempo todo, me apoiando e animando nos momentos difíceis.

A todos os meus familiares que sempre torceram por mim.

Aos amigos do GQA pela amizade e pelo ótimo ambiente de trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial à técnica do laboratório de RMN, Luciana Vizotto, que tornou possível a realização das análises.

Ao IAC por ceder as amostras em especial ao funcionário José de Freitas Benedito (Benê) que nos acompanhou a campo e facilitou nossa entrada na mata e localização da árvore além de disponibilizar as ferramentas necessárias para o sucesso da coleta, como podão, luvas entre outros.

À UFSCar e ao Departamento de Química por disponibilizarem toda a infraestrutura necessária ao desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

## Lista de Abreviaturas

- RMN** – Ressonância Magnética Nuclear
- PCA** – Análise por Componentes Principais
- SVD** – Decomposição por Valores Singulares
- PARAFAC** – Análise dos Fatores Paralelos
- ALS** – Quadrado Mínimos Alternados
- MCR** – Resolução Multivariada de Curvas
- EFA** – Análise de Fatores Evolucionários
- IAC** – Instituto Agronômico de Campinas
- NS** – Número de Varreduras
- TD** – Domínio do Tempo
- PC** – Componente Principal
- COW** – Correlation Optimized Warping
- AMG** – Amostra Comercial 1
- BOT** – Amostra Comercial 2
- FAE** – Amostra Comercial 3
- FAR** – Amostra Comercial 4
- FCL** – Amostra Comercial 5
- FN** – Amostra Comercial 6
- FVP** – Amostra Comercial 7
- IAC** – Amostra Padrão 1

## Lista de Tabelas

TABELA 4.1. Relação das amostras utilizadas nesse trabalho com suas respectivas nomenclaturas.....	20
TABELA 4.2. Fases extratoras utilizadas para obtenção dos extratos das amostras comerciais e padrão .....	20

## Lista de Figuras

FIGURA 2.1. Árvore e folhas da <i>Bauhinia forficata</i> .....	7
FIGURA 2.2. Cromatograma dos padrões de flavonóides. (1) 3,7-di-O-L-ramnopiranosilquercetina (2) Kaempferetrina (3) quercetina (4) Kaempferol <sup>29</sup> . .....	8
FIGURA 2.3. Estrutura do Kaempferol-3,7-di-O-raminosídeo (kaempferitrina) <sup>31</sup> . .....	8
FIGURA 2.4. Configuração de energia para o núcleo de hidrogênio na presença de um campo magnético externo .....	10
FIGURA 2.5. Componentes do modelo PARAFAC para um conjunto de dados de três modos <sup>43</sup> .....	13
FIGURA 4.1. Etapas do processo de preparo das amostras comerciais. (A) Separação dos galhos das folhas das amostras. (B) Imagem do moinho. (C) Amostra após passar pelo moinho de facas .....	19
FIGURA 4.2. Amostras em processo de preparo para obtenção dos extratos .....	21
FIGURA 5.1. Folhas de algumas amostras comerciais (AMG, FAR e FCL) e da amostra padrão (IAC). .....	25
FIGURA 5.2. Espectros de RMN H1 para todos os extratos. (A) Espectro completo. (B) Zoom do espectro completo na região de flavonóides. (C) Zoom do espectro completo na região de açúcares. (D) Zoom do espectro completo na região de compostos com insaturações .....	26
FIGURA 5.3. Espectros de todas as amostras em todas as fases extratoras. (A) Matriz completa (B) Matriz com bucket .....	27
FIGURA 5.4. Gráfico dos scores da PC1 x PC2 do modelo PCA para matriz completa dos dados .....	28
FIGURA 5.5. Gráfico dos scores da PC1 x PC2 do modelo PCA para matriz com bucket .....	29
FIGURA 5.6. Gráfico dos scores da PC1xPC2 do modelo PCA construído excluindo os extratos em metanol e metanol/água .....	30
FIGURA 5.7. Loadings da PC1 e PC2 para o modelo construído excluindo os extratos obtidos em Metanol e Metanol/Água .....	30
FIGURA 5.8. Gráfico dos scores da PC1xPC2 do modelo PCA construído apenas para os solventes metanol e metanol/água .....	31
FIGURA 5.9. Loadings da PC1 e PC2 para o modelo construídos apenas com extratos obtidos em Metanol e Metanol/Água .....	32
FIGURA 5.10. Espectros de H1 RMN da amostra IAC em diferentes fases extratoras .....	33

FIGURA 5.11. Gráfico dos scores da PC1xPC2 do modelo PCA individuais para cada amostra nas sete diferentes fases extratoras .....	35
FIGURA 5.12. Espectros de H1 RMN para todas as amostras para a fase extratora metanol.....	36
FIGURA 5.13. Gráfico dos scores da PC1xPC2 para todas as amostras em diferentes fases extratoras .....	37
FIGURA 5.14. Gráfico de Loadings da primeira componente para o modelo para todas as amostras em solventes diferentes .....	38
FIGURA 5.15. Gráfico dos Scores da PC1xPC2 para as PCAs construídas com as fases extratoras hexano, metanol/água e metanol .....	39
FIGURA 5.16. Gráfico de Loadings da primeira componente para o modelo para todas as amostras em hexano, metanol/água e metanol .....	40
FIGURA 5.17. Gráficos dos escores da PC1xPC2 construído após eliminação da região de absorção de açúcares .....	41
FIGURA 5.18. Gráfico de loadings para a primeira e segunda componente do modelo construído retirando a região do espectro relativa a absorção de açúcares.	42
FIGURA 5.19. Ampliação de duas regiões do espectro de H1 RMN, aromáticos e açúcares, para a amostra IAC.....	44
FIGURA 5.20. Comparação entre os espectros (A) antes do alinhamento (B) após o alinhamento com algoritmo COW.....	45
FIGURA 5.21. Ampliação da região de açúcares do espectro da amostra AMG .....	45

## Resumo

### **Título: Estudo da Viabilidade do Uso de Métodos de Segunda Ordem na Elaboração de Fingerprint de *Bauhinia forficata* baseado em seu Extrato Bruto**

Diante do elevado número de espécies de *Bauhinia* e da grande similaridade morfológica entre elas, se faz necessário o desenvolvimento de técnicas robustas de análise no controle de qualidade de plantas utilizadas como fitoterápicos, uma vez que dificilmente se alcança os efeitos desejados quando se utiliza uma espécie diferente, como é o caso da planta estudada.

Diante disso, o presente trabalho visou identificar similaridades entre os preparados comerciais e a amostra padrão de *Bauhinia forficata* Link. Para tanto, foram obtidos extratos brutos dos preparados comerciais e da amostra padrão utilizando diferentes fases extratoras. Os extratos foram analisados por meio da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) e a análise por componentes principais (PCA) utilizada para extração e interpretação dos dados obtidos.

Como resultados, foi possível identificar que as fases extratoras hexano, metanol e metanol/água, geraram os perfis espectrais mais diferenciados. A análise visual das folhas das amostras sugere que há pelo menos quatro amostras diferentes no conjunto de dados. Além disso, por meio da análise por PCA pode-se concluir que todas as amostras comerciais são diferentes da amostra padrão. Entretanto, não é possível afirmar se as amostras pertencem ou não à mesma espécie, uma vez que causas externas como tempo e temperatura de armazenamento, podem gerar variabilidades químicas que são modeladas pelo PCA e portanto outros estudos devem ser conduzidos com o intuito de classificá-las.

Para tal estudou-se a viabilidade de utilizar métodos de segunda ordem, como PARAFAC e MCR. As características dos dados não atendiam aos pré-requisitos para uso desses métodos, como por exemplo a trilinearidade, tornando-os não aplicáveis.

## Abstract

### **Title: Viability Study of the Use of Second-Order Methods and NMR in the Development of Fingerprint *Bauhinia forficata* using its row Extract**

Given the large number of species of *Bauhinia* and great morphological similarity between them, it is necessary the development of robust analytical techniques in quality control of plants used as herbal medicines, since it is difficult to achieve the desired effects when using a different species as is the case of plant studied.

Therefore, this study aimed to identify similarities between commercial preparations and the standard sample *Bauhinia forficata* Link. Obtained crude extracts of commercial samples and standard sample using different extracting phases. The extracts were analyzed using the technique of nuclear magnetic resonance (NMR) and principal component analysis (PCA) used for extraction and interpretation of the data obtained.

As a result, we found that the extracting phases hexane, methanol and methanol / water, generated the most varied spectral profiles. Visual analysis of the samples suggests that there are at least four different samples in the data set. Moreover, by analyzing PCA can be concluded that all the samples are different from the standard sample. However, it is not possible to say whether or not the samples belong to the same species, since external causes as time and storage temperature, can cause chemical variability that are modeled by the PCA and thus further studies should be conducted in order to classify them.

To do this we studied the feasibility of using second-order methods such as PARAFAC and MCR. The characteristics data didn't accord the requirements for use of these methods, such as trilinearity, blocking its application.

## Sumário

1. Capítulo 1 - Introdução .....	1
2. Capítulo 2 - Revisão de Literatura .....	4
2.1. Fingerprint.....	5
2.2. Bauhinia Forficata Link.....	6
2.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	9
2.4. Análise por Componentes Principais (PCA).....	11
2.5. PARAFAC .....	12
2.6. MCR – ALS .....	14
3. Capítulo 3 - Objetivos .....	16
4. Capítulo 4 - Metodologia.....	18
4.1. Aquisição das amostras .....	19
4.2. Preparo das amostras .....	19
4.3. Preparo dos Extratos .....	20
4.4. Aquisição dos espectros de RMN H1 .....	21
4.5. Pré-Processamento dos dados .....	22
4.6. Matriz com Bucket.....	22
4.7. Análise por Componente Principal .....	23
5. Capítulo 5 - Resultados e Discussões .....	24
5.1. Análise Visual das Amostras.....	25
5.2. Análise dos Espectros .....	26
5.3. Análise dos Modelos.....	27
5.3.1. Influência dos deslocamentos de sinal .....	27
5.3.2. Avaliação do Modelo Completo .....	29
5.4. Influência da Fase Extratora.....	32
5.5. Análise PCA para Fases Extradoras.....	36
5.6. PCA sem a Região dos Açúcares .....	40
5.7. Quebra de Trilinearidade .....	43
6. Capítulo 6 - Conclusão .....	46
7. Capítulo 7 - Referências Bibliográficas .....	48

# CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A composição química das plantas variam em função de um grande número de fatores, como por exemplo, tipo de solo, sazonalidade, incidência solar, presença de insetos, entre outros. Com intuito de abranger tamanha variabilidade e gerar resultados mais confiáveis e com menor probabilidade de erro tem se utilizado técnicas cromatográficas para obter informações de um conjunto de metabólitos característico de uma dada espécie e compor um perfil químico denominado *fingerprint* <sup>1,2</sup>.

Alternativamente podem ser construídos *fingerprints* utilizando ressonância magnética nuclear (RMN). A RMN é uma técnica versátil, que permite de forma rápida e reprodutível, a determinação de grande número de metabólitos em uma única análise sem necessidade de pré tratamento das amostras<sup>3,4</sup>.

A *Bauhinia* é um dos gêneros de plantas pertencentes à família Leguminosae e é característica de regiões tropicais<sup>5</sup>. Das mais de 250 espécies de *Bauhinia* a *B. forficata* é a mais utilizada como fitoterápico contra diabetes no Brasil<sup>6</sup>. Devido às similaridades entre as diferentes espécies, identificar a *B. Forficata* apenas de forma macroscópica se torna um grande problema e é comum ocorrer equívocos de identificação.

A identificação das diversas espécies de *Bauhinia* normalmente é realizada através de sua composição fitoquímica. A *B. Forficata*, por exemplo é identificada através da kaempferitrina, um flavonóide encontrado somente em suas folhas <sup>7</sup>.

A qualidade dos preparados comerciais de *B. Forficata* tem sido monitorado utilizando cromatografia líquida como técnica instrumental e a kaempferitrina como marcador químico dessa espécie. Para serem analisados, os extratos dos preparados comerciais necessitam de separação prévia em colunas cromatográficas, o que demanda tempo e torna a análise onerosa devido à grande quantidade de solventes requerida.

Uma alternativa é realizar a análise do extrato bruto por ressonância magnética nuclear (RMN), obtendo-se espectros sobrepostos das diversas espécies da amostra. O uso de vários solventes na extração de uma mesma amostra gera um conjunto de extratos com diferentes perfis espectrais proporcionando uma aplicação mais eficiente dos métodos quimiométricos. Assim é possível avaliar a eficiência de cada fase extratora na separação e classificação das amostras.

A análise por componentes principais (PCA) é uma ótima forma de análise exploratória, uma vez que forma agrupamentos baseado na variância dos dados. Entretanto, por ser uma técnica não supervisionada não é possível estabelecer critérios para determinar se uma amostra pertence realmente ou não a um dado grupo.

Para o caso de dados complexos, como os gerados nesse trabalho, com tantas fontes de variabilidade e grande quantidade de informações, métodos quimiométricos de segunda ordem, como PARAFAC e MCR, seriam mais apropriados no tratamento dos dados. Essas técnicas permitem a deconvolução de picos sobrepostos e a recuperação de espectros dos compostos puros, bem como a construção de perfis de concentração dos metabólitos. Para serem usadas, algumas características devem estar presentes nos conjuntos de dados. No caso do PARAFAC os dados necessitam ser trilineares e para o MCR os picos precisam ser bem resolvidos.

Para os dados estudados, deslocamentos de picos quebram a trilinearidade dos dados e falta de resolução de algumas regiões do espectro dificultam a deconvolução dos picos, inviabilizando o uso dos métodos de segunda ordem supracitados.

Nesse trabalho é proposto o uso da análise por ressonância magnética nuclear de extratos brutos das amostras comerciais com intuito de compará-las com a amostra padrão e determinar semelhanças. Além disso, busca-se encontrar os solventes que compõe o melhor perfil espectral para separação.

# CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1. Fingerprint

A composição metabólica das plantas possui cunho genético, mas sua concentração está intimamente relacionada com o ambiente circundante<sup>8</sup>. O teor dos compostos presentes nas plantas depende da temperatura, sazonalidade, estações do ano, nutrientes presentes no solo, incidência do sol, entre outros<sup>9</sup>.

Há estudos na literatura que demonstram a variação de concentração do marcador da espécie *Bauhinia forficata pruinosa* com as estações do ano. No inverno observou-se a menor concentração dos constituintes estudados (flavonóides). Além disso percebeu-se que o marcador só é o composto majoritário na primavera<sup>9</sup>.

Estudos de estabilidade acelerada mostraram que as folhas coletadas da árvore submetidas a variação de temperatura e umidade sofrem alteração na coloração e no odor, além de uma queda de 60% na concentração do marcador após um mês na câmara climática<sup>9</sup>.

Sendo assim há sempre o risco de utilizar um metabólito secundário, a Kaempferitrina no caso da subespécie *forficata*, como marcador químico e portanto indicador da autenticidade da planta no controle de qualidade dos preparados comerciais.

Ao se usar o marcador químico como referência na identificação das espécies automaticamente se exclui todos os outros compostos que juntos podem fornecer informações valiosas a respeito da autenticidade da planta.

Com o intuito de utilizar o máximo de informação possível passou-se a utilizar o denominado *fingerprint* como mecanismo de controle de qualidade de plantas medicinais. No princípio, o *fingerprint* era construído a partir de dados cromatográficos, selecionando-se os picos e utilizando apenas sua área. Atualmente todo o perfil cromatográfico é incluído na análise e a avaliação dos cromatogramas é feita com o auxílio de métodos quimiométricos<sup>1,2</sup>. O objetivo é comparar o perfil cromatográfico dos diversos extratos para avaliar a similaridade entre estes, e consequentemente a similaridade entre as plantas.

A grande dificuldade é definir o cromatograma de referência e o grau de similaridade desejado, uma vez que em termos absolutos uma mesma espécie coletada em diferentes locais pode gerar cromatogramas diferentes<sup>2</sup>.

De maneira geral os *fingerprints* baseados em cromatogramas são obtidos a partir de técnicas hífenadas, e podem apresentar pequenos deslocamentos

nos tempos de retenção, grande número de picos, coeluição e deslocamento de linhas base<sup>10-13</sup>.

Para melhorar a qualidade dos dados e não chegar a resultados equivocados é comum o uso de algoritmos que promovam o alinhamento dos picos deslocados e que os dados sejam normalizados com objetivo de eliminar variações devido às diferenças de massa de amostra<sup>14</sup>.

Para serem analisados, os extratos dos preparados comerciais necessitam de separação prévia em colunas cromatográficas, que demandam tempo e torna a análise onerosa devido à grande quantidade de solventes requerida.

Alternativamente podem ser construídos *fingerprints* utilizando ressonância magnética nuclear (RMN). É uma técnica versátil, que permite a determinação de grande número de metabólitos em uma única análise de forma rápida e reproduzível com mínimo de pré tratamento nas amostras<sup>4,3</sup>.

Diversos trabalhos encontrados na literatura mostram o potencial da técnica na construção de fingerprint. Dentre eles pode-se citar o uso de fingerprint de RMN para determinar traços de fluidos corporais, suor, urina, entre outros na ciência forense<sup>15</sup>. Em outros estudos a técnica foi utilizada para determinar a origem e avaliar a estabilidade do azeite de oliva extravirgem<sup>16,17</sup>. De acordo com a referência<sup>18</sup>, foi possível obter fingerprint de RMN H<sup>1</sup> através da análise do extrato bruto de açafraão iraniano que associado a técnicas quimiométricas possibilitou a identificação das amostras adulteradas.

## **2.2. Bauhinia Forficata Link**

As plantas do gênero *Bauhinia* pertencem à família Leguminosae e geralmente são encontradas em regiões tropicais<sup>5</sup>. Já foram descritas mais de 250 espécies nativas do Brasil<sup>6</sup>.

A *Bauhinia forficata* é uma planta arbustiva, decídua, grande ou arbórea, perene, que atinge até 8 m de altura. É popularmente conhecida como pata de vaca devido à semelhança de suas folhas com a pegada de uma vaca<sup>5</sup>. Possui flores apenas na cor branca, ao contrário de outras espécies que podem apresentar flores na cor roxa e rosa, seus galhos possuem espinhos e seu fruto é na forma de vagens<sup>9</sup>.



FIGURA 2.1. Árvore e folhas da *Bauhinia forficata*

As folhas, caules e raízes das espécies de *Bauhinia*, são amplamente utilizados no Brasil e em outros países em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, principalmente infecções, processos dolorosos e diabetes<sup>19</sup>. A *B. forficata* é a espécie de *Bauhinia* mais utilizada como fitoterápico contra diabetes no Brasil<sup>20</sup>.

Existem na literatura diversos estudos testando a ação hipoglicemiante dos extratos de *B. forficata*<sup>20-26</sup>. Outros estudos demonstram que o extrato da *Bauhinia Forficata* auxilia no processo de coagulação do sangue quando ocorrem perturbações provocadas por veneno de cobra<sup>27</sup>.

Devido à diversidade de espécies de *Bauhinia* existentes e às suas semelhanças morfológicas e botânicas há grande dificuldade de diferenciá-las apenas visualmente havendo a necessidade de utilizar a composição fitoquímica na identificação dessa planta<sup>28</sup>. Há estudos na literatura que identificaram diversos flavonóides nas folhas de nove espécies de *Bauhinia*, entre eles derivados glicosilados de Kaempferol, quercetina e isoramnetina<sup>6</sup>. Um estudo comparativo da composição de várias partes da planta de *B. forficata* indicou a presença de esteróides e terpenos em todas as partes<sup>7</sup>.

Embora se tenha caracterizado diversas espécies de *Bauhinia*, isolando vários flavonóides, ainda não se tem conhecimento da ação isolada desses compostos. Se acredita que os efeitos fitoterápicos desta planta sejam fruto da ação sinérgica de vários desses compostos<sup>9</sup>.

A Kaempferitrina foi detectada somente nas folhas, de forma que esta pode ser utilizada como marcador químico no controle de qualidade desta espécie<sup>7</sup>. Os diversos preparados comerciais podem ser monitorados utilizando a Kaempferitrina através da técnica de cromatografia líquida dos extratos<sup>29,30</sup>. Na

FIGURA 2.2 pode ser observado o cromatograma de alguns padrões de flavonóides. A identificação de tais substâncias nos extratos de plantas medicinais em geral é realizada por comparação entre os tempos de retenção padrão e o obtido.

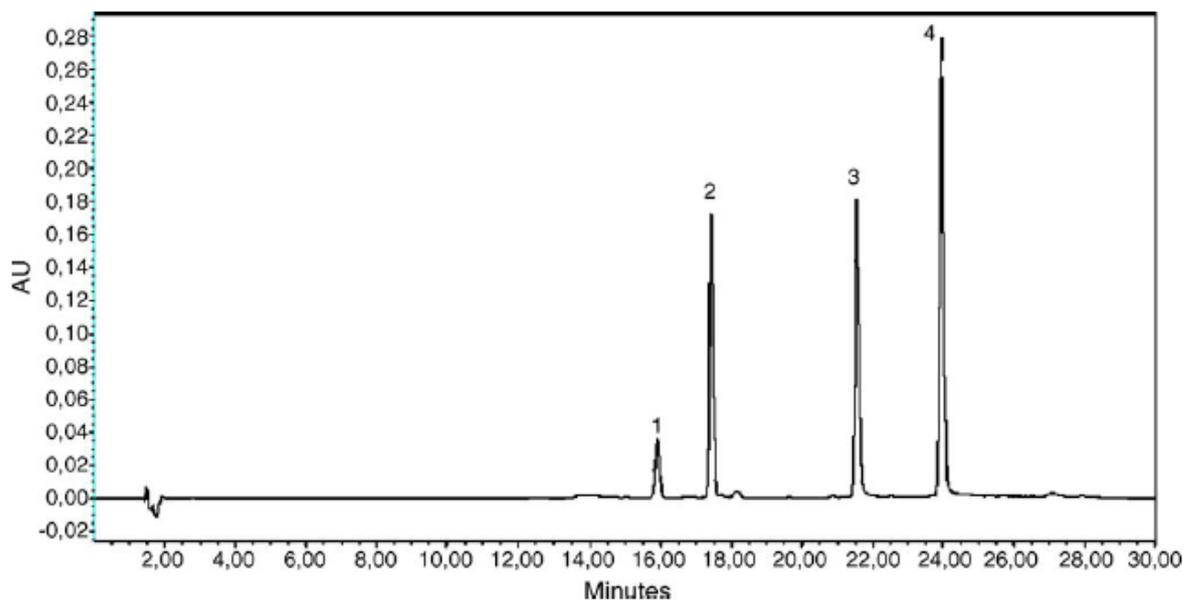


FIGURA 2.2. Cromatograma dos padrões de flavonóides. (1) 3,7-di-O-L-ramnopiranosilquercetina (2) Kaempfertrina (3) quercetina (4) Kaempferol<sup>29</sup>.

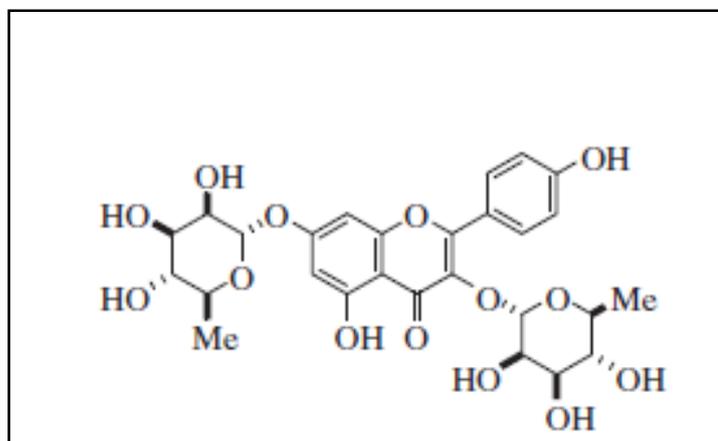


FIGURA 2.3. Estrutura do Kaempferol-3,7-di-O-raminosídeo (kaempferitrina)<sup>31</sup>

A kaempfertrina é um flavonóide glicosilado<sup>32</sup>. Esse grupo de compostos pode ser encontrado naturalmente nas plantas<sup>33</sup> como resultado de reações necessárias à proteção da planta contra agentes externos<sup>34</sup>.

Na

FIGURA 2.3 está representada a estrutura da Kaempfertrina.

### 2.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é baseada na absorção de energia pelos núcleos atômicos constituintes da amostra na região de radiofrequência quando na presença de um campo magnético<sup>35</sup>.

Os núcleos atômicos possuem carga e esta carga em movimento gera um dipolo magnético local descrito pelo momento magnético, a esta propriedade dá-se o nome de spin ( $I$ ). O spin pode assumir valores iguais a zero, inteiros e múltiplos de  $\frac{1}{2}$ . Quando  $I=0$  o núcleo não gira em torno de si e logo não é ativo no RMN. Pelo menos um isótopo dos núcleos de interesse podem ser analisados por RMN, entre eles  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  e  $^{19}\text{F}$ . O número quântico magnético de spin ( $I$ ) nos fornece informações a respeito de número de estados de energia ( $2I + 1$ ) possíveis para um dado núcleo quando colocado em um campo magnético uniforme<sup>35-37</sup>. No caso do hidrogênio que possui spin igual a  $\frac{1}{2}$  pode assumir dois níveis de energia diferentes, correspondendo aos níveis  $-\frac{1}{2}$  e  $+\frac{1}{2}$ .

Na ausência de um campo magnético todas as orientações são igualmente possíveis e numa população de núcleos atômicos a distribuição de energia é randômica. Ao se aplicar um campo magnético externo ocorre um alinhamento da direção do momento magnético nuclear contra ou a favor do campo. Se o alinhamento ocorrer contra o campo magnético implica em maior nível de energia e a favor do campo menor nível de energia. No caso do núcleo de hidrogênio a configuração seria semelhante ao mostrado na FIGURA 2.4.

Há um leve excesso de população no nível de menor energia. A magnitude dessa diferença pode ser calculada utilizando a distribuição de Boltzmann. O fenômeno de ressonância magnética nuclear ocorre quando os núcleos sob o efeito de um campo magnético externo absorvem energia e mudam sua orientação de spin em relação ao campo. O pacote de energia absorvido é quantizado e igual à diferença entre os dois estados de energia. Essa diferença cresce a medida que o campo magnético aplicado aumenta, ou seja, a energia absorvida pelo núcleo para mudar sua orientação de spin é proporcional ao campo aplicado<sup>35</sup>. Assim, é possível aumentar a sensibilidade da técnica utilizando campos mais fortes, que ao aumentarem a diferença de energia entre os níveis, aumenta o excesso de população nos níveis mais baixos.

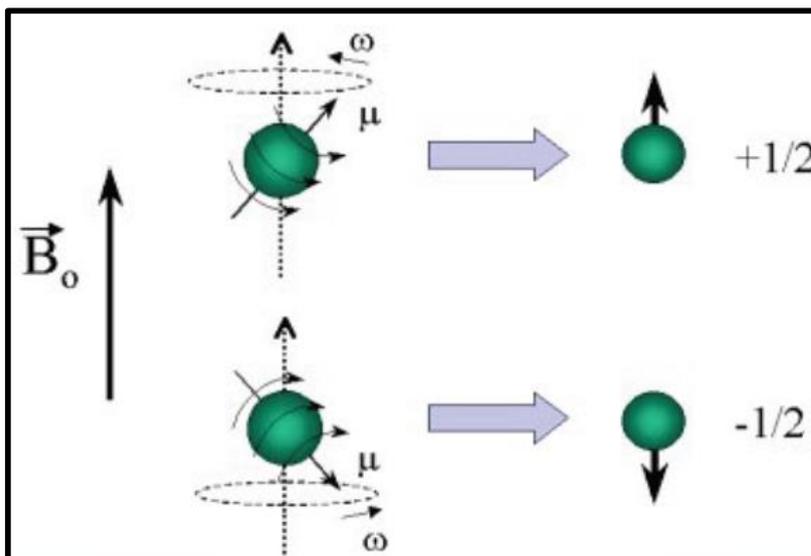


FIGURA 2.4. Configuração de energia para o núcleo de hidrogênio na presença de um campo magnético externo

Todos os instrumentos acima de 100 MHz se baseiam em magnetos supercondutores resfriados com hélio e operam no modo pulsado por transformada de Fourier. O campo magnético produzido deve ser estável e homogêneo.

A amostra normalmente é solubilizada em solvente deuteroado e colocada em um tubo de 5 mm. Esse tudo é posicionado no *probe*, entre os dois magnetos permanentes, na posição vertical. São fornecidos pulsos de radiofrequência na amostra que promove a transição entre os níveis de energia possíveis. O decaimento da energia absorvida é recebido, amplificado e transformado do domínio do tempo para o domínio das frequências utilizando a transformada de Fourier.

Um mesmo tipo de núcleo não absorve sempre a mesma quantidade de energia, ou seja, é magneticamente diferente. Isso se deve ao fato de que cada próton numa molécula está rodeado por elétrons. Os elétrons também respondem à aplicação do campo e começam a circular gerando um campo magnético local que se opõe ao campo aplicado. Esse efeito provoca um deslocamento do sinal de absorção e depende dos átomos da vizinhança.

O espectro é registrado como uma série de picos e sua área é proporcional ao número de diferentes prótons a que representam.

## 2.4. Análise por Componentes Principais (PCA)

A análise por componentes principais (PCA) é um método de análise de dados complexos, utilizado na análise exploratória dos dados e em modelos multivariados<sup>38</sup>. A aplicação mais comum é em dados com variáveis correlacionadas e que portanto apresentam redundância<sup>39</sup>. Na PCA essas redundâncias são eliminadas e as informações mais significativas das variáveis originais são representados em um novo conjunto de variáveis chamado de componentes principais<sup>40</sup>.

Existem vários algoritmos para decomposição das matrizes de dados, sendo o mais largamente utilizado a decomposição por valores singulares (SVD). É um método computacional que decompõe uma matriz de dados real com dimensão arbitrária ( $\mathbf{X}$ ) em três outras matrizes conforme a  $\mathbf{X} = \mathbf{USV}^t + \mathbf{E}$  Equação 1<sup>38</sup>.

$$\mathbf{X} = \mathbf{USV}^t + \mathbf{E} \quad \text{Equação 1}$$

Onde o produto  $\mathbf{US}$  são os escores ( $\mathbf{T}$ ) e contém as coordenadas das amostras nos eixos das componentes e a matriz  $\mathbf{V}$  contém a informação sobre como as variáveis originais estão relacionadas às componentes, sendo denominada matriz de loadings ( $\mathbf{P}$ ). A matriz  $\mathbf{S}$  é diagonal e contém informações sobre a quantidade de variância em cada componente, enquanto  $\mathbf{E}$  é a matriz de erro ou falta de ajuste.

A matriz de scores consiste de vetores coluna e a matriz de loadings de vetores linhas em que cada coluna e linha se relaciona a uma componente principal<sup>39</sup>.

Geometricamente, as matrizes  $\mathbf{T}$  e  $\mathbf{P}$  geram um novo sistema de coordenadas formado pelas  $h$  componentes principais que são os novos eixos. Assim, exatamente como as amostras têm coordenadas no espaço das variáveis originais, elas também têm coordenadas em relação aos novos eixos, ou seja, os denominados escores. Estas coordenadas são as projeções ortogonais de cada amostra sobre os eixos das componentes.

Cada componente é construída a partir da combinação das variáveis originais. Em termos matemáticos, a contribuição de cada eixo original para uma componente principal é o co-seno do ângulo entre o eixo da variável com o eixo da componente. Se uma componente principal aponta exatamente na mesma direção

de uma variável individual, o ângulo entre elas é zero e o co-seno é 1. Isto indica que a componente descreve toda a variação no eixo daquela variável. Similarmente, se uma componente é perpendicular ao eixo de uma determinada variável, o co-seno é 0 indicando que esta variável não fornece nenhuma contribuição à componente em questão. Os valores destes co-senos são os *loadings* e variam na faixa de -1 a 1.

A direção da primeira componente principal descreve o espalhamento máximo das amostras, a quantidade máxima de variação possível dos dados e pode ser definida como o melhor ajuste da reta no espaço multidimensional. A próxima componente, perpendicular à primeira, captura a variância comum em sua direção e em menor quantidade que a primeira e assim sucessivamente. As componentes principais são, portanto, calculadas em ordem decrescente de significância e a percentagem da variação total nos dados descrita por qualquer componente pode ser calculada com precisão usando informações da diagonal da matriz **S**. Porém, como as componentes são perpendiculares entre si, elas contêm informações diferentes e complementares em ordem decrescente de quantidade de variância.

Devido à reorientação das coordenadas do sistema de maneira a obter a máxima variância comum, a maioria da informação dos dados pode ser capturada por um pequeno número de componentes, que compacta as informações, eliminando as redundâncias e correlações nos dados originais<sup>38-40</sup>.

## 2.5. PARAFAC

PARAFAC (PARallel FACTor analysis) é um de muitos métodos de decomposição de dados de ordem superior<sup>41,42</sup>. Sua estrutura se baseia em três matrizes de loading **A**, **B** e **C**, que contêm os elementos  $a_{if}$ ,  $b_{jf}$  e  $c_{kf}$ , relativos às três dimensões dos dados, ou seja, sua decomposição ocorre em tríades ou componentes trilineares<sup>43</sup>.

O modelo trilinear é ajustado de modo que se obtenha a menor soma dos quadrados do resíduo,  $e_{ijk}$ <sup>43</sup>. O modelo pode ser representado pela

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad \text{Equação 2:}$$

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad \text{Equação 2}$$

onde  $F$  é o número de fatores<sup>42</sup>.

Na FIGURA 2.5 está representada esquematicamente a decomposição de um cubo de dados em  $F$  fatores.

O PARAFAC é modelo mais simples, menos flexível e consome menos graus de liberdade. Além disso, fornece solução única, o que significa que não pode sofrer rotações sem que ocorra perda de ajuste. Graças a isso é possível recuperar os espectros dos componentes puros do sistema se os dados forem realmente trilineares e se o número de fatores utilizados e a razão sinal/ruído forem apropriados<sup>41,43</sup>.

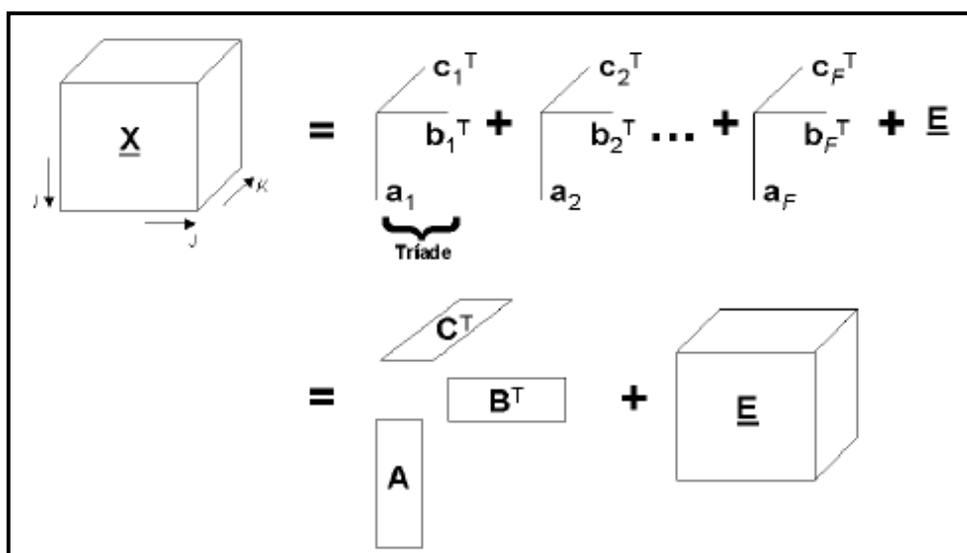


FIGURA 2.5. Componentes do modelo PARAFAC para um conjunto de dados de três modos<sup>43</sup>

O algoritmo mais utilizado para a resolução do PARAFAC é o chamado ALS (Alternating Least Squares), ou quadrados mínimos alternados, que consiste em um método iterativo de determinação do mínimo global através de sucessivas estimativas dos valores de uma matriz de pesos,  $A$ , a partir de valores conhecidos das outras duas,  $B$  e  $C$ <sup>41,43</sup>.

Os passos do algoritmo para um modelo PARAFAC são resumidos a seguir:

- (0) decida o número de fatores,  $F$ ;
- (1) inicie  $B$  e  $C$ ;
- (2) estime  $A$  por um ajuste de mínimos quadrados a partir de  $X$ ,  $B$  e  $C$ ;
- (3) estime  $B$  de maneira análoga;

- (4) estime C de maneira análoga;
- (5) retorne ao passo (2) até a convergência (pequena mudança no ajuste)<sup>41</sup>.

A estimativa inicial das matrizes B e C pode ser feita utilizando decomposição por SVD. É de suma importância a escolha do número de fatores, que pode ser realizada utilizando a variância explicada do modelo, o conhecimento químico do sistema ou no teste de consistência trilinear (CONCORDIA)<sup>41,42</sup>.

Se o núcleo do arranjo, representado por  $\underline{G}$ , não estiver consistente com o modelo PARAFAC, o modelo não estará bem ajustado. Assim, se o modelo PARAFAC é válido então o CORCONDIA estará muito próximo de 100%. Se os dados não podem ser descritos por um modelo trilinear ou se muitas componentes estão sendo usadas, o CORCONDIA terá com valores próximos de zero ou mesmo negativos. Se a consistência estiver com valor próximo de 50% o modelo é instável<sup>44</sup>.

Existem ainda alguns casos, quando os dados apresentam deficiência de rank, onde o número de componentes principais significativos é menor que o número de componentes químicos que contribuem com os dados. Isso acontece, por exemplo, quando um composto desaparece a medida que outro surge, causando deficiência de rank. Nesses casos, os resultados desejados são obtidos com valores de CONCORDIA ao redor de 0 %<sup>45</sup>.

## 2.6. MCR – ALS

Resolução Multivariada de Curvas (MCR - Multivariate Curve Resolution) também é um método de decomposição matemática de dados experimentais. Ao contrário do PARAFAC que utiliza um cubo de dados, o MCR trabalha com matrizes de dados configurando-se então como um método de primeira ordem. Contudo, os cubos de dados podem passar por um processo de desdobramento (unfolding) no qual a posição de cada matriz dentro do cubo de dados original é preservada. Ao realizar esse procedimento a trilinearidade é perdida, mas o MCR utiliza-se de outros artifícios para auxiliar nos processos de deconvolução, aplicando restrições ao ALS. Assim, o MCR também pode trabalhar com dados de segunda ordem. Desta maneira, dados cúbicos trilineares são melhor resolvidos pelo PARAFAC, e dados cúbicos com baixa trilinearidade são melhor resolvidos por MCR.

No MCR as respostas instrumentais são organizadas em uma matriz de dados, **D**, que é decomposta em outras duas matrizes, **C** e **S<sup>t</sup>**, representada matematicamente por:

$$D = CS^t + E \quad \text{Equação 3}$$

em que **D** é matriz original de dados, **C** o perfil de concentração e **S** o perfil espectral dos componentes puros e **E** a matriz de resíduos<sup>38,46</sup>.

Para resolução do problema geralmente são utilizados métodos iterativos, como o ALS, devido à sua flexibilidade e capacidade de lidar com diferentes estruturas e tipos de problemas químicos. O problema matemático a ser resolvido é encontrar o número de espécies que causam a variação dos dados, encontrar os perfis de concentração de cada uma e recuperar os espectros das espécies puras. O problema pode ser resolvido assumindo que o posto da matriz original é igual ao número de espécies ativas espectroscopicamente e que todo o sinal instrumental é advindo das espécies<sup>38,46</sup>.

As estimativas iniciais dos perfis de concentração e espectral podem ser obtidos utilizando técnicas baseadas na detecção de variáveis mais puras ou pela técnica de Análise de Fatores Evolucionários (EFA)<sup>47</sup>.

## CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

Utilizar extração diferencial para alcançar as condições para uso de métodos de segunda ordem, ou seja, extratos de uma mesma amostra com concentrações relativas entre os compostos diferentes.

Verificar a trilinearidade dos dados e a viabilidade do uso de métodos de segunda ordem.

Identificar as fases extratoras que gerem o perfil espectral das amostras o mais diferente possível.

Utilizar a Análise por Componentes Principais para encontrar similaridade entre o conjunto de dados.

# CAPÍTULO 4 - METODOLOGIA

#### 4.1. Aquisição das amostras

As sete amostras comerciais utilizadas nesse trabalho foram compradas de forma aleatorizadas em diferentes farmácias de manipulação nas cidade de São Carlos-SP, Timóteo-MG e Coronel Fabriciano-MG, com o objetivo de abranger o máximo de variações possíveis no modelo. As amostras são comercializadas em folhas e são consumidas na forma de chá pelos pacientes. As folhas da amostra padrão da *Bauhinia forficata forficata* foram coletadas no dia 12/03/2013 na mata Santa Elisa no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) com exsicata depositada no herbário do IAC registrada sob o número IAC 32021.

#### 4.2. Preparo das amostras

Visando a utilização apenas da porção folha das amostras comerciais, foi feita uma separação inicial nas amostras, uma vez que junto com as folhas haviam alguns pedaços de galhos. As folhas da amostra padrão foram separadas dos galhos e secas em estufa a 40°C por 10 dias.



FIGURA 3.1. Etapas do processo de preparo das amostras comerciais. (A) Separação dos galhos das folhas das amostras. (B) Imagem do moinho. (C) Amostra após passar pelo moinho de facas

Em seguida, todas as amostras foram moídas em moinho de facas Tecnal, modelo TE-631, em rotação máxima de 27000 rpm por 5 minutos. As amostras foram nomeadas utilizando as iniciais das farmácias em que foram adquiridas, conforme listado na TABELA 3.1 e no caso da amostra padrão utilizou-se as iniciais do local de coleta.

TABELA 3.1. Relação das amostras utilizadas nesse trabalho com suas respectivas nomenclaturas

<b>Amostra</b>	<b>Nomenclatura</b>
Comercial 1	AMG
Comercial 2	BOT
Comercial 3	FAE
Comercial 4	FAR
Comercial 5	FCL
Comercial 6	FN
Comercial 7	FVP
Padrão 1	IAC

### 4.3. Preparo dos Extratos

Cada uma das oito amostras foi extraída com sete fases extratoras diferentes, escolhidas de forma a abranger um range maior de polaridade. Os solventes estão listados na TABELA 3.2., com respectivas marcas e grau de pureza. Água deionizada com equipamento Milipore, modelo Direct-Q.

TABELA 3.2. Fases extratoras utilizadas para obtenção dos extratos das amostras comerciais e padrão

<b>Solvente</b>	<b>Marca</b>	<b>Grau de Pureza / %</b>
Água/Metanol (2/1)	-	-
Metanol	Synth	99,8
Etanol	Quemis	99,5
Acetona	Cinética	99,5
Acetato de Etila	Synth	99,5
Acetonitrila	J.T. Baker	99,9
Hexano	Synth	98,5

Foram obtidos um total de 56 extratos, uma vez que cada amostra gera uma matriz com sete extratos diferentes.

Após separação de galhos e folhas e posterior moagem foram pesados 1,00 g de cada amostra e colocada em contato com 10,00 mL da fase extratora por 24h. O extrato obtido foi filtrado a vácuo e o solvente evaporado a temperatura ambiente e armazenado em geladeira.

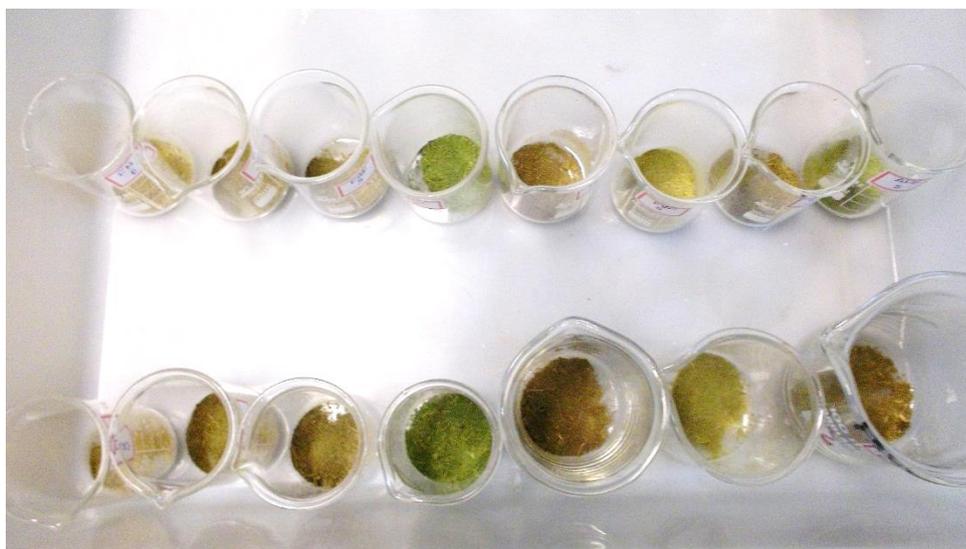


FIGURA 3.2. Amostras em processo de preparo para obtenção dos extratos

#### 4.4. Aquisição dos espectros de RMN $H^1$

Os extratos foram ressuspensos em metanol  $D_4$ , marca Deutero 99,8% de pureza, e os espectros RMN foram obtidos em triplicata com o auxílio de um equipamento Bruker Avance-III-400, operando em um campo magnético de 9.4T, com uma frequência 400 MHz para o núcleo de  $H^1$ . Foram realizados 64 varreduras (number scan - ns) com 64k pontos durante a aquisição (time domain data points - TD). Empregou-se uma sequência de pulsos para pré-saturação do sinal da água.

## 4.5. Pré-Processamento dos dados

Para cada espectro obtido foi necessário corrigir a linha base e a fase e ajustar o zero da escala baseado no pico do solvente (metanol), 3.31 ppm, utilizando o software ACDLABS 12.0.

Os dados foram organizados em matrizes em ambiente Matlab da seguinte forma: 1) matrizes de extratos para cada solvente, por exemplo, todas as amostras extraídas com acetona formaram uma matriz; 2) matrizes de amostras, por exemplo, a amostra padrão foi extraída em sete fases extratoras originando uma matriz; 3) uma matriz com todos os extratos de todas as amostras. Nas matrizes cada linha representa uma amostra e cada coluna um deslocamento químico (variável), sendo as intensidades dos picos presentes na matriz.

Inicialmente notou-se que os espectros estavam em escalas diferentes, por exemplo, em um deles a escala começava em -2.0 ppm e no outro em -1.0 ppm. Isso se tornou um problema porque quando se exporta os dados para o Matlab somente se carrega as intensidades e os deslocamentos se transformam em número de variáveis logo, para um dado espectro a variável 55 corresponde ao deslocamento 3.0 ppm, já em outro espectro se refere ao deslocamento 2.5 ppm. Assim foi necessário ajustar as escalas de todos os espectros utilizando um algoritmo escrito para esse fim. Em seguida eliminou-se algumas variáveis, que continham apenas ruído e portanto não apresentavam informações significativas. Além disso eliminou a região relativa a absorção do solvente residual em 3.31 e 4.85 ppm.

Os pré-processamentos são escolhidos de acordo com a natureza dos dados. Para o presente trabalho os dados foram normalizados para que os espectros tivessem o mesmo peso na construção do modelo e diferenças de intensidade não fossem utilizadas para separar as amostras, já que a massa de amostra utilizada na obtenção dos espectros não foi controlada

Além disso todas as matrizes foram centradas na média que consiste em calcular o vetor linha médio de todo conjunto de dados e subtrair ponto a ponto as linhas da matriz do vetor médio, deslocando assim a origem dos dados.

## 4.6. Matriz com Bucket

É comum em análises feitas utilizando RMN que ocorram pequenos desvios nos deslocamentos dos sinais, devido a mudanças no ambiente químico na

qual a amostra se encontra. A influência de tais deslocamentos pode ser em grande parte minimizada utilizando uma compressão dos dados.

A compressão, denominada *bucket*, é feita através da soma de intervalos fixos do espectro. Nesse trabalho o espectro foi dividido em 151 segmentos, sendo que cada um gera uma nova variável dada pela soma de todos os elementos de cada segmentos, eliminando assim pequenas variações de deslocamento do sinal.

As matrizes com bucket também foram normalizadas e centradas na média.

#### **4.7. Análise por Componentes Principais (PCA)**

Os modelos foram construídos baseados na Análise por Componentes Principais utilizando o toolbox PLS\_Toolbox 6.2 (Eigenvector Research Inc., WA, USA) para o Matlab2011a (Mathworks Inc., MA, USA).

Foram obtidos modelos para a matriz com bucket e para a matriz completa, com o objetivo de avaliar a influência dos deslocamentos na separação das amostras. Outros modelos foram construídos para cada amostra a fim de avaliar o solvente que promove a melhor separação. E por fim foi construído modelos para os solventes eleitos como melhores para avaliar o agrupamento das amostras.

Em todos os casos avaliou-se os scores e os loadings do modelo, de forma a identificar as regiões do espectro que são mais importantes na separação.

# CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

## 5.1. Análise Visual das Amostras

As folhas da *Bauhinia* são vendidas como medicamento de uso fitoterápico e o seu consumo é feito na forma de chá pelos pacientes. Algumas amostras comerciais tinham as folhas bem picadas e em outros casos era possível encontrar folhas inteiras. Nesse último caso foi feita uma análise visual dessas folhas com o objetivo de comparar com as folhas da amostra padrão (IAC).



FIGURA 5.1. Folhas de algumas amostras comerciais (AMG, FAR e FCL) e da amostra padrão (IAC).

Pode-se perceber que há diferenças visuais significativas entre as folhas das quatro amostras apresentadas na FIGURA 5.1. Todas as amostras possuem as folhas fendidas no meio se dividindo em dois lobos ou folíolos, sendo esta uma peculiaridade do gênero *Bauhinia*. Na espécie *Bauhinia forficata* (IAC) o ápice do folíolo é agudo e distante um do outro e sua base é chanfrada (possui um corte). Na amostra denominada AMG o ápice dos folíolos são arredondados, menos alongados e mais alargados quando comparados com a IAC, sua base também é chanfrada. A amostra FAR possui folíolo alongado, com ponto de fusão entre os dois lobos mais próximo da base, o ápice arredondado e a base chanfrada. A amostra FCL possui folíolos muito curto, com fenda mais discreta e ápice bastante arredondado lembrando o formato de uma borboleta e com base chanfrada.

Por meio dessa análise visual é possível inferir que há pelo menos quatro espécies diferentes no conjunto de amostras.

É importante desenvolver métodos de análise fitoquímicos para identificar as espécies que possuem atividade farmacológica, uma vez que, como já foi mencionado, nem todas as amostras possuem folhas inteiras, normalmente as folhas estão picadas, dificultando uma análise visual mais criteriosa.

## 5.2. Análise dos Espectros

Na FIGURA 5.2 são mostrados os espectros de RMN H1 dos extratos de todas as amostras em todas as fases extratores.

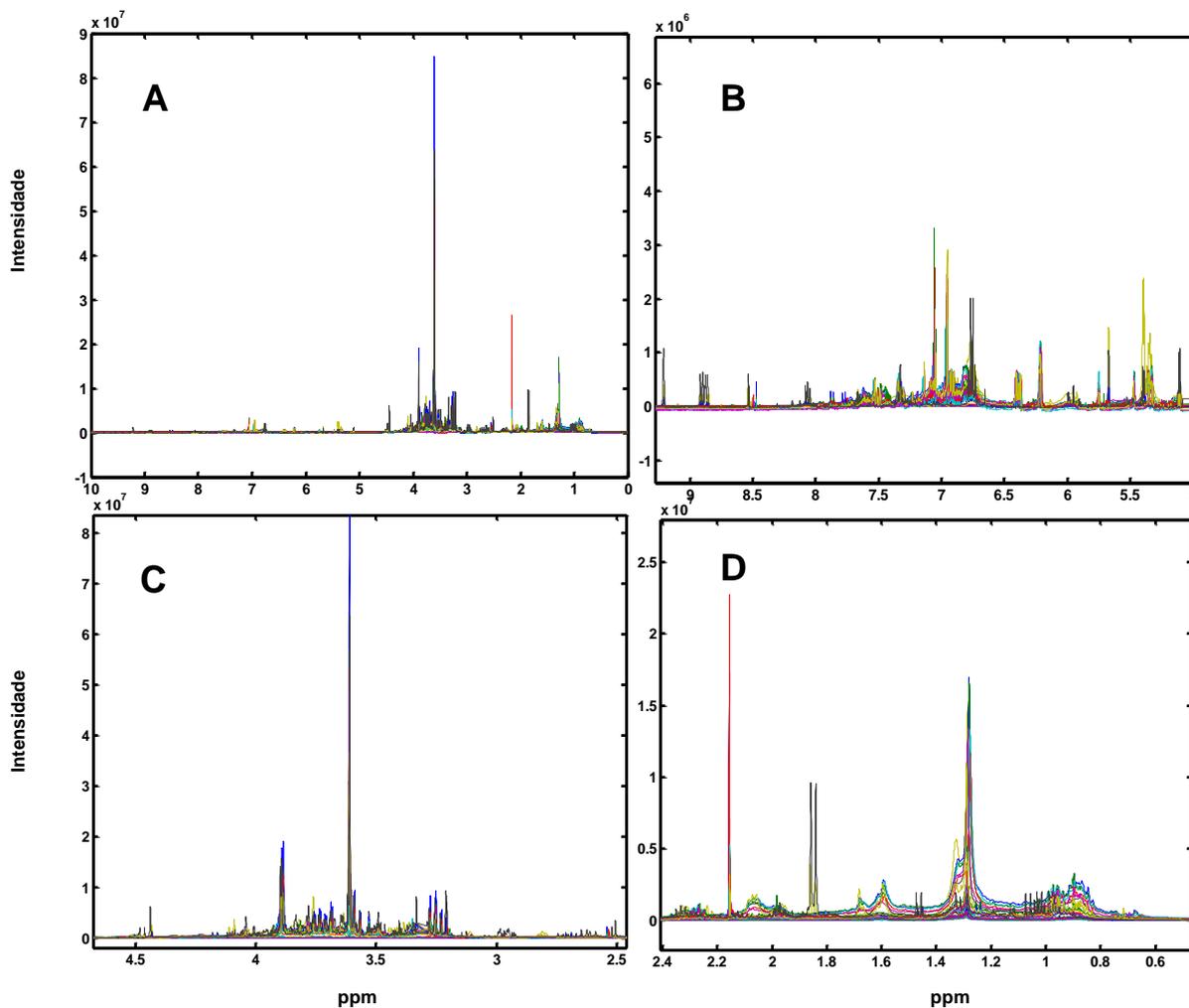


FIGURA 5.2. Espectros de RMN H1 para todos os extratos. (A) Espectro completo. (B) Zoom do espectro completo na região de flavonóides. (C) Zoom do espectro completo na região de açúcares. (D) Zoom do espectro completo na região de compostos com insaturações

Pode-se observar que os espectros fornecem alta quantidade de informação, com muitos picos sobrepostos e, em algumas regiões, picos sem resolução formando bandas. Isso se deve a presença de uma infinidade de compostos que possuem picos de absorção coincidentes, uma vez que utilizou-se o extrato bruto na aquisição dos espectros. A FIGURA 5.2B refere-se a região entre 5 e 9 ppm, característica de absorção por flavonoides. Nessa região há presença de poucos picos e estes por sua vez são de baixa intensidade. A FIGURA 5.2C é a região de 3 a 4 ppm de maior concentração de picos referentes a absorção de

açúcares. Já a FIGURA 5.2D refere-se à região de aminas e compostos saturados e insaturados.

### 5.3. Análise dos Modelos

#### 5.3.1. Influência dos deslocamentos de sinal

Foi feito um modelo PCA para a matriz com bucket e outro com a matriz completa, a fim de comparar os resultados e observar a influência dos deslocamentos dos picos no modelo. Na FIGURA 5.3 pode-se observar a redução no número de variáveis da matriz.

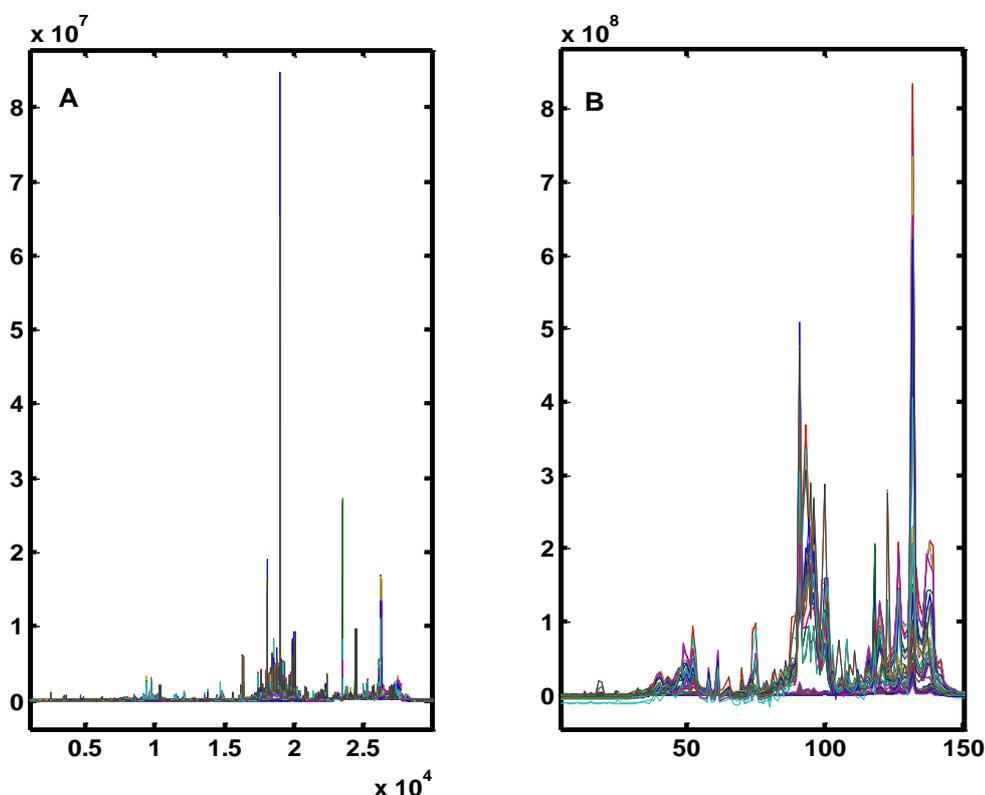


FIGURA 5.3. Espectros de todas as amostras em todas as fases extratoras.  
(A) Matriz completa (B) Matriz com bucket

Na

FIGURA 5.4 é mostrado o gráfico dos escores da PC1 versus PC2 para o modelo construído com a matriz completa de todas as amostras em todas as fases extratoras. Pode-se observar que há uma nítida separação das amostras extraídas em Metanol/Água, indicando que essa fase extratora extrai compostos que distinguem as amostras do conjunto total e que provavelmente são diferentes dos extraídos pelos outros solventes.

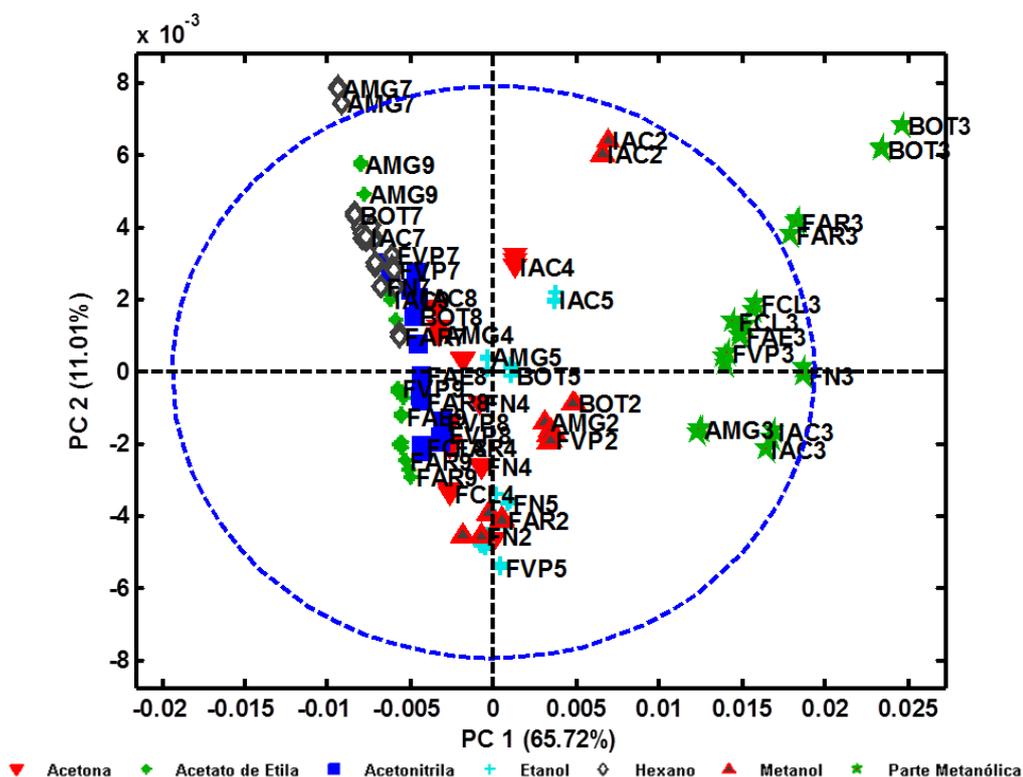


FIGURA 5.4. Gráfico dos scores da PC1 x PC2 do modelo PCA para matriz completa dos dados

Comparada com a FIGURA 5.5, que mostra o gráfico dos escores da PC1 versus PC2 para a matriz total com o bucket, percebe-se que o padrão de separação não se altera, ou seja, o grupo de amostras extraído com metanol/água se distancia das demais e os outros grupos se distribuem no espaço de acordo com diferenças de polaridade e conseqüentemente capacidade extrair compostos semelhantes ou não.

As diferentes amostras apresentam perfil similar quando extraídas com o mesmo solvente, diferenciando da mesma amostra quando extraída por um solvente diferente.

É por isso que os agrupamentos da análise exploratória agrupou os solventes ao invés de agrupar as amostras.

Diante disso, conclui-se que os deslocamentos dos picos observados nos espectros não são significativos a ponto de interferir na separação das amostras e que as diferenças de composição das amostras explicam a maior fração da variância dos dados.

Sendo assim optou-se por construir os modelos utilizando a matriz sem bucket devido a maior facilidade de interpretação do loadings.

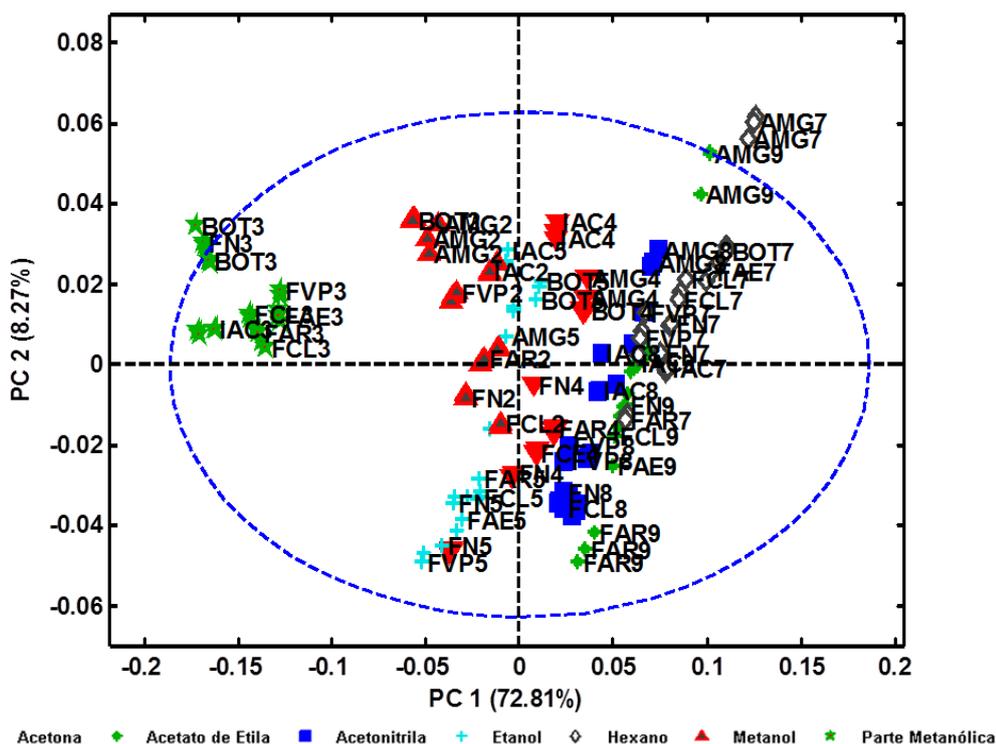


FIGURA 5.5. Gráfico dos scores da PC1 x PC2 do modelo PCA para matriz com bucket

### 5.3.2. Avaliação do Modelo Completo

Observando a distribuição das amostras na

FIGURA 5.4 percebe-se que o grupo extraído com metanol/água se distancia significativamente dificultando distinguir a separação dos outros grupos. Com o objetivo de observar melhor os agrupamentos foi feito dois modelos distintos, um com todas as amostras em todas as fases extratoras exceto metanol e metanol/água e outro com apenas as duas fases extratoras excluídas do primeiro. Os resultados obtidos para estas análises são apresentados nas FIGURA 5.6 a FIGURA 5.9.

Na FIGURA 5.6 é possível observar que o grupo de amostras extraído com hexano se separa mais nitidamente dos demais. Ao analisar os loadings da primeira componente, FIGURA 5.7, percebemos que a região relativa a compostos mais apolares, variáveis 2.2 a 3.0 ppm, é a de maior importância na separação, pois possui maiores valores de loadings. Há uma tendência na ordem dos agrupamentos relativa à capacidade de extrair essa classe de compostos, ou seja, no extremo esquerdo temos os extratos em etanol e mais a direita os extratos em hexano.

Podemos inferir que há uma separação baseada na afinidade do solvente pelos compostos que mais influenciam o agrupamento. Para os solventes

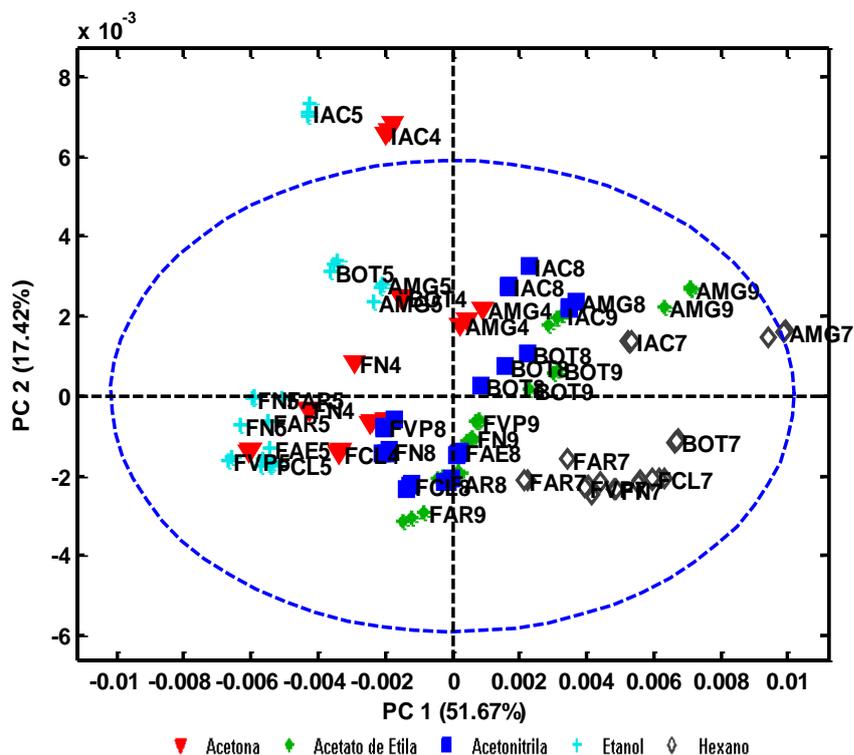


FIGURA 5.6. Gráfico dos scores da PC1xPC2 do modelo PCA construído excluindo os extratos em metanol e metanol/água

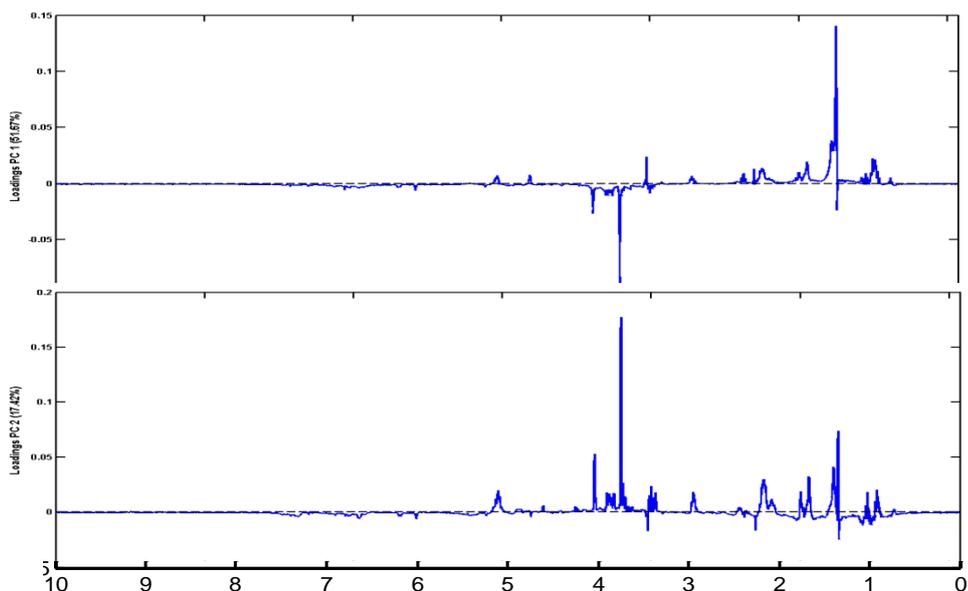


FIGURA 5.7. Loadings da PC1 e PC2 para o modelo construído excluindo os extratos obtidos em Metanol e Metanol/Água

em que há maior mistura das amostras como, por exemplo, os pares etanol / acetona e acetato de etila / acetonitrila pode se supor que compostos similares estão sendo extraídos.

Embora haja uma dispersão das amostras para um mesmo solvente, ou seja, as amostras extraídas com uma fase extratora específica não se concentram em uma região, no global a variância devido a alteração de solvente é mais significativa que as variâncias entre as amostras.

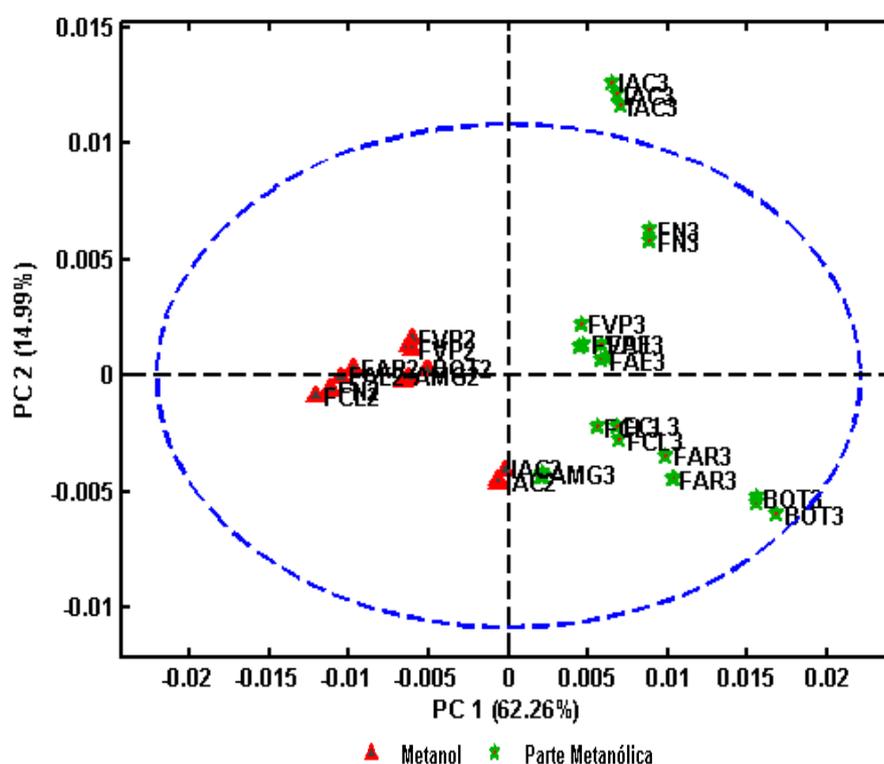


FIGURA 5.8. Gráfico dos scores da PC1xPC2 do modelo PCA construído apenas para os solventes metanol e metanol/água

A

FIGURA 5.8 mostra a distribuição de scores para o modelo construído apenas com dois solventes, excluídos do modelo anterior. Há uma separação nítida em dois grupos principais. A primeira componente separa os grupos por solvente. Já a segunda componente evidencia diferenças dentro de um mesmo grupo. As amostras extraídas com metanol se concentram mais perto do eixo da segunda componente, indicando que esse solvente está sendo pouco eficiente em extrair compostos que diferenciem as amostras.

As amostras extraídas com metanol/água se dispersam ao longo da segunda componente. Quando avaliamos o gráfico de loadings, FIGURA 5.9, percebemos que a região de açúcares tem alto peso na separação em ambas as componentes. Mas para a segunda componente também há influência da região relativa aos flavonóides, mesmo que em menor peso.

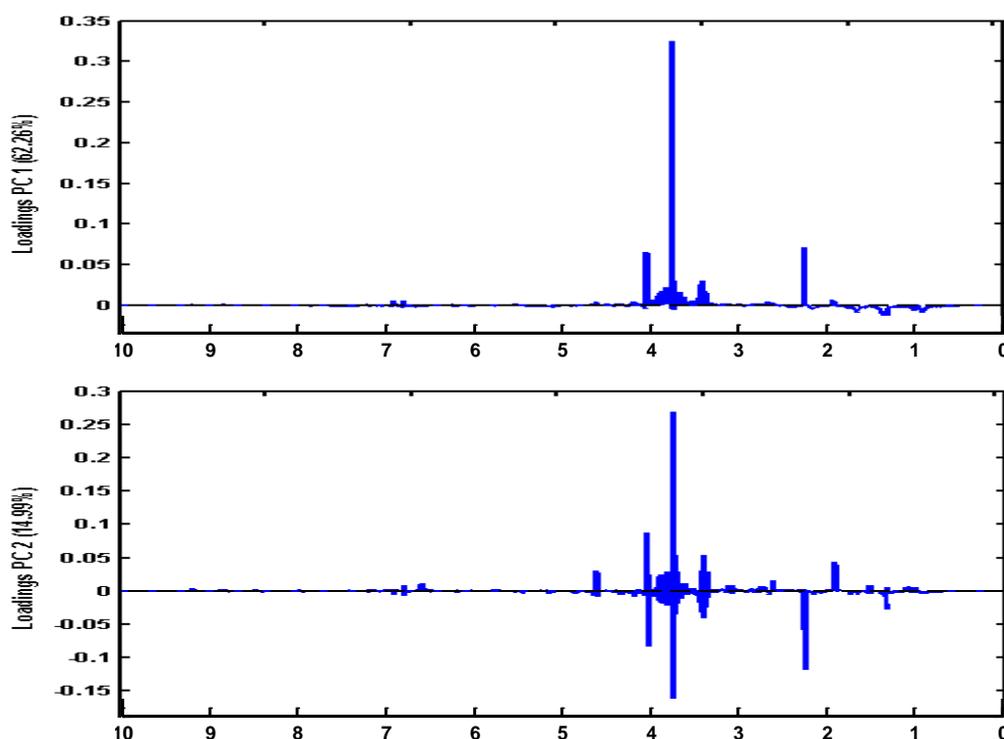


FIGURA 5.9. Loadings da PC1 e PC2 para o modelo construídos apenas com extratos obtidos em Metanol e Metanol/Água

#### 5.4. Influência da Fase Extratora

Cada amostra foi submetida à extração com diferentes fases extratoras. Com isso diferentes compostos seriam extraídos em maior ou menor concentração dependendo da afinidade com o solvente. A extração diferencial é uma forma importante de obter as condições necessárias na deconvolução de sinais sobrepostos e obtenção dos espectros das substâncias puras ou o espectro da combinação de um conjunto de compostos semelhantes, uma vez que, estas técnicas se baseiam na variação da concentração relativa entre os compostos. Estudos na literatura mostram o uso de técnicas de resolução de curvas na geração de perfis espectrais e de concentração no acompanhamento online de reações

químicas e na determinação simultânea de concentração de princípios ativos em medicamentos<sup>48,49</sup>.

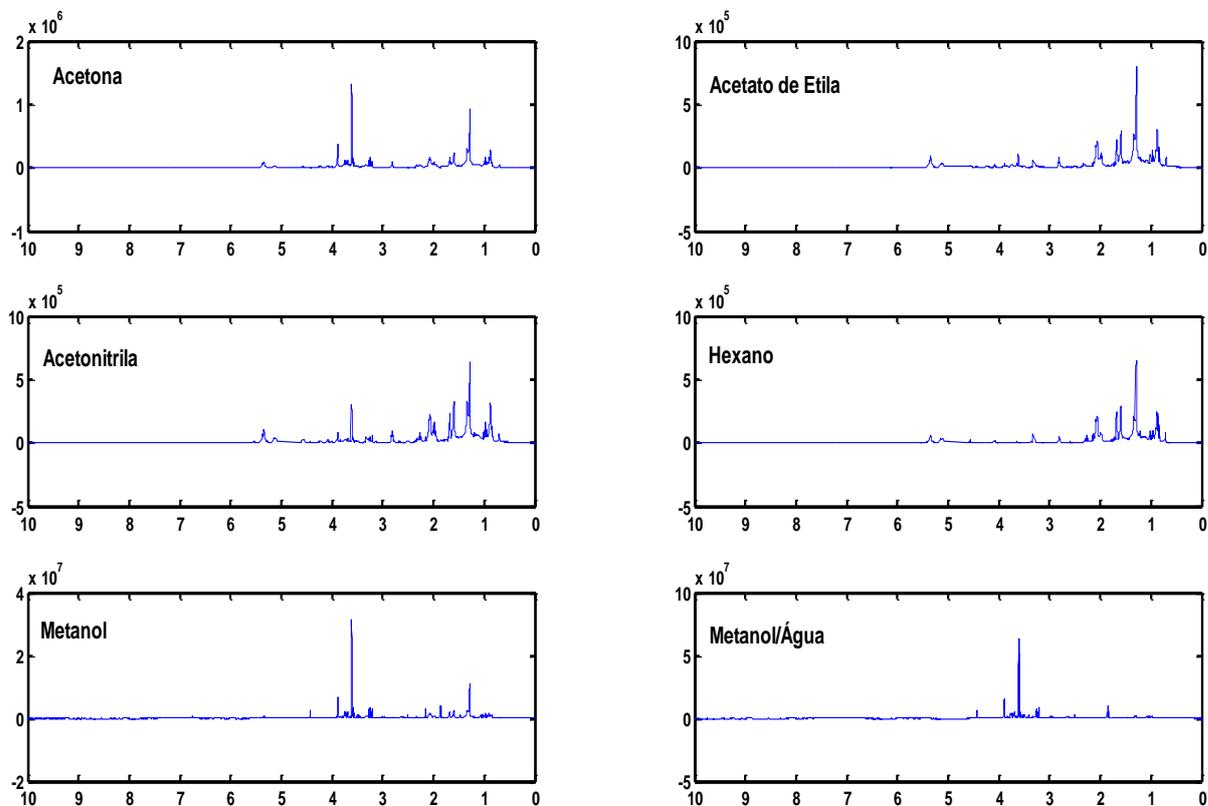


FIGURA 5.10. Espectros de H1 RMN da amostra IAC em diferentes fases extratoras

Na FIGURA 5.10 são apresentados os perfis espectrais para uma mesma amostra, nesse caso a referência IAC, em sete fases extratoras. Podemos observar que o perfil espectral de cada uma delas é diferente indicando que compostos diferentes estão sendo extraídos.

Solventes mais polares, como metanol, água e acetona extraem maior quantidade de açúcares. Os espectros obtidos a partir dos extratos em acetona e acetonitrila apresentam características semelhantes, mas suas intensidades relativas são diferentes, sugerindo que mesmos compostos, ou da mesma classe foram extraídos, mas em concentrações diferentes.

O hexano extrai compostos mais apolares que absorvem na região de 0.0 a 3.0 ppm. Além disso, fornece um espectro mais limpo com picos mais resolvidos e menos sobrepostos.

As fases extratoras metanol e água/metanol extraem uma gama mais variada de compostos com perfis espectrais mais complexos. Conseqüentemente os

picos apresentam-se bastante sobrepostos e com baixa resolução, em algumas regiões formam-se bandas. Além disso, devido à solubilidade dos flavonóides em álcoois há presença de bandas de absorção na região de aromáticos, mesmo que em baixas concentrações.

O mesmo comportamento foi observado para todas as amostras, mostrando o sucesso obtido com a extração diferencial e o objetivo de usar várias fases extratoras foi alcançado.

Para determinar quais solventes que extraem mas compostos similares ou diferentes, realizou-se análises PCA individuais, para cada uma das amostras utilizadas neste trabalho, como mostrado na FIGURA 5.10. A amostra, nesse caso, é o fator constante e o solvente é variado. Uma vez que a composição da amostra não varia, toda fração de variância entre os pontos seria explicada pela mudança de solvente. Os solventes que geram posição semelhante para cada amostra (escores semelhantes), são aqueles que extraem compostos semelhantes e em concentração semelhante. Desta maneira, para extrair uma maior variedade de compostos, é interessante trabalhar com os solventes que não formam agrupamentos, ou seja, que extraiam compostos diferentes e em diferentes concentrações.

De forma geral os solventes que mais se diferenciam são: hexano, metanol e metanol/água. O hexano, como foi comentado anteriormente, por extrair menos compostos e o outros dois por extrair uma gama maior de substâncias. As amostras extraídas com acetato de etila e acetonitrila estão próximas corroborando o que foi observado na análise dos espectros (FIGURA 5.10) e na análise PCA para todas as amostras (FIGURA 5.6).

A tendência de agrupamento desses solventes é devido à semelhança entre os compostos que são extraídos.

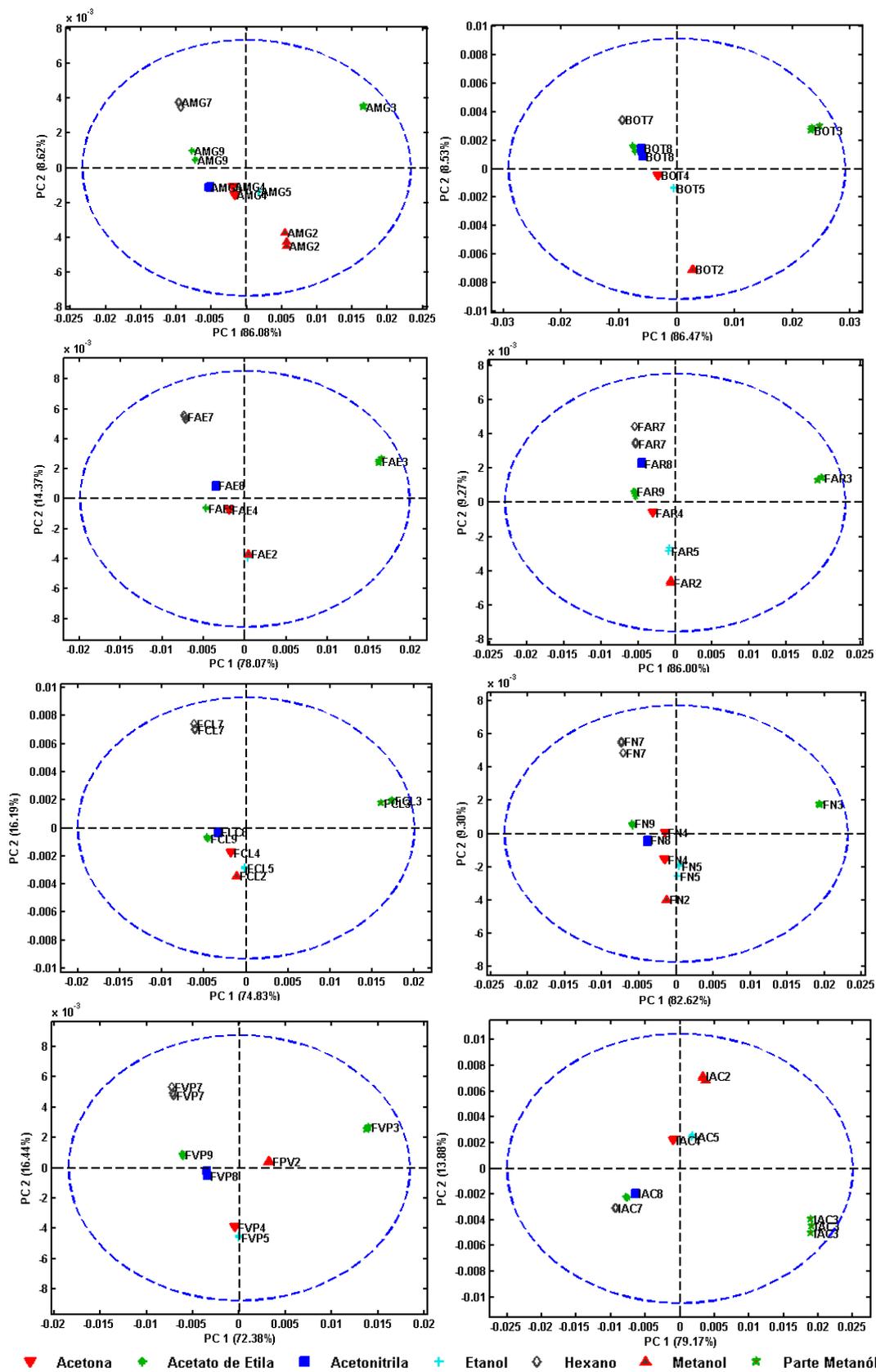


FIGURA 5.11. Gráfico dos scores da PC1xPC2 do modelo PCA individuais para cada amostra nas sete diferentes fases extratoras

## 5.5. Análise PCA para Fases Extratoras

Na FIGURA 5.12 estão apresentados os espectros dos extratos obtidos em metanol para todas as amostras. Pode-se verificar que o perfil espectral das amostras se diferencia bastante umas das outras. A carga de flavonóides varia não só com a espécie, mas também depende do tempo de coleta, forma de armazenamento, da maneira de secagem das folhas, uma vez que esses compostos são sensíveis às variações externas e são degradados<sup>9</sup>.

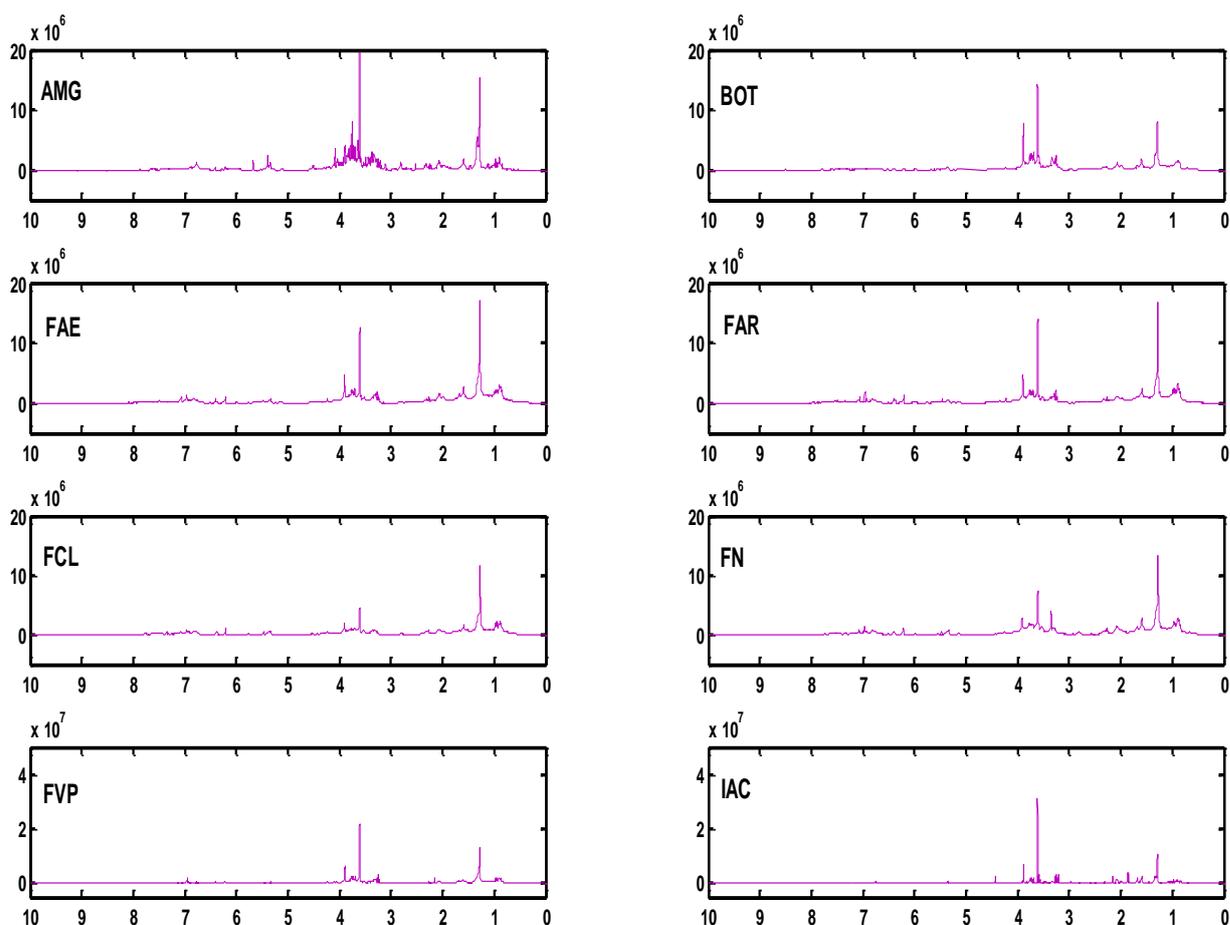


FIGURA 5.12. Espectros de H1 RMN para todas as amostras para a fase extratora metanol

Comparando a região dos açúcares, 3.0 a 4.0 ppm é nítida que sua distribuição nas amostras é diferente, já que se observa variação nos sinais e na concentração relativa entre eles.

Há vários agrupamentos das amostras, uma vez que a composição dos extratos depende da afinidade e da capacidade das fases extratoras extraírem determinada classe de substância.

Como pode ser observado na FIGURA 5.13, a distribuição das amostras para os scores da primeira e segunda componente é semelhante para as fases extratoras, acetato de etila, etanol e acetonitrila. Nesses três casos há formação nítida de quatro grupos, com distinção significativa das amostras comerciais AMG e BOT e da amostra padrão IAC. Para a fase extratora etanol há formação de cinco grupos com efetiva separação das amostras citadas anteriormente.

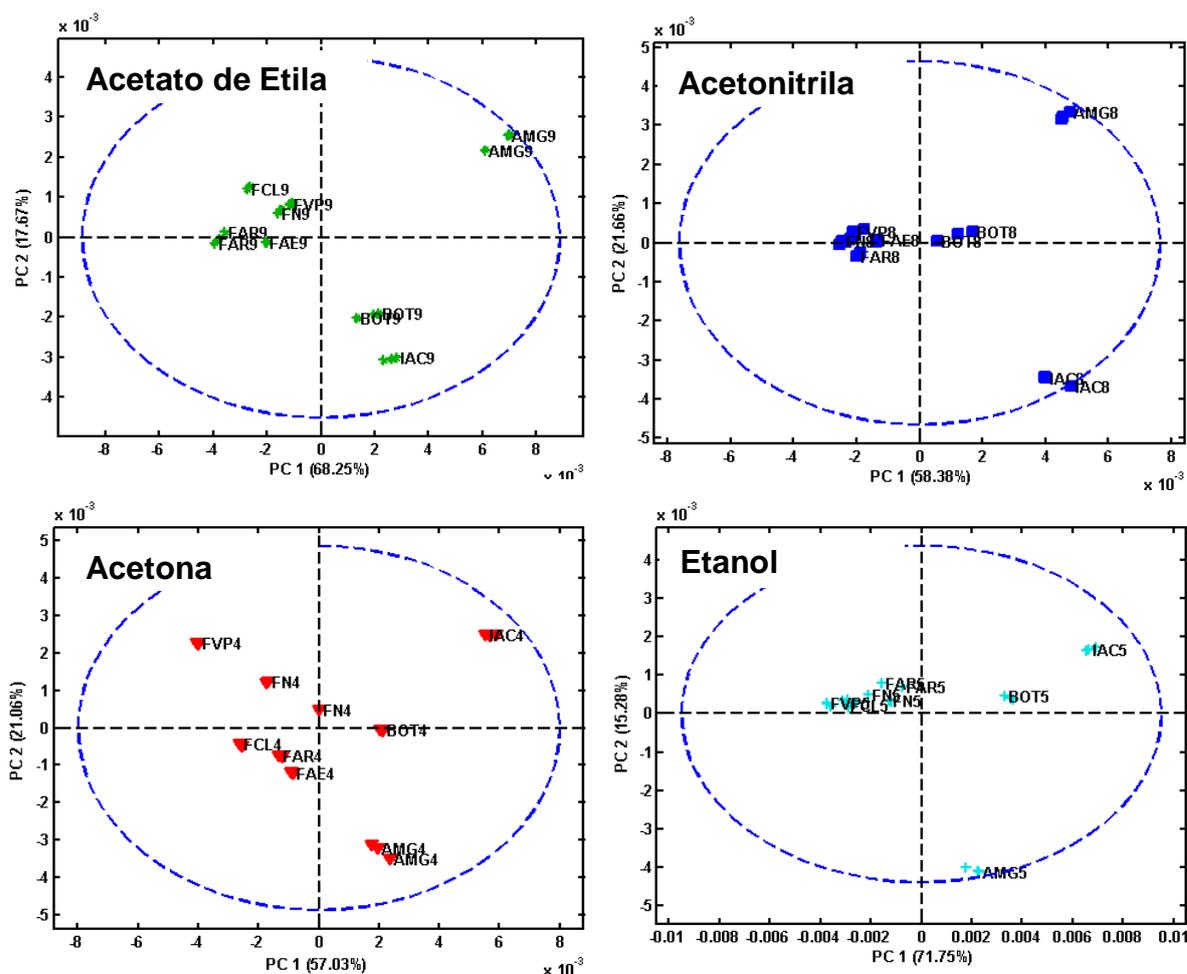


FIGURA 5.13. Gráfico dos scores da PC1xPC2 para todas as amostras em diferentes fases extratoras

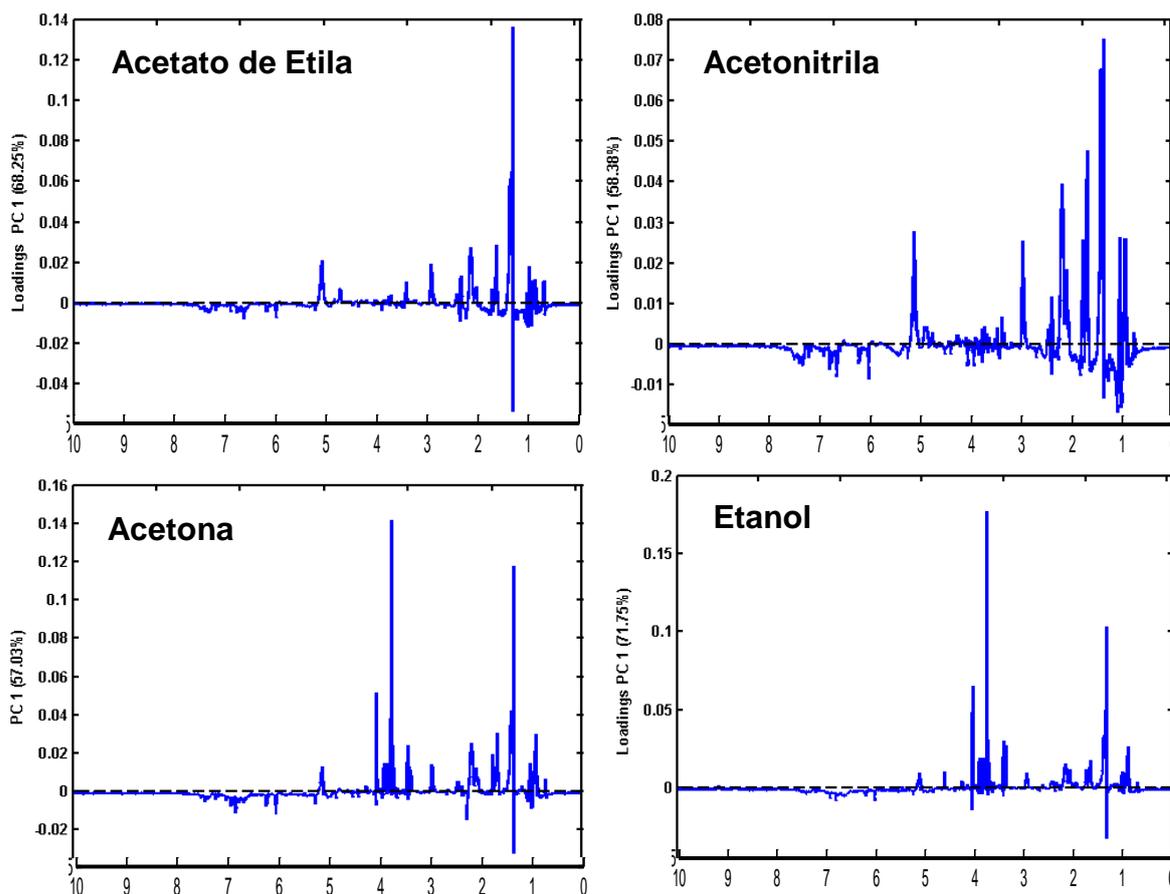


FIGURA 5.14. Gráfico de Loadings da primeira componente para o modelo para todas as amostras em solventes diferentes

Uma avaliação dos loadings, FIGURA 5.14, indica que para as fases extratoras, acetato de etila e acetonitrila, a região que mais influencia a separação é relativa a hidrocarbonetos saturados e insaturados. Já para o etanol e acetona, região relativa a açúcares também são importantes na distinção das amostras.

Na FIGURA 5.15, são apresentados as PCAs para todas as amostras nos solventes que a princípio proporcionaram a melhor separação no modelo construído com a mesma amostra variando o solvente.

Para o hexano há formação de três grupos, sendo que dois deles são compostos por apenas uma amostra. O modelo construído para extratos obtidos em metanol também forma três grupos, mas para esse caso apenas a amostra IAC fica isolada das demais.

Para os extratos em metanol/água é nítida a separação das amostras, BOT, IAC e AMG, além de um grupo formado por três amostras próximas à segunda componente. Como o PCA é uma técnica não-supervisionada fica difícil julgar a qual grupo as amostras FN e FAR são pertencentes.

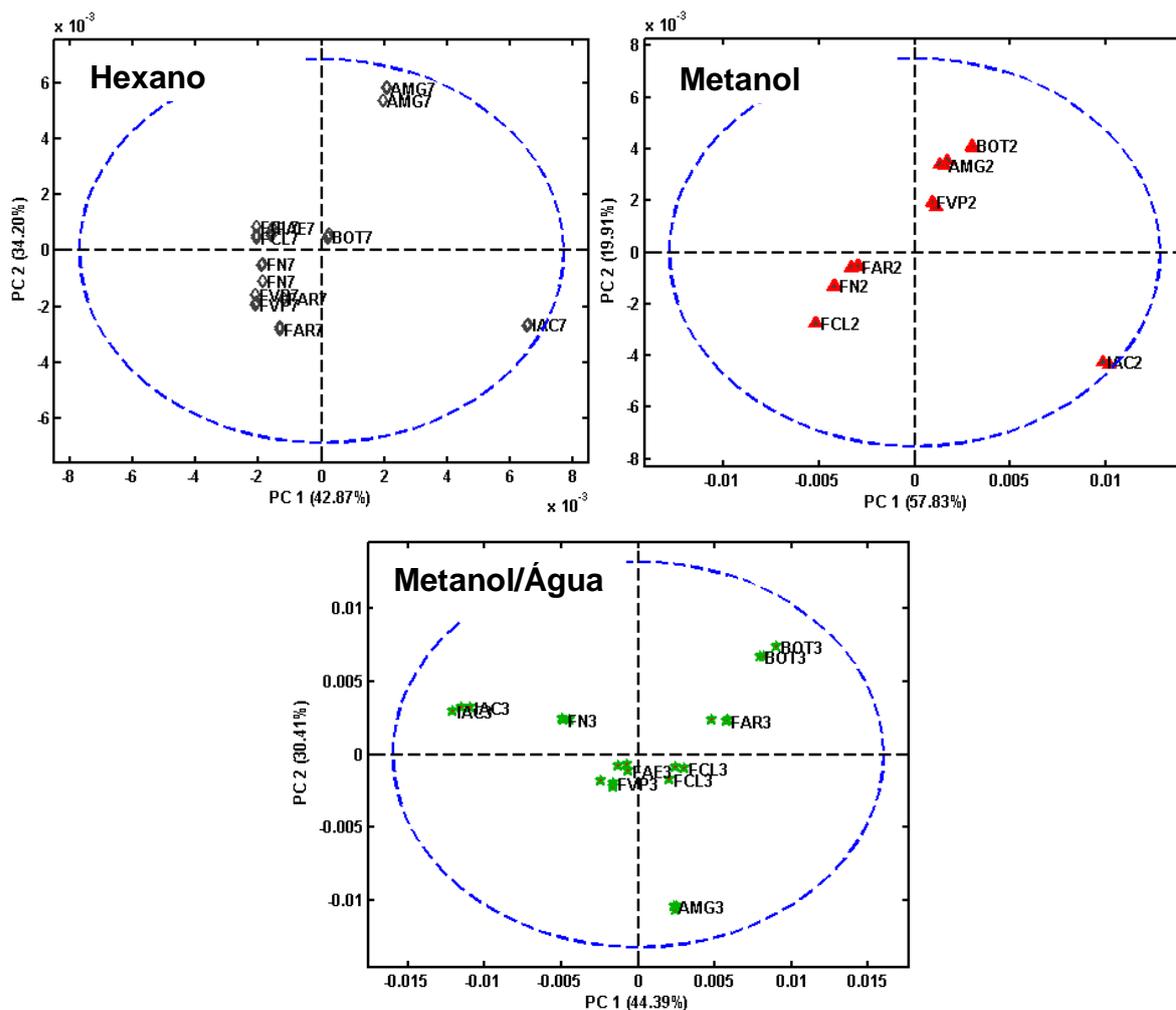


FIGURA 5.15. Gráfico dos Scores da PC1xPC2 para as PCAs construídas com as fases extratoras hexano, metanol/água e metanol

A análise dos loadings, FIGURA 5.16, da primeira componente segue a mesma tendência observada até o momento. A região importante para o hexano é relativa a compostos mais apolares e para metanol/água e metanol é mais significativa a região de açúcares.

Independente do solvente utilizado, as amostras padrão IAC e a amostra comercial AMG ficam isoladas do conjunto formando uma classe, indicando que são realmente diferentes, fato que está de acordo com a análise visual feita no item 5.1.

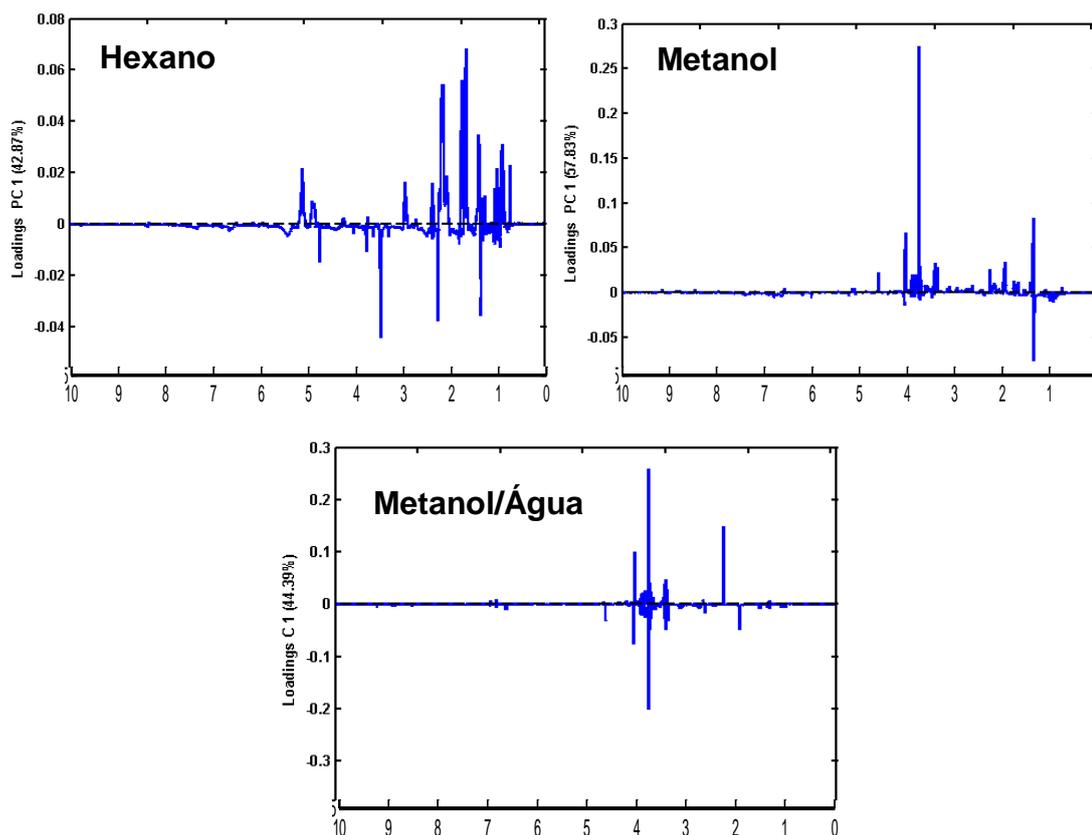


FIGURA 5.16. Gráfico de Loadings da primeira componente para o modelo para todas as amostras em hexano, metanol/água e metanol

Uma vez que a amostra padrão sempre se distancia das demais pode se concluir que todas as amostras comerciais são quimicamente diferentes da amostra padrão. Tal diferença pode ser proveniente de espécies diferentes ou da diferença de tempo entre processamento entre as amostras, já que não há controle quando se trata das amostras comerciais.

## 5.6. PCA sem a Região dos Açúcares

Eliminou-se a região de 3.0 a 4.8 ppm, relativa à absorção de açúcares, da matriz completa com todos os extratos em todas as fases extratoras para verificar a eficiência da separação do modelo.

A

FIGURA 5.17 mostra o gráfico de escores para o modelo. Com exceção de algumas amostra extraídas com metanol/água que estão mais distantes do modelo, pode-se observar que não há pequenos agrupamentos. As amostras se concentram em uma região evidenciando que não há fontes de variabilidade que sejam significativas ao ponto de separá-las pela análise de componentes principais.



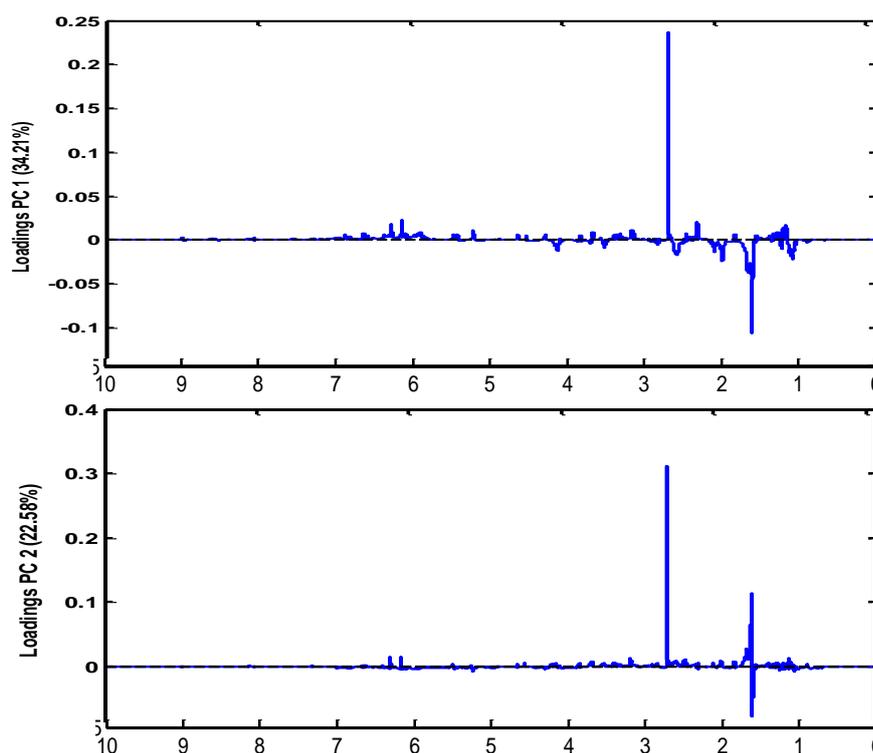


FIGURA 5.18. Gráfico de loadings para a primeira e segunda componente do modelo construído retirando a região do espectro relativa a absorção de açúcares

Sobre as amostras comerciais utilizadas, não há controle a respeito da estação do ano em que foram coletadas, da idade da árvore, se a árvore tinha frutos ou apenas folhas, quanto tempo e como as folhas foram secas e transportadas. Além disso, no rótulo de algumas amostras há a denominação *sp*, indicando que mais de uma espécie pode ter sido misturada. Assim o espectro obtido a partir do extrato de uma dessas amostras seria a soma dos espectros das espécies individuais.

Sendo assim com tantas fontes de variabilidade é arriscado confiar nessa região para classificar as amostras.

## 5.7. Quebra de Trilinearidade

Um dos pré-requisitos para utilizar o PARAFAC é que os dados sejam trilineares, ou seja, uma saída deve modular a outra. Por exemplo, o extrato da amostra IAC é uma saída e o espectro de RMN desse extrato é outra saída, sendo assim temos uma tríade: amostra, solvente, espectro RMN. Mas, uma tríade não é suficiente para que os dados sejam trilineares. Para tal, seria necessário que os compostos extraídos para um dado solvente, por exemplo o metanol, e que sejam iguais para todas as amostras, devem apresentar absorção exatamente no mesmo deslocamento, ou seja, o extrato de metanol modula o espectro de RMN.

Conforme observado no subitem 5.3.1 há pequenos deslocamentos dos sinais de absorção, que não comprometem a análise por componentes principais, mas que inviabilizam a construção de um modelo utilizando PARAFAC, uma vez que há quebra da trilinearidade dos dados.

Na FIGURA 5.19 é apresentada uma ampliação do espectro de H1 RMN para a amostra IAC de duas diferentes regiões do espectro, de forma que se possa observar mais claramente o deslocamento. Não há um deslocamento em bloco, ou seja, a variação depende do pico que se analisa, ora pode ser para a direita, ora pode ser pra esquerda, ora não há deslocamento. Esse comportamento é observado em toda a faixa espectral estudada.

Com intuito de eliminar os deslocamentos utilizou-se o algoritmo Correlation Optimized Warping (COW) para correção (alinhamento) dos espectros<sup>53</sup>. Esse algoritmo utiliza como referência para o alinhamento o espectro que tenha mais semelhanças com todos os outros. O tamanho do segmento que será ajustado durante as interações e escolhido pelo usuário. Como não há padrão nos deslocamentos o espectro foi dividido em frações que praticamente englobavam apenas um pico por vez.

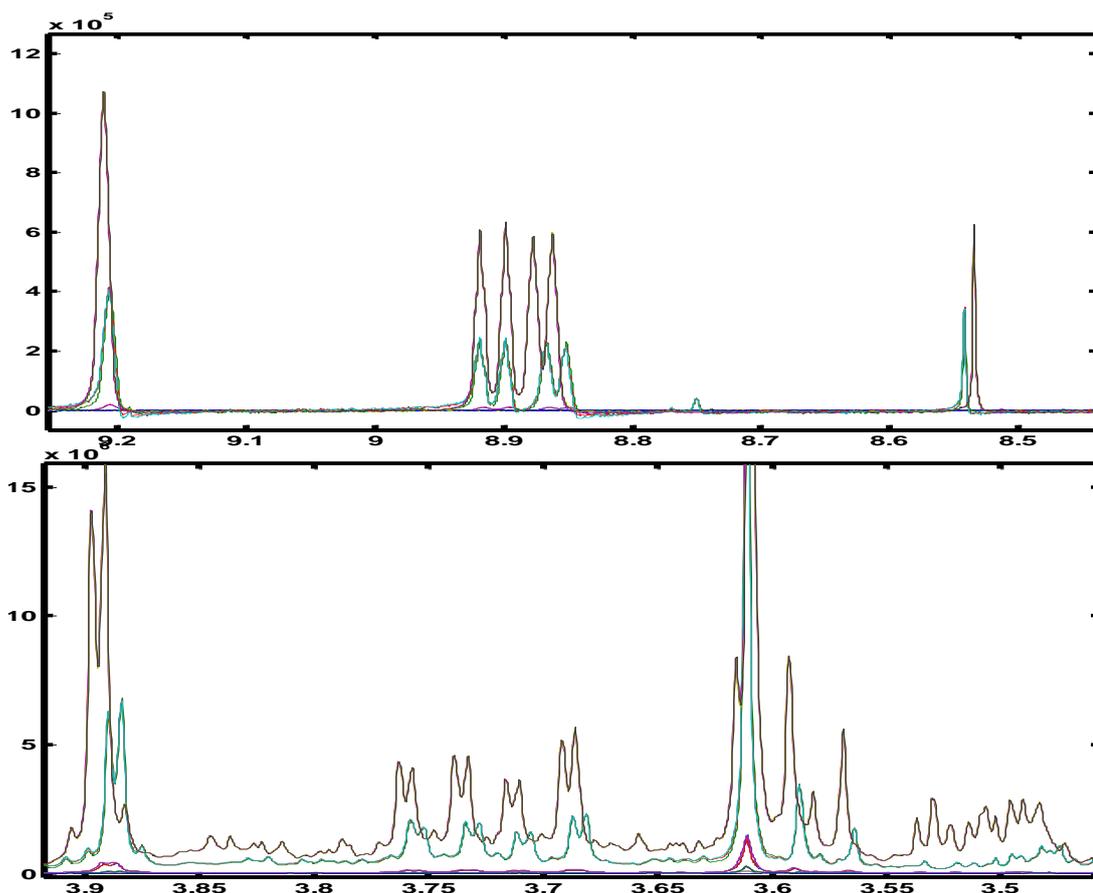


FIGURA 5.19. Ampliação de duas regiões do espectro de H1 RMN, aromáticos e açúcares, para a amostra IAC

Na FIGURA 5.20 é possível avaliar os espectros antes e após o alinhamento feito com o algoritmo. Os picos são alinhados satisfatoriamente, mas com alguns inconvenientes, por exemplo os quatro picos na região de 8.9 ppm são alargados após o alinhamento.

Adicionalmente, a tentativa de alinhamento da região de maior número de picos não foi bem sucedida, justamente devido ao número elevado de picos, sendo portanto, inviável dividir o espectro em frações de no máximo dois picos.

A deconvolução com MCR também fica prejudicada com os deslocamentos de picos pois o modelo pode interpretar os mesmos como picos diferentes, quando na realidade não são. Além disso há perda de resolução, com formação de bandas largas que são difíceis de resolver, como pode ser visto em algumas regiões do espectro mostrado na FIGURA 5.21, como por exemplo nos deslocamentos em torno de 4.0 e 3.8 ppm.

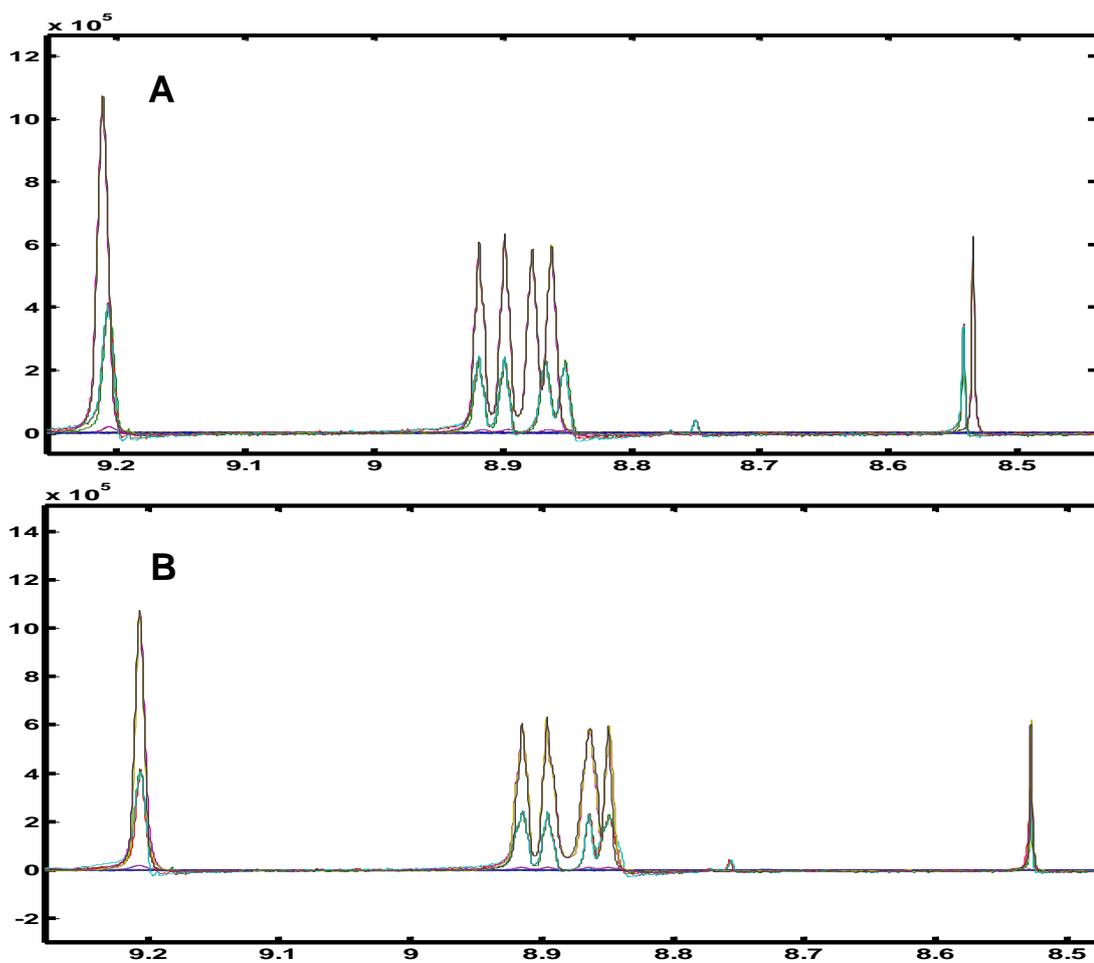


FIGURA 5.20. Comparação entre os espectros (A) antes do alinhamento (B) após o alinhamento com algoritmo COW

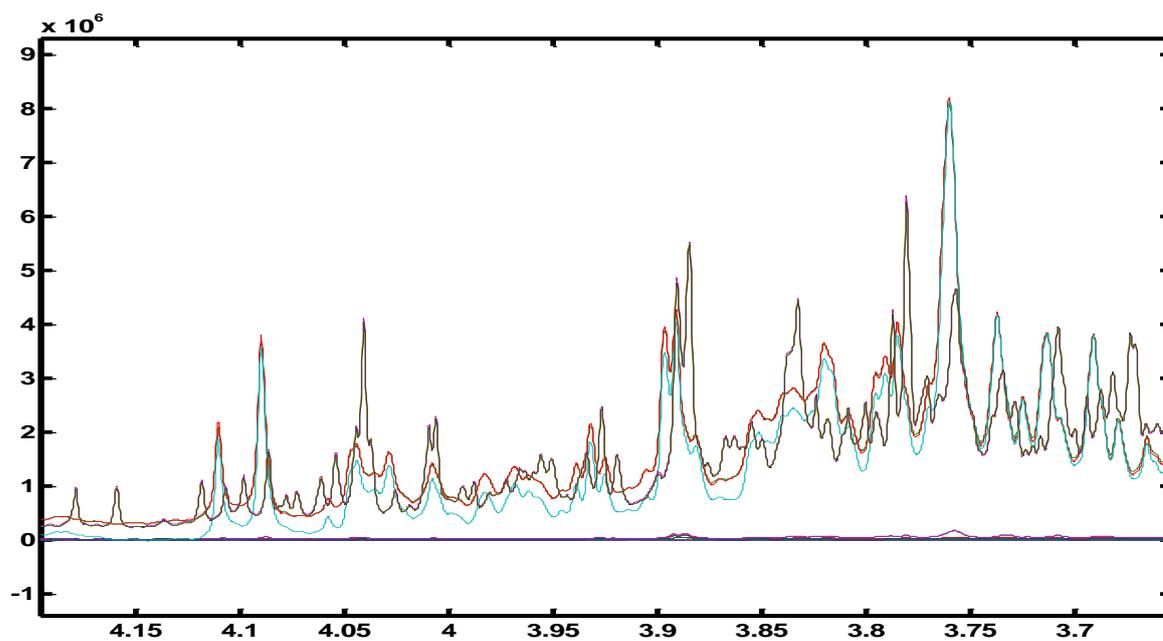


FIGURA 5.21. Ampliação da região de açúcares do espectro da amostra AMG

# CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO

A análise visual só foi possível para algumas amostras, uma vez que em geral as folhas são vendidas picadas. Por meio dessa análise foi possível inferir que possivelmente há pelo menos quatro espécies diferentes de *Bauhinia forficata* no conjunto de amostras.

O deslocamento de picos nos espectros de ressonância magnética nuclear não influenciam a análise por componente principais, não sendo observada diferenças significativas entre os resultados obtidos utilizando o espectro completo e o espectro após compressão por bucket.

A análise PCA do espectro completo mostrou um padrão de separação baseado na afinidade dos solventes em extrair determinados grupos de compostos. Solventes mais polares, como por exemplo metanol/água se distanciavam de solventes mais apolares, como o hexano.

Solventes como metanol, metanol/água e hexano se destacaram por gerarem extratos com características bem diferentes dos demais. Os dois primeiros com espectros complexos, com elevado número de picos e alto grau de sobreposição. O hexano com espectros mais limpos e picos bem resolvidos.

A região do espectro que mais influencia na separação observada na análise por componentes principais corresponde a absorção de açúcares. Região com maior fração de variância que separa as amostras, mas em geral não classifica, uma vez que se utiliza as folhas para análise. Essa região das plantas concentram açúcares temporariamente e a composição pode variar de acordo com a sazonalidade, idade da planta, se há troca de tecidos, entre outros.

Embora o deslocamento dos picos não afetem a análise PCA, no caso do uso do PARAFAC torna a análise inviável. Há quebra da trilinearidade dos dados e já não é possível decompor os dados em tríades. Além disso, para o MCR, o deslocamento pode ser interpretado como pico diferente gerando uma análise errônea dos dados.

Provavelmente seja necessário realizar uma extração orientada para um dado grupo de compostos, e portanto, não usar o extrato bruto, eliminando ou minimizando o efeito do deslocamento de picos, o que torna possível a análise por meio de métodos de segunda ordem.

**CAPÍTULO 7 -  
REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

1. Tistaert, C., Dejaegher, B. & Vander Heyden, Y. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. *Anal. Chim. Acta* **690**, 148–61 (2011).
2. Liang, Y.-Z., Xie, P. & Chan, K. Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **812**, 53–70 (2004).
3. De Oliveira, C. R., Carneiro, R. L. & Ferreira, A. G. Tracking the degradation of fresh orange juice and discrimination of orange varieties: An example of NMR in coordination with chemometrics analyses. *Food Chem.* **164**, 446–53 (2014).
4. Longobardi, F. *et al.* Non-targeted <sup>1</sup>H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Italian sweet cherries. *Food Chem.* **141**, 3028–33 (2013).
5. Souza, C. R. F. de. Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro. 180 (2003).
6. Salatino, A. & Dos Santos, Â. Foliar Flavonoids of Nine Species of *Bauhinia*. *Rev. Bras. Botânica* **22**, (1999).
7. Silva, K. . Phytochemical and Pharmacognostic Investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). *Z. Naturforsch* **55**, 478–480 (2000).
8. Gobbo-neto, L. & Lopes, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Quim. Nova* **30**, 374–381 (2007).
9. Arigony, A. L. V. A. Determinação Química e Biológica de *Bauhinia forficata* Link Subespécie pruinosa (pata-de-vaca - Leguminosae). 160 (2005).
10. Lucio-Gutiérrez, J. R., Coello, J. & Maspoch, S. Enhanced chromatographic fingerprinting of herb materials by multi-wavelength selection and chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **710**, 40–9 (2012).
11. Ni, Y., Mei, M. & Kokot, S. One- and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography-diode-array detector fingerprints of complex substances: a comparison of classification performance of similar, complex *Rhizoma Curcumae* samples with . *Anal. Chim. Acta* **712**, 37–44 (2012).
12. Chen, Y. *et al.* Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. *Anal. Chim. Acta* **623**, 146–56 (2008).
13. Lucio-Gutiérrez, J. R. *et al.* Multi-wavelength high-performance liquid chromatographic fingerprints and chemometrics to predict the antioxidant activity of *Turnera diffusa* as part of its quality control. *J. Chromatogr. A* **1235**, 68–76 (2012).

14. Hendriks, M. M. W. B., Cruz-Juarez, L., Bont, D. De & Hall, R. D. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. *Anal. Chim. Acta* **545**, 53–64 (2005).
15. Scano, P. *et al.* H-1 NMR metabolite fingerprinting as a new tool for body fluid identification in forensic science. *Magn. Reson. Chem.* **51**, 454–462 (2013).
16. Longobardi, F. *et al.* Classification of olive oils according to geographical origin by using <sup>1</sup>H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. *Food Chem.* **130**, 177–183 (2012).
17. Alonso-Salces, R. M., Holland, M. V. & Guillou, C. <sup>1</sup>H-NMR fingerprinting to evaluate the stability of olive oil. *Food Control* **22**, 2041–2046 (2011).
18. Yilmaz, A., Nyberg, N. T., Mølgaard, P., Asili, J. & Jaroszewski, J. W. <sup>1</sup>H NMR metabolic fingerprinting of saffron extracts. *Metabolomics* **6**, 511–517 (2010).
19. Silva, K. L. da & Filho, V. C. Plantas do Gênero Bauhinia: Composição Química e Potencial Farmacológico. *Quim. Nova* **25**, 449–454 (2002).
20. Pepato, M. T., Keller, E. H., Ba, A. M., Kettelhut, I. C. & Vendramini, R. C. Anti-diabetic activity of Bauhinia forficata decoction in streptozotocin-diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **81**, 191–197 (2002).
21. Juliane, C. Ação hipoglicemiante de Bauhinia forficata Link. Novos estudos experimentais. *Rev. Sudam. Endocrinol. Immunol. e Quimioter.* **14**, 326–334 (1931).
22. Cunha, A. M. da, Menon, R., Couto, A. G., Bürger, C. & Biavatti, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of Bauhinia forficata Link. *Phytomedicine* **17**, 37–41 (2010).
23. Menezes, F. de S. H. S. R., Sheridan, R. M. K. H. & Frankish, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian Bauhinia species: Bauhinia forficata L. and Bauhinia monandra Kurz. *Brazilian J. Pharmacogn.* **14**, 8–13 (2007).
24. Damasceno, D. C., Calderon, I. de M. P., Aguilar, R. & Rudge, M. V. C. Effect of Bauhinia forficata extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. *Phytomedicine* **11**, 196–201 (2004).
25. Cleide de Sousa Lino Pereira Faria, B. A. R. A. P. G. *et al.* Antidiabetic Activity of Bauhinia forficata Extracts in Alloxan-Diabetic Rats. *Biol. Pharm. Bull* **27**, 125–127 (2004).
26. Pepato, M. T. *et al.* Evaluation of the spouted bed dried leaf extract of Bauhinia forficata for the treatment of experimental diabetes in rats. *African J. Biotechnol.* **9**, 7165–7173 (2010).
27. Oliveira, C. Z. *et al.* Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from Bauhinia forficata against snake venoms. *J. Ethnopharmacol.* **98**, 213–6 (2005).

28. Miyake, G. A. & Akisue, M. . Caracterização Farmacognóstica da Pata de Vaca (*Bauhinia forficata* Link). *Ver. Bras. Farmacogn.* **1**, 56–68 (1986).
29. Engel, I. C., Ferreira, R. A., Cechinel-filho, V. & Meyre-silva, C. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **18**, 258–264 (2008).
30. Pinheiro, T. S. D. B., Johansson, L. a P., Pizzolatti, M. G. & Biavatti, M. W. Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* link. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 431–6 (2006).
31. Rho, H. S. *et al.* Changes in flavonoid content and tyrosinase inhibitory activity in kenaf leaf extract after far-infrared treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 7534–7536 (2010).
32. Prasad, C. N. V. & S. S. M., A. B. A. G. Kaempferitrin inhibits GLUT4 translocation and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 39–43 (2009).
33. Jorge, A. P., Sousa, E. de, Pizzolatti, M. G. & Silva, F. R. M. B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chem. Biol. Interact.* **149**, 89–96 (2004).
34. Vihakas, M., Ossipov, V. & Salminen, J.-P. Flavonoid Metabolites in the Hemolymph of European Pine Sawfly (*Neodiprion sertifer*) Larvae. *Journal Chem. Ecol.* **38**, 538–546 (2012).
35. Silverstein, R. M., Webster, F. X. & Kiemle, D. J. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 508 (2006).
36. Jukarainen, N. NMR Metabolomics Techniques and Mathematical Tools as an Aid in Neurological Diagnosis. (2009).
37. James, T. L. *Fundamentals of NMR*. 1–31 (1998).
38. *Practical Guide to Chemometrics*. (Taylor e Fancis Group, 2006).
39. Brereton, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. **8**, 0–471 (John Wiley e Sons Ltd, 2003).
40. Miller, J. C. & Miller, J. N. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. (Pearson, 2005).
41. Bro, R. PARAFAC: Tutorial and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **38**, 149–171 (1997).
42. Bro, R. Multi-way Analysis in the Food Industry: Models, Algorithms, and Applications. 311
43. Sena, M. M., Trevisan, M. G. & Poppi, R. J. Parafac: Uma Ferramenta Quimiométrica para Tratamento de Dados Multidimensionais. Aplicações na

- Determinação Direta de Fármacos em Plasma Humano por Espectrofluorimetria. *Quim. Nova* **28**, 910–920 (2005).
44. Bro, R. & Kiers, H. A. L. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *J. Chemom.* **17**, 274–286 (2003).
  45. Carneiro, R. L., Braga, J. W. B., Poppi, R. J. & Tauler, R. Multivariate curve resolution of pH gradient flow injection mixture analysis with correction of the Schlieren effect. *Analyst* **133**, 774–83 (2008).
  46. Garrido, M., Rius, F. X. & Larrechi, M. S. Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) applied to spectroscopic data from monitoring chemical reactions processes. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 2059–66 (2008).
  47. Kowalski, B. Selectivity , Local Rank , Three-Way Data Analysis and Ambiguity in Multivariate Curve Resolution. *J. Chemom.* **9**, 31–58 (1995).
  48. Shariati-Rad, M. & Hasani, M. Rank analysis and simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and caffeine in pharmaceuticals using second-order data and multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS). *J. Iran. Chem. Soc.* **11**, 471–479 (2013).
  49. Heravi, M. R. P., Vessally, E. & Behbehani, G. R. R. An efficient green MCR protocol for the synthesis of 2,4,5-trisubstituted imidazoles by Selectfluor™ under ultrasound irradiation. *Comptes Rendus Chim.* **17**, 146–150 (2014).
  50. York, N. & Garden, B. Sources and Sinks in Woody Plants Carbohydrate. **58**, 107–222 (2014).
  51. Koch, K. E. Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 509–540 (1996).
  52. Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. & Sheen, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 675–709 (2006).
  53. Skov, T., Berg, F. Van Den, Tomasi, G. & Bro, R. Automated alignment of chromatographic data. 484–497 (2007). doi:10.1002/cem