

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

**“Perfil Cromatográfico e Análise Multivariada para o
Controle de Qualidade de Amostras Comerciais
do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra)”**

Lúcia Regina Rocha Martins*

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

Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

Co-orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

*** bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2008**

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

M386pc

Martins, Lúcia Regina Rocha.

Perfil cromatográfico e análise multivariada para o controle de qualidade de amostras comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra) / Lúcia Regina Rocha Martins. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

154 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. *Phyllanthus*. 3. Perfil cromatográfico. 4. Controle de qualidade. I. Título.

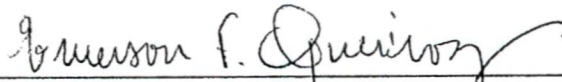
CDD: 540 (20^a)

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

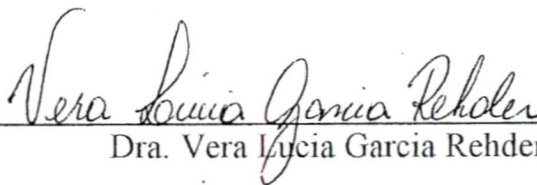
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Lucia Regina Rocha Martins**, realizada em 05 de dezembro de 2008:*



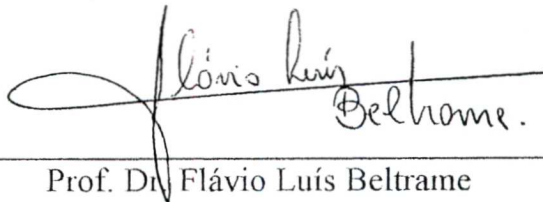
Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass



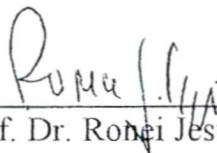
Dr. Emerson Ferreira Queiroz



Dra. Vera Lucia Garcia Rehder



Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame



Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

*À Dyrce, minha querida mãe e amiga,
exemplo de amor e generosidade.*

*“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.
É que posso evitar que ela vá a falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
se tornar um autor da própria história.
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
um oásis no recôndito da sua alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um 'não'.
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.*

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sinceramente, à oportunidade que a Profa. Dra. Quezia B. Cass me proporcionou em realizar este trabalho sob sua orientação. Acreditando em mim, você *me fez* acreditar em mim mesma, e isso tem sido fundamental em meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, pelo acompanhamento e orientação nas análises quimiométricas, pela atenção dispensada a esse trabalho e, principalmente, pela paciência.

A minha mãe, que participou dos momentos alegres e de crise, com o mesmo entusiasmo e amor.

Ao Thomaz, meu amor e companheiro, que foi o meu apoio quando me faltavam forças, meu amigo quando precisei de auxílio, meu grande incentivador. Esse trabalho também é seu!

Agradeço a minha família: Lígia, Manoel e Gabriel, pelo apoio incondicional e pela compreensão nos muitos momentos em que estive ausente.

Esse trabalho reflete um período de muito aprendizado e crescimento pessoal. As pessoas que fizeram parte dessa história me mostraram o quanto é importante o trabalho em grupo e a amizade. A vocês, deixo registrado o meu mais sincero agradecimento: Patrícia Polacchini, Angela C. de Pietro, Mariana Coimbra, Fernando Campos, Túlio Gallati, Fernando Almeida, Carmen Cardoso, Vanessa Urban, Malu Montanari, Kenia Vanzolini, Roberta Belaz, Marina Denadai, Tiago Lourenço, Graziane Ferrer, Bruna Netto, Tania Madureira, Marcela Moraes, Ariele Fogolin, Vinícius Carvalho, Carla Fernandes, Rejane Souza, Regina de Oliveira e Neila Cassiano.

A minha grande amiga Bianca Rebelo. Você tornou minha vida melhor com sua amizade. Obrigada pela compreensão, conselhos e auxílio em todos os momentos.

À Juliana Cristina Barreiro, pela cumplicidade, amizade e carinho.

Ao Alexandre Cruz, pela amizade generosa e sincera, pelos momentos de descontração e também pelos ensinamentos.

Aos amigos Bianca Ferreira, Carolina Moreira, Daniela Schiavo e Joel Alvim. Vocês são pessoas admiráveis! Obrigada pela amizade, apoio e incentivo em todos os momentos.

Aos inesquecíveis amigos, que também participaram dessa caminhada, nos momentos de descontração: Gustavo, Lígia, André, Luiz Ferreira, Maurício, Camila, Maria Tereza, Presley, Francisca, Rui, Daniel e Duda.

Ao Ademir Sertori (oficina de vidraria), Valdir Vaz (Laboratório de Síntese de Produtos Naturais), Luiz Carlos Yunes (CEMA), Paulo e Luciana (Laboratório de RMN), pela amizade, apoio e auxílio em momentos tão importantes do trabalho.

À Dra. Glyn Mara Figueira (CPQBA/UNICAMP), pela gentileza com que sempre esteve pronta a ajudar e pelas amostras vegetais fornecidas.

Às professoras do Departamento de Botânica, Dra. Sônia Cristina Perez e Dra. Maria Inês S. Lima, cujo auxílio foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Valéria Regina Moraes, Prof. Dr. Paulo Cesar Nogueira e Silvana Floresta (UFS/SE), pela amizade, carinho e apoio.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto e ao Felipe Augusto Dörr (USP/SP), pelos conhecimentos generosamente transmitidos.

Aos Professores, Mestres exemplares, que tive o privilégio de conhecer durante o período de doutoramento: Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, Prof. Dr. João Batista Fernandes e Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado... muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – acetonitrila

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

d.i. – diâmetro interno

DAD – detector de arranjo de diodos

HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*

k – fator de retenção

KNN – K^{th} Nearest Neighbor

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MeOH – metanol

PCA – *Principal Component Analysis*

PLS-DA – *Partial Least Square for Discriminant Analysis*

RMN – ressonância magnética nuclear

SIMCA – *Soft Independent Modelling of Class Analogy*

t_r – tempo de retenção

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
GLOSSÁRIO	xiv
INTRODUÇÃO	17
JUSTIFICATIVA	21
2.1. Controle Químico de Qualidade de Amostras Vegetais para fins Terapêuticos	22
2.1.1. Quantificação de Marcadores Químicos por Métodos Cromatográficos	24
2.1.2. Perfil Cromatográfico de Extratos Vegetais e suas Aplicações em Controle de Qualidade de Fitoterápicos.....	25
2.2. Quebra-pedra: <i>aspectos botânicos, farmacológicos e químicos</i>	27
2.2.1. Aspectos Botânicos.....	27
2.2.2. Aplicações terapêuticas e estudos farmacológicos.....	29
2.2.3. Aspectos Químicos de <i>Phyllanthus</i>	31
2.2.3.1. Controle de Qualidade Químico em Amostras de <i>Phyllanthus</i> ..	35
OBJETIVOS	39
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	41
4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: eluição gradiente.....	42
4.2. Quimiometria.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1. Cultivo, coleta e processamento de amostras de <i>Phyllanthus</i>	54
5.1.1. Amostras cultivadas no CPQBA/UNICAMP.....	54
5.1.2. Amostras cultivadas no <i>campus</i> da UFSCar.....	55
5.1.3. Coleta de amostras não cultivadas de espécies de <i>Phyllanthus</i>	62
5.2. Obtenção de amostras comerciais de “quebra-pedra”.....	64
5.3. Método de extração.....	65
5.4. Otimização das condições analíticas do perfil cromatográfico.....	68
5.5. Validação do método analítico para o perfil cromatográfico de espécies de <i>Phyllanthus</i>	73
5.6. Análise dos extratos obtidos com amostras cultivadas em São Carlos.....	77
5.6.1. Amostras coletadas em janeiro de 2007.....	77
5.6.2. Amostras coletadas em abril e em outubro de 2007.....	79

5.7. Análise de amostras coletadas em municípios do estado de São Paulo	81
5.8. Análise de amostras comerciais.....	82
5.9. Análises Quimiométricas.....	85
5.9.1. Organização e pré-tratamento dos dados.....	85
5.9.1.1. Alinhamento dos perfis cromatográficos.....	86
5.9.2. Análise Exploratória das amostras padrão cultivadas.....	87
5.9.2.1. Análise de Componentes Principais (PCA)	89
5.9.2.2. Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA)	91
5.9.3. Modelos de Classificação	94
5.9.3.1. KNN (<i>Kth Nearest Neighbor</i>)	94
5.9.3.2. SIMCA (<i>Soft Modelling Independent of Classe Analogy</i>)	95
5.9.3.3. PLS-DA (<i>Partial Least Square for Discriminant Analysis</i>).....	96
5.9.4. Análise de amostras não cultivadas.....	98
5.9.5. Análise de amostras comerciais.....	101
5.10. Purificação, isolamento e caracterização de marcador químico.....	105
5.10.1. Caracterização espectroscópica da fração 1	108
5.11. Quantificação do marcador químico corilagina.....	111
5.11.1. Condições cromatográficas de análise	111
5.11.2. Validação do método	112
5.11.3. Aplicação do método.....	117
5.11.3.1. Amostras cultivadas	117
5.11.3.2. Amostras não cultivadas de <i>Phyllanthus tenellus</i>	119
5.11.3.3. Amostras comerciais.....	121
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	123
6.1. Materiais e Equipamentos	124
6.2. Cultivo, coleta e processamento de amostras vegetais	125
6.2.1. Amostras cultivadas no CPQBA/UNICAMP	125
6.2.2. Amostras cultivadas na UFSCar	126
6.2.2.1. Cultivo de espécies de <i>Phyllanthus</i>	126
6.2.2.2. Coletas e processamento de amostras	127
6.2.3. Coleta de amostras não cultivadas de <i>Phyllanthus</i>	128
6.2.4. Obtenção e processamento de amostras comerciais	128
6.3. Preparo dos Extratos Aquosos.....	129

6.4. Condições analíticas para o perfil cromatográfico de extratos de espécies de <i>Phyllanthus</i> e de amostras comerciais de “quebra-pedra”	130
6.5. Isolamento e caracterização do corilagina	130
6.6. Quantificação de corilagina em extratos de amostras cultivadas e não cultivadas de <i>Phyllanthus</i> e em amostras comerciais de “quebra-pedra”	131
6.6.1. Condições analíticas do método quantitativo	131
6.6.2. Preparo das soluções estoque, padrões de calibração e amostras controle de qualidade.....	132
6.6.3. Limites de Quantificação e de Detecção.....	133
6.6.4. Preparo de amostras para aplicação do método.....	134
CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
ANEXO 1:.....	151

RESUMO

PERFIL CROMATOGRÁFICO E ANÁLISE MULTIVARIADA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE AMOSTRAS COMERCIAIS DO GÊNERO *PHYLLANTHUS* (QUEBRA-PEDRA). O presente trabalho apresenta o desenvolvimento e aplicação de métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para o controle de qualidade de amostras vegetais conhecidas como “quebra-pedra”, que correspondem a espécies do gênero *Phyllanthus*, duas delas inscritas na Farmacopéia Brasileira: *P. niruri* L. e *P. tenellus* Roxb. Um método analítico de perfil cromatográfico foi desenvolvido e validado, utilizando CLAE com detecção por arranjo de diodos (DAD), para a análise de extratos aquosos de amostras autênticas de *Phyllanthus*, que consistiram de seis espécies cultivadas sob condições controladas, em dois diferentes locais (Campinas e São Carlos/SP, Brasil) e também de amostras não cultivadas, coletadas em 27 municípios do estado de São Paulo. Para a interpretação das informações cromatográficas, métodos quimiométricos de análise exploratória foram utilizados: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). Modelos quimiométricos de classificação (SIMCA, KNN e PLS-DA) foram elaborados e validados e demonstraram que as espécies de *Phyllanthus* podem ser diferenciadas entre si através de seus perfis cromatográficos e análise multivariada. O método cromatográfico foi aplicado na análise de 25 amostras comerciais de “quebra-pedra” e sua autenticidade foi determinada através dos modelos de classificação: os resultados demonstraram que a maior parte dos produtos é produzida com a espécie *P. tenellus*, embora sejam comercializados como *P. niruri*; para duas amostras foi determinada adulteração, uma vez que não foram classificadas como nenhuma espécie de *Phyllanthus*. Utilizando CLAE-UV semi-preparativa, um marcador químico foi purificado a partir do extrato aquoso bruto da espécie *P. niruri*; a caracterização espectroscópica determinou sua estrutura como sendo a corilagina, um tanino hidrolisável. Um método analítico por CLAE-UV foi desenvolvido e validado para a quantificação desse marcador em extratos de espécies de *Phyllanthus* e em amostras comerciais de “quebra-pedra”. Para as amostras cultivadas, verificou-se significativa variabilidade na concentração de corilagina em função do local de cultivo e da época do ano; entre as amostras não-cultivadas de *P. tenellus*, houve grandes diferenças na concentração do marcador, resultado da influência de diferentes *habitats* no metabolismo secundário do vegetal. A quantificação de corilagina, portanto, não se mostrou viável na determinação da autenticidade/qualidade de amostras comerciais, porém pode ser utilizada no monitoramento de espécies cultivadas de *Phyllanthus*. Em duas amostras comerciais o marcador não foi detectado, o que as caracterizou como amostras adulteradas de “quebra-pedra”.

ABSTRACT

CHROMATOGRAPHIC PROFILE AND MULTIVARIATED ANALYSIS TO QUALITY CONTROL OF COMMERCIAL SAMPLES OF THE *PHYLLANTHUS* GENUS (STONE BREAKER). This work present the development and application of methods by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to the quality control of vegetable samples known as “stone breaker”, that correspond to *Phyllanthus* species, two of them entered in Brazilian Pharmacopoeia: *P. niruri* L. and *P. tenellus* Roxb. A chromatographic profile analytical method was developed and validated, using HPLC with diode array detection (DAD), for the analysis of aqueous extracts of *Phyllanthus* authentic samples, which consisted of six species grown under controlled conditions in two different sites (Campinas and São Carlos, Brazil) and also not cultivated samples, collected in 27 cities of São Paulo state. Chemometric methods of exploratory analysis were used to interpret the chromatographic informations, such as Principal Component Analysis (PCA) and Hierarquical Cluster Analysis (HCA). Classification models (SIMCA, KNN e PLS-DA) were developed and validated and demonstrated that the *Phyllanthus* species can be differentiated from each other through their chromatographic profiles and multivariate analysis. The chromatographic method was applied in the analysis of 25 “stone breaker” commercial samples and their authenticity was determined by the classification models: the results showed that most products are produced with the *P. tenellus* species, although they are marketed as *P. niruri*; two samples was determined as adulteration since they were not classified as any *Phyllanthus* species. A chemical marker was purified by semi-preparative HPLC-UV from the crude aqueous extract of *P. niruri* specie; spectroscopy characterization determined its structure as corilagin, an hydrolysable tannin. An analytical method by HPLC-UV was developed and validated for quantification of this marker in extracts of *Phyllanthus* species and “stone breaker” commercial samples. For the cultivated samples, there was significant variability in the concentration of corilagin according to the place of cultivation and the time of year; among the non-cultivated *P. tenellus* samples, there was large differences in the marker concentration, result of the influence of different habitats in secondary metabolism of the plant. The corilagin quantification therefore was not feasible to determine the authenticity/quality of commercial samples, but can be used in the monitoring of *Phyllanthus* cultivated species. In two commercial samples the marker was not detected, which characterized as adulterated samples of “stone breaker”.

GLOSSÁRIO

Tendo em vista que o presente trabalho está inserido no campo de medicamentos fitoterápicos e correlatos e que, nessa área do conhecimento, muitas vezes as terminologias utilizadas na literatura apresentam-se por vezes com significados confusos para o leitor, faz-se necessário esclarecer, antes da elaboração textual propriamente dita, o significado dos termos que serão citados, abordados e discutidos, dentro do contexto que envolve a terapia com plantas medicinais. A definição dos termos abaixo foi baseada na Resolução RDC nº48, publicada pela Agência de Vigilância Sanitária, em 2004¹.

Fitoterápico – consiste de todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, sendo caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso (que pode ser profilático ou terapêutico), assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Portanto, faz-se necessário definir também o que não é considerado fitoterápico:

- planta medicinal ou suas partes, mesmo após processos de coleta, estabilização e secagem, seja ela íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada;
- qualquer medicamento que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, ou associações destas com extratos vegetais;
- chás e medicamentos homeopáticos.

Na literatura estrangeira, correspondem a essa definição de fitoterápicos os seguintes termos: *herbal drugs*, *herbal medicines*, *medicinals & botanicals*, *botanical drugs*, *herbal medicinal products*, dentre outros.

Matéria-prima vegetal - planta medicinal fresca, droga vegetal ou derivado de droga vegetal.

Droga vegetal - planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.

Derivado de droga vegetal - produtos de extração da matéria-prima vegetal: extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros.

Marcador - substância ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, taninos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo ou que, preferencialmente, tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado

como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

Princípio ativo de medicamento fitoterápico – substância ou classe química (ex: alcalóides, saponinas, etc.), cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do medicamento fitoterápico.

Fitofármaco² – substância química com atividade terapêutica, que tenha sido isolada de droga vegetal ou de seus derivados, utilizada diretamente como fármaco em um medicamento; pode ser alterada por semi-síntese com a finalidade de otimizar algumas propriedades, tais como: potência, toxicidade, solubilidade, ou ainda ser utilizada como modelo para a síntese de novos fármacos.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um expressivo crescimento no interesse por fármacos derivados de plantas superiores e também na procura por alternativas terapêuticas, como os fitoterápicos³⁻⁶. Estima-se que os produtos naturais estejam envolvidos em 44% do desenvolvimento de todo arsenal terapêutico atual como fonte de novos fármacos e que, em países industrializados, 25% dos medicamentos prescritos sejam oriundos de plantas superiores⁷.

Em países subdesenvolvidos (p.ex. Etiópia, Benin, Índia, Ruanda), o uso de medicamentos tradicionais constitui a única alternativa terapêutica e são, majoritariamente, constituídos de plantas medicinais. Porém, mesmo em países desenvolvidos, como Alemanha, Canadá, França e Estados Unidos, o uso de terapias naturais tem crescido significativamente. Estima-se que, na Alemanha, 80% da população façam uso de alguma terapia alternativa ou complementar, dentre as quais se destaca o uso de plantas medicinais para essa finalidade⁸.

No Brasil, embora o mercado farmacêutico esteja entre os maiores do mundo, o consumo de medicamentos é desigual. Segundo o Ministério da Saúde, 15% da população (classes A e B) consomem 48% da produção de medicamentos do país e somente 40% da população possuem condições financeiras para adquirir medicamentos⁹. Nesse contexto social, os fitoterápicos e as plantas medicinais adquirem importância ímpar na saúde pública brasileira, no entanto, muitas vezes os mesmos são utilizados indiscriminadamente, sem qualquer controle de qualidade e/ou orientação médica¹⁰.

Dentre os fatores que propiciaram o expressivo crescimento do setor farmacêutico de fitoterápicos, bem como o interesse da população por eles, vale destacar: preferência por tratamentos preventivos e terapias naturais, principalmente com relação a doenças degenerativas e crônicas, que afetam o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular; preocupação com os efeitos colaterais, freqüentemente observados com o uso de medicamentos sintéticos, associada à crença de que os fitomedicamentos não os possuem; tendência à automedicação; maior volume e divulgação de estudos científicos que comprovam a eficácia clínica e a segurança de algumas espécies vegetais; e menores custos para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos¹¹.

Tendo como base o cenário internacional, a ampla aceitação pela população e a promissora biodiversidade brasileira, a indústria farmacêutica nacional aplicou-se, nos últimos anos, ao desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos. Em 2006, o mercado de indústrias de fitoterápicos no Brasil já havia crescido significativamente, apresentando um total de 103 laboratórios, com a comercialização de 367 medicamentos fitoterápicos referentes a 53 classes terapêuticas. Em termos financeiros, entre 2003 e 2006, o faturamento obtido no setor foi de R\$ 1,8 bilhão e, em média, tem apresentado crescimento na ordem de 10% ao ano^{12,13}.

Acompanhando o processo de crescimento do setor industrial de fitoterápicos, ações governamentais surgiram para regulamentar e fomentar seu desenvolvimento, como a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2006)¹⁴. Com relação ao registro e comercialização, há cinco resoluções específicas: a RDC 48, complementada pelas RE 88, 89, 90 e 91, todas publicadas em 2004^{1,15-18}. Os aspectos abordados pelas legislações em vigor são: a normatização da produção e da comercialização; estudos de eficácia pré-clínica e clínica; estudos toxicológicos; normas para o controle de qualidade de drogas vegetais, seus derivados e também para o produto acabado.

Considerando a necessidade de ampliar as opções terapêuticas para a população, a indiscutível disponibilidade de plantas medicinais do país e o surgimento de políticas específicas para a área de fitoterápicos, dentre outros fatores, possivelmente nos próximos anos haverá uma grande inovação no setor de produção de fitomedicamentos no Brasil. Para isso, devem ser considerados, criteriosamente, fatores relacionados à eficácia, segurança e qualidade desses medicamentos².

A eficácia diz respeito à comprovação dos efeitos biológicos atribuídos a um determinado recurso terapêutico, através de estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos¹⁹. A segurança é verificada por ensaios que avaliam possíveis efeitos tóxicos e adversos, além de estudos que determinam a presença de contaminantes nocivos à saúde, como elementos tóxicos, pesticidas, microorganismos patogênicos, produtos de degradação, dentre outros²⁰.

Para garantir a uniformidade de diferentes lotes de medicamentos e, conseqüentemente, a reprodutibilidade na eficácia, segurança e qualidade farmacêutica, faz-se necessário um controle criterioso de todas as etapas do

processo de produção. Sendo assim, os parâmetros de qualidade da matéria-prima vegetal devem ser rigorosamente estabelecidos, bem como devem ser padronizados os procedimentos de preparo dos extratos (derivados de droga vegetal), a fim de se obter produtos com consistência em termos de composição química¹¹.

Além da padronização na produção de fitomedicamentos, é de grande importância a utilização de técnicas químicas de análise, que permitam avaliar a qualidade dos produtos de origem vegetal de forma adequada, considerando sua complexidade e todos os fatores inerentes aos fitomedicamentos²¹. Neste contexto, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento, validação e aplicação de métodos analíticos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência selecionando-se, para isso, uma das plantas medicinais mais amplamente conhecida, divulgada e utilizada no Brasil: o “quebra-pedra”.

Em uma primeira abordagem, o presente trabalho descreve as condições analíticas para a purificação de marcador químico e sua quantificação em amostras autênticas e em produtos comerciais, explorando as potencialidades da técnica cromatográfica e investigando as possibilidades de aplicação da quantificação na padronização química de espécies e no estabelecimento de parâmetros de qualidade.

O trabalho também descreve as condições para a análise do perfil cromatográfico de extratos, associado à interpretação dos dados por meio de métodos quimiométricos. Desta forma, buscou-se o desenvolvimento de uma estratégia inovadora, que possibilite a análise da complexidade química peculiar às amostras vegetais de forma eficiente, e que seja aplicável na avaliação da autenticidade/qualidade de matérias-primas vegetais, produtos comerciais e na padronização de extratos.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

2.1. Controle Químico de Qualidade de Amostras Vegetais para fins Terapêuticos

A qualidade das matérias-primas vegetais, de seus derivados e dos fitoterápicos é verificada através de procedimentos de análises químicas, físicas, físico-químicas e microbiológicas, seguindo parâmetros de qualidade estabelecidos em farmacopéias nacionais e internacionais, códigos oficiais e monografias elaboradas por órgãos internacionalmente reconhecidos, como as publicadas pela Organização Mundial de Saúde, União Européia, dentre outros²²⁻²⁵.

Os parâmetros de qualidade das matérias-primas vegetais, principalmente com relação à composição química, podem variar em decorrência de diversos fatores, tais como: procedência do material vegetal, condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes do solo, uso de defensivos agrícolas e métodos de coleta, secagem e armazenamento (temperatura, umidade, luminosidade), dentre outros^{20,26}.

Atualmente, os avanços em pesquisa e tecnologia têm tornado possível o controle de muitas variáveis através, por exemplo, do cultivo de plantas medicinais em larga escala, que permite selecionar espécies com maior teor de princípios ativos, evitar a contaminação por elementos tóxicos e defensivos agrícolas inadequados, além de tornar possível o monitoramento de fatores inerentes ao desenvolvimento vegetal e que podem afetar o valor terapêutico dos preparados fitoterápicos^{7,27,28}.

Além da ampla variabilidade inerente aos vegetais, é importante considerar que as plantas constituem misturas complexas de várias substâncias químicas cuja atividade biológica pode, em muitos casos, ser atribuída aos efeitos sinérgicos das mesmas^{21,29}. Além disso, muitas vezes os princípios ativos responsáveis pela atividade farmacológica não estão suficientemente estabelecidos⁷. Desta forma, o controle de qualidade, a padronização e a determinação da estabilidade de fitoterápicos se tornam tarefas bastante complexas.

Convencionalmente, um dos primeiros e imprescindíveis passos para o controle de qualidade é a verificação da autenticidade da matéria-prima vegetal, que pode ser feita através da identificação botânica (análise macro e microscópica) e

através de métodos químicos, baseados na presença de substâncias que, preferencialmente, possuam relação com a atividade terapêutica e/ou com a identificação das espécies, os chamados marcadores químicos e/ou quimiotaxonômicos.

Os métodos químicos clássicos correspondem às reações de caracterização, que permitem verificar a presença de grupos de substâncias (p. ex. flavonóides, alcalóides, taninos) de forma simples, fácil e com baixo custo, porém apresentam o inconveniente de serem pouco sensíveis e inespecíficos, pois várias classes de metabólitos secundários são comuns a diferentes espécies vegetais^{22,30,31}.

As técnicas utilizadas na fitoquímica convencional para o isolamento de marcadores químicos utilizam métodos cromatográficos simples (p. ex. cromatografia em camada delgada preparativa, cromatografia em coluna aberta ou 'flash'), que empregam grandes volumes de solventes orgânicos, consomem muito tempo e minucioso trabalho que, muitas vezes, apresenta-se pouco produtivo, embora ainda sejam bastante utilizados⁴.

Com o avanço das técnicas cromatográficas, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em escala semi ou preparativa, o isolamento de substâncias de matrizes vegetais complexas foi se tornando cada vez mais rápido, eficaz e economicamente viável^{20,32}. Após a purificação, as estruturas químicas dos compostos obtidos são então determinadas a partir de técnicas espectroscópicas usuais: Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massas, Infravermelho, dentre outras. Desta forma, têm sido possíveis inúmeras descobertas de novas substâncias³³, grandes avanços nas pesquisas de atividades biológicas⁴ e no conhecimento quimiotaxonômico de diversas famílias vegetais³⁴.

Atualmente, a identificação estrutural *on line* de substâncias através de técnicas cromatográficas hifenadas, como CLAE-EM e CLAE-RMN, tem sido o foco de muitos pesquisadores em inúmeras aplicações, como estudos metabolômicos e *screening* de extratos sincronizado a testes de atividades biológicas, com desrepliação de extratos de forma rápida e eficiente^{29,35}.

2.1.1. Quantificação de Marcadores Químicos por Métodos Cromatográficos

Normalmente, os diferentes tipos de amostras de origem vegetal (matérias-primas, extratos, fitoterápicos obtidos com apenas uma espécie ou a partir da associação de diferentes plantas) são quimicamente analisados através da identificação e quantificação de marcadores químicos, os quais são utilizados como padrões de referência e cuja concentração está, preferencialmente, associada ao efeito terapêutico pretendido. Muitas vezes, porém, esses padrões não são disponíveis comercialmente e cabe ao analista os procedimentos de purificação, isolamento e caracterização dos mesmos.

A CLAE apresenta diversas vantagens para a quantificação de marcadores químicos em produtos naturais, tais como: eficiência na separação, alta reprodutibilidade, linearidade, automação e habilidade em analisar vários compostos em um único método^{36,37}. A caracterização e quantificação de marcadores químicos em amostras complexas requerem a utilização de técnicas cromatográficas acopladas a detectores apropriados, que aumentem consideravelmente a seletividade e a sensibilidade na análise das substâncias de interesse, tais como o detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetros de massas (EM)^{29,36}. Esses detectores permitem verificar a presença de interferentes na eluição do composto de interesse, além de tornarem possíveis quantificações de substâncias que não apresentam grupos cromóforos (EM), como é o caso de saponinas triterpênicas, dentre outras^{4,38}.

Os métodos de quantificação de marcadores podem ser aplicados para diferentes abordagens, tais como: estudos de variação sazonal em espécies cultivadas; estudos de correlação com atividade biológica e/ou toxicológica; avaliação da variabilidade química de espécies obtidas a partir de regiões geográficas diferentes; padronização de extratos e análise de variações entre lotes na produção de fitomedicamentos. Na literatura, estão disponíveis diversos exemplos de métodos cromatográficos por CLAE para a quantificação de substâncias de referência em amostras vegetais^{37,39-43}.

Muito embora os métodos de quantificação de substâncias marcadoras sejam fundamentais e encontrem inúmeras aplicações científicas e industriais, faz-se necessário considerar que os produtos de origem vegetal constituem matrizes complexas que contêm dezenas de diferentes substâncias, nos quais em geral

nenhum constituinte químico é, isoladamente, o responsável pela atividade biológica ou pela eficácia terapêutica; na verdade, a sua totalidade química pode ser considerada como “princípio ativo”^{21,29,44}.

Além disso, a quantificação de marcadores químicos, muitas vezes, não é suficiente para assegurar a autenticidade de matérias-primas ou garantir a eficácia e segurança dos medicamentos delas derivados, uma vez que muitos metabólitos secundários estão presentes em várias e diferentes espécies⁴⁴. Adicionalmente, a presença concomitante de outros compostos pode envolver efeitos tóxicos indesejáveis e os mesmos não serão detectados em métodos que avaliam a presença de apenas algumas substâncias⁴⁵.

2.1.2. Perfil Cromatográfico de Extratos Vegetais e suas Aplicações em Controle de Qualidade de Fitoterápicos

A utilização de perfis químicos (ou “*fingerprints*”) para análise de extratos vegetais vem sendo utilizado por muitos pesquisadores para diversos estudos com diferentes abordagens, aplicando-se variadas técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas. O uso de métodos cromatográficos hifenados tem-se destacado, pois fornece, ao mesmo tempo, informações analíticas e espectroscópicas importantes para a identificação *on line* das substâncias presentes em diferentes extratos^{21,29}.

O perfil cromatográfico possibilita a representatividade dos múltiplos compostos químicos presentes na amostra em uma única análise, desta forma estabelecendo um parâmetro comparativo para o reconhecimento de semelhanças e diferenças entre extratos submetidos às mesmas condições de extração e análise⁴⁶. Desta maneira, a qualidade química de amostras vegetais pode ser assegurada por uma ferramenta analítica que envolve adequadamente sua complexidade, na qual se pode avaliar não somente a ausência ou presença de marcadores químicos, mas também a proporcionalidade existente entre os analitos detectados.

A partir do padrão de reconhecimento fornecido pela análise de amostras cuja autenticidade, procedência, qualidade e/ou eficácia são previamente conhecidas, diferentes aplicações podem ser consideradas para a análise de amostras de origem vegetal, tais como^{44,47}:

- 1 – determinação de autenticidade e identificação de espécies;

- 2 - avaliação da qualidade química e da fitoequivalência;
- 3 – análise de estabilidade entre diferentes extratos;
- 4 - análise de consistência (variação lote-a-lote) de matérias-primas e de fitoterápicos;
- 5 – estudos de variabilidade sazonal e acompanhamento de cultivares.

Apesar de sua grande versatilidade, a obtenção e análise de perfis cromatográficos confiáveis e que realmente representem os componentes característicos e/ou farmacologicamente ativos do material vegetal não é tarefa fácil ou trivial. Deve-se considerar que muitos compostos químicos presentes nos extratos vegetais não são conhecidos, alguns deles estão em pequenas concentrações e que existem diferentes fontes de variações em função da origem do vegetal.

Um dos aspectos importantes é a escolha do método de extração e preparo de amostras para análise de perfis cromatográficos, uma vez que influenciam sobremaneira a variedade de substâncias que serão analisadas, além de poderem promover a degradação de várias delas^{36,48,49}. Portanto, faz-se necessário desenvolver um método extrativo adequado, que apresente boa reprodutibilidade e que possa ser representativo dos compostos ativos e/ou característicos do vegetal.

Outros fatores importantes a serem considerados são as condições de análise necessárias para uma boa separação cromatográfica, uma vez que várias substâncias estarão presentes na amostra e uma boa seletividade entre elas se faz necessária. Neste caso, a CLAE apresenta a grande vantagem da versatilidade, valendo-se de diferentes modos de separação e, para cada um deles, várias opções de fases móveis que permitem obter excelentes resultados experimentais. Além disso, devem ser utilizados detectores adequados para a obtenção dos dados químicos apropriados, tendo em vista a classe de metabólitos secundários que será analisada.

Para que as informações geradas nos perfis cromatográficos possam ser adequadamente interpretadas, faz-se necessário o uso de ferramentas multivariadas de análise de dados, uma vez que os perfis cromatográficos constituem sistemas complexos, cuja avaliação requer métodos apropriados para

que, através deles, possam ser atribuídos resultados^{21,46}. Para isso, os métodos quimiométricos de análise são imprescindíveis e fornecem, através de um sistema de compressão de dados e de cálculos matemáticos já bastante estabelecidos, a projeção de amostras de forma prática e de fácil interpretação.

2.2. Quebra-pedra: aspectos botânicos, farmacológicos e químicos

2.2.1. Aspectos Botânicos

O gênero *Phyllanthus*, com cerca de 750 espécies, é o maior e mais diversificado da família Euphorbiaceae, subfamília Phyllanthoideae⁵⁰. As espécies distribuem-se, predominantemente, pela região tropical da Ásia, embora cerca de 200 espécies estejam presentes nas Américas, principalmente Brasil e Caribe. As características das espécies são muito variadas, desde árvores de pequeno porte, arbustos e plantas herbáceas, anuais ou perenes, terrestres ou aquáticas. No Brasil, as espécies do gênero *Phyllanthus* são popularmente conhecidas como “quebra-pedra”, em virtude de sua principal aplicação terapêutica, que é o tratamento de cálculos renais.

Os “quebra-pedras” normalmente possuem porte herbáceo, os caules medem de 50 a 60 cm de altura e são delgados, flexíveis; são classificados como semi-perenes, pois vegetam por um período de 3 a 4 anos. As flores femininas apresentam gineceu geralmente formado por carpelos que, alcançando seu pleno desenvolvimento, adquirem aspecto típico de cocos robustos. Os frutos são dotados de três compartimentos, contendo duas sementes em cada, num total de seis sementes⁵¹.

O nome derivado do grego, phyllon (folha) e anthos (flor), é uma alusão à produção de flores nos ramos laterais, as quais se assemelham a folhas compostas. A identificação das espécies é difícil e sujeita a interpretações errôneas, uma vez que o gênero é bastante complexo⁵². As características das flores, apesar de importantes, são de utilização limitada devido ao tamanho reduzido e à pequena variação no número e forma de suas partes. Em geral, a distribuição espacial dos ramos e das flores masculinas e femininas é o aspecto mais utilizado para a identificação das espécies, embora a morfologia das sementes tenha sido o melhor

parâmetro de distinção, uma vez que não existem duas espécies com, precisamente, a mesma combinação de tamanho e padrão de ornamentação⁵⁰.

De acordo com a 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira⁵³, a droga vegetal popularmente conhecida como “quebra-pedra”, “arrebenta-pedra” ou “erva-pombinha” é atribuída às espécies: *P. niruri* (subespécies *P. niruri* ssp. *niruri* L. e *P. niruri* ssp. *lathyroides* (Kunth) G.L. Webster), além da espécie *P. tenellus* Roxb.

A droga vegetal é constituída pelas folhas e ramos secos de ambas as espécies, que apresentam características organolépticas similares, tais como sabor amargo e suave após a mastigação. Quanto à anatomia, também são bastante semelhantes e, de acordo com suas descrições morfológicas, alguns caracteres macroscópicos podem ser usados para distingui-las, tais como formato e tamanho das folhas, coloração do caule e disposição dos frutos. A FIGURA 1 ilustra os aspectos morfológicos das espécies.



FIGURA 1. Quebra-pedra. Espécies *P. niruri* L. (esq.) e *P. tenellus* Roxb. (dir.)⁵⁴

Na TABELA 1 encontram-se as características morfológicas e anatômicas que permitem diferenciar as espécies *P. niruri* L. e *P. tenellus* Roxb.⁵⁵.

TABELA 1. Características morfológicas e anatômicas de diferenciação das espécies oficiais de *Phyllanthus* no Brasil⁵⁵.

Caracteres	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	<i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb.
Morfológicos		
<i>Folha</i>		
Forma	oblonga	elíptica
Ápice	agudo	obtusos
Base	assimétrica	aguda
<i>Estípula</i>		
Número	2 (desiguais)	4 opostas (2+2)
Forma	lanceolada	triangular
Ápice	truncado	arredondado
<i>Flor masculina</i>		
Diâmetro	3,5 mm	1-1,5 mm
Pedúnculo	2-4 mm long.	1 mm long.
Cor	avermelhado	verde
Estames	3	5
Deiscência	transversal	quase horizontal
<i>Flor feminina</i>		
Diâmetro	5 mm	1,1 mm
Pedúnculo	4-5 mm (longitudinal)	até 4 mm (longitudinal)
Cor	avermelhado	verde
Estilete	ereto	aderido ao ovário
<i>Fruto</i>		
Diâmetro	4 mm	2 mm
Altura	1,5-2 mm	1 mm
<i>Semente</i>		
Tamanho	± 1,5 mm (longitudinal) ± 1,5 mm (largura)	±1 mm (longitudinal) < 1 mm (largura)
<i>Pólen</i>	perprolado	esférico
Anatômicos		
<i>Folha</i>	hipoestomática	anfiestomática
<i>Caule</i>		
Colênquima	laminar, 1-estratificado	laminar, 1-2 estratificado
Parênquima	conteúdo lipídico	sem conteúdo evidente
Fibras pericíclicas	paredes celulares finas	paredes celulares grossas
Medula	granulações de amido abundantes	granulações de amido e drusas abundantes

2.2.2. Aplicações terapêuticas e estudos farmacológicos

Muitas espécies do gênero *Phyllanthus*, especialmente *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. corcovadensis*, *P. amarus*, *P. tenellus*, *P. caroliniensis*, *P. fraternus*, *P. stipulatus* e *P. sellowianus* são amplamente empregadas na medicina popular, no Brasil e em muitos outros países, para o tratamento de distúrbios urinários dos rins e

bexiga (infecções urinárias e cálculos renais), diabetes, infecções intestinais e hepatite B⁵⁶. Outras aplicações terapêuticas também relacionadas às espécies de *Phyllanthus* em diversos países estão relacionadas na TABELA 2.

TABELA 2. Aplicações de espécies do gênero *Phyllanthus* na medicina popular.

Espécie	Aplicações terapêuticas	Ref.
<i>P. niruri</i>	icterícia e desordens hepáticas, asma, infecções brônquicas, febre, epilepsia, malária, hipertensão, diarreia, tétano, gonorréia e doenças genitourinárias, diurético	57-70
<i>P. amarus</i>	Icterícia	71
<i>P. sellowianus</i>	Nefrolitíase	72
<i>P. urinaria</i>	icterícia, hepatite, nefrolitíase, desordens dolorosas, diabetes	68,73
<i>P. orbicularis</i>	hepatite	74
<i>P. oxyphyllus</i>	gonorréia, febre, diaforético	75

O uso popular dessas espécies se faz através do consumo de chás obtidos por infusão ou decocção das suas folhas, caules e raízes. No mercado brasileiro, estão disponíveis algumas marcas de chás e também cápsulas produzidas a partir do vegetal seco e triturado, os quais podem ser comprados em farmácias, ervanarias e até pela *internet*⁷⁶⁻⁷⁸. Muitas vezes, porém, o consumo popular se faz através do comércio no mercado informal (mercados municipais, praças e feiras livres) que, em geral, fornece plantas de uso medicinal para a população, baseado no conhecimento transmitido pelas gerações, sem qualquer controle sanitário ou mesmo certificação das espécies.

Recentes estudos farmacológicos têm sido realizados com o intuito de verificar o efeito do Extrato Aquoso de *P. niruri* (EAPn) sobre cálculos renais em ratos e em humanos. Freitas, Schor e Boim⁷⁹ avaliaram o efeito da administração crônica de EAPn em um modelo experimental de urolitíase, induzido pela introdução de pequenos cristais de oxalato de cálcio na bexiga de ratos adultos. Foi verificado que o tratamento com EAPn inibiu o crescimento dos cristais e reduziu o número de cálculos; além disso, em alguns animais tratados, houve a eliminação dos cálculos.

Em outro estudo, pacientes com cálculo renal foram tratados com EAPn (cápsulas de 450 mg contendo 2% do extrato, três vezes ao dia) durante 3 meses e acompanhados através de exames laboratoriais e clínicos. Verificou-se que os pacientes com hipercaleiúria (elevação dos níveis de cálcio na urina) apresentaram redução de cálcio urinário após o período de tratamento⁸⁰.

Barros, Schor e Boim⁸¹ avaliaram o efeito de EAPn sobre o processo de cristalização de oxalato de cálcio *in vitro*, a partir de amostras de urina de ratos e de humanos. Observou-se que o EAPn não inibiu a precipitação de oxalato de cálcio da urina, embora os cristais obtidos de amostras de urina tratada com EAPn foi significativamente menor que os do grupo controle, além de ter sido observada redução da agregação dos cristais formados após 24h. Esses dados sugerem que pode haver interferência do extrato de *P. niruri* nas fases iniciais de formação de cálculos (crescimento e agregação de cristais) na urina humana.

Embora ainda sejam necessários outros estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos, os efeitos observados do EAPn são promissores para o desenvolvimento de um fitoterápico no tratamento ou prevenção de reincidência da litíase renal, doença que afeta grande parte da população e cujo tratamento é, na maioria das vezes, apenas sintomático.

2.2.3. Aspectos Químicos de *Phyllanthus*

As espécies do gênero *Phyllanthus* são amplamente distribuídas e largamente utilizadas na medicina popular de diversos países tropicais e subtropicais^{56,61}. Devido a esses fatores, diversos pesquisadores voltaram sua atenção para o isolamento dos constituintes químicos desses vegetais e para a análise de suas atividades biológicas.

Muitas espécies do gênero *Phyllanthus* têm sido investigadas fitoquímica e farmacologicamente e várias novas moléculas têm sido isoladas e identificadas das mesmas, pertencendo a diferentes classes de compostos de interesse medicinal. Todavia, pode-se notar que taninos, lignanas, triterpenos e alcalóides são as classes de compostos mais abundantes nas espécies estudadas. A literatura sobre a abordagem fitoquímica do gênero *Phyllanthus* é exuberante e extensa; o presente trabalho pretende apresentar, de maneira breve, alguns dos trabalhos consultados, com o intuito de apenas fazer-se notar a complexidade química inerente ao assunto.

Dentre todas as espécies, *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. amarus*, *P. sellowianus*, *P. emblica* e *P. flexuosus* foram as que mais receberam atenção quanto à análise fitoquímica. Curiosamente, a espécie *P. tenellus*, incluída na Farmacopéia Brasileira⁵³ como uma das espécies oficiais de “quebra-pedra”, não apresenta um

número considerável de publicações. Em contrapartida, a espécie *P. niruri* é a que mais apresenta estudos relacionados tanto à pesquisa fitoquímica, quanto a diversas atividades biológicas. Na TABELA 3 estão relacionadas as principais substâncias químicas isoladas das espécies oficiais de *Phyllanthus* no Brasil. Nas FIGURAS 2-4 estão representadas as estruturas químicas de algumas substâncias isoladas de *P. niruri*.

TABELA 3. Constituintes químicos isolados das espécies *P. niruri* e *P. tenellus*

Espécie	Classe	Substâncias	Ref.
<i>P. niruri</i>	Alcalóides	4-metoxinorsecurinina, 4-hidroxisecurinina, 4-metoxidihidronorsecurinina, nirurina, ent-norsecurinina	56,59, 67,82
	Flavonóides	quercetina, quercetina-3-O-β-D-glucopiranosil-(2→1)-O-β-D-xilopiranosídeo, rutina, astragalina, quercitrina, isoquercitrina, caempferol-4'-rhamnopiranosídeo, caempferol-3-O-rutinosídeo, eridictiol-7-ramnopiranosídeo, fisetina-4-O-glucosídeo, nirurina	56,60, 66,70
	Lignanas	filantina, hipofilantina, nirantina, nirtetralina, filtetralina, hinokinina, filnirurina, nirfilina, neonirtetralina, isolintetralina	57,69, 83-85
	Esteróides	β-sitosterol	60
	Fenólicos	(-)-epicatequina, (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, ácido gálico, ácido elágico, filangina	61,86
	Taninos hidrolisáveis	geranina, corilaginaa, terquebina, β-glucogalina, 1-O-galoil-6-O-luteoil-α-glucose	60,64
	Triterpenos	lupeol acetato, lupeol, filantenol, filantenona, filanteol	87-89
	Polissacarídeos	arabinogalatana, xilanos	90,91
	Outros	nirurisida, 1,12-diazaciclodocosano-2,11-diona, filester	58,65, 92,93
<i>P. tenellus</i>	Taninos	Pinocembrina	94
	Benzenóides	ácido gálico	30

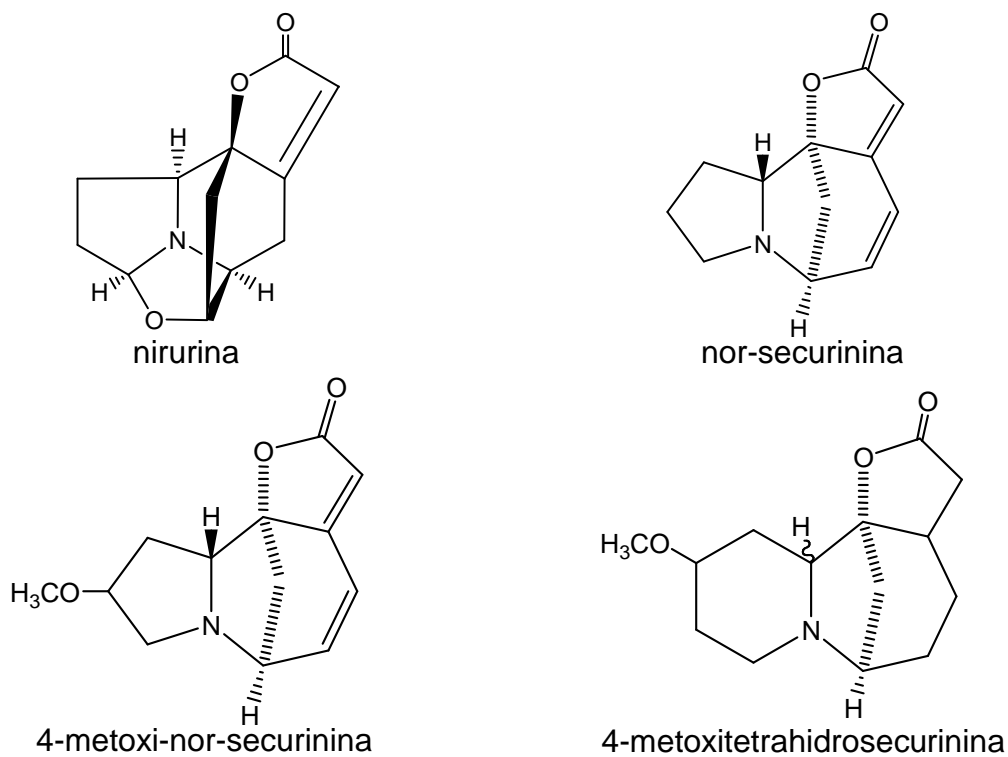


FIGURA 2. Exemplos de alcalóides de *P. niruri*.

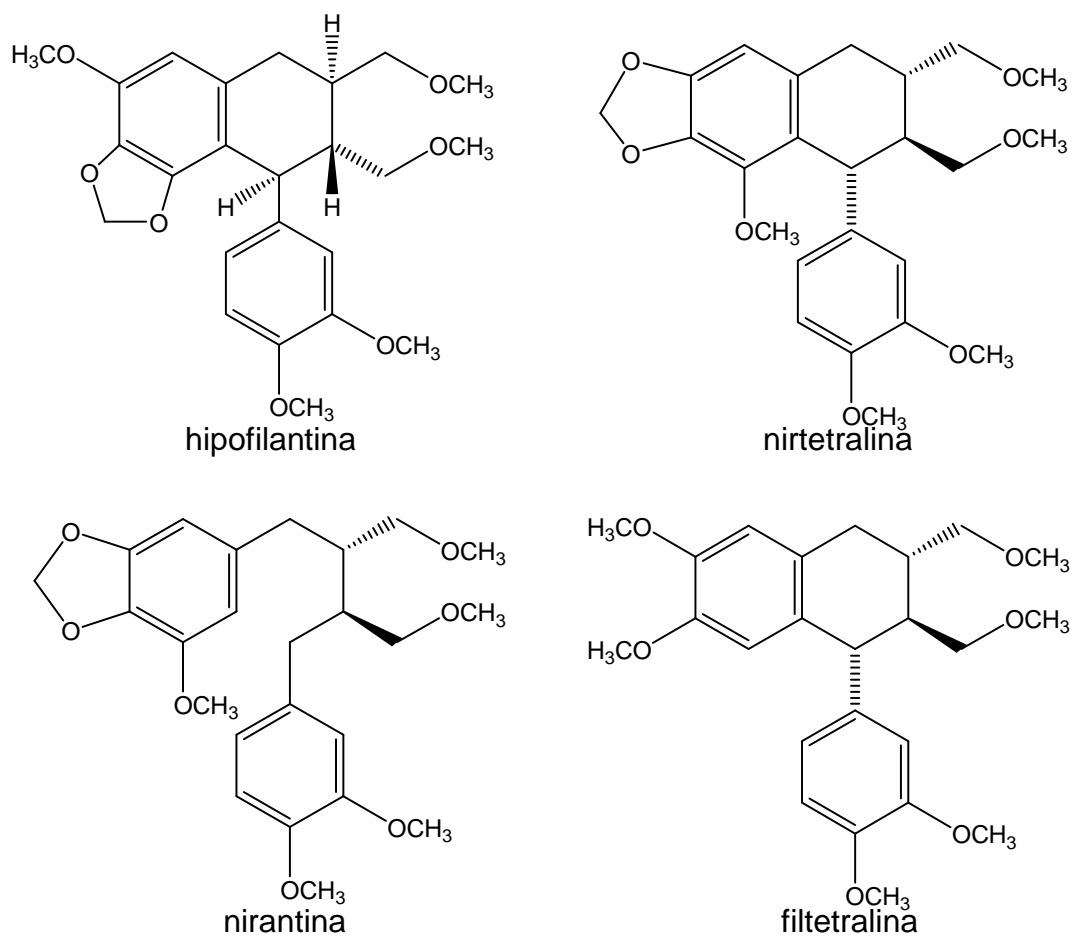
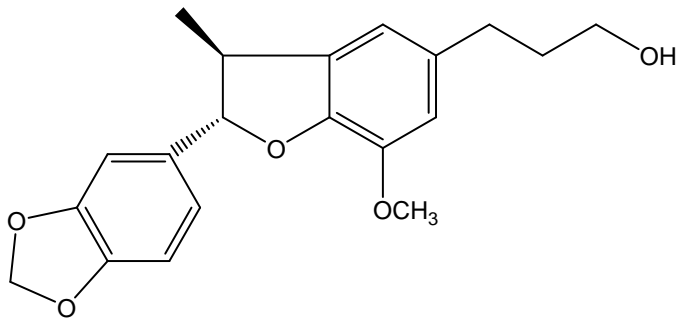
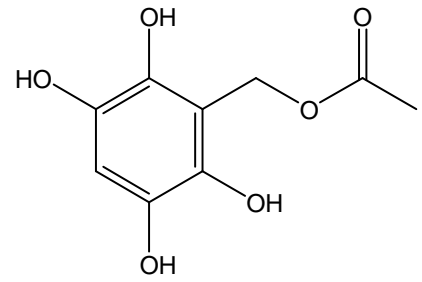


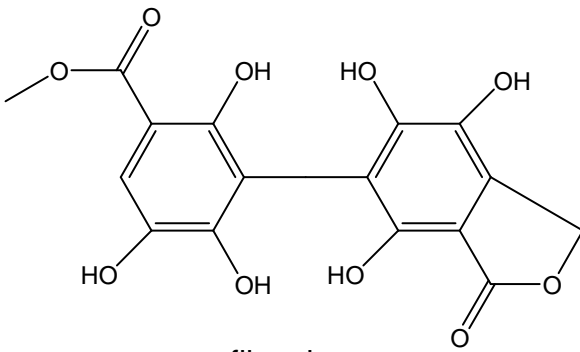
FIGURA 3. Exemplos de lignanas isoladas de *P. niruri*.



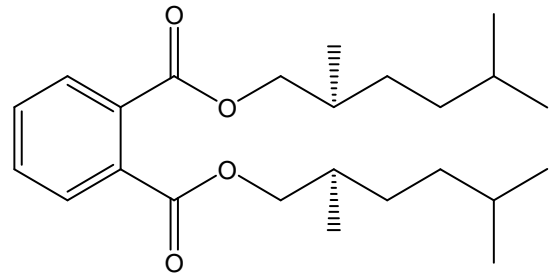
filnirurina



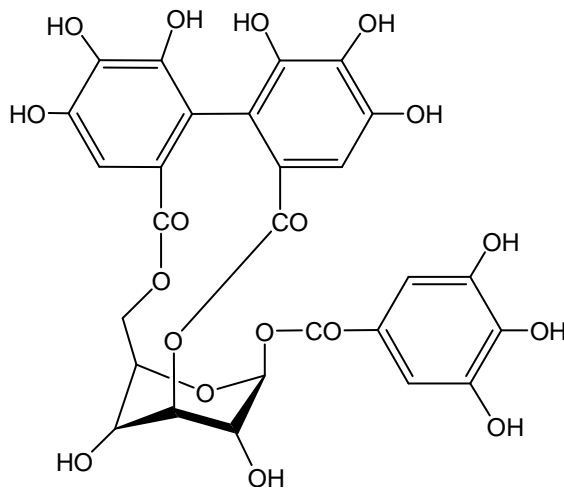
2,3,5,6-tetrahydroxibenzil acetato



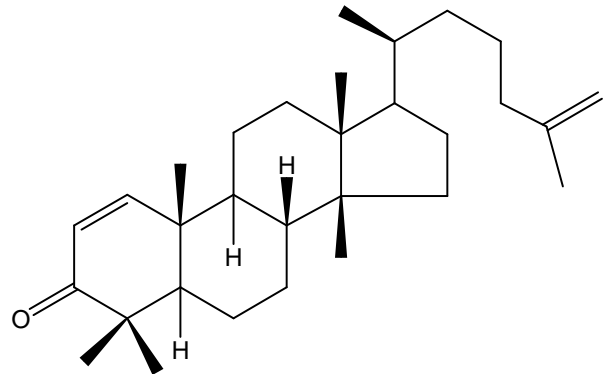
filangina



filester



corilangina



filantenona

FIGURA 4. Outros compostos isolados de *P. niruri*.

2.2.3.1. Controle de Qualidade Químico em Amostras de *Phyllanthus*

De acordo com a Farmacopéia Brasileira⁵³, quimicamente as duas espécies de “quebra-pedra” podem ser distintas entre si através da determinação do teor de taninos totais por técnica colorimétrica (mínimo 6,5% para *P. niruri* e mínimo 9,0% para *P. tenellus*) e da quantificação de ácido gálico por CLAE-UV após hidrólise dos taninos presentes nos extratos (0,15% para *P. niruri* e 0,12% para *P. tenellus*).

Além dos métodos descritos na Farmacopéia, há trabalhos na literatura que relatam a caracterização química, métodos de extração e quantificações de marcadores químicos a partir de extratos de *Phyllanthus*, os quais serão apresentados a seguir.

Em 1983, Bacchi e Oliveira³⁰ descreveram a caracterização química da droga vegetal e do extrato fluido, obtidos a partir de *P. tenellus*, utilizando reações de caracterização para diferentes classes de metabólitos secundários. Foram detectados flavonóides, taninos, alcalóides e baixo teor de óleos essenciais; também foi obtido, utilizando cromatografia em camada delgada preparativa, quantidade significativa de ácido gálico a partir do extrato hidroalcoólico concentrado.

Em 1998, Soares et al.⁹⁵ avaliaram o efeito de diferentes fatores inerentes à extração aquosa de *P. niruri* sobre o teor de flavonóides totais, utilizando planejamento fatorial. Os valores ótimos de extração de flavonóides foram obtidos com a proporção de 7,5% planta/solvente, utilizando o método de decocção durante 15 minutos.

Em 2002, De Souza et al.⁹⁶ publicaram um método de análise para compostos fenólicos em extratos aquosos obtidos a partir das partes aéreas de *P. niruri*. Nesse trabalho, os autores utilizaram CLAE/DAD para quantificar ácido gálico, um de seus derivados e uma flavona (estes últimos não identificados). As substâncias químicas utilizadas como marcadores nesse trabalho foram caracterizadas através da comparação do tempo de retenção e do espectro UV com os obtidos para o ácido gálico (padrão externo, obtido comercialmente) e com dados da literatura. O trabalho demonstrou que maior concentração das substâncias quantificadas estava presente no extrato obtido com apenas as folhas do vegetal.

Mouco et al.³¹ realizaram, em 2003, testes qualitativos (reações químicas de caracterização) para avaliar a presença de classes de metabólitos

secundários em uma amostra comercial de quebra-pedra. Foram detectados os seguintes metabólitos secundários: flavonóides, alcalóides e glicosídeos antraquinônicos. No mesmo ano, Soares et al.⁹⁷ desenvolveram um método para determinar o teor de flavonóides totais em amostras vegetais e extratos aquosos de *P. niruri*, através de reação de complexação com cloreto de alumínio, seguida de análise espectrofotométrica. As análises se mostraram adequadas para o material vegetal, mas apresentaram limitações com relação ao extrato aquoso, devido a desvios de linearidade.

Em 2007, Markom et al.⁴⁸ realizaram um estudo para otimizar a eficiência de extração de taninos hidrolisáveis de *P. niruri*, utilizando diferentes técnicas (extração com soxhlet, fluido super crítico e extração pressurizada com água) e solventes orgânicos e aquosos. O desempenho das extrações foi avaliado pelas concentrações de ácido gálico, ácido elágico e corilaginaa, determinadas por método quantitativo utilizando CLAE-UV. Os resultados demonstraram que melhores rendimentos de extração foram obtidos com solventes aquosos utilizando extração pressurizada, sendo que o extrato aquoso e hidroetanólico (8:2) apresentaram as maiores concentrações das substâncias analisadas.

Murugaiyah e Chan⁴³ desenvolveram um método quantitativo, utilizando CLAE com detecção por fluorescência, para a determinação de quatro lignanas em extratos metanólicos de *P. niruri*. O método foi aplicado para análise de amostras coletadas em diferentes regiões geográficas da Malásia e na análise de extratos obtidos com diferentes partes do vegetal. A lignana filantina foi a mais abundante nas amostras analisadas e as concentrações de lignanas foram maiores nas folhas do que nas outras partes da planta.

Embora existam métodos farmacopeicos e publicações sobre parâmetros quantitativos de marcadores químicos de *Phyllanthus*, ainda se faz necessário o desenvolvimento de métodos que possibilitem a verificação da autenticidade de amostras vegetais de “quebra-pedra” com maior exatidão, tendo em vista que os métodos desenvolvidos não são, por si só, ferramentas capazes de assegurar e diferenciar a identidade dessas espécies.

Diversas atividades biológicas foram estudadas e atribuídas a várias substâncias presentes em espécies de *Phyllanthus*. Porém, os marcadores químicos relacionados aos efeitos observados em cálculos renais ainda não são conhecidos. Considerando que essa é a aplicação terapêutica mais comum para o “quebra-

pedra” no Brasil e que, no país, existem várias espécies morfologicamente muito próximas entre si, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que possam ser aplicados na autenticação dessas espécies, evitando que sejam erroneamente utilizadas.

Tendo em vista que o mercado de fitoterápicos nacional está apto ao desenvolvimento de novas formulações e que o “quebra-pedra” constitui uma das promissoras possibilidades nesse setor, o controle de qualidade químico baseado em estudos sistematizados de espécies de *Phyllanthus* constitui uma importante contribuição para sua industrialização.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

1. Diferenciar espécies de *Phyllanthus* através de perfil cromatográfico e técnicas quimiométricas
2. Desenvolver método quantitativo para marcador químico.

3.2. Específicos

1. Desenvolver e validar um método de perfil cromatográfico (*fingerprint*), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), para caracterização química de espécies de *Phyllanthus*;
2. Utilizar técnicas quimiométricas para análise exploratória dos perfis cromatográficos e elaborar modelos de classificação;
3. Aplicar o método analítico e os modelos quimiométricos para determinar a autenticidade de amostras comerciais de “quebra-pedra”;
4. Purificar marcador químico a partir de extrato bruto de *Phyllanthus* utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala multi-miligrama (CLAE-UV) e caracterizar quimicamente sua estrutura por técnicas espectroscópicas;
5. Desenvolver e validar um método cromatográfico (CLAE-UV) para a quantificação de marcador químico e utilizá-lo em quantificações de amostras de espécies de *Phyllanthus* e em amostras comerciais de “quebra-pedra”.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: eluição gradiente

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência consiste em um método físico-químico de separação, que ocorre através de diferentes interações entre as substâncias presentes em uma mistura e na interface entre dois ambientes químicos imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel. No modo reverso de eluição, a fase estacionária é apolar em relação à fase móvel, que é constituída por misturas aquosas de solventes orgânicos, normalmente acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) ou tetrahidrofurano (THF). O mecanismo básico pelo qual a separação ocorre é a hidrofília, que está relacionada à polaridade e acidez (ou basicidade) dos analitos na amostra. Desta forma, a retenção das substâncias na coluna cromatográfica será diretamente proporcional a sua hidrofobicidade^{98,99}.

A separação cromatográfica pode ser realizada através de eluição isocrática ou gradiente. Entende-se por eluição gradiente a separação cromatográfica na qual a composição da fase móvel é modificada ao longo da análise, de tal forma que a concentração do modificador orgânico, também denominado solvente forte, aumenta com o tempo. Normalmente, a eluição gradiente é feita em sistemas binários (p. ex. água e ACN) e de forma linear, porém outras formas de gradiente são igualmente utilizadas. A eluição isocrática, ao contrário, é aquela na qual a composição da fase móvel se mantém ao longo de toda a separação cromatográfica.

Normalmente, a opção por eluição gradiente é feita quando as substâncias presentes na amostra apresentam substâncias com ampla faixa de retenção. Nestes casos, nenhuma condição isocrática consegue, ao mesmo tempo, oferecer boa resolução, tempo de análise adequado e pequeno alargamento de bandas. As substâncias que eluem rapidamente (hidrofílicas) requerem uma fase móvel fraca e, por outro lado, as substâncias hidrofóbicas são melhor separadas e detectadas com fase móvel mais forte (maior concentração de modificador orgânico). Quando isso acontece, a separação em eluição gradiente é a opção a ser adotada, pois permite uma retenção adequada de todos os compostos de interesse e, conseqüentemente, bandas cromatográficas que podem ser melhor detectadas¹⁰⁰.

A eluição gradiente também é aplicada em outras situações: na análise de macromoléculas, especialmente em matrizes biológicas; em amostras que contém interferentes de eluição tardia, que podem prejudicar a eficiência da coluna ou sobrepor-se a bandas cromatográficas em análises subseqüentes; na análise de soluções diluídas de amostras dissolvidas em um solvente fraco, pois ocorre concentração dos analitos na entrada da coluna e os mesmos eluem à medida que aumenta a força da fase móvel.

Em diversas situações, porém, a eluição isocrática é preferida, em virtude de algumas limitações que a eluição gradiente apresenta, tais como:

- incompatibilidade com alguns detectores (p.ex. índice de refração);
- necessidade de equipamento apropriado;
- tempo de análise normalmente mais longo, devido à necessidade de reequilibrar a coluna a cada injeção;
- desvios de linha de base, principalmente quando a detecção é feita em comprimentos de onda abaixo de 225 nm;
- o desenvolvimento do método é mais complexo e sua transferência é difícil, uma vez que pequenas variações na configuração do equipamento podem causar alterações na separação;
- a composição e miscibilidade da fase móvel precisam ser cuidadosamente avaliadas, assim como sua compatibilidade com a fase estacionária.

Em muitos casos, independentemente da composição da amostra, uma eluição gradiente inicial é o melhor ponto de partida para o desenvolvimento de um método por CLAE, mesmo quando a eluição isocrática será a escolha final, pois permite conhecer a retenção dos compostos presentes na amostra e, a partir dessa informação, encontrar a melhor proporção de modificador orgânico que atenderá os critérios de retenção nas análises posteriores.

Segundo Snyder e Dolan¹⁰¹, uma condição de análise adequada para o gradiente inicial consiste em utilizar coluna de 15 x 0,46 cm de d.i., fase estacionária octil ou octadecilsílica (C₈ ou C₁₈) com partículas de 5µm e fase móvel constituída por água e ACN, com intervalo de 5-100% de ACN em 60 minutos, utilizando vazão de 2 mL/min. A partir dessa análise, podem ser determinadas as próximas condições experimentais para otimização da separação, utilizando os

tempos de retenção da primeira (t_{r1}) e última (t_{rn}) bandas cromatográficas como parâmetros de referência, calculando seu intervalo:

$$\Delta t_r = t_{rn} - t_{r1}$$

Para que uma separação isocrática seja possível, a relação entre $\Delta t_r/t_g$ (t_g = tempo do gradiente) precisa ser menor que 0,4, ou seja, o intervalo de retenção das bandas cromatográficas deverá ser menor que 40% do tempo do gradiente. Snyder, Kirkland e Glajch¹⁰⁰ descreveram em detalhes os intervalos de retenção para a primeira e última banda do gradiente inicial e a possibilidade de separação isocrática, assim como a estimativa da concentração de modificador orgânico para que k (fator de retenção) permaneça entre 0,5 e 20. Da mesma forma, caso a eluição gradiente seja selecionada, fornece o intervalo de concentração inicial e final do modificador orgânico (solvente B) para a eluição de todos os compostos presentes na amostra.

Na eluição gradiente, o valor de k decresce com a migração da banda, à medida que a força da fase móvel aumenta. Efetivamente, o valor de k corresponde à retenção da banda cromatográfica quando a mesma migra a metade do comprimento da coluna, e é representado por k^* . Em uma eluição gradiente linear, o valor de k^* e a largura das bandas cromatográficas serão constantes ao longo de toda a análise.

A relação entre o intervalo de variação da concentração do modificador orgânico ($\Delta\%B$) e o tempo de análise (t_g) corresponde à inclinação do gradiente. Modificações na inclinação do gradiente ($\Delta\% B/\text{min}$) alteram o valor de k^* de forma inversamente proporcional, ou seja, ao diminuí-la, a retenção aumenta (k^*) e, conseqüentemente, melhor resolução entre bandas adjacentes é observada. Entretanto, esse procedimento precisa ser cuidadosamente avaliado, uma vez que promove o alargamento das bandas, diminuindo sua altura e prejudicando a detectabilidade; além disso, o tempo de análise aumenta consideravelmente.

Uma estratégia a ser adotada é encontrar, primeiramente, um valor adequado para k^* , ou seja, o intervalo e inclinação de gradiente que sejam apropriados para atender os critérios de retenção e tempo de análise. Ajustes posteriores podem ser considerados, como o uso de gradientes não-lineares, quando o cromatograma apresenta grande espaçamento entre bandas em algumas regiões, e sobreposições em outras. Entretanto, a utilização de gradientes

“curvados” ou em “degraus” requer diversos experimentos e, muitas vezes, a melhora na resolução é muito pequena e não justifica sua utilização^{100,102}.

Da mesma forma como na eluição isocrática, a otimização da separação dependerá da seletividade do solvente, portanto a substituição do modificador orgânico (ACN, MeOH, THF) ou mesmo a mistura entre eles pode ser avaliada. A seletividade cromatográfica também pode ser modificada com variações na temperatura, controle de pH da fase móvel, ajustes de vazão e tamanho de coluna^{102,103}. Nos casos em que essas estratégias não forem suficientes, a substituição da fase estacionária pode representar uma boa alternativa, tanto com relação ao tamanho de partícula, quanto com relação à natureza da cadeia hidrocarbônica quimicamente ligada à sílica¹⁰⁰.

A utilização de soluções tampão ou reagentes de pareamento iônico na composição da fase móvel em eluição gradiente deve ser criteriosamente avaliada, tendo em vista a baixa solubilidade de alguns tampões em altas concentrações de solvente orgânico e à estabilidade variável dos reagentes em diferentes concentrações de solventes¹⁰⁰.

Ao final do desenvolvimento do método, é importante definir o modo e tempo de reequilíbrio da fase estacionária, que irá determinar o intervalo entre análises. Normalmente, utiliza-se um volume de fase móvel de 5 a 10 vezes o volume interno da coluna. Caso esse intervalo não seja observado, podem ocorrer modificações nos tempos de retenção e na separação das bandas cromatográficas em análises subseqüentes^{104,105}.

4.2. Quimiometria

A Quimiometria pode ser definida como uma área da Química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos, com a finalidade de extrair, a partir de um conjunto de dados, o máximo de informação química relevante. Atualmente, a Quimiometria constitui uma das melhores alternativas para a interpretação de informações químicas em sistemas multivariados, nos quais se podem medir, simultaneamente, muitas variáveis de uma mesma amostra¹⁰⁶.

Através das análises quimiométricas, as amostras podem ser classificadas em categorias conforme suas semelhanças, ou ainda podem ser identificadas variáveis que apresentem algumas propriedades particulares para as amostras de interesse. No presente trabalho, algumas ferramentas quimiométricas são utilizadas com o objetivo de detectar, a partir dos dados cromatográficos, similaridades entre espécies de *Phyllanthus* e entre essas e amostras comerciais de “quebra-pedra”.

Normalmente, iniciam-se as análises do conjunto de dados através de estudos de reconhecimento de padrões não supervisionado (análise exploratória), ou seja, as informações sobre as amostras conhecidas não são consideradas para a execução dos cálculos. A Análise de Componentes Principais (PCA - *Principal Component Analysis*) é um método de “compressão”, que projeta dados multivariados no espaço de menor dimensão (2D ou 3D), possibilitando sua visualização comparativa e melhor interpretação. Já na Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA - *Hierarchical Cluster Analysis*), o principal objetivo é agrupar as amostras de acordo com as semelhanças existentes entre elas, o que revela seu grau de similaridade. Desta forma, são calculadas as distâncias (geralmente Euclidiana) entre as amostras e os resultados são apresentados na forma de um dendrograma, hierarquicamente, formando grupos que são facilmente reconhecidos.

Para que as análises quimiométricas sejam realizadas, é necessária uma organização adequada do conjunto de dados que está sendo estudado. Esses dados são organizados em um único arquivo, compondo uma matriz de valores numéricos, onde cada amostra corresponde a uma linha, cujos elementos são os valores das variáveis medidas. Cada coluna se refere a uma variável independente, ou seja, uma medida realizada para todas as amostras. O resultado é uma matriz $X(N,K)$, com um total de N linhas (amostras) e K colunas (variáveis que, em

cromatografia, correspondem aos tempos de retenção), cujos valores x_{ij} são as respostas para as variáveis $j = 1, 2, 3, \dots, K$, referentes à amostra i . Assim, obtém-se uma matriz com as seguintes características:

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & \dots & x_{1K} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & \dots & x_{2K} \\ \vdots & \vdots & \ddots & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \ddots & \vdots \\ x_{M1} & x_{M2} & \dots & \dots & x_{MK} \end{pmatrix}$$

Pré-tratamento e pré-processamento dos dados

O objetivo de fazer pré-tratamento dos dados é remover, matematicamente, fontes de variação indesejáveis. Essas variações podem ser aleatórias (ruídos experimentais), ou sistemáticas (p. ex., desvios de linha de base), e precisam ser minimizadas. No caso de dados cromatográficos, a principal variação experimental indesejável é o desalinhamento de bandas cromatográficas, que será discutida mais adiante.

Existem dois tipos de pré-tratamento dos dados: as transformações, que são aplicadas às amostras (linhas da matriz \mathbf{X}) e os pré-processamentos, que são aplicados às variáveis (colunas da matriz \mathbf{X}). Aplicam-se técnicas de transformação para minimizar ou eliminar variações aleatórias e sistemáticas, (p. ex.: alisamento, correções de linha de base, alinhamento) ou para uniformizar o conjunto de dados, tais como: uso de logaritmo, normalizações, correção multiplicativa de sinal, transformada de Fourier, aplicação de derivadas, etc.

Os pré-processamentos mais comumente usados são: centragem dos dados na média e autoescalamamento. Ao centrar os dados na média, subtrai-se o valor de cada variável de sua média, obtida a partir de todas as amostras. Desta forma, a média das variáveis pré-processadas será igual a zero. No autoescalamamento, o valor de cada variável é subtraído de sua média e, então, dividido pelo desvio padrão; a média será igual a zero e o desvio padrão será igual a 1. A centragem na média é muito utilizada em dados espectroscópicos (p. ex.: infravermelho ou ultravioleta), enquanto que o autoescalamamento é usado quando se quer atribuir a mesma importância a todas as variáveis¹⁰⁷.

Alinhamento de dados cromatográficos

A ocorrência de desvios instrumentais em análises químicas é um fenômeno bastante comum e, no caso de sistemas multivariados que são analisados por métodos quimométricos, esses desvios precisam ser corrigidos antes das análises exploratórias propriamente ditas. Em cromatografia, o principal problema encontrado na análise de perfis cromatográficos é a ocorrência de desalinhamento de bandas, ocasionado por diversos fatores, tais como^{21,108}: pequenas alterações na composição da fase móvel, perda de desempenho da coluna cromatográfica, alterações instrumentais (oscilações de vazão e pressão), desalinhamento do monocromador em detectores, etc.

Diversos trabalhos têm sido publicados na literatura, abordando diferentes técnicas de alinhamento de dados cromatográficos^{46,109}: *Dynamic time warping*¹¹⁰ (DTW), *Parametric time warping*¹¹¹ (PTW), *Correlation Optimized Warping*¹⁰⁸ (COW), *Target Peak Alignment*¹¹² (TPA), dentre outros.

Uma opção de alinhamento bastante aceita e discutida na literatura é o uso do algoritmo *Correlation Optimized Warping* (COW), desenvolvido em 1998¹⁰⁸. Esse método utiliza uma programação dinâmica para estimar valores ótimos de estiramento e compressão dos dados, sendo aplicado a partir da escolha de uma amostra padrão, denominada “amostra vetor de referência”. Apresenta as vantagens de preservar as áreas e os formatos das bandas cromatográficas, sendo considerada atualmente a técnica mais apropriada para tal finalidade¹¹³. Os parâmetros utilizados para o alinhamento são definidos pelo usuário, na tentativa de estabelecer o melhor tamanho e número de “segmentos” no cromatograma, a partir do qual todo o alinhamento será processado; esses parâmetros são:

m – (“*segment length*”) representa o tamanho dos segmentos, que irão dividir as variáveis no eixo do tempo e serão alinhados por compressão e estiramento;

t – (“*slack size*”) valor que determina o grau de “flexibilidade” aceitável para que as bandas cromatográficas possam ser ajustadas nos tempos de retenção.

O ajuste dos parâmetros \underline{m} e \underline{t} é feito normalmente de forma experimental, e seus valores são selecionados por inspeção visual dos perfis cromatográficos após o alinhamento, não havendo um padrão pré-definido para usá-

los, ou seja, a otimização das condições de alinhamento é demorada e, muitas vezes, não completamente efetiva.

Em virtude disso, Skov et al.¹¹³ propuseram uma forma de otimização desses parâmetros, que envolve a escolha da melhor amostra de referência (a partir da qual os demais cromatogramas serão alinhados), além de valores adequados para \underline{m} e \underline{t} . Essa otimização é acompanhada por gráficos de superfície de resposta denominados *simplicity*, *peak factor* e *warping effect*. Em *simplicity*, avalia-se a qualidade do alinhamento e em *peak factor*, a distorção das bandas cromatográficas. A combinação de ambos corresponde ao *warping effect*, que indica a melhor combinação de \underline{m} e \underline{t} capaz de realizar o alinhamento preservando as características originais dos dados. A partir dos valores otimizados de \underline{m} e \underline{t} , pode-se realizar o alinhamento COW do conjunto de dados¹¹⁴.

Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA é um método de projeção de dados multivariados em espaço de dimensões menores, através do cálculo de novos eixos ortogonais entre si (PC's) e que são altamente não correlacionados. A redução da dimensionalidade do conjunto de dados originais é feita de forma a preservar a maior quantidade de informação (variância) possível.

Assim, uma dada matriz \mathbf{X} (N, K) é decomposta em duas matrizes¹¹⁵, uma de *scores* (\mathbf{T}) e outra de *loadings* (\mathbf{P}) (FIGURA 5), de tal forma que:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T$$

Os *scores* são as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos e os *loadings* correspondem aos pesos ou importância das variáveis. O número de colunas na matriz dos *scores* (\mathbf{T}) será igual ao número de linhas dos *loadings* (\mathbf{P}), e corresponde à quantidade de Componentes Principais (PC's) necessárias para descrever as informações mais relevantes do conjunto de dados. A projeção gráfica das amostras pelos *scores* utiliza as PC's, que apresentam ordem decrescente de variância.

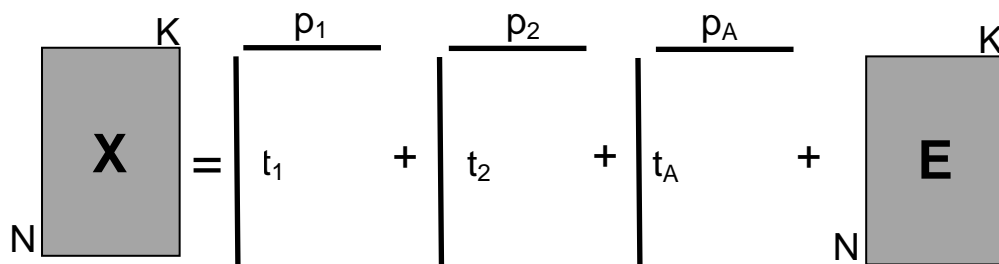


FIGURA 5. Decomposição da matriz original **X** (N linhas e K colunas) em vetores de scores (t_i) e loadings (p_i) e uma matriz de erros **E**.

Há diferentes maneiras de calcular os *scores* e os *loadings*: através da decomposição de valores singulares (SVD, *Singular Value Decomposition*), da diagonalização da matriz de correlação e através do algoritmo NIPALS (*Non Linear Iterative Partial Least-Square*). O algoritmo NIPALS, utilizado no presente trabalho, calcula os vetores dos *loadings* (**P**) e dos *scores* (**T**) iterativamente, iniciando com uma estimativa dos *scores* através da coluna, na matriz **X**, que contém a maior variância. Usando estes valores, calcula-se o autovalor da componente principal e, então, podem-se calcular os *loadings* que serão usados para estimar novos *scores*, e o processo continua até a convergência dos autovalores.

Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA)

É um método de reconhecimento não supervisionado de padrões, que representa os dados multidimensionais em um gráfico bidimensional (dendrograma), utilizando uma técnica aglomerativa^{107,116}: considera inicialmente cada amostra como um grupo unitário, e faz agrupamentos sistematicamente, por ordem de similaridade. Calcula a distância Euclidiana entre as amostras, utilizando uma variável de cada vez (ou duas a duas), de acordo com o método de agrupamento escolhido:

A – método simples ou do vizinho mais próximo: define a distância entre dois grupos pela distância mínima entre duas amostras

B – método completo ou do vizinho mais distante

C – método da média

D – método centróide: utiliza o centro de cada grupo para representá-lo como um todo

E – método do Ward ou incremental: calcula a soma dos quadrados das distâncias da amostra central média de cada grupo.

As análises PCA e HCA constituem métodos exploratórios, nos quais é possível: identificar agrupamentos e tendências entre as amostras; verificar as variáveis que contém as informações mais importantes e investigar a correlação entre elas; fazer a compressão de dados e detectar amostras anômalas. A partir da análise exploratória, podem-se elaborar modelos de regressão ou de classificação para as amostras analisadas, dependendo do objetivo do estudo. No presente trabalho, serão utilizados métodos de classificação para a construção de modelos e previsão de amostras desconhecidas.

Métodos de Classificação: SIMCA, KNN e PLS-DA

Os métodos quimiométricos de classificação são também conhecidos como métodos de reconhecimento supervisionado de padrões, e são utilizados para comparar amostras entre si. Baseiam-se no pressuposto de que a técnica utilizada para caracterizar as amostras é adequada para refletir as semelhanças e diferenças entre as elas. Assim, utilizando o conjunto de dados onde se conhece a classe das amostras (conjunto de calibração), pode-se construir um modelo no qual as amostras conhecidas supervisionarão a classificação das amostras desconhecidas.

O método SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*) é classificado como uma técnica paramétrica, pois considera que as variáveis tenham distribuição normal e uniforme. Cada classe do conjunto de amostras conhecidas é submetida a uma análise de componentes principais; determina-se o número de Componentes Principais (PC's) necessário para descrever cada classe e constrói-se uma hipercaixa, envolvendo as amostras de cada classe, na qual os limites são definidos com um intervalo de confiança. O poder de discriminação em das classes é dado pela distância e pelos resíduos entre elas.

Na previsão de uma amostra desconhecida, a atribuição de classe é baseada na projeção dessa amostra no espaço dos *scores* e sua distância com relação às classes modeladas. Se os modelos não tiverem poder de discriminação suficiente, a amostra a ser testada poderá ser classificada em mais de uma classe simultaneamente. Quando a amostra é muito diferente do conjunto de calibração, poderá não pertencer a nenhuma das classes previamente modelada.

No método KNN (*Kth Nearest Neighbor*), calcula-se a distância entre uma amostra desconhecida e as amostras do conjunto de calibração. A atribuição a

uma classe é feita utilizando a menor distância como critério, baseada no número de vizinhos mais próximos. Apesar de ser computacionalmente muito simples, apresenta a desvantagem de ser incapaz de detectar amostras anômalas (suficientemente diferentes do conjunto de calibração), inevitavelmente alocando-as em uma das classes modeladas; além disso, não possibilita estimar o intervalo de confiança no resultado da classificação. Na maioria das vezes, é utilizada em conjunto com outros métodos, para que seus resultados sejam comparados¹⁰⁷.

Outro importante método de classificação é o PLS-DA (*Partial Least Square for Discriminant Analysis*), no qual é feita a decomposição dos valores das variáveis independentes (matriz **X**) e também das variáveis dependentes (**Y**), que corresponde à atribuição de cada classe, e encontra uma relação linear entre os scores de **X** e **Y**, utilizando os cálculos de mínimos quadrados parciais. Dessa forma, estabelece uma regressão linear entre as amostras que pertencem a uma classe (às quais se atribui o valor 1) das demais amostras (que recebem o valor zero)^{107,117}.

Originalmente, o método PLS não foi desenvolvido para análise classificatória/discriminatória de amostras, mas sim para o estabelecimento de regressões lineares a partir de dados multivariados, com intuítos quantitativos. Porém, vários trabalhos têm recentemente demonstrado que esse método favorece a discriminação de amostras em conjuntos complexos de dados, uma vez que utiliza os escores obtidos a partir da decomposição da matriz **X** em relação às variáveis independentes das amostras (valores de **Y**), ou seja, reduz a dimensionalidade dos dados da mesma forma que a PCA, porém com a diferenciação de classes através da regressão obtida com os mínimos quadrados parciais dos escores da matriz **X**. Quando a separação entre os grupos é relevante, é então possível a classificação de amostras desconhecidas, que poderá pertencer a qualquer classe previamente modelada, ou a nenhuma delas, caso seus escores estejam distantes das regressões obtidas para as classes pré-estabelecidas¹¹⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os procedimentos experimentais referentes aos resultados apresentados e discutidos neste capítulo encontram-se descritos no item 6 (Procedimento Experimental).

5.1. Cultivo, coleta e processamento de amostras de *Phyllanthus*

5.1.1. Amostras cultivadas no CPQBA/UNICAMP

O CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) tem cultivado espécies de “quebra-pedra” há vários anos, desenvolvendo pesquisas acerca do seu cultivo em condições controladas e fornecendo material vegetal a diversos centros de pesquisa do Brasil, que realizam estudos fitoquímicos e farmacológicos com espécies de *Phyllanthus*. Na TABELA 4 estão relacionadas as espécies fornecidas para o presente trabalho, coletadas em janeiro de 2006, e seus respectivos números de exsicatas, as quais estão depositadas no Herbário da mesma Instituição.

TABELA 4. Espécies de quebra-pedra obtidas do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)

Espécie	Exsicata
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	CPQBA 481
<i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb.	CPQBA 55
<i>Phyllanthus caroliniensis</i> Walt.	CPQBA 479
<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. & Thonn.	CPQBA 187
<i>Phyllanthus urinaria</i> L.	CPQBA 341
<i>Phyllanthus stipulates</i> (Raf.) Webster	CPQBA-1336

As amostras coletadas foram submetidas à secagem e, após esse processo, foi realizada dupla moagem do material vegetal (constituído por partes aéreas contendo folhas, caules, flores e frutos), seguida de tamização para a padronização da granulometria dos pós a serem posteriormente extraídos (item 6.2.1 do Procedimento Experimental). Primeiramente, uma trituração grosseira foi

feita em moinho de pás rotativas e, em seguida, a pulverização foi feita em um liquidificador industrial, obtendo um pó com granulometria de até 0,25 mm (60 mesh). Esse tamanho de partícula, de acordo com Sonaglio¹¹⁸, é bastante apropriado para o processo de extração, sendo classificado como moderadamente fino.

5.1.2. Amostras cultivadas no *campus* da UFSCar

O CPQBA desenvolve estudos sobre a germinação de sementes e técnicas de cultivo de espécies de *Phyllanthus* com o objetivo de, a partir da agrotecnologia desenvolvida, obter matéria-prima uniforme e de boa qualidade, destinadas tanto à pesquisa, quanto ao consumo. As sementes obtidas após o cultivo são selecionadas, de forma a obter cultivares com mínima variabilidade genética.

Em conjunto com as amostras vegetais fornecidas pelo CPQBA, foram obtidas sementes das respectivas espécies: *P. niruri*, *P. amarus*, *P. tenellus*, *P. caroliniensis*, *P. urinaria* e *P. stipulatus*. A partir de orientações agronômicas (Dr^a Glyn M. Figueira e Sr. Benício Pereira), foi realizado o cultivo no *campus* da UFSCar, com o intuito de verificar a influência de alguns fatores, como características de solo e condições climáticas, sobre o perfil cromatográfico das espécies.

As espécies de *Phyllanthus* estão presentes nas Américas desde o norte do México até o sul da Argentina, sendo bastante comum em terrenos úmidos e sombreados. No Brasil, está aclimatada em todas as regiões, principalmente nas tropicais e equatoriais; apresenta algumas restrições em regiões altas (acima de 1000 m) e frias. São pouco exigentes com relação ao tipo de solo, mas preferem os terrenos argilosos, com elevado teor de matéria orgânica.

A forma mais indicada para a propagação de “quebra-pedra” é por sementes que, em geral, são colhidas quando os frutos amadurecem e apresentam tempo de dormência média de quatro meses. Para a germinação, é aconselhável a semeadura superficial, pois as espécies de *Phyllanthus* comportam-se como fotoblásticas positivas. Assim, devem-se cobrir as sementes apenas com uma fina camada de substrato, que ainda possibilite a passagem de luz. A formação das

mudas pode ser feita em viveiro sombreado ou estufas agrícolas e, normalmente, seu tempo de formação é de 45 a 60 dias.

O experimento de germinação das sementes foi realizado em condições análogas às utilizadas para as espécies cujas amostras foram coletadas em janeiro de 2006, utilizando substrato agrícola preparado com adição de vermiculita e adubo granulado N/P/K (item 6.2.2.1 do Procedimento Experimental). As sementes foram plantadas em tubetes dispostos em plataformas, que permaneceram em estufa agrícola sob condições controladas de temperatura e umidade, durante 40 dias. A germinação teve início quinze dias após o plantio e o crescimento das mudas foi acompanhado e registrado semanalmente. A FIGURA 6 ilustra o experimento de plantio das sementes e o desenvolvimento das plântulas após trinta dias.

No início, a germinação das sementes foi irregular, principalmente para as espécies *P. amarus*, *P. caroliniensis* e *P. tenellus*. Com trinta dias de desenvolvimento, entretanto, a maioria dos tubetes havia germinado e apresentava crescimento homogêneo; as plantas foram medidas por amostragem e calculou-se a média de suas alturas (TABELA 5). Apenas a espécie *P. urinaria* apresentou germinação tardia e permanentemente irregular.

TABELA 5. Medidas de altura das espécies de *Phyllanthus*, após 30 dias da semeadura.

Espécie	Altura média (cm); n = 16
<i>P. niruri</i>	9,78 ± 3,61
<i>P. tenellus</i>	10,59 ± 3,12
<i>P. caroliniensis</i>	6,09 ± 2,32
<i>P. amarus</i>	9,94 ± 1,49
<i>P. urinaria</i>	0,94 ± 1,68
<i>P. stipulatus</i>	12,59 ± 2,61

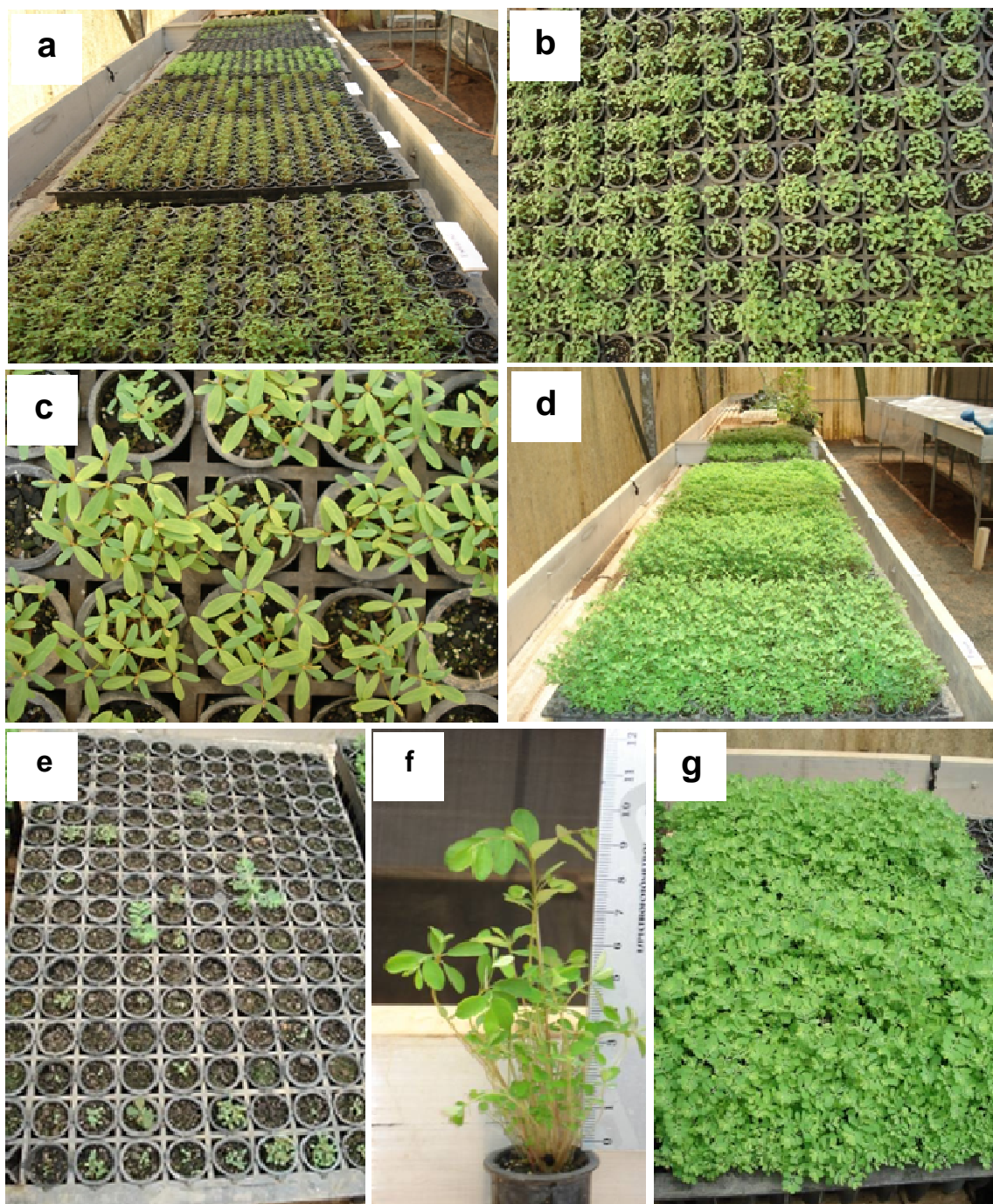


FIGURA 6. Fotos da germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas de *Phyllanthus*: **a** - após quinze dias de plantio; **b** - espécie *P. niruri* e **c** - *P. stipulatus*, em 18/09/06; **d** - após trinta dias de plantio; **e** - espécie *P. urinaria*, **f** - *P. tenellus* e **g** - *P. amarus*, em 30/09/06.

A melhor época para o transplante das mudas é de outubro a janeiro, que corresponde à época chuvosa e quente no Brasil. O cultivo pode ser conduzido em canteiros a pleno sol, porém exige irrigações frequentes, mantendo a umidade

do solo entre 60 a 80% e, nos primeiros meses após o transplante, deve-se manter o canteiro livre de ervas, fazendo capinas periódicas. O controle de formigas cortadeiras deve ser cuidadoso, pois um ataque pode destruir o canteiro em poucas horas.

O transplante das mudas para o canteiro foi feito após 40 dias do plantio das sementes. Infelizmente, a espécie *P. urinaria* não apresentou germinação adequada, homogênea e crescimento suficiente. Portanto, o cultivo no campus da UFSCar foi realizado apenas com cinco espécies de *Phyllanthus*: *P. niruri*, *P. tenellus*, *P. amarus*, *P. stipulatus* e *P. caroliniensis*. A FIGURA 7 mostra fotos do canteiro antes e depois de receber as mudas, com pleno desenvolvimento das espécies. A espécie *P. niruri* foi cultivada em dois canteiros separados, lado a lado, no qual em um deles (canteiro 1) recebeu maior incidência de luz durante o dia (8 horas em média de incidência solar direta) e o outro (canteiro 2), permaneceu sombreado por um maior tempo (exposição solar de 5 horas por dia, em média).

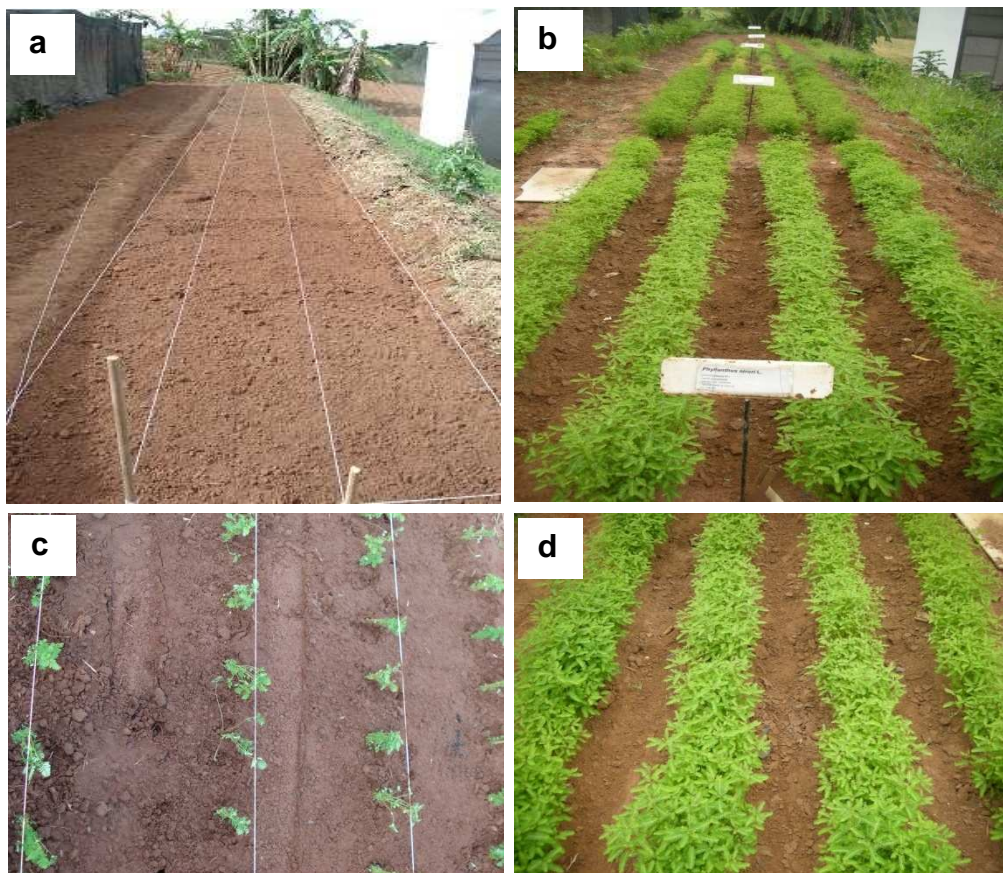


FIGURA 7. Fotos do canteiro preparado para cultivo de cinco espécies de quebra-pedra. (a) demarcação do canteiro; (c) no dia do transplante das mudas e (b) após 60 dias; (d) *P. niruri*.

Na área do canteiro, foi coletada amostra de solo e encaminhada para análise físico-química e de macro e micronutrientes, realizada no Instituto Brasileiro de Análises (IBRA), localizado na cidade de Campinas; da mesma forma, uma amostra de solo do canteiro do CPQBA também foi analisada. Os resultados das análises estão relacionados na TABELA 6 e podem ser graficamente visualizados na FIGURA 8.

TABELA 6. Resultado das análises físico-químicas, de macro e micronutrientes de amostras de solo dos canteiros da UFSCar e do CPQBA*

Análise	unidade	CPQBA	UFSCar
mat.orgânica	g/dm ³	62	26
tampão SMP		5,79	6,7
pH		4,8	5,7
fósforo	mg/dm ³	27	53
potássio	mmolc/dm ³	3,4	7,6
cálcio	mmolc/dm ³	24	25
magnésio	mmolc/dm ³	7	7
sódio	mmolc/dm ³	0,3	0,1
alumínio	mmolc/dm ³	1	1
hidrogênio	mmolc/dm ³	51,8	19,2
H+Al	mmolc/dm ³	53	20
soma das bases	mmolc/dm ³	34,7	39,7
C.T.C.	mmolc/dm ³	87,5	59,9
sat. de bases	%	40	66
enxofre	mg/dm ³	14	19
boro	mg/dm ³	0,42	0,21
cobre	mg/dm ³	5,9	2,6
ferro	mg/dm ³	13	52
manganês	mg/dm ³	64	8,6
zinco	mg/dm ³	3,8	4,6
% de K C.T.C.	%	3,9	12,7
% de Ca C.T.C.	%	27,4	41,7
% de Mg C.T.C.	%	8	11,7
% de Al C.T.C.	%	1,1	1,7
% de H C.T.C.	%	59,2	32,1
% de Na C.T.C.	%	0,3	0,2
Ca/Mg		3,4	3,6
Ca/K		7,1	3,3
Mg/K		2,1	0,9

*resultados analíticos fornecidos pelo IBRA. **H+Al** = acidez potencial; **C.T.C.** = capacidade de troca de cátions; **tampão SMP** = parâmetro que avalia a necessidade de calagem do solo.

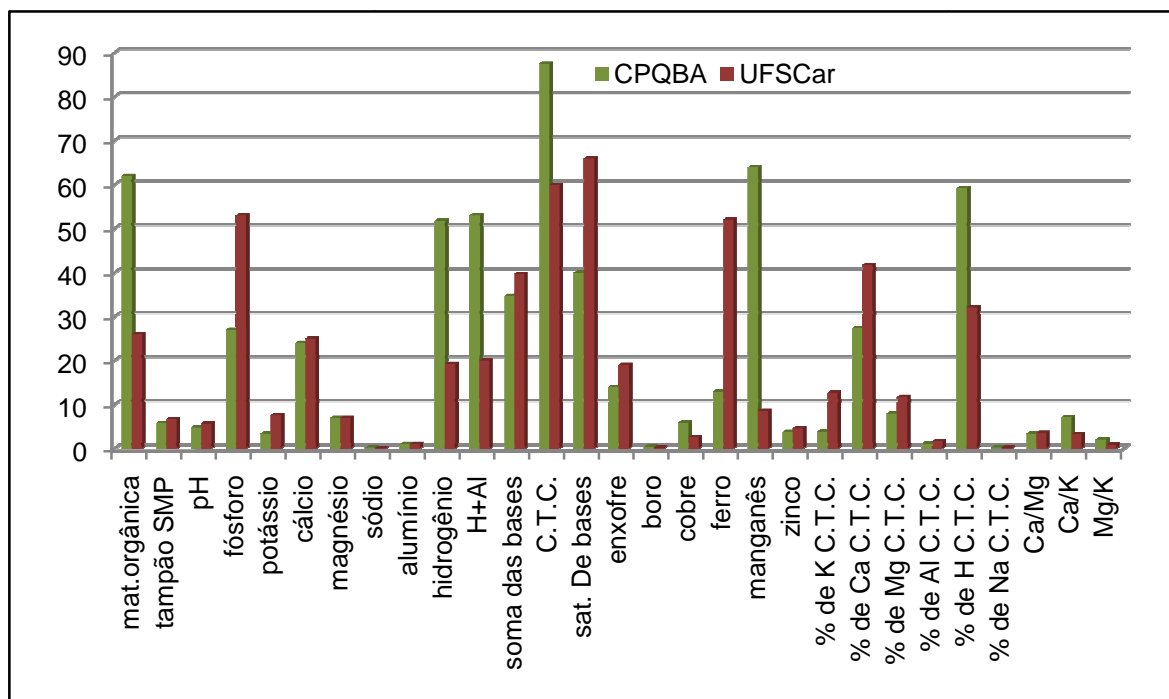


FIGURA 8. Gráfico de valores de análises de amostras de solo dos canteiros CPQBA e UFSCar.

É possível observar, através da TABELA 6 e da FIGURA 8, que os solos dos canteiros apresentam características bastante diferentes com relação a várias propriedades, tais como: matéria orgânica, fósforo, acidez, ferro, manganês, dentre outros. Essas variações podem interferir no desenvolvimento do vegetal e em seu metabolismo secundário, modificando o teor de substâncias ativas na droga vegetal²⁶. É importante frisar, entretanto, que nenhuma medida de correção de solo foi adotada para o cultivo das espécies de *Phyllanthus* em ambos os locais de cultivo.

Quanto às diferenças climáticas, as regiões de Campinas/SP (longitude 47,8°, latitude -22,89° e altitude 680m) e de São Carlos/SP (longitude 47,9°, latitude -22,02° e altitude 830m) apresentam ligeiras variações, conforme informações obtidas através do CEPAGRI-UNICAMP (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura) e que estão apresentadas na TABELA 7.

TABELA 7. Características climáticas comparativas entre a região de Campinas/SP e São Carlos/SP¹¹⁹.

Município	CMTA (mm)	MCA (mm)	MnCA (mm)	TMA (°C)	TMMF (°C)	TMMQ (°C)
Campinas	1372	243,3	30,6	21	18	24
São Carlos	1422,7	269	16	21	18	23

CMTA = Chuva Média Total Anual; **MCA** = Maior Chuva do Ano; **MnCA** = Menor Chuva do Ano; **TMA** = Temperatura Média Anual; **TMMF** = Temperatura Média do Mês Mais Frio; **TMMQ** = Temperatura Média do Mês Mais Quente.

Na primeira coleta (janeiro de 2007), foi feita a medida individual de altura de algumas plantas (n = 10) aleatoriamente escolhidas e, a partir de tais valores, calculou-se a média de altura: *P. caroliniensis* (37,5 cm), *P. amarus* (70,5 cm), *P. niruri* (60,5 cm), *P. tenellus* (63 cm) e *P. stipulatus* (115 cm). Pode-se perceber que o porte das espécies é bastante diferente: a espécie *P. caroliniensis* é rasteira e apresenta porte menor, a espécie *P. stipulatus* apresenta desenvolvimento vegetativo semi-arbustivo, e as demais espécies apresentam porte herbáceo.

Após a coleta de janeiro (item 6.2.2.2), as espécies continuaram a ser irrigadas e monitoradas diariamente, porém, algumas semanas após o corte, o cultivo sofreu uma infestação por um tipo de invasor popularmente conhecido como “cochonilha”. Trata-se de um grupo bastante diversificado de insetos, classificados como Homópteros, que ocasionam o definhamento da planta sem qualquer sinal de doença ou praga, pois são sugadores de seiva¹²⁰. Em geral, combate-se essa infestação com aplicação de uma mistura de sabão e água quente, sendo esta considerada uma opção natural de controle.

Ao ser constatada a infestação, inicialmente fez-se a pulverização com a mistura de água e sabão, porém esse procedimento não foi suficiente para o controle da praga, o que acarretou na perda por completo do canteiro da espécie *P. caroliniensis* (FIGURA 9). A partir de então, sob orientação agrônômica, foi feita pulverização semanal com óleo mineral, até que não mais se observasse o definhamento das plantas. Felizmente, após algumas semanas, a infestação foi controlada e os demais canteiros prosseguiram seu desenvolvimento: *P. niruri*, *P. tenellus*, *P. amarus* e *P. stipulatus*.

Após três meses de desenvolvimento, foi realizada nova coleta de amostras (item 6.2.2.2), em abril de 2007. Durante o período de outono e inverno (maio a setembro) o desenvolvimento vegetativo se mostrou bastante lento e, portanto, nenhuma coleta foi realizada; a espécie *P. amarus* não resistiu ao frio e à

baixa umidade do ar, apesar dos cuidados com a irrigação diária. Dessa forma, a última amostragem realizada no canteiro da UFSCar ocorreu no mês de outubro de 2007, no qual o porte médio das espécies apresentava-se semelhante ao inicialmente verificado.



FIGURA 9. Espécie *P.caroliniensis* infestada por cochonilhas no canteiro da UFSCar.

5.1.3. Coleta de amostras não cultivadas de espécies de *Phyllanthus*

No Brasil, na grande maioria das vezes, a comercialização de produtos de origem vegetal se faz a partir de matérias-primas obtidas de forma extrativista, e não de cultivares de plantas medicinais. Sabe-se que o metabolismo secundário é consideravelmente afetado por diversos fatores inerentes ao desenvolvimento vegetal, tais como: umidade, condições de solo, incidência luminosa, etc²⁶. Dessa forma, o desenvolvimento de um método de análise química que pretenda avaliar a autenticidade de amostras vegetais comercialmente disponíveis, baseado unicamente em padrões de referência cultivados (como os obtidos nos itens 5.1.1 e 5.1.2) seria bastante arbitrário e incompleto.

Tendo em vista esses fatores, foram efetuadas coletas de amostras não cultivadas de *Phyllanthus*, em diferentes municípios do estado de São Paulo, com o intuito de caracterizar as espécies provenientes de *habitats* distintos e verificar se existem diferenças significativas em seus perfis cromatográficos e em relação às espécies cultivadas. Essas coletas foram efetuadas entre os meses de dezembro de 2007 e janeiro de 2008, contemplando 27 municípios (item 6.2.3), como pode ser verificado na FIGURA 10 e na TABELA 8.

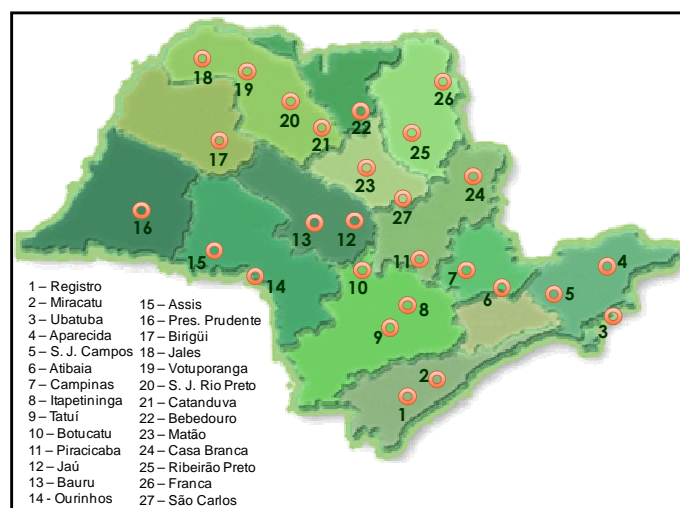


FIGURA 10. Locais de coleta de amostras não cultivadas de *Phyllanthus*.

TABELA 8. Amostras não cultivadas de *Phyllanthus*, coletadas em municípios do estado de São Paulo.

Amostra	Cidade (SP)	Data	Coordenada
P1	Registro	27/12/07	S 24°29'17,6" W 47°50'52,5"
P2A	Miracatu	27/12/07	S 24°16'58,4" W 47°27'5,3"
P2B	Miracatu	27/12/07	S 24°16'58,4" W 47°27'5,3"
P3	Ubatuba	04/01/08	S 23°27'28,0" W 45°03'38,7"
P4	Aparecida	07/01/08	S 22°50'53,6" W 45°14'35,0"
P5	S.J. dos Campos	07/01/08	S 23°13'57,8" W 45°54'12,8"
P6	Atibaia	08/01/08	S 23°08'19,8" W 46°33'50,7"
P7	Campinas	08/01/08	S 22°49'39,3" W 47°05'0,4"
P8	Itapetininga	08/01/08	S 23°35'28,7" W 48°02'54,4"
P9	Tatuí	09/01/08	S 23°21'40,7" W 47°52'51,0"
P10	Botucatu	09/01/08	S 22°53'36,0" W 48°26'24,3"
P11	Piracicaba	09/01/08	S 22°43'30,9" W 47°39'19,6"
P12	Jaú	12/01/08	S 22°17'10,1" W 48°33'03,6"
P13	Bauru	12/01/08	S 22°19'06,0" W 49°02'57,8"
P14	Ourinhos	13/01/08	S 22°59'28,4" W 49°52'02,1"
P15	Assis	13/01/08	S 22°38'43,1" W 50°24'33,8"
P16	Presidente Prudente	13/01/08	S 22°08'42,4" W 51°23'21,6"
P17	Birigüi	13/01/08	S 21°18'07,0" W 50°21'26,6"
P18	Jales	14/01/08	S 20°15'42,5" W 50°32'45,7"
P19	Votuporanga	14/01/08	S 20°26'24,6" W 49°58'55,1"
P20	S.J.do Rio Preto	15/01/08	S 20°48'48,5" W 49°23'47,4"
P21	Catanduva	15/01/08	S 21°07'46,7" W 48°57'59,2"
P22	Bebedouro	15/01/08	S 20°56'43,5" W 48°29'41,1"
P23	Matão	15/01/08	S 21°36'22,1" W 48°21'17,2"
P24	Casa Branca	16/01/08	S 21°46'44,3" W 47°05'09,1"
P25	Ribeirão Preto	16/01/08	S 21°11'36,9" W 47°45'34,5"
P26	Franca	16/01/08	S 20°33'18,5" W 47°22'23,7"
P27	São Carlos	17/01/08	S 22°00'48,7" W 47°54'20,1"

Todas as amostras foram submetidas aos mesmos procedimentos de coleta, secagem, armazenamento, moagem e pulverização (item 6.2.3). Nos locais de coleta, exemplares foram herborizados (n=3) e, posteriormente, encaminhados para identificação taxonômica no Instituto de Botânica de São Paulo (IBT). O resultado da identificação das espécies está apresentado na TABELA 9. Como pode se perceber, a grande maioria das amostras coletadas pertence à espécie *P. tenellus*.

TABELA 9. Identificação das amostras de *Phyllanthus* não cultivadas e coletadas em municípios de São Paulo*.

Espécie	Amostra
<i>P. urinaria</i>	P2B
<i>P. amarus</i>	P18, P19, P22
<i>P. tenellus</i>	P1,P2A,P3,P4,P5,P6,P7,P8,P9,P10,P11,P12,P13, P14,P15,P16,P17,P20,P21,P23,P24,P25,P26,P27

*Instituto de Botânica de São Paulo.

5.2. Obtenção de Amostras comerciais de “quebra-pedra”

Amostras comerciais de “quebra-pedra” foram adquiridas em diferentes locais e de distintos fabricantes (TABELA 10).

Em farmácias de manipulação e homeopáticas, as embalagens apresentavam rótulo contendo nome comercial, lote, data de fabricação, validade e a descrição da espécie vegetal como *Phyllanthus niruri*. As amostras adquiridas em mercados municipais, ervanarias e feiras livres não apresentavam embalagem adequada, prazo de validade ou identificação de espécie. Em geral, consistiam de 30 a 50g de material seco, contendo partes aéreas (caules, folhas, flores e frutos) e, em alguns casos, fragmentos de raízes.

TABELA 10. Amostras comerciais de “quebra-pedra”.

Amostra	Origem*	Aquisição	Observação
CAP1	Hortolândia/SP	Internet	
CHA1	Chapecó/SC	Curitiba/PR	Farmácia de manipulação
CHA2	São Carlos/SP	São Carlos/SP	Farmácia de manipulação
CHA3	Campo Largo/PR	Curitiba/PR	Farmácia de manipulação
CHA4	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Feira livre
CHA5	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Mercado municipal
CHA6	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Farmácia de manipulação
CHA7	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Mercado municipal
CHA8	Piracicaba/SP	Barra Bonita/SP	Farmácia de manipulação
CHA9	Chapecó/SC	Florianópolis/SC	Farmácia de manipulação
CHA10	Mandirituba/PR	Maringá/PR	Farmácia de manipulação
CHA11	Maringá/PR	Maringá/PR	Farmácia homeopática
CHA12	Campo Largo/PR	Maringá/PR	Farmácia de manipulação
CHA13	Campo Largo/PR	Maringá/PR	Farmácia de manipulação
CHA14	Maringá/PR	Maringá/PR	Farmácia homeopática
CHA15	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Farmácia de manipulação
CHA16	Atibaia/SP	Atibaia/SP	Farmácia de manipulação
CHA17	Campinas/SP	Campinas/SP	Ervanaria
CHA18	Piracicaba/SP	Piracicaba/SP	Farmácia de manipulação
CHA19	Franca/SP	Franca/SP	Ervanaria
CHA20	Catanduva/SP	Catanduva/SP	Farmácia de manipulação
CHA21	Botucatu/SP	Botucatu/SP	Farmácia de manipulação
CHA22	Recife/PE	Recife/PE	Mercado municipal
CHA23	Aracaju/SE	Aracaju/SE	Mercado municipal
CHA24	Aracaju/SE	Aracaju/SE	Mercado municipal

*considera-se como origem o local de fabricação; CAP = amostra de cápsulas.

5.3. Método de extração

A escolha do método de extração levou em consideração alguns fatores: a) as espécies de *Phyllanthus* conhecidas como “quebra-pedra” são popularmente consumidas sob a forma de chás⁵⁶; b) os estudos farmacológicos que pesquisam os efeitos de *Phyllanthus* sobre cálculos renais utilizam extratos aquosos⁷⁹⁻⁸¹ e c) a Farmacopéia Brasileira preconiza a extração aquosa para a identificação química das espécies *P. niruri* e *P. tenellus*⁵³.

Os procedimentos selecionados para extração foram, inicialmente, baseados nos métodos descritos na Farmacopéia Brasileira⁵³, com algumas modificações (item 6.3). Esses extratos, denominados *ExtAq1* e *ExtAq2*, foram preparados a partir de amostra vegetal da espécie *P. niruri*, coletada no CPQBA.

Os extratos preparados foram analisados cromatograficamente e, para que se pudessem avaliar as características de retenção dos compostos neles presentes, as análises cromatográficas iniciais foram realizadas utilizando o modo reverso de eluição, com gradiente exploratório amplo¹⁰⁰.

As análises foram feitas em coluna analítica C₁₈ Luna[®] (10µm de tamanho de partícula, 100 Å de poro), com 15 x 0,46 cm de d.i., utilizando detector de arranjo de diodos (DAD) com varredura entre 190-800nm. A fase móvel consistiu na mistura de ACN:água, em gradiente linear: 5-100% de ACN em 60 min ($\Delta\%B/\text{min} = 1,58$); permanecendo em 100% de ACN por 10 min; 100-5% de ACN em 5 min (retorno do gradiente); 5% de ACN por 15 min (condicionamento da coluna), utilizando vazão de 1 mL/min e volume de injeção 50µL.

Para o ExtAq 1, baixa retenção foi observada para todos os compostos presentes no cromatograma (FIGURA 11a), resultando em baixa resolução. Considerando que, a 15 minutos do tempo de análise, o percentual do modificador orgânico correspondia a 28,7%, pode-se inferir uma elevada hidrofília para as substâncias presentes no extrato. Em consequência, a inclinação e a faixa do gradiente foram alteradas: 3-60% de ACN em 60 minutos ($\Delta\%B/\text{min} = 0,95$), obtendo melhor retenção e resolução das bandas cromatográficas (FIGURA 11b).

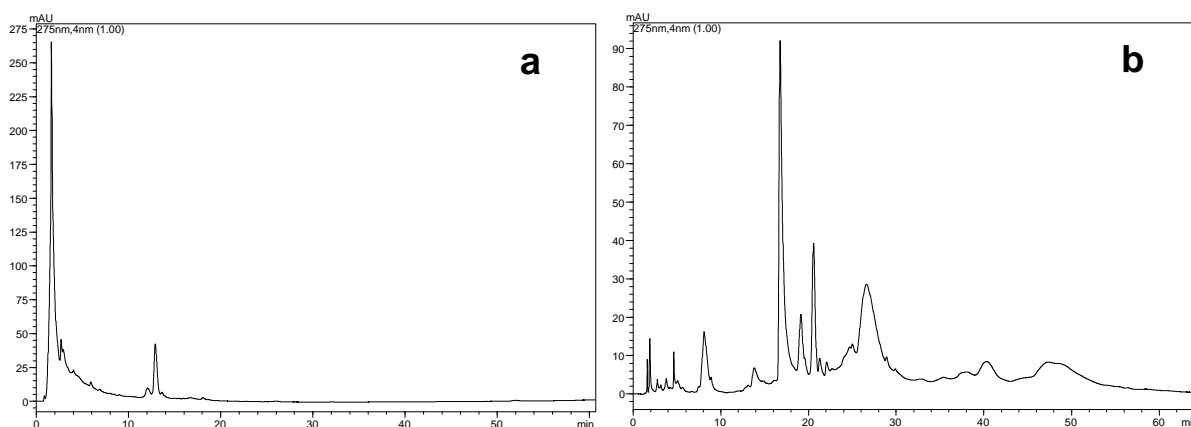


FIGURA 11. Cromatogramas ($\lambda = 275 \text{ nm}$) obtidos para a amostra ExtAq 1, com eluição gradiente inicial (a) e modificada (b).

Para comparar o perfil cromatográfico dos dois extratos preparados, o ExtAq 2 (obtido por extração durante 3 horas sob refluxo) foi analisado nas mesmas condições estabelecidas para o ExtAq1 (gradiente modificado). O cromatograma obtido apresentou grandes diferenças, com relação à retenção, separação e intensidade de bandas cromatográficas (FIGURA 12), o que evidencia a forte influência do método de extração sobre a composição da amostra, tendo em vista que ambos foram preparados a partir do mesmo tipo de material vegetal.

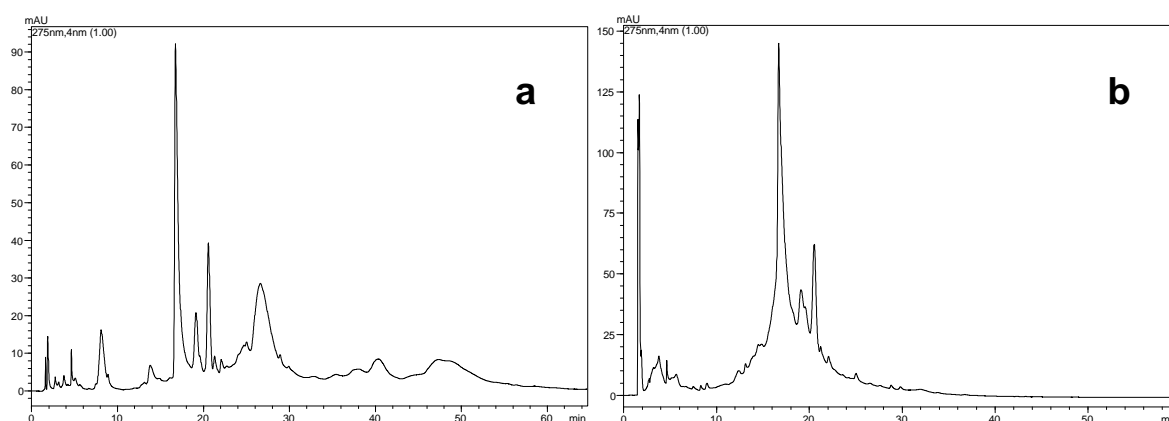


FIGURA 12. Cromatogramas ($\lambda = 275$ nm) obtidos com as amostras ExtAq 1 (a) e ExtAq 2 (b), com eluição gradiente: 3-60% de ACN em 60 minutos ($\Delta\%B = 0,95$), volume de injeção = 50 μ L, vazão 1mL/min.

Considerando o intuito de analisar comparativamente o perfil cromatográfico de extratos aquosos de diferentes espécies de *Phyllanthus*, a utilização de um método de extração com elevada reprodutibilidade seria fundamental.

Assim sendo, foi feito um estudo para a padronização do procedimento de extração, no qual foi verificado que a proporção entre material vegetal/água, a temperatura e o tempo de extração influenciavam consideravelmente o perfil cromatográfico. A temperatura interna do sistema passou a ser monitorada através de um termômetro inserido na entrada lateral do balão de extração (FIGURA 13). Além disso, a extração passou a ser feita com maior quantidade de material vegetal (3g), uma vez que a intensidade das bandas cromatográficas apresentava-se bastante baixa (Figuras 12a e b). O protocolo final de extração encontra-se descrito no item 6.3 do Procedimento Experimental, denominado ExtAq3.

Com o objetivo de evitar possíveis processos de degradação, por oxidação e/ou hidrólise, e uniformizar as análises com relação à concentração de amostra injetada no sistema cromatográfico, os extratos preparados passaram a ser liofilizados e mantidos em freezer (-20°C).



FIGURA 13. Sistema de extração aquosa para preparo das amostras.

5.4. Otimização das condições analíticas do perfil cromatográfico

De acordo com Ji et al.¹²¹ e Gong et al.¹²², o desempenho do *fingerprint* cromatográfico na representatividade de amostras vegetais é altamente dependente da separação cromatográfica e da intensidade das bandas ao longo de toda a análise; além disso, o uso de fases móveis de composição simples é desejável, uma vez que aumenta a robustez do método. Portanto, deve-se desenvolver um método com boa seletividade e resolução, distribuição homogênea de bandas cromatográficas e condições analíticas de fácil ajuste, evitando que pequenas oscilações na composição da fase móvel influenciem o desempenho da separação.

Neste trabalho, foi avaliada a influência dos seguintes fatores sobre as condições cromatográficas de separação: diferentes fases estacionárias, natureza do modificador orgânico (solvente B), volume de injeção, temperatura da coluna e parâmetros da eluição gradiente. As otimizações foram feitas com o extrato aquoso *ExtAq 3* de *P. niruri* (CPQBA), na concentração de 30 mg/mL, e estão apresentadas na TABELA 11.

Em cromatografia líquida no modo reverso, a fase estacionária quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (C₁₈) é, em geral, a primeira opção de escolha, devido a sua baixa polaridade e às interações hidrofóbicas que ocorrem entre a parte não polar das substâncias a serem separadas e as cadeias hidrocarbônicas da fase estacionária. A acidez das fases estacionárias depende da presença de grupos silanóis livres, que varia de acordo com seu processo de produção¹²³. Em virtude disso, foram avaliadas duas colunas analíticas C₁₈ de diferentes marcas: Luna[®], que apresenta menor acidez e Hypersil[®], com maior acidez.

A retenção e a separação cromatográfica são influenciadas por várias propriedades das fases estacionárias, tais como o tipo de cadeia hidrocarbônica e o tamanho de partícula, dentre outros fatores. Desta forma, foram feitas análises em colunas C₁₈ com 5 e 10µm de tamanho de partícula, além de coluna com fase estacionária C₈.

Em extratos aquosos, é comum a presença de taninos, flavonóides glicosilados e compostos fenólicos diversos. Por essa razão, foram feitas análises em coluna de fase estacionária hexil-fenil. Nesta, além das interações hidrofóbicas inerentes ao modo reverso, ocorrem interações do tipo π - π , o que diferencia sua seletividade na análise de substâncias com anéis benzênicos e duplas ligações em sistema conjugados¹²⁴.

Durante os estudos de otimização, o modificador orgânico (ACN) foi substituído por MeOH, de modo a avaliar a influência da força e da seletividade do solvente na retenção e separação cromatográficas. Além disso, foram avaliadas modificações no gradiente, como: concentração inicial e final do modificador orgânico, tempo e inclinação ($\Delta\%$ de solvente/minuto).

TABELA 11. Condições cromatográficas avaliadas para análise do extrato aquoso liofilizado de *P. niruri* (*ExtAg 3*)*.

Fase estacionária*	Análise	Condição cromatográfica
C₁₈ Luna 10 µm	1	2,5-30% ACN por 40 min ($\Delta\%B = 0,69$); 30-100% ACN por 10 min ($\Delta\%B = 7,0$); isocrático em 100% ACN por 10 min; vazão = 1,0 mL/min; vol. inj. 30 µL.
	2	2-40% ACN por 40 min ($\Delta\%B = 0,95$); isocrático em 40% ACN por 10 min; vazão = 1,0 mL/min; vol. inj. 30 µL.
	3	2-40% ACN por 40 min ($\Delta\%B = 0,95$); isocrático em 40% ACN por 10 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. 30 µL.
	4	2-40% ACN por 35 min ($\Delta\%B = 1,08$); isocrático em 40% ACN por 5 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. 20 µL.
	5	2-40% ACN por 35 min ($\Delta\%B = 1,08$); isocrático em 40% ACN por 5 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. 20 µL. T = 40°C
	6	2-40% ACN por 35 min ($\Delta\%B = 1,08$); isocrático em 40% ACN por 5 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. 20 µL. T = 10°C
	7	5-100% MeOH por 50 min ($\Delta\%B = 1,90$); isocrático em 100% MeOH por 5 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. = 20 µL
Hexil-Fenil Luna 10 µm	8	2-40% ACN por 35 min ($\Delta\%B = 1,08$); isocrático em 40% ACN por 5 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. 20 µL. T = 10°C
	9	2-40% MeOH por 40 min ($\Delta\%B = 0,95$); isocrático em 40% por 10 min; vazão = 0,5 mL/min; volume injeção 20 µL.
	10	3-60% MeOH por 30 min ($\Delta\%B = 1,9$); isocrático em 60% MeOH por 10 min; vazão = 0,3 mL/min; vol. inj. 20 µL. T = 50°C.
	11	3-100% MeOH por 40 min ($\Delta\%B = 2,42$); isocrático em 100% MeOH por 10 min; vazão = 0,3 mL/min; vol. inj. 20 µL. T = 50°C.
	12	5-100% MeOH por 50 min ($\Delta\%B = 1,90$); isocrático em 100% MeOH por 5 min; vazão = 0,3 mL/min; vol. inj. 20 µL
	13	3-60% ACN por 40 min ($\Delta\%B = 1,42$); isocrático em 60% ACN por 5 min; vazão = 0,3 mL/min; vol. inj. 20 µL.
	14	5-50% ACN por 40 min ($\Delta\%B = 1,12$); isocrático em 50% ACN por 5 min; vazão = 0,3 mL/min; vol. inj. 20 µL.
C₈ Luna 5 µm	15	3-80% MeOH por 50 min ($\Delta\%B = 1,54$); isocrático em 80% MeOH por 5 min; vazão = 0,3 mL/min; vol. inj. 20 µL
	16	5-60% ACN por 50 min ($\Delta\%B = 1,1$); isocrático em 60% ACN por 10 min; vazão = 0,3 mL/min; vol. inj. 20 µL
	17	4-45% ACN por 50 min ($\Delta\%B = 0,82$); isocrático em 45% ACN por 5 min; vazão = 0,3 mL/min; vol. inj. 20 µL
	18	2-40% ACN por 40 min ($\Delta\%B = 0,95$); isocrático em 40% ACN por 10 min; vazão = 1 mL/min; vol. inj. 30 µL.
	19	2-40% ACN por 40 min ($\Delta\%B = 0,95$); isocrático em 40% ACN por 10 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. 30 µL.
	20	2-40% ACN por 35 min ($\Delta\%B = 1,08$); isocrático em 40% ACN por 5 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. 20 µL.
C₁₈ Hypersil 5 µm	21	2-40% ACN por 35 min ($\Delta\%B = 1,08$); isocrático em 40% ACN por 5 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. 20 µL. T = 40°C
	22	2-40% ACN por 35 min ($\Delta\%B = 1,08$); isocrático em 40% ACN por 5 min; vazão = 0,5 mL/min; vol. inj. 20 µL. Forno a 10°C
	23	5-100% MeOH por 50 min ($\Delta\%B = 1,90$); isocrático em 100% MeOH por 5 min; vazão = 0,3 mL/min; vol. inj. = 20 µL

*colunas analíticas 15 x 0,46cm d.i.; vol.inj.=volume de injeção; T = temperatura do forno.

Dentre as condições analíticas avaliadas, o cromatograma que mostrou melhor faixa de retenção e melhor separação foi obtido com a condição cromatográfica 12 da TABELA 11: coluna analítica Hexil-fenil Luna[®] 10 μm ; vazão 0,3 mL/min; volume de injeção 20 μL ; eluição gradiente no modo reverso: 5-100% de MeOH por 50 min ($\Delta\%B/\text{min} = 1,90$); isocrático em 100% de MeOH por 5 min; 100-5% de MeOH por 5 min (retorno do gradiente) e 5% de MeOH por 15 min (condicionamento da coluna), apresentado na FIGURA 14. A presença de compostos fenólicos está evidenciada em espectros de absorção UV de bandas cromatográficas.

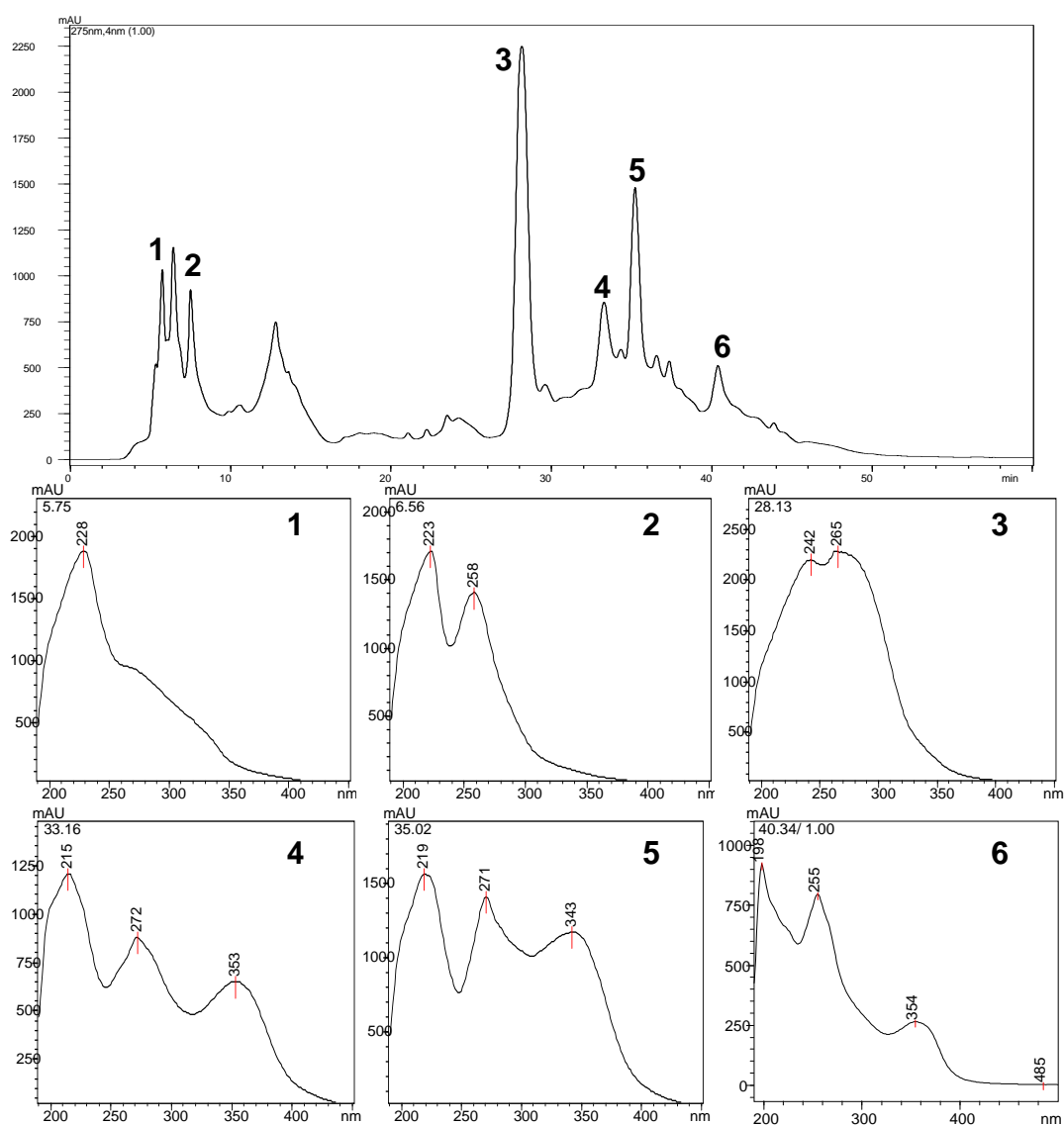


FIGURA 14. Cromatograma ($\lambda=275$ nm) obtido a partir da análise de extrato aquoso de *P. niruri*. Os espectros de absorção UV das bandas cromatográficas assinaladas estão apresentados em 1-6.

Em extratos vegetais obtidos a partir de solventes polares, uma grande quantidade de compostos ionizáveis de caráter ácido está normalmente presente, tais como compostos fenólicos e ácidos carboxílicos diversos. Essas substâncias, em solução aquosa, podem estar parcial ou totalmente ionizadas. Nesses casos, a supressão da ionização é uma condição muitas vezes desejável, pois as torna mais hidrofóbicas, aumentando sua retenção¹²⁵. Por isso, a diminuição do pH da fase móvel através da adição de ácido fracos é uma opção a ser considerada na otimização da separação cromatográfica e tem sido bastante utilizada em diversos trabalhos^{121,126-128}.

Sendo assim, foi feita a substituição da água da fase móvel por solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v), obtendo melhor retenção e resolução dos compostos presentes no extrato (FIGURA 15).

Desta forma, a condição considerada adequada para análise do perfil cromatográfico de extratos de *Phyllanthus* foi: coluna analítica de fase estacionária Hexil-fenil Luna[®] 10 μ m, utilizando vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e eluição gradiente linear no modo reverso, com fase móvel constituída por MeOH e solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v): 5-100% de MeOH em 50 min ($\Delta\%/min = 1,90$), permanecendo isocrático em 100% de MeOH por 10 min; o retorno do gradiente de 100-5% de MeOH em 5 min e o condicionamento da coluna em 5% de MeOH por 30 min, que corresponde a seis vezes seu volume interno (item 6.4 do Procedimento Experimental).

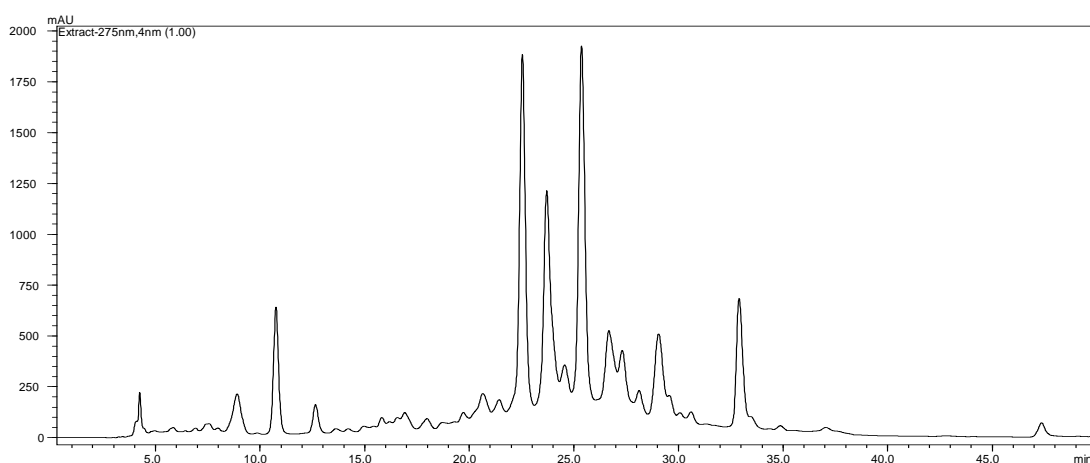


FIGURA 15. Cromatograma ($\lambda=275$ nm) do extrato aquoso liofilizado de *P. niruri* (*ExtAq 3*), após substituição da água por solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v) na fase móvel.

5.5. Validação do método analítico para o perfil cromatográfico de espécies de *Phyllanthus*

Após a otimização das condições cromatográficas de análise, foram preparados extratos (item 6.3, extração aquosa 3), a partir das amostras vegetais de *Phyllanthus* coletadas em Campinas (CPQBA/UNICAMP): *P. niruri*, *P. amarus*, *P. urinaria*, *P. stipulatus*, *P. tenellus* e *P. caroliniensis*. Foram preparados 10 (dez) extratos de cada espécie, obtendo o total de 60 amostras, que foram analisadas cromatograficamente (item 6.4).

As análises de perfis cromatográficos constituem métodos qualitativos e, para que se possam validar tais métodos, algumas figuras de mérito precisam ser avaliadas, como a repetibilidade (precisão entre análises de amostras independentemente preparadas) e a precisão de injeção^{47,121}. Com as análises obtidas a partir das replicatas de extração (n=10), avaliou-se a repetibilidade, baseado nos valores de tempo de retenção (t_r) e área de bandas cromatográficas. Além disso, uma das amostras (extrato de *P. niruri*) foi analisada em quintuplicata, para que se pudesse avaliar a precisão instrumental.

Primeiramente, foi escolhido um comprimento de onda adequado para avaliar a repetibilidade das análises, de tal forma que se representasse apropriadamente os perfis cromatográficos e as bandas neles presentes. A FIGURA 16 apresenta um cromatograma CLAE-DAD de uma das replicatas de *P. niruri*, onde está indicado o comprimento de onda 275nm, que foi selecionado para as análises comparativas entre as amostras. Nesse, a área e o tempo de retenção de bandas cromatográficas podem ser corretamente avaliados, uma vez que apresentam boa resolução e intensidade.

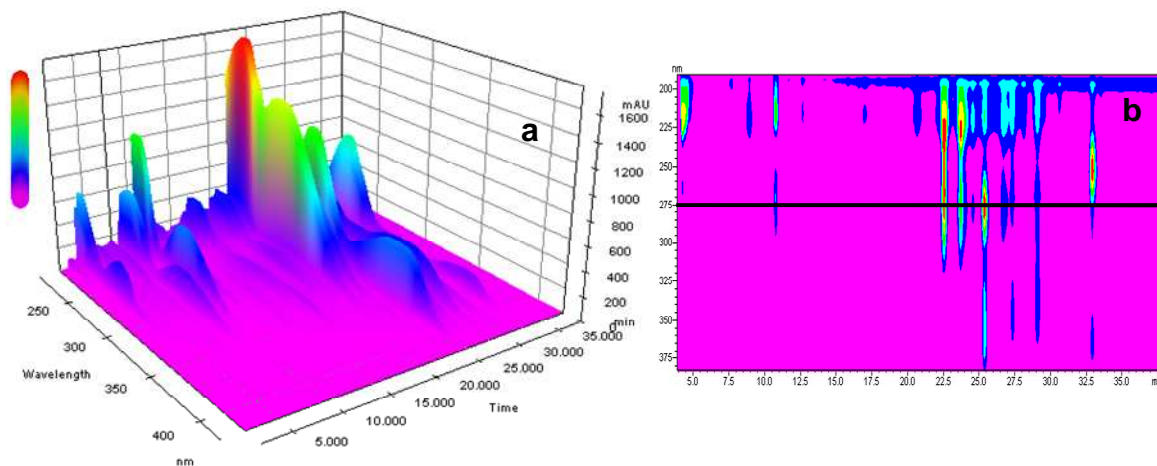


FIGURA 16. Cromatograma de extrato aquoso liofilizado de *Phyllanthus niruri*. **a.** projeção tridimensional e **b.** projeção de contornos; a linha preta indica o comprimento de onda 275nm.

A FIGURA 17 apresenta os cromatogramas referentes às análises das replicatas (n = 10). Para avaliar a repetibilidade, foram escolhidas quatro bandas cromatográficas, presentes em todas as espécies analisadas: **1** - t_r entre 10,5 e 11,5 min; **2** - t_r entre 22,3 e 23,3 min; **3** - t_r entre 25,3 e 26,3 min e **4** - t_r entre 32,5 e 34 min. Para as bandas **1** e **4**, foram considerados os valores de área e de tempo de retenção e, para as bandas **2** e **3**, apenas o tempo de retenção.

O critério estabelecido para aceitação da repetibilidade foi um coeficiente de variação menor ou igual a 15%, em acordo com o que preconiza o Guia da ANVISA, para quantificação em métodos bioanalíticos¹²⁹. De acordo com os valores da TABELA 12, os coeficientes de variação médios entre todas as análises foram 0,3 e 9,8% para os tempos de retenção e para as áreas, respectivamente. Esses valores representam tanto a variabilidade instrumental quanto a reprodutibilidade de extração e preparo de amostras.

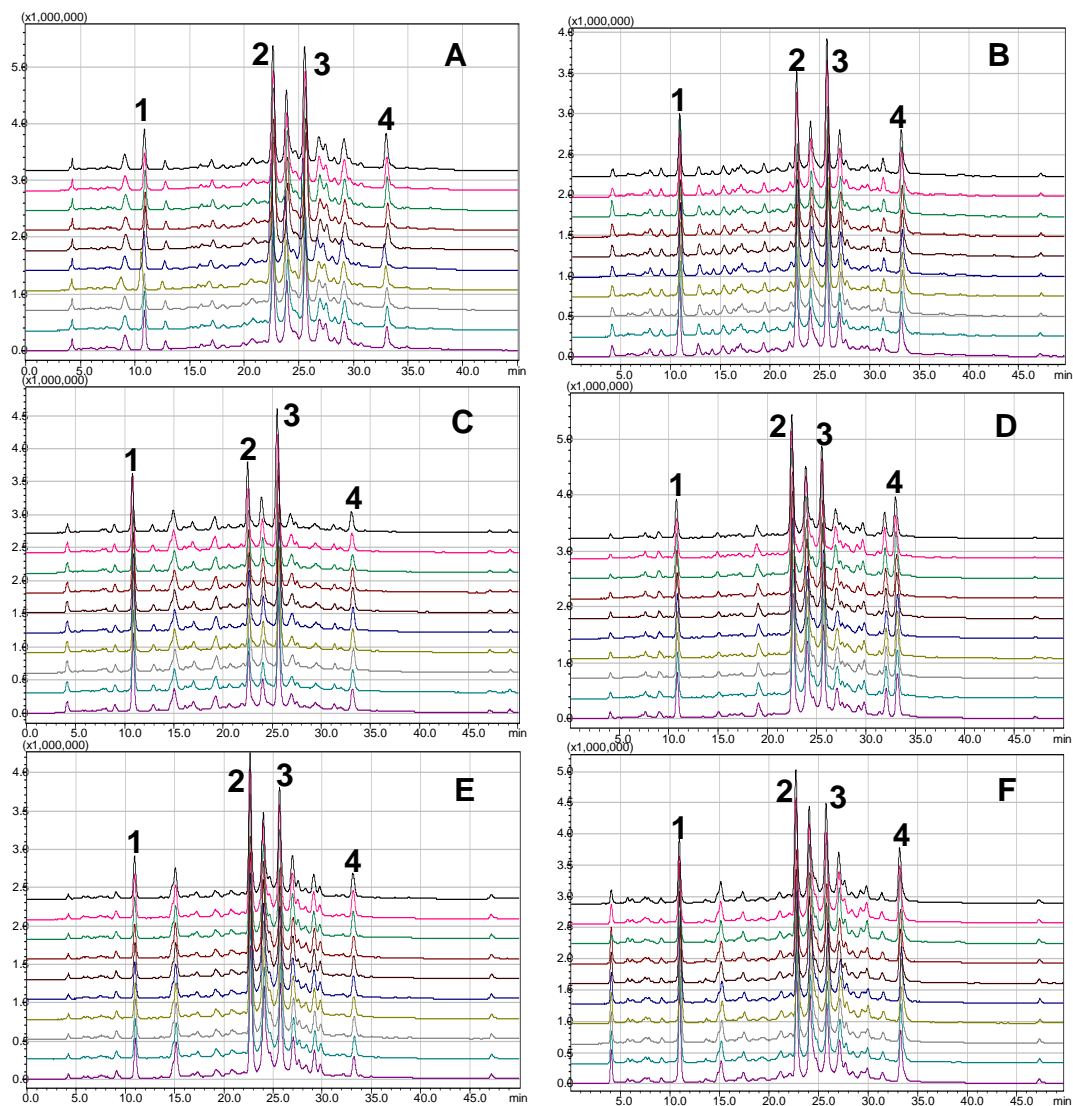


FIGURA 17. Cromatogramas sobrepostos ($\lambda=275\text{nm}$) de amostras cultivadas de *Phyllanthus* (CPQBA, coleta janeiro/2006): **A** – *P. niruri*; **B** – *P. tenellus*; **C** – *P. amarus*; **D** – *P. stipulatus*; **E** – *P. caroliniensis*; **F** – *P. urinaria*. As bandas 1 - 4 foram utilizadas para avaliar a repetibilidade do método.

TABELA 12. Valores de média e coeficiente de variação (CV) entre os tempos de retenção (t_r) e as áreas das bandas cromatográficas avaliadas nas análises de amostras de *Phyllanthus* (repetibilidade).

Espécie	banda	média (n = 10)	CV(%)
<i>P. niruri</i>	1 t_r	10,8	1,0
	área	$1,15 \times 10^7$	5,2
	2 t_r	22,6	0,4
	3 t_r	25,5	0,4
<i>P. tenellus</i>	4 t_r	33,0	0,3
	área	$1,04 \times 10^7$	14,2
	1 t_r	10,9	0,4
	área	$1,58 \times 10^7$	13,1
<i>P. amarus</i>	2 t_r	22,7	0,2
	3 t_r	25,8	0,2
	4 t_r	33,3	0,1
	área	$1,31 \times 10^7$	11,1
<i>P. stipulatus</i>	1 t_r	10,8	0,4
	área	$2,01 \times 10^7$	10,9
	2 t_r	22,6	0,2
	3 t_r	25,6	0,3
<i>P. caroliniensis</i>	4 t_r	33,1	0,2
	área	$6,80 \times 10^6$	11,7
	1 t_r	10,8	0,4
	área	$1,41 \times 10^7$	5,8
<i>P. urinaria</i>	2 t_r	22,6	0,3
	3 t_r	25,6	0,4
	4 t_r	33,1	0,2
	área	$1,62 \times 10^7$	4,9
<i>P. caroliniensis</i>	1 t_r	10,9	0,3
	área	$8,97 \times 10^6$	9,0
	2 t_r	22,7	0,2
	3 t_r	25,7	0,2
<i>P. urinaria</i>	4 t_r	33,2	0,1
	área	$5,73 \times 10^6$	10,9
	1 t_r	10,9	0,4
	área	$2,33 \times 10^7$	11,0
<i>P. urinaria</i>	2 t_r	22,8	0,3
	3 t_r	25,8	0,3
	4 t_r	33,3	0,2
	área	$2,10 \times 10^7$	9,2

A TABELA 13 apresenta os coeficientes de variação para as análises de precisão de injeção (n=5), utilizando seis bandas cromatográficas (FIGURA 18). A média dos valores obtidos foi de 0,1% para os tempos de retenção e, para as áreas, de 1,1%.

TABELA 13. Valores de média e coeficiente de variação (CV) entre os tempos de retenção (t_r) e as áreas das bandas cromatográficas avaliadas nas análises de amostra de *P. niruri* (precisão de injeção).

Banda		Média (n = 5)	CV (%)
1	t_r	10,8	0,2
	área	$1,19 \times 10^7$	0,8
2	t_r	12,9	0,2
	área	$2,45 \times 10^6$	0,8
3	t_r	22,6	0,1
4	t_r	24,1	0,1
5	t_r	25,7	0,1
6	t_r	33,2	0,1
	área	$7,33 \times 10^6$	1,7

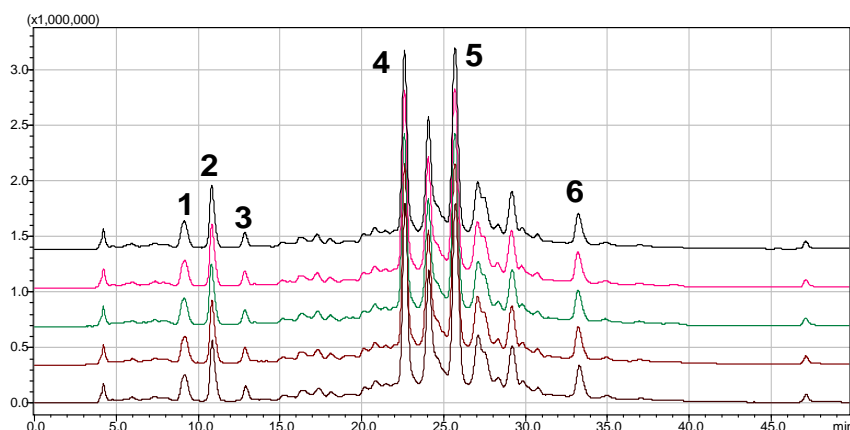


FIGURA 18. Cromatogramas ($\lambda=275\text{nm}$) de amostra de extrato aquoso liofilizado de *P. niruri* para análise da precisão de injeção (n = 5).

As figuras de mérito avaliadas (repetibilidade e precisão de injeção) demonstraram que a técnica de extração e preparo de amostra apresentam boa reprodutibilidade e que o método qualitativo de análise proposto oferece boa precisão e excelente desempenho analítico.

5.6. Análise dos extratos obtidos com amostras cultivadas em São Carlos

5.6.1. Amostras coletadas em janeiro de 2007

As espécies cultivadas no *campus* da UFSCar foram coletadas em janeiro de 2007 e os procedimentos utilizados para as amostras do CPQBA foram igualmente aplicados (item 6.2.2 e 6.3). O rendimento dos extratos de ambas as coletas foram calculados, em relação à massa de material vegetal utilizada para a

extração (3g de pó 60 mesh), conforme apresentado na TABELA 14. O método padronizado de extração apresentou rendimentos com boa reprodutibilidade, porém as amostras do CPQBA forneceram maiores quantidades de extratos que as da UFSCar, o que indica que a produção de biomassa vegetal pode ter sido influenciada por diferenças climáticas e/ou por características do solo.

TABELA 14. Valores de rendimento de extração para amostras cultivadas de *Phyllanthus* (CPQBA e UFSCar, coletadas em janeiro de 2006 e de 2007, respectivamente).

Espécies	Local					
	Campinas (n = 10)			UFSCar (n = 5)		
	Extrato (mg)	Rendimento (%)	CV (%)	Extrato (mg)	Rendimento (%)	CV (%)
<i>P. niruri</i>	578,6	19,3 ± 2,6	0,5	424,9	14,1 ± 1,0	0,3
<i>P. tenellus</i>	569,6	19,0 ± 3,5	0,6	496,7	16,6 ± 0,8	0,2
<i>P. caroliniensis</i>	716,2	23,9 ± 3,6	0,5	447,5	14,9 ± 0,6	0,1
<i>P. amarus</i>	675,5	22,5 ± 3,1	0,5	461,7	15,4 ± 0,4	0,1
<i>P. stipulatus</i>	680,4	22,7 ± 3,2	0,5	400,6	13,4 ± 0,5	0,1
<i>P. urinaria</i>	672,3	22,4 ± 4,4	0,7	-	---	-

CV = coeficiente de variação

A FIGURA 19 apresenta os cromatogramas das replicatas de extração (n= 5) para as espécies cultivadas na UFSCar e coletadas em janeiro/2007, analisadas sob as condições cromatográficas anteriormente estabelecidas (item 6.4).

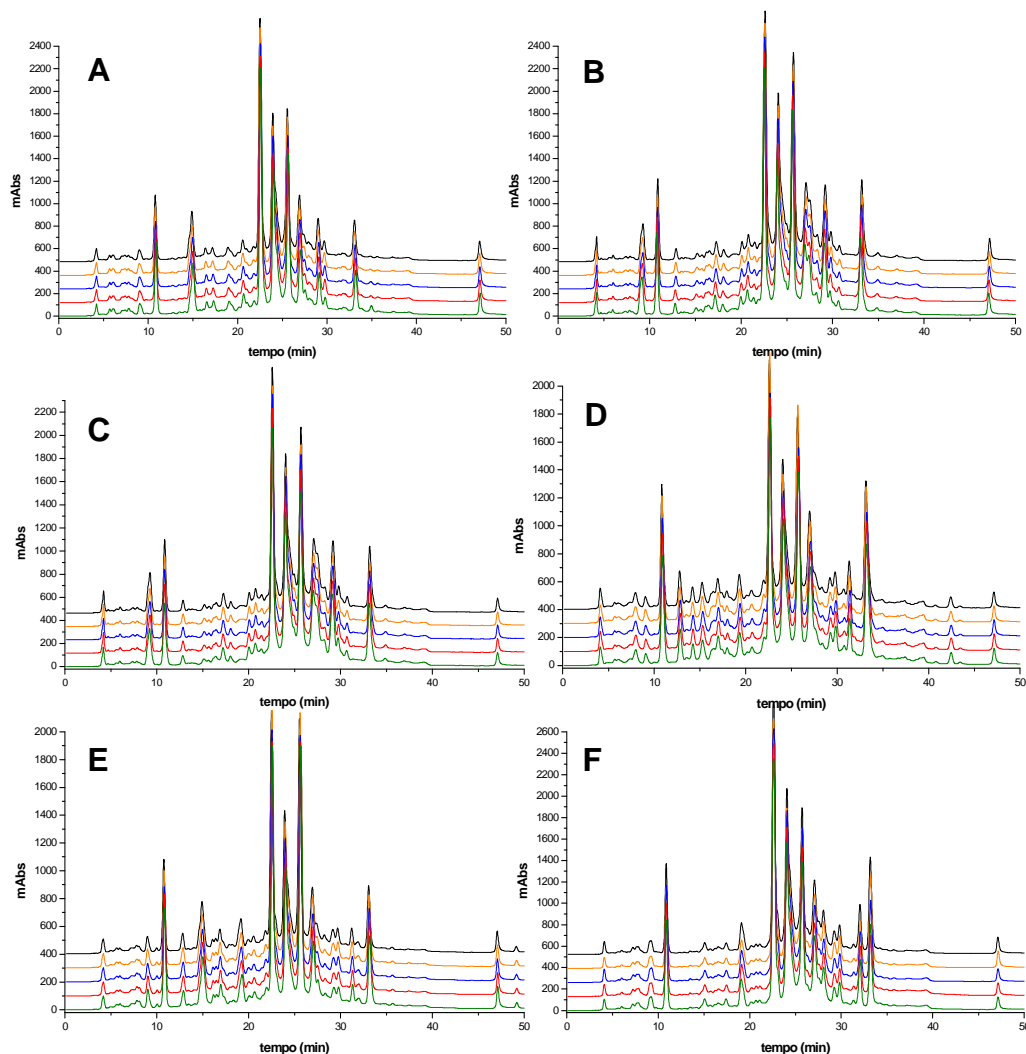


FIGURA 19. Cromatogramas sobrepostos ($\lambda=275\text{nm}$) de amostras cultivadas de *Phyllanthus* (campus da UFSCar, coleta janeiro/2007): **A** – *P. caroliniensis*; **B** - *P. niruri* (canteiro 1); **C** - *P. niruri* (canteiro 2); **D** - *P. tenellus*; **E** - *P. amarus*; **F** - *P. stipulatus*.

5.6.2. Amostras coletadas em abril e em outubro de 2007

Da mesma forma como no item anterior, as amostras coletadas em abril e em outubro de 2007 foram submetidas aos mesmos procedimentos de pulverização, extração e análise (itens 6.2.2, 6.3 e 6.4).

Os extratos preparados tiveram seus rendimentos calculados e, para essas amostras, não foi observada variação significativa na quantidade de extrato obtida, com relação às amostras coletadas em janeiro de 2007(TABELA 15). As FIGURAS 20 e 21 apresentam os cromatogramas das replicatas dos extratos de abril e outubro, respectivamente.

TABELA 15. Valores de rendimento de extração para as amostras de *Phyllanthus* cultivadas na UFSCar, coletadas em abril e em outubro de 2007.

Espécies	Época					
	Abril (n = 8)			Outubro (n = 3)		
	Extrato (mg)	Rendimento (%)	CV (%)	Extrato (mg)	Rendimento (%)	CV (%)
<i>P. niruri</i>	391,9	13,1 ± 1,6	0,4	481,6	16,1 ± 0,3	0,1
<i>P. tenellus</i>	387,5	12,9 ± 0,8	0,2	543,5	18,1 ± 0,7	0,1
<i>P. amarus</i>	467,4	15,6 ± 0,5	0,1	--	-----	--
<i>P. stipulatus</i>	495,2	16,5 ± 1,0	0,2	531,4	17,7 ± 0,3	0,1

CV = coeficiente de variação

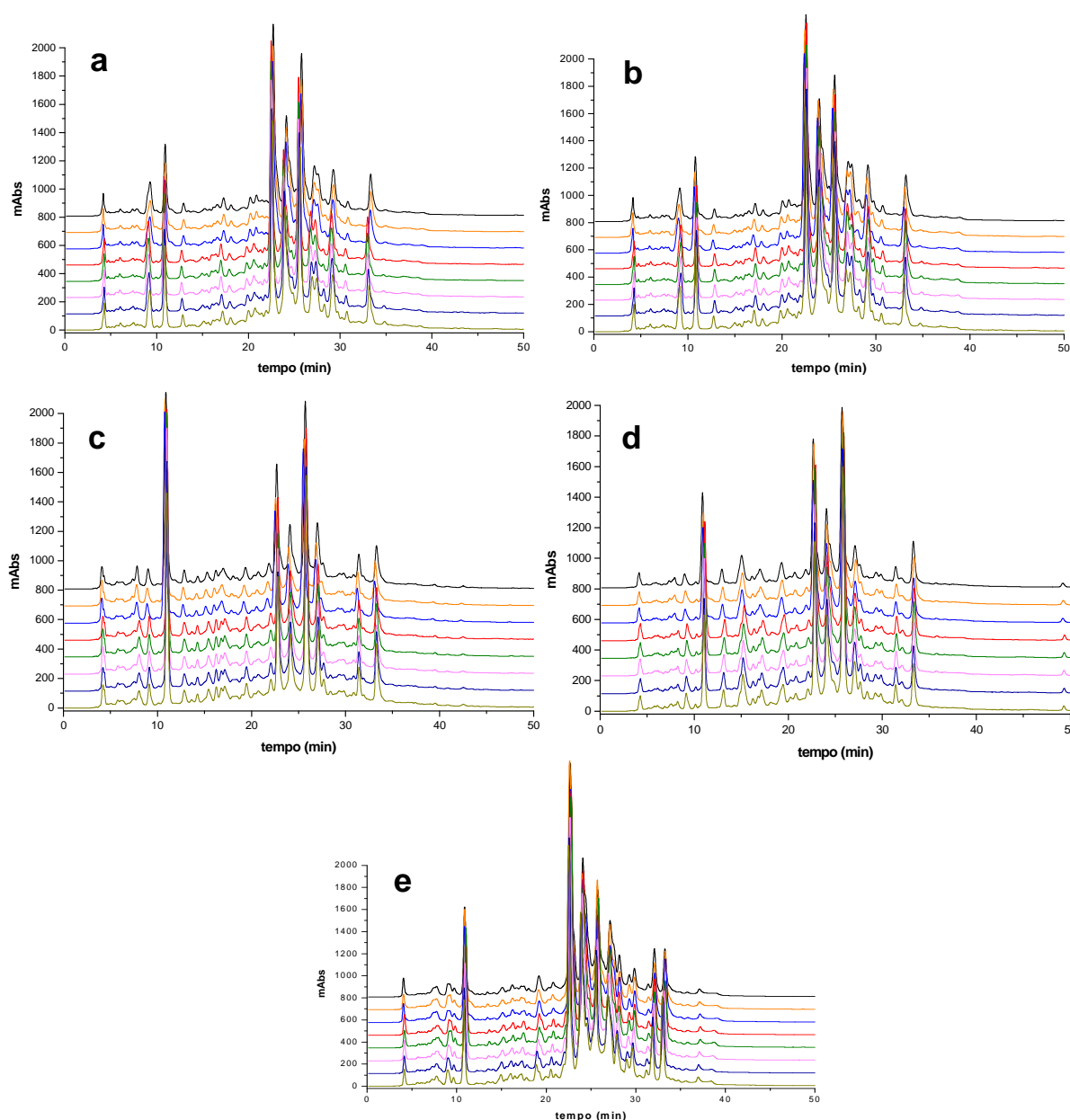


FIGURA 20. Cromatogramas sobrepostos ($\lambda=275\text{nm}$) de amostras cultivadas de *Phyllanthus* (coletadas em abril/2007): **a** - *P. niruri* (canteiro 1); **b** - *P. niruri* (canteiro 2); **c** - *P. tenellus*; **d** - *P. amarus*; **e** - *P. stipulatus*.

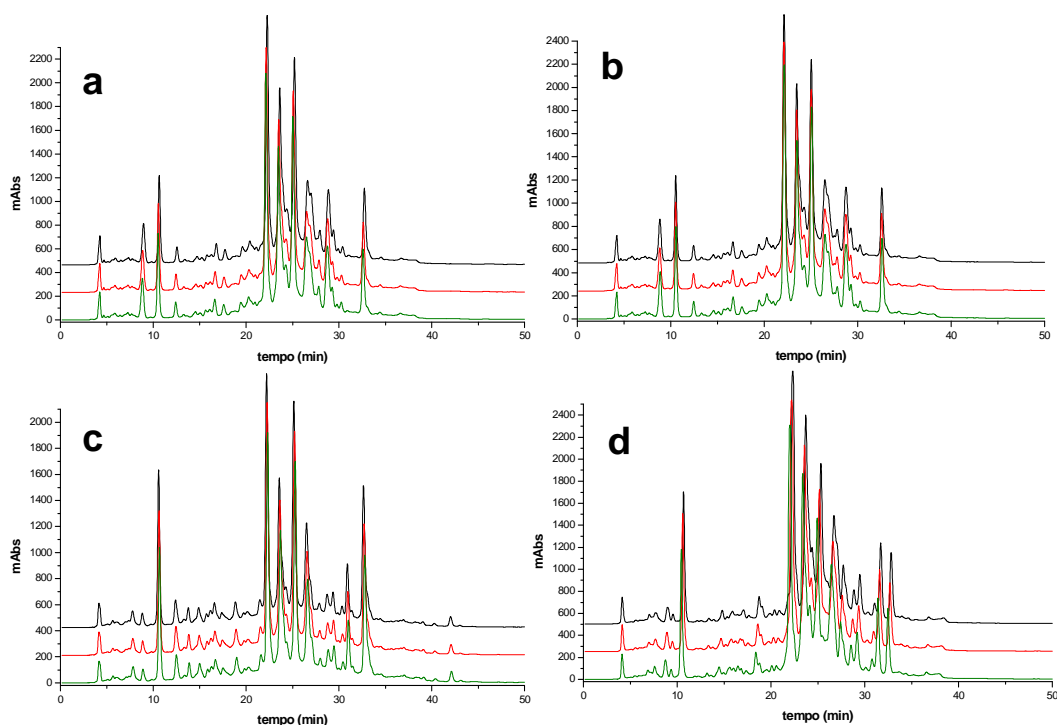


FIGURA 21. Cromatogramas sobrepostos ($\lambda=275\text{nm}$) de amostras cultivadas de *Phyllanthus* (coletadas em outubro/2007): **a** – *P. niruri* (canteiro 1); **b** - *P. niruri* (canteiro 2); **c** - *P. tenellus*; **d** - *P. stipulatus*.

5.7. Análise de amostras coletadas em municípios do estado de São Paulo

As amostras não cultivadas, coletadas em municípios do estado de São Paulo, foram processadas e seus extratos foram analisados sob as mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente para as amostras cultivadas (itens 6.2.3, 6.3 e 6.4).

Com relação aos rendimentos de extração ($n=2$), a média obtida foi de 15% (equivalente a 450 mg de extrato) para todas as amostras. Na FIGURA 22, estão apresentados os perfis cromatográficos das amostras não cultivadas, separados por espécies.

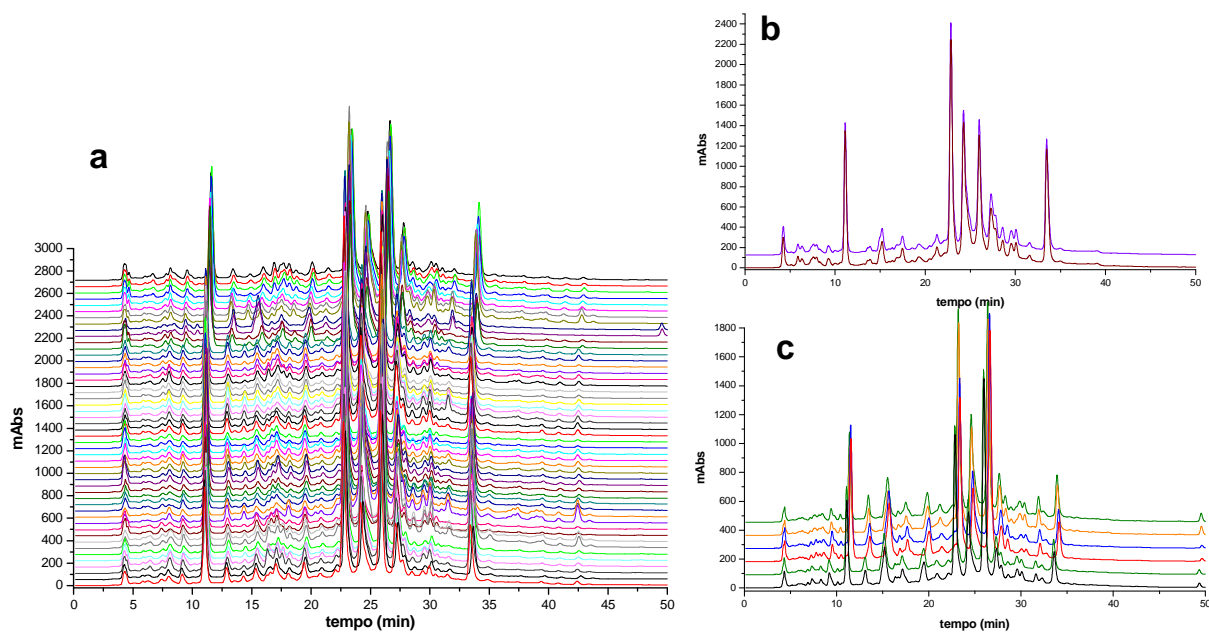


FIGURA 22 Cromatogramas sobrepostos ($\lambda=275\text{nm}$) de amostras não cultivadas de *Phyllanthus*, coletadas em municípios de São Paulo: **a** – *P. tenellus*; **b** – *P. urinaria*; **c** – *P. amarus*.

5.8. Análise de amostras comerciais

As amostras comerciais foram processadas e seus extratos preparados e analisados conforme os procedimentos descritos nos itens 6.2.4, 6.3 e 6.4. Os extratos das amostras **cap1** e **cha1-cha10** foram preparados em triplicata, enquanto as demais em duplicata. A TABELA 16 apresenta os rendimentos de extração obtidos para as amostras comerciais e a FIGURA 23, seus perfis cromatográficos.

TABELA 16. Valores de rendimento de extração para as amostras comerciais analisadas de “quebra-pedra”.

Amostra	Extrato (mg)	Rendimento (%)
Cap 1	341,1	11,4 ± 3,1
Chá 1	643,9	21,5 ± 1,0
Chá 2	177,6	5,9 ± 1,0
Chá 3	609,3	20,3 ± 1,3
Chá 4	605,2	20,2 ± 1,4
Chá 5	558,2	18,6 ± 0,5
Chá 6	388,2	12,9 ± 0,3
Chá 7	496,5	16,6 ± 1,6
Chá 8	438,4	14,6 ± 0,1
Chá 9	769,1	25,6 ± 2,3
Chá 10	511,8	17,1 ± 0,9
Chá 11	423,6	14,1 ± 1,1
Chá 12	520,9	17,7 ± 0,1
Chá 13	455,6	15,2 ± 0,1
Chá 14	520,5	17,4 ± 1,4
Chá 15	516,1	17,2 ± 0,4
Chá 16	331,5	11,1 ± 0,5
Chá 17	249,8	8,3 ± 0,4
Chá 18	395,6	13,2 ± 0,3
Chá 19	439,6	14,7 ± 1,1
Chá 20	428,1	14,3 ± 0,2
Chá 21	406,0	13,5 ± 1,27
Chá 22	295,9	9,9 ± 1,0
Chá 23	387,4	12,9 ± 0,4
Chá 24	445,4	14,8 ± 1,0

Os perfis cromatográficos das amostras comerciais são, em grande parte, visualmente muitos semelhantes àqueles obtidos a partir das amostras padrão cultivadas, com exceção das amostras **cha2** e **cha22**, que apresentam perfil cromatográfico bastante diferente dos demais (FIGURA 23).

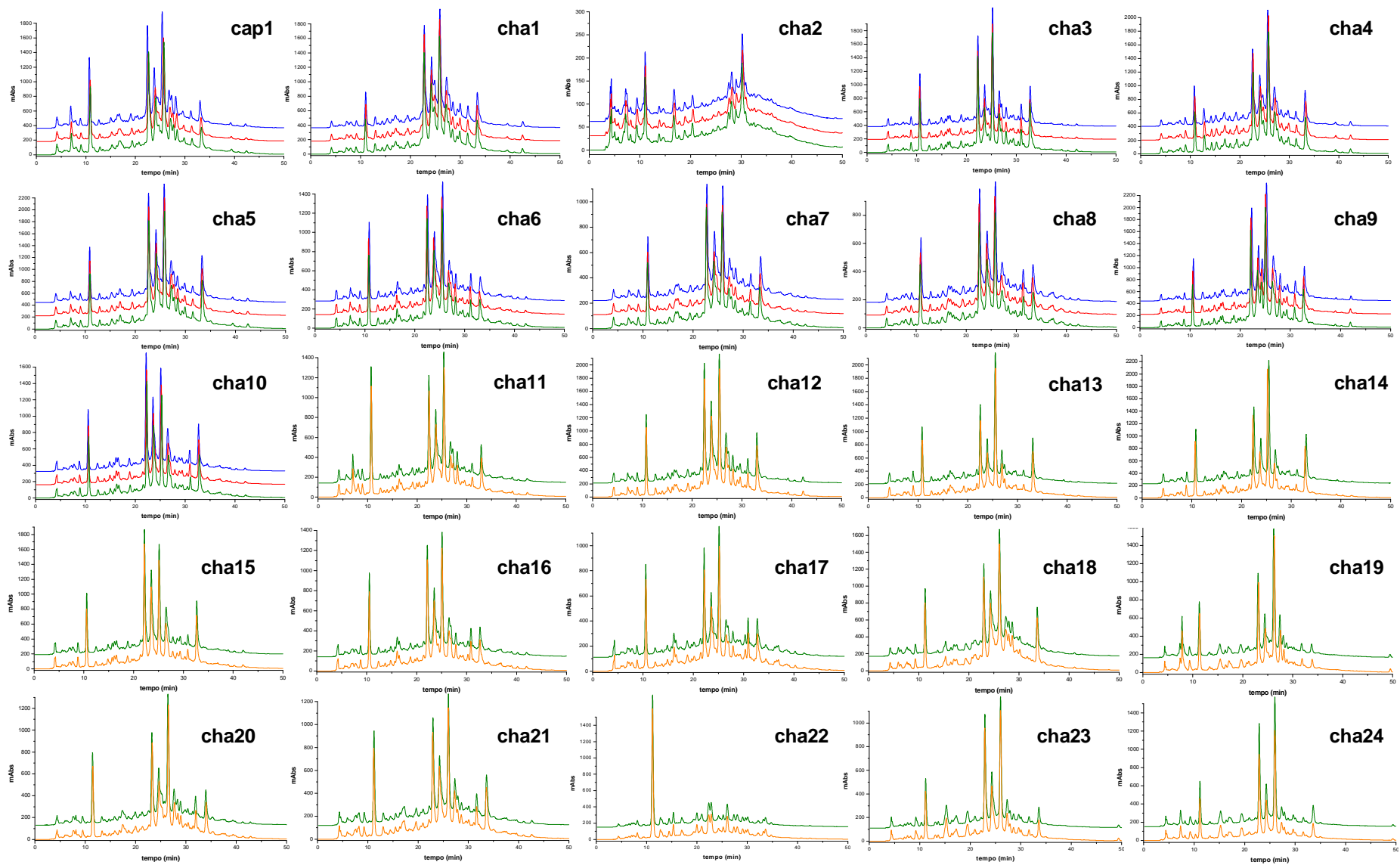


FIGURA 23. Cromatogramas ($\lambda=275\text{nm}$) das amostras comerciais de quebra-pedra

5.9. Análises Quimiométricas

5.9.1. Organização e pré-tratamento dos dados

Para as análises quimiométricas, os cromatogramas foram transformados em dados numéricos e organizados em uma matriz, na qual as linhas apresentam as amostras e as colunas, as variáveis que, em cromatografia, correspondem aos tempos de retenção.

Apenas um comprimento de onda foi utilizado para representar as amostras. Como critério de seleção, foi escolhida uma região que não apresentasse desvio de linha de base (como ocorre entre 200-215nm) e que a intensidade de grande parte das bandas cromatográficas fosse o mais homogênea possível. Outros comprimentos de onda foram avaliados (197 e 215 nm), mas o que melhor atendeu esses requisitos foi 275 nm, o mesmo utilizado na validação do método cromatográfico (FIGURA 24).

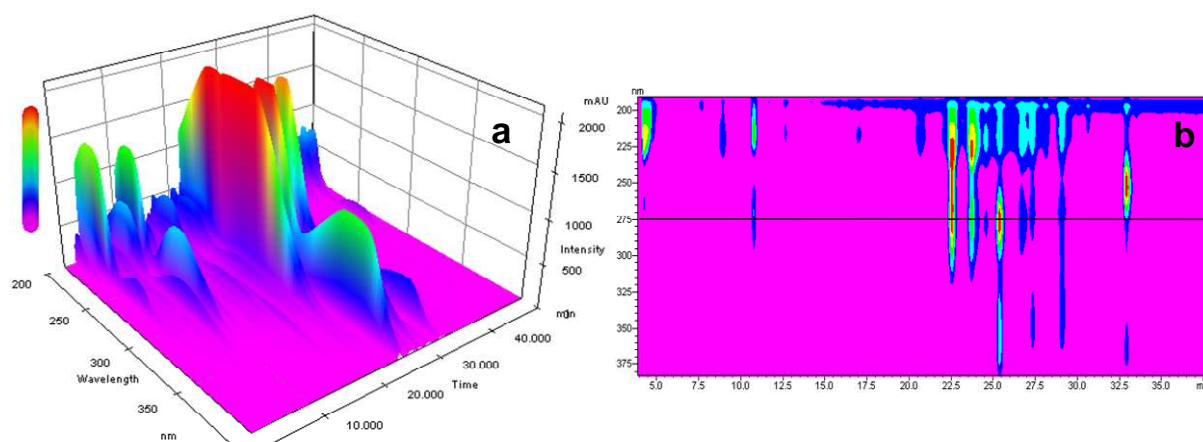


FIGURA 24. Cromatograma tridimensional (a) de amostra da espécie *P. niruri*, indicando o comprimento de onda selecionado (275nm) para as análises quimiométricas (b).

Os cromatogramas das amostras cultivadas de *Phyllanthus*, consideradas como padrões de referência, foram utilizados para compor a primeira matriz de dados numéricos, que consiste de:

- espécies cultivadas em Campinas (*P. niruri*, *P. tenellus*, *P. amarus*, *P. urinaria* e *P. caroliniensis*), coletadas em janeiro/06, que totalizam 60 amostras (10 replicatas para cada espécie) e

- espécies cultivadas no *campus* da UFSCar (*P. niruri*, *P. tenellus*, *P. amarus*, *P. stipulatus* e *P. caroliniensis*), coletadas em janeiro, abril e outubro de 2007 que, considerando suas replicatas, totalizam 82 amostras.

Sendo assim, a matriz (**X**) das amostras “padrão” apresentou 142 linhas e 4675 colunas, ou seja, $\mathbf{X} = [142 \ 4675]$. Esse conjunto de dados foi, inicialmente, submetido ao processo de alinhamento, conforme descrito a seguir.

5.9.1.1. Alinhamento dos perfis cromatográficos

Os cromatogramas da matriz **X** foram submetidos ao alinhamento, de acordo com o método proposto por Skov et al¹¹³. Esse método pressupõe a existência de uma amostra de referência, a partir da qual as demais serão alinhadas, e que deve apresentar um elevado índice de similaridade com relação ao conjunto total de amostras. Desta forma, a seleção da amostra de referência foi realizada conforme o seguinte procedimento:

a) os cromatogramas foram separados por espécie formando, portanto, 6 matrizes distintas, nas quais o índice de similaridade foi calculado e uma das amostras foi selecionada como referência para cada espécie;

b) as amostras selecionadas foram reunidas em uma nova matriz ($\mathbf{X} = [6 \ 4675]$) e o procedimento anterior foi repetido, obtendo-se assim uma amostra como referência geral para todo o conjunto de dados.

A amostra selecionada foi uma das replicatas da espécie *Phyllanthus amarus* (cultivada no *campus* da UFSCar e coletada em abril/07) (FIGURA 25).

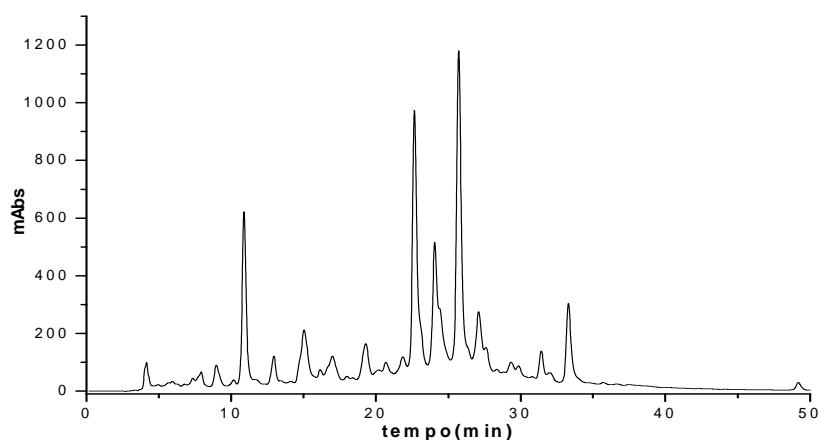


FIGURA 25. Cromatograma ($\lambda = 275\text{nm}$) da amostra de *P. amarus*, selecionada como referência para o alinhamento.

Em alguns casos, pode-se realizar uma redução do número de variáveis, tornando o conjunto de dados menores e os cálculos computacionais, mais rápidos. Entretanto, para o alinhamento de cromatogramas, a redução do número de variáveis pode resultar em distorções nas formas e áreas das bandas e, por isso, sua utilização deve ser criteriosamente avaliada. Neste trabalho, esse recurso matemático não foi aplicado.

Para a otimização dos parâmetros de alinhamento, foi utilizada a matriz de dados \mathbf{X} , contendo 6 amostras (as referências) e 4675 variáveis ([6 4675]). Inicialmente, foram utilizados intervalos amplos para os valores de \underline{m} (*segment length*) e \underline{t} (*slack size*) e, à medida que os resultados eram obtidos, intervalos menores foram utilizados, até que seus valores convergissem. De acordo com esse procedimento, os valores 375 e 152 foram obtidos para \underline{m} e \underline{t} , respectivamente.

Desta forma, os cromatogramas da matriz $\mathbf{X} = [142 \ 4675]$ foram alinhados através do algoritmo COW (*Correlation Optimized Warping*), utilizando segmentos de tamanho 375 e grau de flexibilidade 152. A FIGURA 26 apresenta os cromatogramas da matriz \mathbf{X} , antes e após o alinhamento.

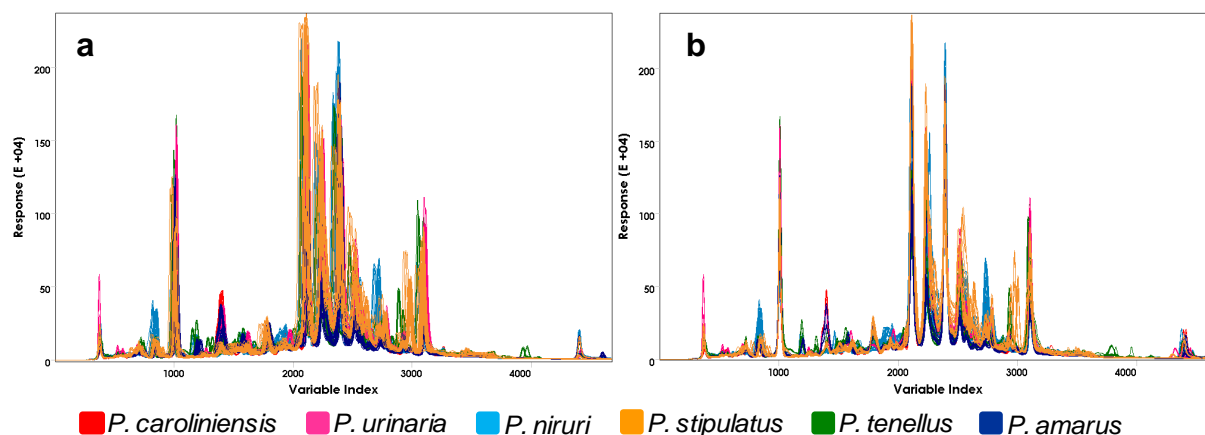


FIGURA 26. Cromatogramas sobrepostos ($\lambda=275$ nm) de amostras cultivadas de espécies de *Phyllanthus* antes (a) e após o alinhamento (b).

5.9.2. Análise Exploratória das amostras cultivadas

Em uma Análise Exploratória, é necessário verificar a necessidade de realizar o pré-tratamento dos dados, que pode ser aplicado tanto nas amostras, quanto nas variáveis. Um dos tipos de pré-tratamento mais comum em dados de cromatografia é a normalização que, de acordo com Brereton, é bastante útil quando

as concentrações absolutas das substâncias presentes nas amostras não podem ser facilmente controladas, mas a proporção dos compostos químicos pode ser medida¹⁰⁷.

Existem vários tipos de normalizações, que consistem na divisão de cada variável de uma amostra por um valor constante. A normalização pela área é uma das opções mais utilizada em dados cromatográficos¹³⁰ e, neste caso, cada variável é dividida por um fator de normalização, que corresponde à soma dos valores absolutos de todas as variáveis da amostra, conforme a equação:

$$X_{ij(norm)} = \frac{X_{ij}}{\sum_{j=1}^J X_{ij}}$$

Ao realizar esse procedimento, a escala das intensidades é modificada, porém as características originais e a proporção das bandas cromatográficas são mantidas (FIGURA 27).

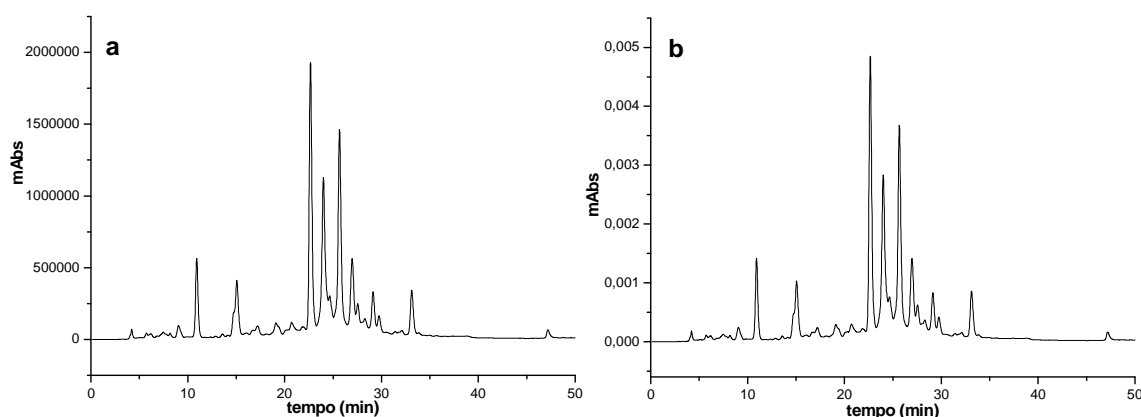


FIGURA 27. Cromatograma ($\lambda=275\text{nm}$) de amostra de *P. caroliniensis* antes (a) e após (b) a normalização.

Na grande maioria das análises quimiométricas, faz-se necessário algum tipo de pré-processamento. Os métodos mais comuns são a centragem dos dados na média e o autoescalamento, sendo este utilizado quando se deseja atribuir a mesma importância a todas as variáveis. Em perfis cromatográficos por CLAE-DAD, a intensidade relativa das bandas está relacionada à absorvidade das substâncias nela presentes (natureza dos cromóforos) e, também, à concentração. Por essa razão, as bandas de pequena intensidade precisam ser consideradas na mesma proporção que as demais, uma vez que as amostras podem se distinguir exatamente através delas.

Desta forma, as análises quimiométricas dos dados cromatográficos apresentados neste trabalho foram realizadas com normalização dos dados pela área e com pré-processamento autoescalado.

5.9.2.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

Na PCA, é necessário estabelecer o número de Componentes Principais (PC's) necessários para descrever a maior variação do conjunto de dados; esse valor é denominado "posto químico" e é selecionado através do gráfico de Seleção de Fatores. Um critério para seleção do posto químico é o valor a partir do qual a variância explicada segue um declínio pouco acentuado (queda monotônica). Na análise PCA da matriz **X**, foram selecionadas 5 PC's, que correspondem a 64,7% da variação total dos dados. Através da FIGURA 28, é possível notar que a PC1 é responsável por 30,2% da variância original dos dados, já a PC2, PC3, PC4 e PC5 são relacionadas com 12,7, 9,5, 7,4 e 4,9%, respectivamente. Após a PC5, a variância explicada apresenta uma diminuição pouco acentuada e, desta forma, foram escolhidas as 5 primeiras PC's. Os dados originais (matriz **X** [142 4675], ou seja, 4675 dimensões) podem agora ser interpretados em um número reduzido de dimensões e em um sistema menos complexo.

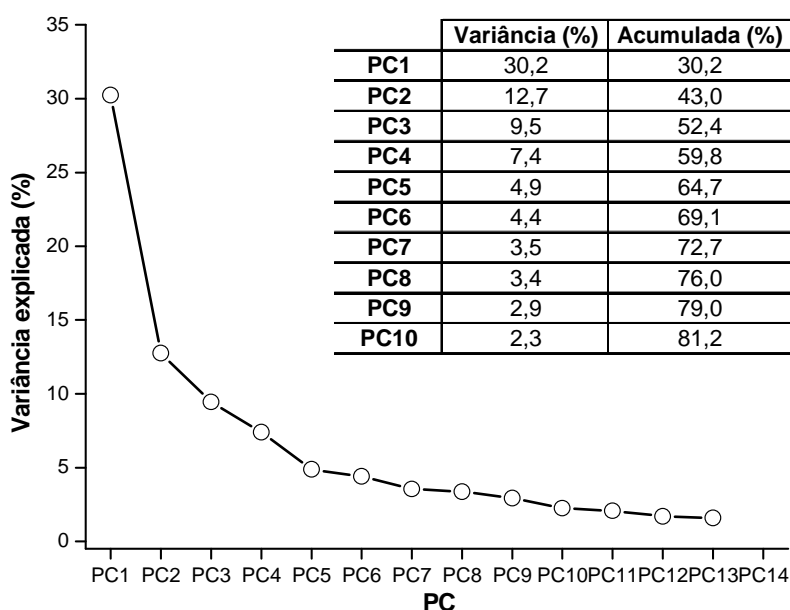


FIGURA 28. Análise de Componentes Principais da matriz **X**. Gráfico de seleção de fatores pela percentagem de variância.

A projeção das amostras no novo sistema de eixos (PC's) é visualizada através do gráfico de escores (FIGURA 29), no qual pode-se perceber que as amostras formam grupos, de acordo com as espécies a que pertencem. Isso demonstra que os perfis cromatográficos, embora sejam visualmente bastante semelhantes, apresentam características que distinguem as amostras nas seis espécies de *Phyllanthus* cultivadas, independentemente do local de cultivo ou época de coleta. A importância (peso) de cada variável na descrição dos eixos (PC's) é apresentada no gráfico de loadings (FIGURA 30). Como as variáveis foram autoescaladas, os tempos de retenção têm influência homogênea na explicação da variabilidade dos dados. Entretanto, observando a FIGURA 30, nota-se que alguns tempos de retenção apresentam valores de loadings muito próximos de zero (por exemplo, os primeiros tempos de retenção). Estas variáveis com valores pequenos de loadings não influenciam na análise exploratória dos dados.

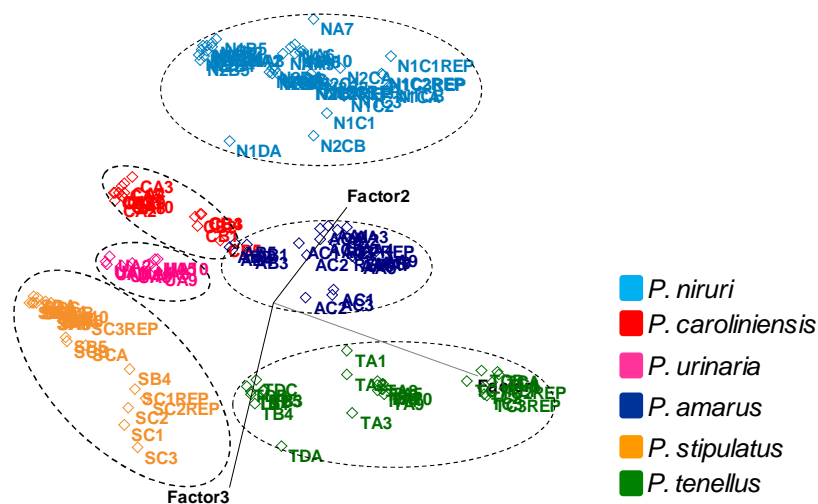


FIGURA 29. Análise PCA da matriz X. Gráfico de escores PC1(30,2%)xPC2 (12,7%)xPC3(9,5%).

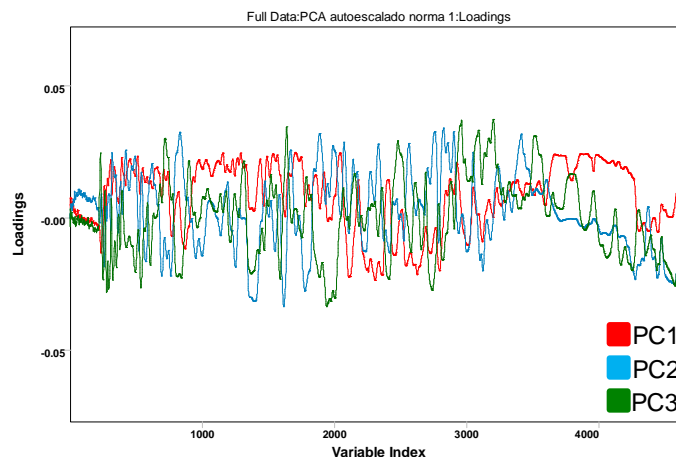


FIGURA 30. Análise PCA da matriz X. Gráfico de loadings (pesos) das variáveis em PC1, PC2 e PC3.

5.9.2.2. Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA)

A análise HCA é uma técnica aglomerativa, que calcula a distância Euclidiana entre as amostras hierarquicamente, formando grupos que se correlacionam pelo índice de similaridade ($0 < \textit{similaridade} < 1$), de tal forma que amostras semelhantes (mais próximas) formarão grupos com maior similaridade que outras. Os grupos podem ser unidos por diferentes métodos de ligação, tais como: simples, completo, centróide, etc. Neste trabalho, o método escolhido foi o “incremental” ou método de Ward, que calcula a soma dos quadrados das distâncias entre o elemento central médio de cada grupo.

As amostras são projetadas em um gráfico bidimensional denominado dendrograma, para que possam ser analisadas. Na FIGURA 31 pode-se observar que três grandes grupos se diferenciam por índice de similaridade bastante pequeno (0,270).

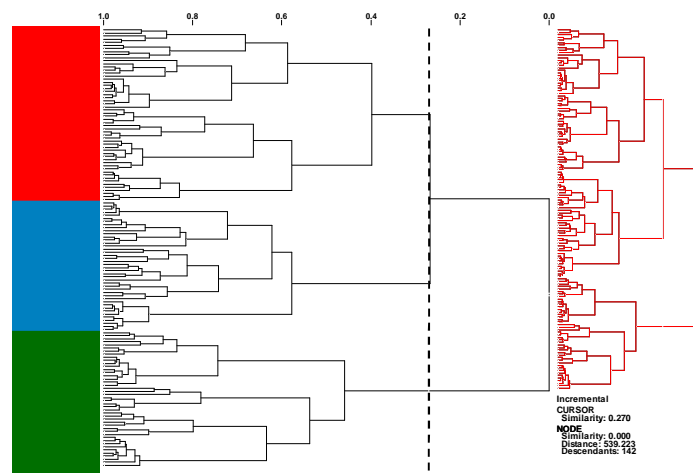


FIGURA 31. Análise HCA da matriz X. Dendrograma de todas as amostras.

Na HCA, normalmente a distribuição dos grupos ocorre com a mesma tendência que na PCA, de tal forma que uma comparação entre ambas pode ser feita. Desta forma, as amostras da espécie *P. stipulatus* formam um grupo bem definido na região superior do dendrograma (similaridade = 0,586), da mesma forma como observado no gráfico de escores (PC1 x PC3) (FIGURA 32).

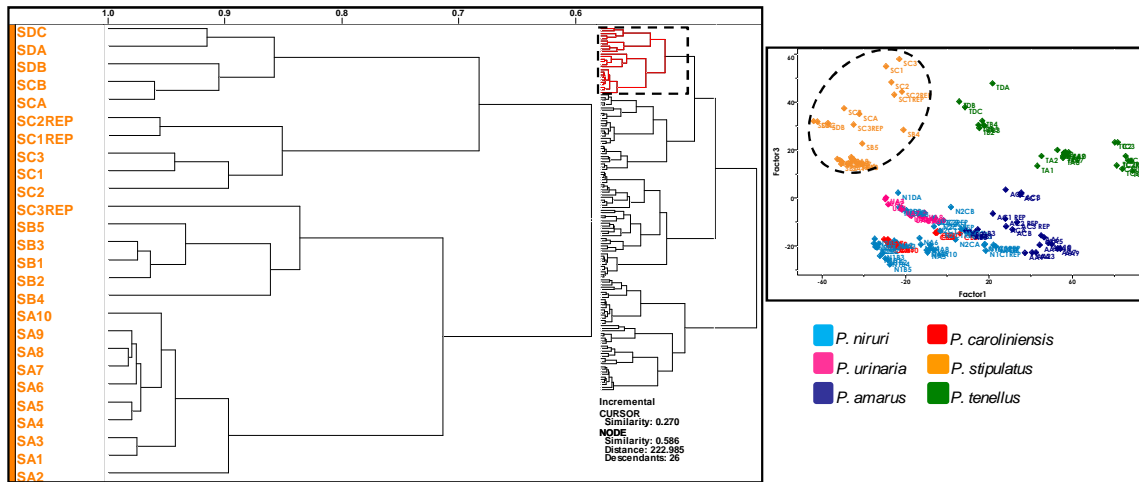


FIGURA 32. Análise HCA da matriz **X**. Dendrograma das amostras de *P. stipulatus* e sua comparação com o gráfico de escores da PCA (PC1 x PC3).

Na região intermediária do dendrograma, há um grupo com similaridade de 0,578. Nele, três grupos menores se distinguem, com similaridade de 0,664, nos quais encontram-se as amostras de *P. urinaria*, *P. caroliniensis* e algumas amostras de *P. amarus*. As amostras de *P. caroliniensis* cultivadas no *campus* da UFSCar (amostras CB) formam um grupo com as amostras de *P. amarus* cultivadas no mesmo local e coletadas na mesma época (amostras AB). Essa proximidade também pode ser constatada no gráfico de escores (PC1 x PC2) (FIGURA 33). Embora aparentemente ocorra essa “mistura” entre as espécies *P. amarus* e *P. caroliniensis*, a projeção em três eixos nos mostra que essas duas espécies podem ser discriminadas entre si (FIGURA 29).

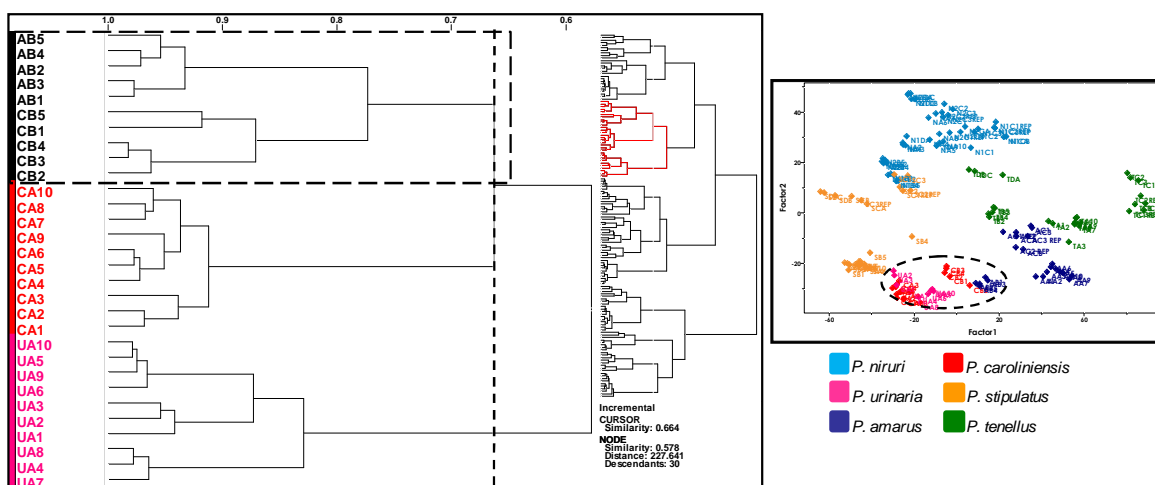


FIGURA 33. Análise HCA da matriz **X**. Dendrograma das amostras da região intermediária e sua comparação com o gráfico de escores da PCA (PC1 x PC2).

Na região central do dendrograma, encontram-se as amostras de *P. niruri*, que formam um grupo único com similaridade 0,577. Na porção inferior, as amostras de *P. tenellus* e grande parte das *P. amarus* formam um grupo com similaridade 0,460. Essa distribuição pode ser analogamente observada em PC1 x PC2 (FIGURA 34).

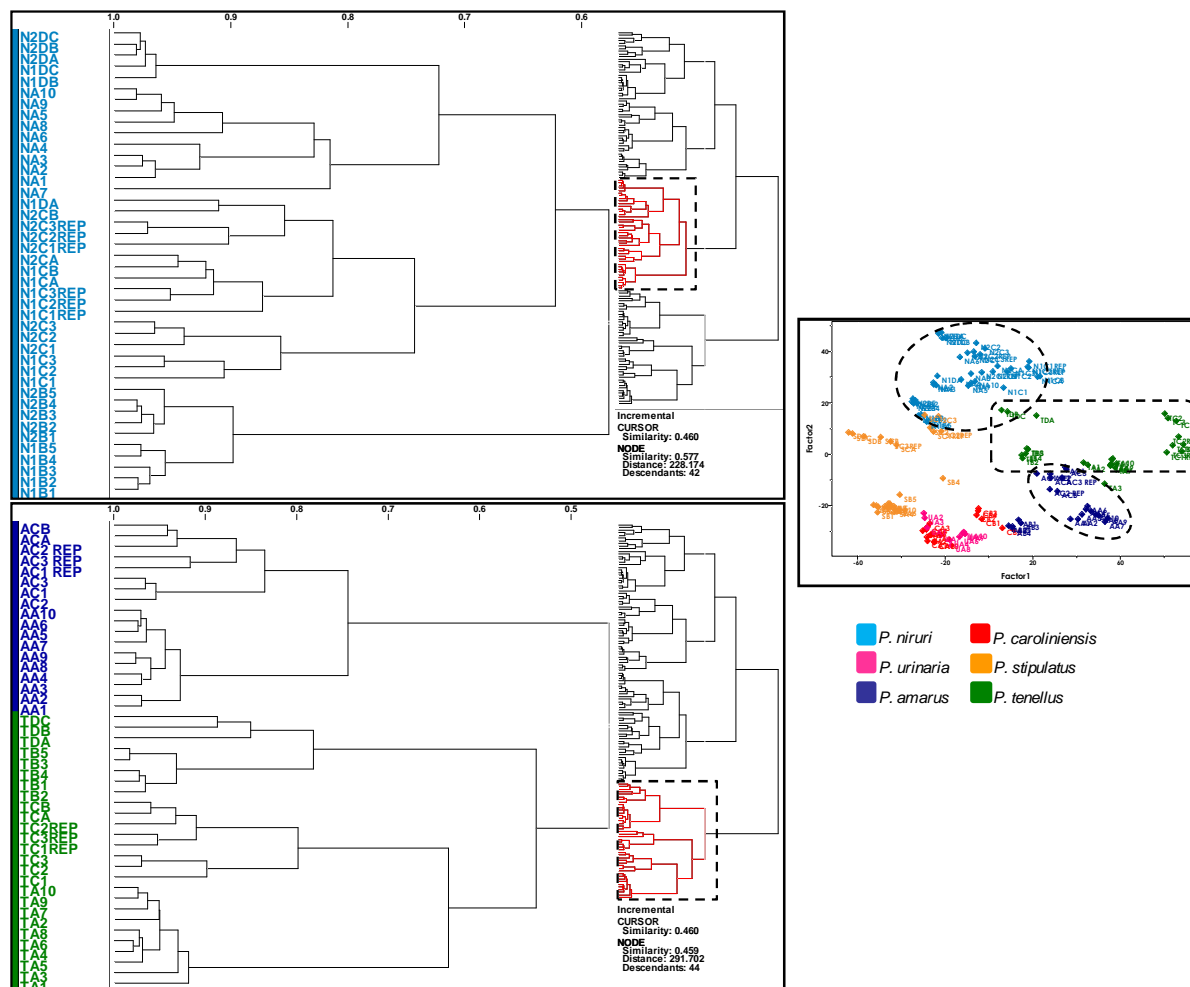


FIGURA 34. Análise HCA da matriz X. Dendrograma das amostras de *P. niruri* e da região inferior (*P. tenellus* e *P. amarus*) e sua comparação com o gráfico de escores da PCA (PC1 x PC2).

Baseado nos resultados das Análises Exploratórias, modelos de classificação foram elaborados e aplicados na verificação de semelhanças e diferenças com relação às amostras não cultivadas.

5.9.3. Modelos de Classificação

Os modelos de classificação foram elaborados a partir das amostras cultivadas, que constituem o conjunto de calibração, na qual cada espécie corresponde a uma classe. Porém, após sua construção, os modelos precisam ser avaliados quanto ao seu desempenho, ou seja, a habilidade de classificar corretamente amostras por eles desconhecidas. Para isso, as amostras são divididas em dois grupos: um conjunto de treinamento, com o qual os modelos são construídos, e um conjunto de validação, que é formado por algumas amostras de cada classe (espécie) e que se submete à previsão dos modelos. A constatação de que as amostras do conjunto de validação são classificadas corretamente indica que os modelos são adequados e podem ser aplicados a outros conjuntos de amostras.

O conjunto de amostras padrão (142 no total) foi dividido em dois grupos: conjunto de treinamento, contendo 130 amostras, e conjunto de validação, com 12 amostras aleatoriamente selecionadas, sendo três da espécie *P. niruri*, uma *P. urinaria* e duas de cada espécie: *P. amarus*, *P. tenellus*, *P. stipulatus* e *P. caroliniensis*.

Da mesma forma como na Análise Exploratória, os modelos de classificação foram elaborados com os dados normalizados e autoescalados.

5.9.3.1. KNN (K^{th} Nearest Neighbor)

O modelo KNN foi elaborado pelo cálculo da distância Euclidiana entre as amostras. Seu desempenho com relação à classificação do conjunto de treinamento pode ser analisado pelo gráfico de Total de Erros (FIGURA 35), no qual se verifica que nenhuma amostra é classificada erroneamente com até 15 vizinhos.

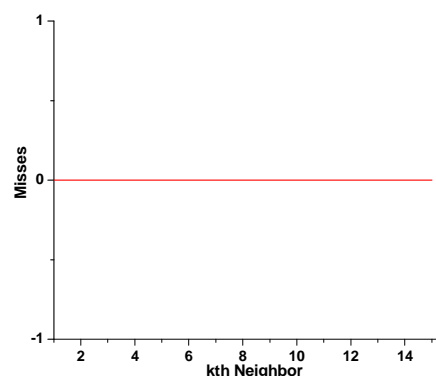


FIGURA 35. Modelo de classificação KNN. Gráfico de Total de erros.

Na aplicação desse modelo, normalmente utiliza-se o menor número de vizinhos para a classificação de amostras desconhecidas. Para o conjunto de validação, o modelo KNN classificou corretamente todas as amostras com apenas um vizinho mais próximo.

5.9.3.2. SIMCA (*Soft Independent Modelling of Classe Analogy*)

No modelo SIMCA, uma análise de Componentes Principais é realizada para cada classe (espécie). O número de fatores (PC's) é estabelecido individualmente e, a partir deles, são construídas hipercaixas que envolvem as amostras, com um grau de confiança selecionado. A classificação das amostras se dá pela sua projeção nos escores do modelo e pela distância entre cada classe, de tal forma que podem ser classificadas em mais de uma classe (quando elas se sobrepõem) ou em nenhuma delas (quando a amostra está fora das hipercaixas). É importante salientar que, diferentemente do KNN, o SIMCA fornece modelos probabilísticos de classificação. No presente trabalho, o grau de confiança escolhido foi de 95%.

A seleção do posto químico para as classes foi feita utilizando o menor número de fatores que explicasse a variação mais significativa para cada uma delas. Desta forma, as classes com maior dispersão das amostras precisaram de maior número de PC's que as outras (TABELA 17). A construção do modelo pode ser visualizada no gráfico de projeção das classes (FIGURA 36A). As amostras do conjunto de validação foram todas corretamente classificadas, como pode ser observado na FIGURA 36B, onde o eixo *y* apresentar a melhor classe para cada uma das amostras.

TABELA 17. Seleção de fatores (PC) para as classes do modelo SIMCA.

classe	espécie	PC	variância acumulada (%)
1	<i>P. caroliniensis</i>	2	88,3
2	<i>P. niruri</i>	5	81,9
3	<i>P. tenellus</i>	4	91,5
4	<i>P. urinaria</i>	2	90,5
5	<i>P. amarus</i>	2	80,2
6	<i>P. stipulatus</i>	3	80,4

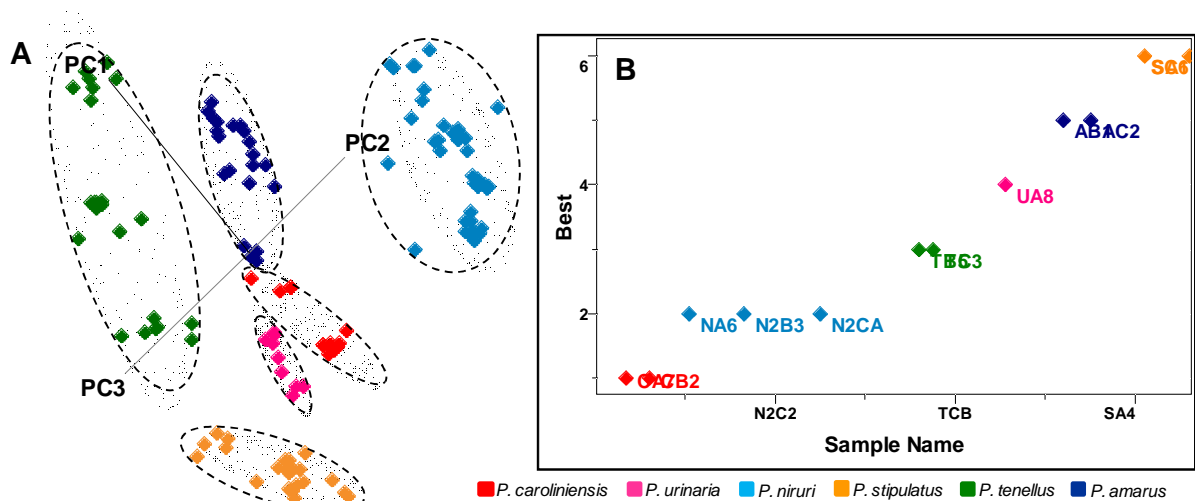


FIGURA 36. Modelo de classificação SIMCA. Gráfico de projeção das classes (A) e classificação das amostras do conjunto de validação (B).

5.9.3.3. PLS-DA (*Partial Least Square for Discriminant Analysis*)

O modelo PLS-DA é estabelecido a partir de uma regressão entre as amostras que pertencem a uma classe (espécie), às quais se confere o valor 1, e as demais, que recebem o valor zero. A partir dessa atribuição, são calculados os mínimos quadrados parciais entre os escores das variáveis independentes (valores da matriz X) e as variáveis dependentes (atribuição das classes).

O modelo PLS-DA normalmente é submetido ao procedimento de validação cruzada, que consiste em avaliar a magnitude dos erros quando se subtrai amostras do conjunto de treinamento sistematicamente, de tal forma que, a cada retirada de uma amostra, a mesma é submetida à classificação pelo modelo construído com as demais, até que todas as amostras tenham sido testadas.

Para cada classe, a seleção de fatores é feita considerando a construção de regressões com baixo resíduo e coeficientes de correlação adequados à modelagem das amostras (TABELA 18). A FIGURA 37 apresenta, como exemplo, o gráfico de seleção de fatores para a espécie *P. stipulatus* e a regressão obtida para esta classe. Para o conjunto de validação, o modelo classificou corretamente todas as amostras.

TABELA 18. Seleção de fatores (PC) para as classes do modelo PLS-DA.

Classe	espécie	PC	SEV	PRESS Val	rVal
1	<i>P. caroliniensis</i>	3	0,123	1,951	0,913
2	<i>P. niruri</i>	2	0,086	0,965	0,982
3	<i>P. tenellus</i>	2	0,114	1,683	0,956
4	<i>P. urinaria</i>	3	0,084	0,913	0,944
5	<i>P. amarus</i>	3	0,106	1,459	0,958
6	<i>P. stipulatus</i>	3	0,088	1,000	0,974

PRESS Val = soma dos quadrados dos resíduos de validação; **SEV** = raiz quadrada de PRESS Val, com $n = 130$; **rVal** = coeficiente de correlação da regressão.

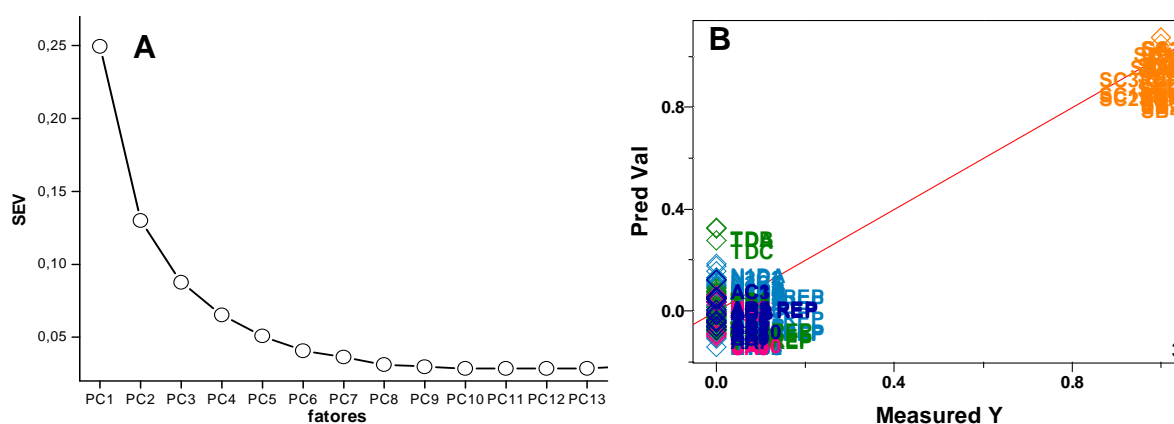


FIGURA 37. Seleção de fatores para a classe 6 (*P. stipulatus*) no modelo PLS-DA (A) e regressão obtida para a classe (B).

Os três modelos de classificação propostos apresentaram desempenhos adequados e, em virtude disso, foram utilizados para a classificação das amostras não cultivadas de *Phyllanthus*, com o intuito de:

1 – avaliar se os modelos são aptos a classificar corretamente amostras por eles desconhecidas que, embora sejam autênticas (pois foram identificadas botanicamente), são provenientes de diferentes localidades;

2 – verificar a distribuição das amostras em um conjunto de maior variabilidade quanto à origem

3 – propor novos modelos de classificação, que contemplem amostras cultivadas e não cultivadas, para a análise quimiométrica de amostras comerciais.

A classificação das amostras não cultivadas foi realizada a partir de modelos construídos com todas as amostras padrão, ou seja, os conjuntos de treinamento e validação foram unificados e os parâmetros dos modelos, tais como

seleção de fatores e número de vizinhos, foram reavaliados, de acordo com os mesmos critérios anteriormente descritos (TABELA 19).

TABELA 19. Parâmetros dos modelos de classificação elaborados com todas as amostras padrão cultivadas*.

Modelo	Parâmetros					
KNN	k** = 1; classificação correta de todas as amostras com até 15 vizinhos.					
SIMCA	classe	espécie	PC	variância acumulada (%)		
	1	<i>P. caroliniensis</i>	3	92,4		
	2	<i>P. niruri</i>	5	82,1		
	3	<i>P. tenellus</i>	4	91,5		
	4	<i>P. urinaria</i>	2	91,4		
	5	<i>P. amarus</i>	3	86,5		
	6	<i>P. stipulatus</i>	3	80,8		
PLS-DA	classe	espécie	PC	SEV	PRESS Val	rVal
	1	<i>P. caroliniensis</i>	3	0,123	2,147	0,916
	2	<i>P. niruri</i>	2	0,084	1,004	0,983
	3	<i>P. tenellus</i>	2	0,112	1,770	0,957
	4	<i>P. urinaria</i>	3	0,082	0,954	0,947
	5	<i>P. amarus</i>	3	0,104	1,543	0,959
	6	<i>P. stipulatus</i>	3	0,082	0,948	0,977

*matriz **X** = [142 4675]; **k = número de vizinhos; **PRESS Val** = soma dos quadrados dos resíduos de validação; **SEV** = raiz quadrada de PRESS Val, com n = 142; **rVal** = coeficiente de correlação da regressão.

5.9.4. Análise de amostras não cultivadas

As amostras não cultivadas de *Phyllanthus* compuseram uma nova matriz de dados, contendo 56 linhas (amostras) e 4675 colunas (variáveis). Essa matriz foi submetida ao mesmo procedimento de alinhamento de bandas cromatográficas anteriormente descrito, utilizando o algoritmo COW com segmentos de tamanho 375 e grau de flexibilidade 152, utilizando a mesma amostra como referência (item 5.9.1.1). Para todas as análises quimiométricas, os dados também foram normalizados pela área e autoescalados.

As amostras não cultivadas foram submetidas à classificação pelos modelos obtidos com amostras cultivadas (TABELA 20). Os modelos KNN e PLS-DA classificaram corretamente todas as amostras não cultivadas de *Phyllanthus*,

enquanto o modelo SIMCA classificou corretamente apenas as amostras P7, P8 e P17, não atribuindo nenhuma espécie para todas as demais.

TABELA 20. Classificação das amostras não cultivadas pelos modelos quimiométricos construídos com amostras padrão cultivadas de espécies de *Phyllanthus*.

Amostra	Cidade (SP)	Espécie*	Classificação - modelos		
			KNN	SIMCA	PLS-DA
P1	Registro	T	T	nc	T
P2A	Miracatu	T	T	nc	T
P2B	Miracatu	U	U	nc	U
P3	Ubatuba	T	T	nc	T
P4	Aparecida	T	T	nc	T
P5	S.J. dos Campos	T	T	nc	T
P6	Atibaia	T	T	nc	T
P7	Campinas	T	T	T	T
P8	Itapetininga	T	T	T	T
P9	Tatuí	T	T	nc	T
P10	Botucatu	T	T	nc	T
P11	Piracicaba	T	T	nc	T
P12	Jaú	T	T	nc	T
P13	Bauru	T	T	nc	T
P14	Ourinhos	T	T	nc	T
P15	Assis	T	T	nc	T
P16	Presidente Prudente	T	T	nc	T
P17	Birigüi	T	T	T	T
P18	Jales	A	A	nc	A
P19	Votuporanga	A	A	nc	A
P20	S.J.do Rio Preto	T	T	nc	T
P21	Catanduva	T	T	nc	T
P22	Bebedouro	A	A	nc	A
P23	Matão	T	T	nc	T
P24	Casa Branca	T	T	nc	T
P25	Ribeirão Preto	T	T	nc	T
P26	Franca	T	T	nc	T
P27	São Carlos	T	T	nc	T

*T = *P. tenellus*; U = *P. urinaria*; A = *P. amarus*; nc = não classificada.

A análise exploratória de Componentes Principais pode auxiliar a compreender a classificação das amostras pelos modelos. As amostras cultivadas e não cultivadas foram então reunidas em uma única matriz $\mathbf{M} = [198 \ 4675]$ e uma PCA foi feita, com seleção de 7 fatores, que correspondem a 69,5% da variação total dos dados. O gráfico de escores revela que grande parte das amostras não cultivadas encontra-se próxima das amostras de *P. tenellus*, porém com maior dispersão em relação ao conjunto de amostras cultivadas da mesma espécie e que, por esse motivo, não foram classificadas pelo modelo SIMCA (FIGURA 38).

Os modelos KNN e PLS-DA utilizam critérios de atribuição de classes que não foram influenciados pela dispersão das amostras não cultivadas de *P. tenellus* e, desta forma, realizaram sua classificação corretamente.

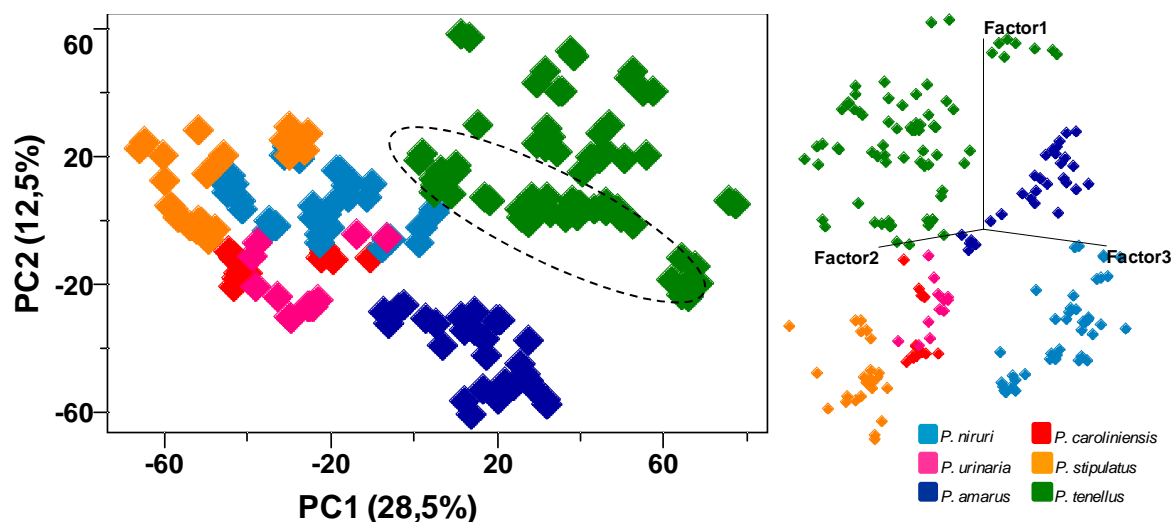


FIGURA 38. Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras cultivadas e não cultivadas de *Phyllanthus*. Gráfico de escores: a região circulada indica a distribuição das amostras de *P. tenellus* cultivadas.

Os resultados apresentados demonstraram que, embora o perfil cromatográfico seja influenciado pelo cultivo, pois amostras não cultivadas de *P. tenellus* apresentaram-se, em grande parte, dispersas em relação às cultivadas, essa diferença não foi suficiente para que as espécies não possam ser discriminadas quimiometricamente. Assim sendo, foram elaborados novos modelos de classificação com todas as amostras de *Phyllanthus* analisadas (matriz **M**), com o intuito de, posteriormente, avaliar a autenticidade de amostras comerciais de “quebra-pedra”.

Os novos modelos KNN, SIMCA e PLS-DA foram estabelecidos conforme os mesmos procedimentos de pré-tratamento (normalização), pré-processamento (autoescalado) e critérios de seleção de fatores anteriormente descritos; seus desempenhos foram avaliados por um conjunto de validação de 16 amostras.

Os parâmetros dos modelos obtidos encontram-se na TABELA 21. A classificação das amostras foi realizada corretamente, com exceção de apenas uma amostra não cultivada de *P. tenellus* no modelo SIMCA (amostra P27A), que não foi classificada em nenhuma espécie (FIGURA 39).

TABELA 21. Parâmetros dos modelos de classificação elaborados com todas as amostras de *Phyllanthus**.

Modelo	Parâmetros					
KNN	k** = 1; classificação correta de todas as amostras com até 10 vizinhos.					
SIMCA	classe	espécie	PC	variância acumulada (%)		
	1	<i>P. caroliniensis</i>	3	95,3		
	2	<i>P. niruri</i>	4	82,1		
	3	<i>P. tenellus</i>	4	71,3		
	4	<i>P. urinaria</i>	3	93,5		
	5	<i>P. amarus</i>	3	82,3		
PLS-DA	classe	espécie	PC	SEV	PRESS Val	rVal
	1	<i>P. caroliniensis</i>	3	0,119	2,804	0,893
	2	<i>P. niruri</i>	2	0,077	1,168	0,982
	3	<i>P. tenellus</i>	3	0,096	1,843	0,980
	4	<i>P. urinaria</i>	3	0,092	1,668	0,923
	5	<i>P. amarus</i>	3	0,101	2,014	0,958
	6	<i>P. stipulatus</i>	3	0,085	1,428	0,968

*matriz **M** = [198 4675]; **k = número de vizinhos; **PRESS Val** = soma dos quadrados dos resíduos de validação; **SEV** = raiz quadrada de PRESS Val, com n = 198; **rVal** = coeficiente de correlação da regressão.

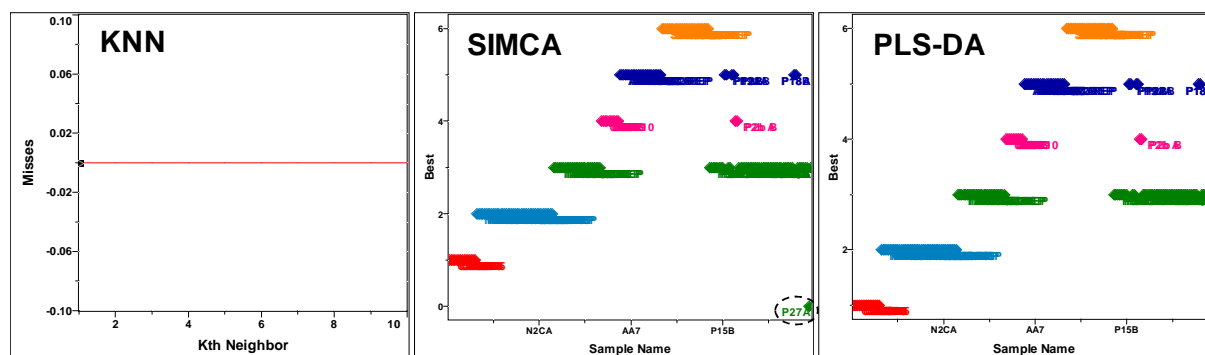


FIGURA 39. Modelos de classificação elaborados a partir de todas as amostras de *Phyllanthus*. Gráfico de total de erros (**KNN**) e de classificação de amostras (**SIMCA** e **PLS-DA**).

5.9.5. Análise de amostras comerciais

As amostras comerciais constituíram uma matriz de dados numéricos contendo 65 linhas e 4675 colunas. Os cromatogramas foram alinhados conforme procedimento descrito no item 5.9.1.1, e os dados foram igualmente normalizados pela área e autoescalados, para a realização das análises quimiométricas.

Os modelos de classificação elaborados a partir da matriz **M**, contendo amostras cultivadas e não cultivadas de espécies de *Phyllanthus*, foram utilizados

para avaliar a autenticidade das amostras comerciais (TABELA 22). No modelo KNN, as amostras foram classificadas com diferentes números de vizinhos, de modo a observar alguma alteração nos resultados, porém a atribuição de classes se manteve para todas as amostras.

TABELA 22. Classificação de amostras comerciais pelos modelos quimiométricos construídos com amostras de espécies de *Phyllanthus*.

Amostra	Origem*	Classificação – modelos					Obs.
		KNN			SIMCA	PLS-DA	
		K=1	K = 5	K = 10			
CAP1	Hortolândia/SP	T	T	T	nc	T	IT
CHA1	Chapecó/SC	T	T	T	T	T	FM
CHA2	São Carlos/SP	T	T	T	nc	nc	FM
CHA3	Campo Largo/PR	T	T	T	T	T	FM
CHA4	Curitiba/PR	T	T	T	T	T	FL
CHA5	Curitiba/PR	T	T	T	nc	T	MM
CHA6	Curitiba/PR	T	T	T	nc	T	FM
CHA7	Curitiba/PR	T	T	T	nc	T	MM
CHA8	Piracicaba/SP	T	T	T	nc	T	FM
CHA9	Chapecó/SC	T	T	T	nc	T	FM
CHA10	Mandirituba/PR	T	T	T	nc	T	FM
CHA11	Maringá/PR	T	T	T	nc	T	FH
CHA12	Campo Largo/PR	T	T	T	T	T	FM
CHA13	Campo Largo/PR	T	T	T	T	T	FM
CHA14	Maringá/PR	T	T	T	T	T	FH
CHA15	Curitiba/PR	T	T	T	T	T	FM
CHA16	Atibaia/SP	T	T	T	nc	T	FM
CHA17	Campinas/SP	T	T	T	nc	T	E
CHA18	Piracicaba/SP	T	T	T	nc	nc	FM
CHA19	Franca/SP	T	T	T	nc	T	E
CHA20	Catanduva/SP	T	T	T	nc	T	FM
CHA21	Botucatu/SP	T	T	T	nc	T	FM
CHA22	Recife/PE	T	T	T	nc	nc	MM
CHA23	Aracaju/SE	A	A	A	T	A	MM
CHA24	Aracaju/SE	A	A	A	nc	A	MM

T = *P. tenellus*; A = *P. amarus*; nc = não classificada.

*considera-se como origem o local de fabricação; CAP = amostra de cápsulas.

IT = internet, FM = farmácia de manipulação, FH = farmácia homeopática, FL = feira livre, MM = mercado municipal, E = ervanaria

A atribuição de classes segue critérios diferentes em cada método de classificação e, portanto, a análise comparativa de seus resultados precisa ser feita cautelosamente. De modo geral, foi verificado que a grande maioria das amostras comerciais pertence à espécie *P. tenellus*, embora ocorra discordância na classificação de algumas amostras entre os diferentes modelos.

Os três modelos de classificação atribuíram a mesma espécie (*P. tenellus*) para sete amostras: CHA1, CHA3, CHA4, CHA12-15, o que representa uma concordância de 28%. Entre os modelos KNN e PLS-DA, a classificação foi a mesma para 15 amostras (60%), das quais apenas as amostras CHA23 e CHA24 foram classificadas como *P. amarus* e as demais, como *P. tenellus*. O modelo SIMCA não determinou nenhuma espécie para 17 amostras, o que corresponde a 68% do total.

As amostras CHA2, CHA22 e CHA18 não foram classificadas nos modelos SIMCA e PLS-DA, embora o modelo KNN tenha atribuído a espécie *P. tenellus* nos três casos. O método de classificação que utiliza o vizinho mais próximo é estabelecido por cálculo de distância entre as amostras desconhecidas e todas as que pertencem ao conjunto de calibração, de tal forma que a classificação é determinada pelo número de votos de cada classe, independentemente da distância em que se encontram, o que dificulta o diagnóstico de amostras anômalas. Outra limitação desse método consiste no fato de que, se o conjunto de calibração apresentar classes contendo maior número de amostras (como ocorre com *P. tenellus*), estas influenciam a classificação de amostras desconhecidas, uma vez que terão maior probabilidade de votos.

Uma análise exploratória PCA foi feita com todas as amostras analisadas, compondo uma matriz $\mathbf{T} = [263 \ 4675]$, com os dados normalizados pela área e autoescalados. O objetivo desta análise foi investigar a classificação das amostras CHA2, CHA22 e CHA18 e avaliar as semelhanças e diferenças entre as amostras comerciais e o conjunto de calibração. Foram selecionados 5 fatores, que correspondem a 62,4% da variância total do conjunto de dados.

O gráfico de escores (FIGURA 40) evidencia as diferenças entre as amostras CHA2 e CHA22 com relação a todo o conjunto de dados, o que demonstra que estas amostras não pertencem a nenhuma espécie de *Phyllanthus* analisada e confirma as atribuições dos modelos SIMCA e PLS-DA. É importante salientar que estas amostras não são formadas por misturas de *Phyllanthus*, pois não se encontram em regiões limítrofes entre as espécies estudadas. Por outro lado, elas podem pertencer a algumas espécies não contempladas nos modelos de classificação.

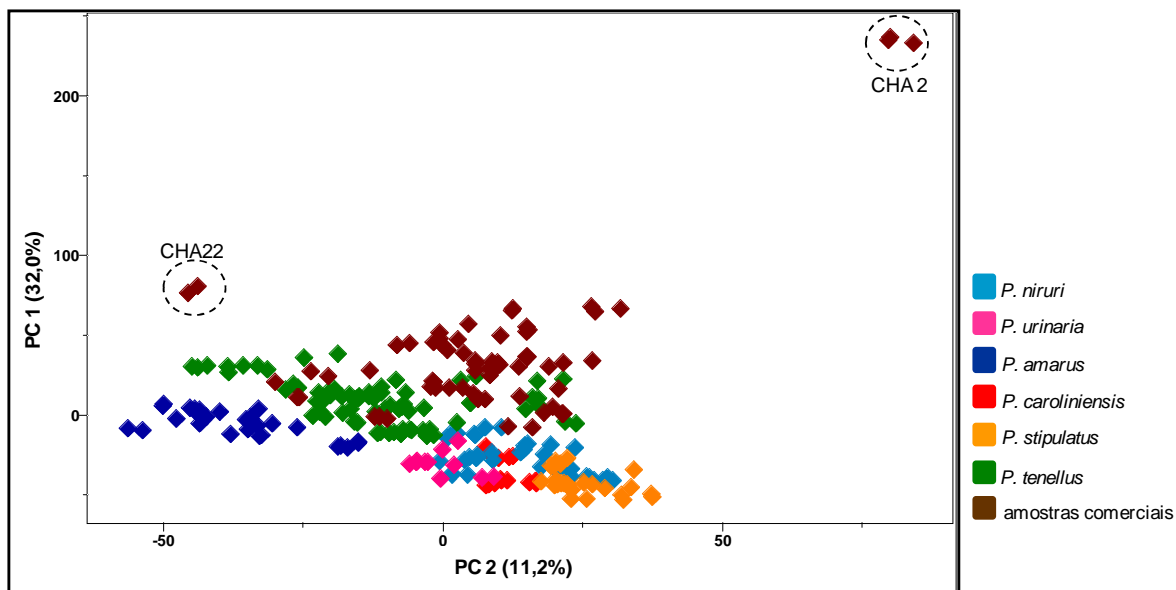


FIGURA 40. Análise de Componentes Principais (PCA) das espécies de *Phyllanthus* e amostras comerciais de “quebra-pedra”.

Para que as demais amostras fossem melhor visualizadas, as amostras CHA2 e CHA22 foram retiradas do conjunto de dados e nova PCA foi feita, com seleção de 7 fatores (67,4% de variância) (FIGURA 41). O gráfico de escores demonstra que as amostras comerciais apresentam, de fato, maior semelhança com relação à espécie *P. tenellus* do que com as demais espécies, o que explica a classificação obtida nos modelos elaborados. Observa-se, porém, que grande parte apresenta-se bastante dispersa do conjunto de amostras da classe de *P. tenellus* e, por essa razão, não foram classificadas pelo modelo SIMCA.

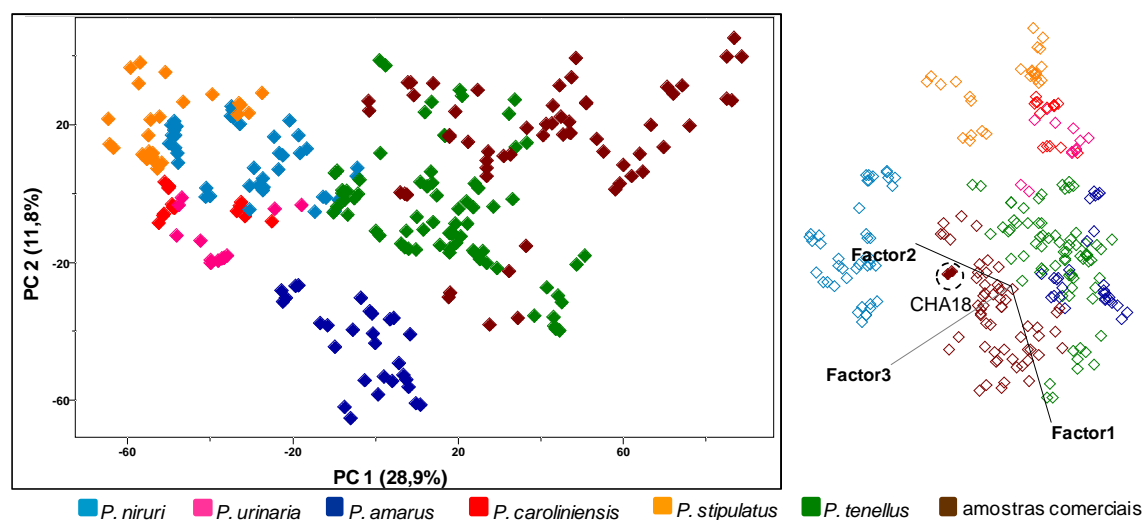


FIGURA 41. Análise de Componentes Principais (PCA) das espécies de *Phyllanthus* e amostras comerciais de “quebra-pedra”, após exclusão das amostras anômalas.

A amostra CHA18 (indicada na FIGURA 41), que também não foi classificada como nenhuma espécie pelos modelos SIMCA e PLS-DA, apresenta-se mais afastada dentre as amostras comerciais, com relação ao conjunto da espécie *P. tenellus*, o que justifica sua não classificação e demonstra que esta não pertence, de fato, a nenhuma das espécies analisadas.

É importante ressaltar que as 16 amostras comerciais adquiridas em farmácias de manipulação ou homeopáticas foram classificadas como *P. tenellus*, embora em suas embalagens a espécie informada no rótulo seja *P. niruri*. Para essas amostras, a descrição incorreta da espécie constitui uma irregularidade, que poderia ter sido evitada através da análise botânica do material vegetal pelo fabricante.

5.10. Purificação, isolamento e caracterização de marcador químico

Baseado nas condições de análise estabelecidas para o perfil cromatográfico dos extratos de *Phyllanthus* (FIGURA 42), foram avaliadas condições isocráticas, no modo reverso de eluição, para que fosse possível a purificação e isolamento de marcadores químicos presentes nas amostras.

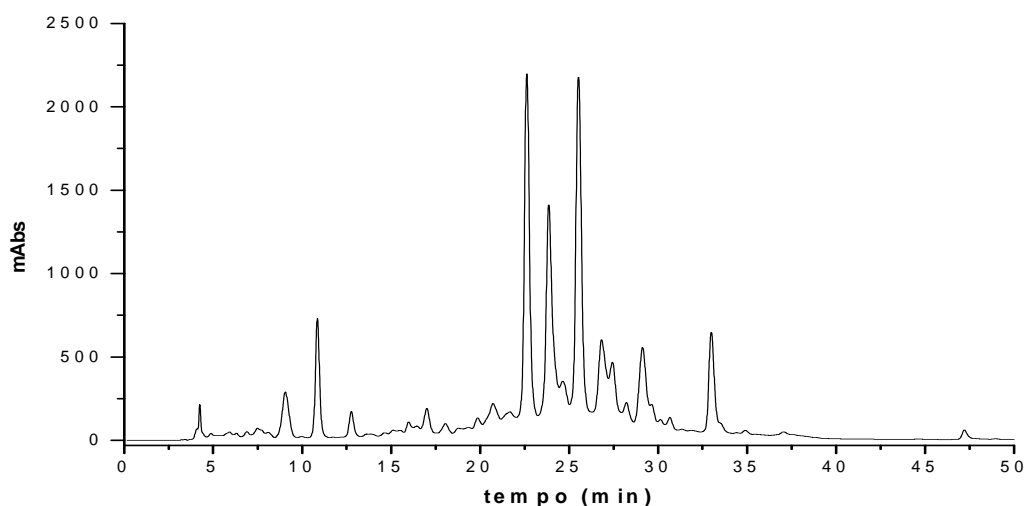


FIGURA 42. Cromatograma (275nm) de amostra de extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* (30mg/mL), condições cromatográficas: coluna analítica Luna[®] hexil-fenil 10 μ m, vazão 0,5 mL/min; volume de injeção 10 μ L; eluição gradiente linear no modo reverso (MeOH:ácido fosfórico 0,1%v/v): 5-100% MeOH em 50 min ($\Delta\%B = 1,90$).

A banda cromatográfica em t_r 22,6 foi escolhida para isolamento, purificação e caracterização, uma vez que está presente no perfil cromatográfico de todas as amostras de *Phyllanthus*. A concentração do modificador orgânico neste tempo de retenção é de 47,94% e, a partir desse valor, a otimização da separação cromatográfica foi avaliada.

Na composição da fase móvel, a solução de ácido fosfórico foi substituída por ácido fórmico 0,5% (v/v), em virtude de sua volatilidade. Após alguns ajustes, obteve-se uma condição cromatográfica com boa separação entre duas bandas cromatográficas, em $t_r= 17,2$ ($K_1= 7,6$) e em $t_r= 22,8$ min ($K_2=10,4$), apresentando seletividade ($\alpha = 1,37$) e resolução ($R_s=1,32$) adequadas para a purificação em sistema semi-preparativo (FIGURA 43).

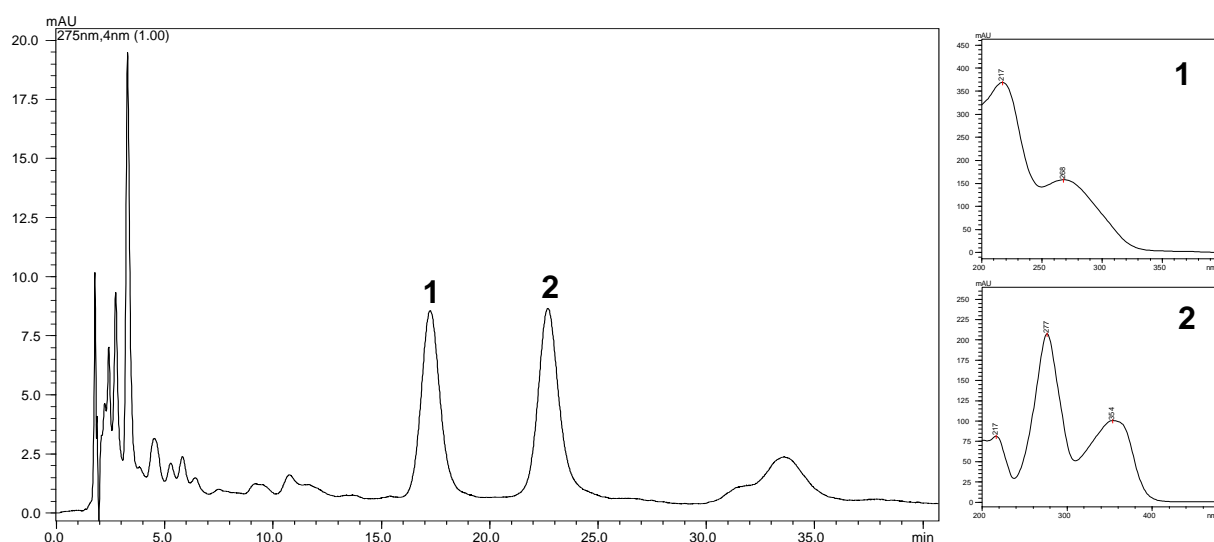


FIGURA 43. Amostra de extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* (300 μ g/mL). Cromatograma (275nm) utilizando coluna Hexil-fenil Luna[®] 10 μ m (15 x 0,46 cm d.i.), vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 30 μ L; eluição isocrática MeOH:ácido fórmico 0,5% v/v (20:80 v/v); ao lado direito, os espectros de absorção UV para as bandas cromatográficas 1 e 2.

Para a cromatografia em escala semi-preparativa, foi utilizada uma coluna com a mesma fase estacionária da separação analítica (Luna[®] Hexil-fenil, 10 μ m), diferenciando-se desta apenas pelo tamanho: 25 x 0,7 cm d.i.. Sendo assim, o ajuste da condição cromatográfica foi feito através de escalonamento, conforme a equação¹³¹:

$$S = \frac{R_p^2 L_p^2}{R_A^2 L_A^2}$$

onde **S** = fator de escalonamento, **R_p** e **R_A** são os diâmetros e **L_p** e **L_A** são os comprimentos das colunas preparativa e analítica, respectivamente.

O valor de **S** (3,09) foi multiplicado pela vazão utilizada no sistema analítico (1,0 mL/min). Desta forma, a vazão no sistema semi-preparativo foi ajustada em 3,1mL/min.

Para a purificação das bandas cromatográficas, solução aquosa do extrato de *P. niruri* (item 6.2.1) foi preparada na concentração de 30 mg/mL; o volume de injeção utilizado foi de 500µL, que corresponde a 15mg de extrato/injeção (FIGURA 44). A limpeza da coluna cromatográfica foi feita após 30 minutos de cada injeção, utilizando 100% de MeOH durante 10 minutos.

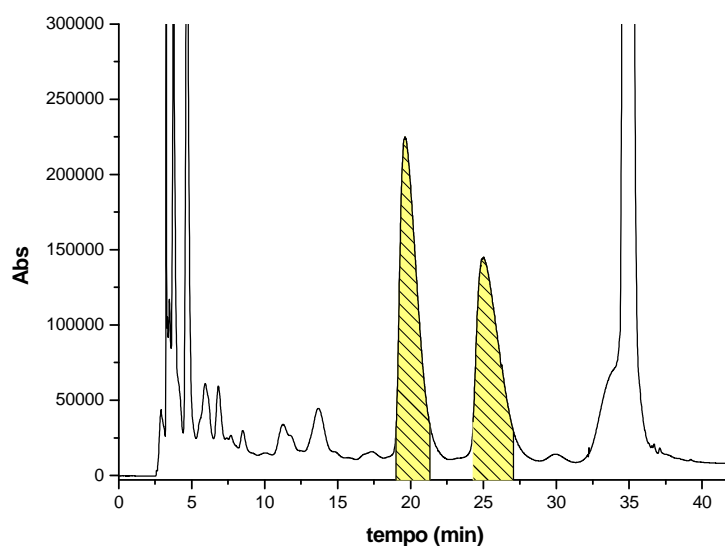


FIGURA 44. Cromatograma ($\lambda=275\text{nm}$) de extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* (30mg/mL) em sistema semi-preparativo; as regiões destacadas indicam a coleta das frações 1 e 2. Condições cromatográficas: coluna Luna[®] Hexil-fenil 10µm (25 x 0,7 cm d.i.), vazão 3,1 mL/min; volume de injeção 500µL; eluição isocrática MeOH:ácido fórmico 0,5% v/v (20:80 v/v).

As bandas cromatográficas (t_{r1} entre 19-21,3 min e t_{r2} entre 24,3-27 min), denominadas **fração 1** e **2**, foram coletadas em balões de fundo redondo, concentradas em rotaevaporador, congeladas e liofilizadas. Após 17 injeções (255 mg de extrato), as frações coletadas e liofilizadas foram pesadas, obtendo $m = 12\text{mg}$ para a **fração 1** (4,7% m/m de rendimento) e $m = 2,2\text{ mg}$ (0,9% m/m de rendimento) para a **fração 2**. O rendimento obtido para a fração 2 foi muito pequeno e, além disso, a amostra apresentou-se extremamente instável (oxidava-se com grande facilidade) e, por isso, não foi possível caracterizar sua estrutura química.

A **fração 1** foi reanalisada em condições analíticas (0,1mg/mL), com o objetivos de verificar sua pureza (FIGURA 45). Como não foram observadas impurezas na análise cromatográfica, a amostra foi submetida à caracterização de sua estrutura química.

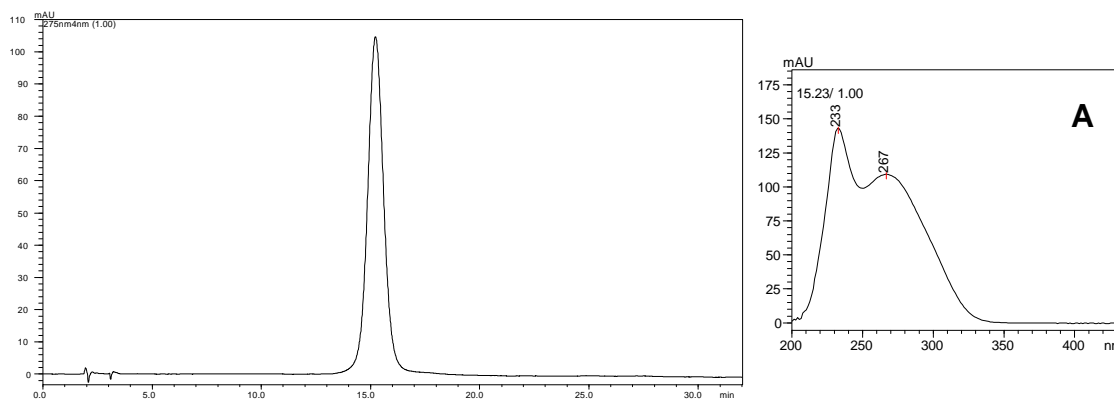


FIGURA 45. Cromatograma ($\lambda=275$ nm) da **fração 1**, purificada no sistema semi-preparativo. Condições analíticas: coluna Luna[®] Hexil-fenil 10 μ m, vazão 1 mL/min; volume de injeção 30 μ L; eluição isocrática MeOH:ácido fórmico 0,5%(v/v) (20:80), detecção por DAD (190-600 nm). **A** – espectro de absorção UV no tempo de retenção da banda.

5.10.1. Caracterização espectroscópica da fração 1

A amostra purificada (**fração 1**, 10 mg) foi dissolvida em solvente deuterado (DMSO- d_6) e caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , COSY, HSQC e DEPT 135. A análise dos espectros, juntamente com a comparação dos valores encontrados com dados da literatura¹³²⁻¹³⁵, demonstrou que a amostra refere-se à substância 1-O-galoil-3,6-(R)-hexadihidroxidifenoil- β -D-glucopiranosose, também conhecida como corilagina (FIGURA 46), um tanino hidrolisável isolado anteriormente de espécies de *Phyllanthus*^{48,86,136}. Em analogia aos estudos já publicados para a corilagina, a conformação da unidade de glucose foi estabelecida como sendo barco 1,4 ($B_{1,4}$), com base na constante de acoplamento ($J_{1,2} = 6,0\text{Hz}$) observada para o hidrogênio anomérico^{132,137}, podendo apresentar modificações na conformação em virtude da natureza do solvente utilizado, conforme observado por Seikel e Hillis¹³³.

A análise elementar forneceu valores percentuais de carbono (49,98%) e hidrogênio (4,3%), com desvio padrão relativo de 0,2%. Considerando a fórmula molecular do corilagina ($\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{18}$), a pureza do padrão foi considerada como 100%. A rotação óptica da amostra foi determinada por análise polarimétrica e apresentou valor de -145° (25°C ; $c. 0,006$ g/mL), estando em concordância com dados da literatura¹³².

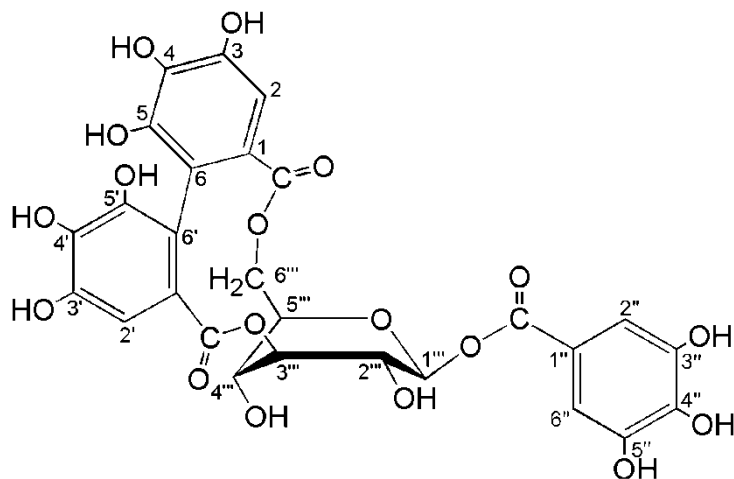


FIGURA 46. Estrutura química da corilagina.

A TABELA 23 apresenta os valores de deslocamento químico dos carbonos e hidrogênios da molécula corilagina. Os espectros uni e bidimensionais encontram-se no Anexo 1.

TABELA 23. Valores espectroscópicos de RMN da corilagina.

C	¹ H (multiplicidade)	COSY	¹³ C (HSQC)	DEPT 135
2	6,46 (s, H)		105,7	CH
2'	6,53 (s, H)		106,6	CH
2'' e 6''	7,02 (s, 2H)		108,7	CH
1'''	6,21 (1H, d, J=6Hz)	2'''	91,9	CH
2'''	3,88 (1H, dd, J=6 e 1,6Hz)	1''', 3'''	71,5	CH
3'''	4,58 (1H, 5 sinais, J=1,6Hz)	2''', 4'''	77,4	CH
4'''	4,25 (1H, d, J=2,8Hz)	3'''	61,9	CH
5'''	4,36 (1H, dd, J=8 e 9Hz)	6'''a, 6'''b	76,1	CH
6'''	a – 3,99 (1H, dd, J=9 e 11,2Hz) b – 4,21 (1H, dd, J=8 e 11,2Hz)	5''', 6'''b 5''', 6'''a	63,7	CH ₂
1			120,6	C
3			144,8	C
4			133,9	C
5			145,4	C
6			116,8	C
1'			125,5	C
3'			144,9	C
4'			138,3	C
5'			145,6	C
6'			117,3	C
1''			119,1	C
3'' e 5''			146,4	C
4''			140,0	C
			166,8	C=O
			168,6	C=O
			170,2	C=O

A substância isolada e caracterizada (corilagina) também foi analisada por espectrometria de massas, utilizando experimento de infusão direta de amostra, com fonte de ionização *electrospray* no modo negativo e analisador do tipo *ion trap* (item 6.5).

A FIGURA 47A apresenta o espectro de massas obtido, que confirma a fórmula molecular (fórmula $C_{27}H_{22}O_{18}$)^{15,17}. O pico do íon pseudomolecular $[M - H]^-$ em m/z 633 foi selecionado e fragmentado, com energia de fragmentação de 0,3 V. O espectro obtido pode ser observado na FIGURA 47B. Pela fragmentação, pode-se observar a perda das massas: 170 (a partir de m/z 633), que representa a saída do grupo galoil através de uma perda neutra com a quebra da ligação C-O entre o carbono anomérico da glucose e o oxigênio do éster; 162 e 188, que sugerem a fragmentação do íon em m/z 463 com duas possibilidades: com a quebra das ligações C-O de ambas carbonilas dos ésteres ligados ao açúcar, formando o fragmento m/z 301, ou com a quebra de uma das ligações C-C entre um dos anéis aromáticos e uma das carbonilas dos ésteres, formando o fragmento m/z 275 (FIGURA 48).

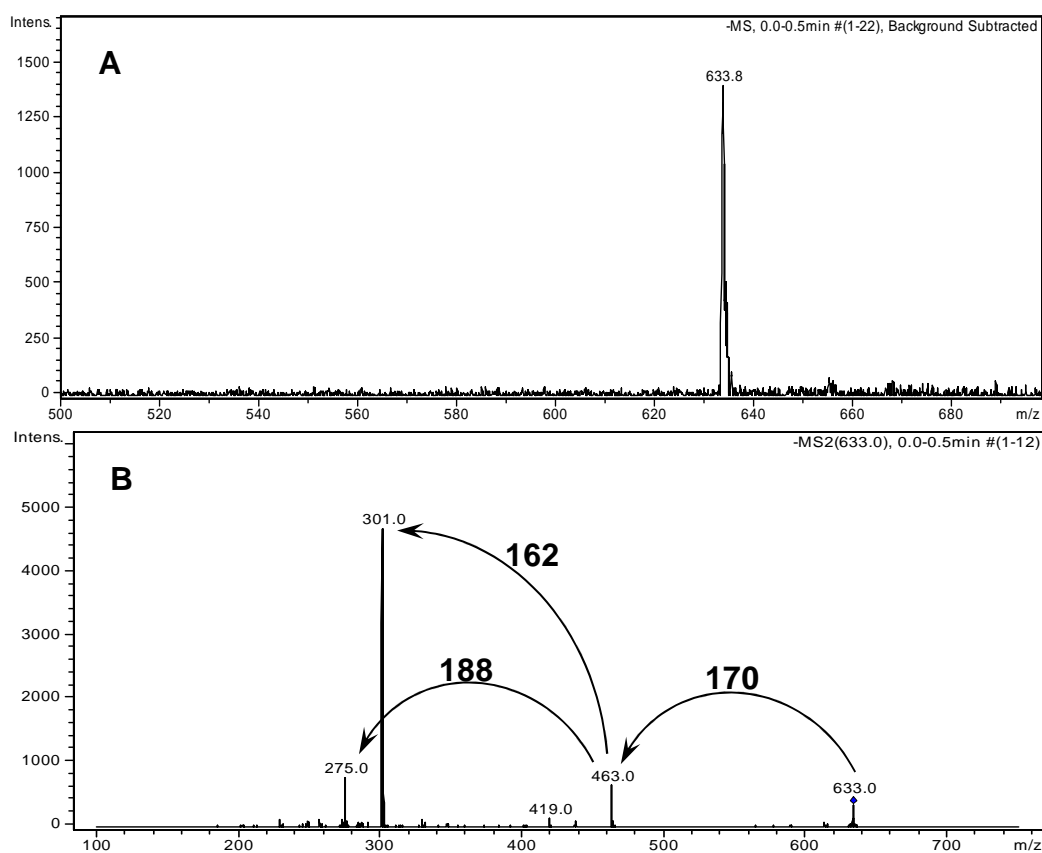


FIGURA 47. Espectro de massas da corilagina por inserção direta de amostra em *electrospray* no modo negativo. **A)** espectro de íons totais e **B)** fragmentação do íon pseudomolecular $[M - H]^-$ 633 m/z .

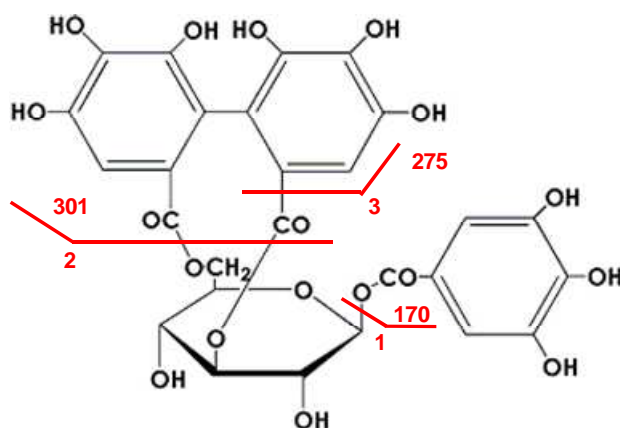


FIGURA 48. Fragmentação da molécula corilagina.

5.11. Quantificação do marcador químico corilagina

O corilagina tem sido encontrado não apenas em espécies do gênero *Phyllanthus*^{48,56,136,137}, mas também em plantas medicinais de outros gêneros e famílias^{132-135,138}. Diferentes atividades farmacológicas têm sido estudadas para essa substância, tais como: atividade antioxidante¹³⁷, antiaterogênica¹³⁹, hepatoprotetora¹⁴⁰, antimicrobiana¹⁴¹, imunomodulatória¹⁴², trombolítica¹⁴³ e antiinflamatória¹⁴⁴.

5.11.1. Condições cromatográficas de análise

Baseado nas condições cromatográficas desenvolvidas para a purificação do corilagina, um método analítico foi desenvolvido para sua quantificação em extratos de *Phyllanthus*. O objetivo desse estudo foi avaliar comparativamente a concentração deste composto em amostras cultivadas, não cultivadas e comerciais.

Para as análises, foi utilizada coluna Luna[®] Hexil-fenil 10 µm (15 x 0,46 cm d.i.), vazão de 1mL/min e volume de injeção de 50 µL. A fase móvel foi constituída de 20% de MeOH e 80% de solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v), em eluição isocrática, durante 20 min. Em seguida, a limpeza da coluna foi feita por eluição gradiente, de 20-100% de MeOH em 5 min, permanecendo em 100% de MeOH por 5 min. O retorno do gradiente foi feito em 5 min (100-20% de MeOH) e a coluna foi equilibrada em 20% de MeOH por 20 min.

Para a quantificação, a pureza da banda cromatográfica de interesse precisa ser avaliada. Para isso, amostra de extrato de *P. tenellus* (5 mg/mL) foi analisada, utilizando detector de arranjo de diodos com varredura entre 190-600nm (FIGURA49). A banda referente ao corilagina ($t_r = 15,9$ min, $k = 6,95$) foi determinada pela comparação com análise de solução do padrão. O cromatograma apresentou boa seletividade ($\alpha = 1,33$) em relação à banda em $t_r = 20,5$ min ($k = 9,26$) e excelente resolução ($R_s = 1,66$), não sendo detectado nenhum interferente na eluição da corilagina. Na quantificação, o comprimento de onda selecionado foi 230 nm.

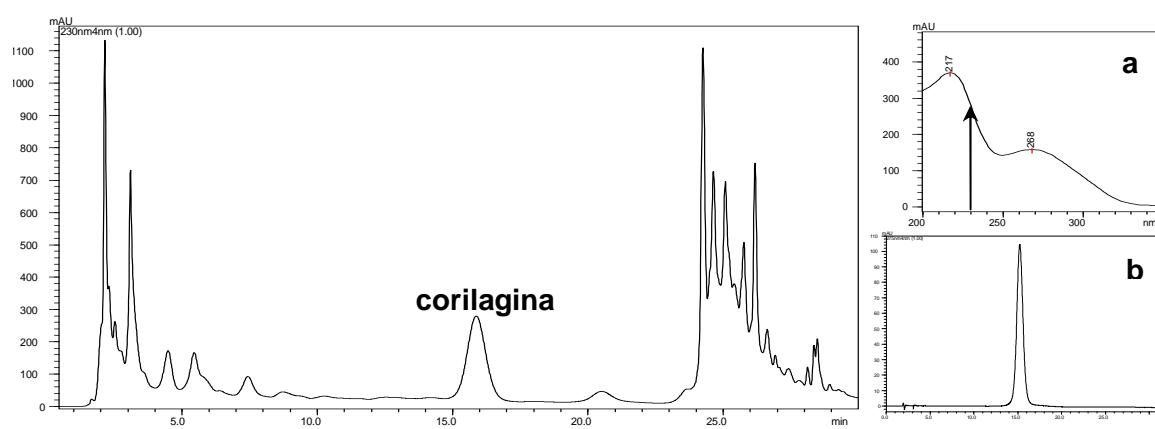


FIGURA 49. Cromatograma ($\lambda=230$ nm) do extrato aquoso liofilizado de *P. tenellus* (5 mg/mL, volume de injeção de 50 μ L) sob condições analíticas ajustadas para quantificação de corilagina ($t_r = 15,9$ min); **a** = espectro de absorção UV no tempo de retenção da corilagina; **b** = análise de solução do padrão (100 μ g/mL) nas mesmas condições cromatográficas.

5.11.2. Validação do método

A validação do método seguiu as normas estabelecidas pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, publicado pela ANVISA em 2003¹²⁹. Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, precisão, exatidão, estabilidade de curta duração, limites de quantificação e de detecção.

A linearidade foi avaliada por dois métodos de calibração: padronização externa e padronização por adição de padrão. A padronização externa é utilizada em amostras que não precisam de extenso pré-tratamento, como é o caso das análises de extratos aquosos de espécies de *Phyllanthus*, desenvolvida no presente trabalho. Neste caso, a construção da curva de calibração foi feita através

de padrões de calibração, que são soluções de concentrações conhecidas do analito, preparadas em solução aquosa de ácido fosfórico 0,1% (v/v), que compõe a fase móvel e suprime a ionização da amostra. A determinação da concentração do analito nas amostras foi feita pela comparação da área do corilagina com as áreas obtidas a partir das soluções padrão de calibração.

A calibração por adição de padrão é utilizada nos seguintes casos: quando não é possível obter a matriz (extrato) isenta do analito, em matrizes muito complexas, quando há fortes interações entre o analito e a matriz e quando é difícil encontrar um padrão interno adequado¹⁴⁵. Este método consiste na adição de diferentes concentrações do analito à matriz, que já contém uma quantidade desconhecida do mesmo. A concentração do analito (**C**) na matriz é determinada pela extrapolação da reta, cuja regressão linear foi definida pelas demais concentrações analisadas, ou de acordo com a seguinte equação¹⁴⁶:

$$C = \frac{\text{Área do analito na matriz}}{\text{coeficiente angular da reta}}$$

Como o método de adição de padrão considera o efeito da matriz sobre a resposta instrumental e a concentração final do analito na amostra depende da regressão obtida, a curva de calibração deve ser elaborada para cada matriz analisada, o que dificulta sua aplicação na análise de grandes quantidades de amostras.

Quando as curvas de calibração obtidas pelos dois diferentes métodos são comparadas e apresentam-se paralelas, isso significa que o método tem seletividade e que a matriz não interfere na quantificação do analito de interesse. Nesse caso, pode-se determinar a concentração do analito em diferentes amostras, utilizando simplesmente a regressão obtida a partir da padronização externa.

Curvas de calibração: padrão externo e adição de padrão

As curvas de calibração foram construídas a partir do preparo e análise de sete concentrações (2,5; 8,75; 15,0; 21,25; 27,5; 33,75 e 40 µg/mL), em triplicata, e a regressão foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, a partir da relação entre as áreas das bandas cromatográficas e as concentrações das amostras. O preparo da solução estoque, soluções de trabalho e padrões de calibração estão descritos no item 6.6.2 do Procedimento Experimental.

As curvas de calibração obtidas estão apresentadas na FIGURA 50. Entre as replicatas (n = 3) das concentrações das curvas, o coeficiente de variação não ultrapassou 2%. Os coeficientes de correlação obtidos para a padronização externa e para a adição de padrão foram 0,9995 e 0,9996, respectivamente, estando acima do valor preconizado pela ANVISA¹²⁹, que é 0,98. Os coeficientes angulares de ambas as curvas são bastante próximos entre si (coeficiente de variação de 0,3%), o que demonstra a seletividade do método e a não-interferência da matriz na resposta analítica.

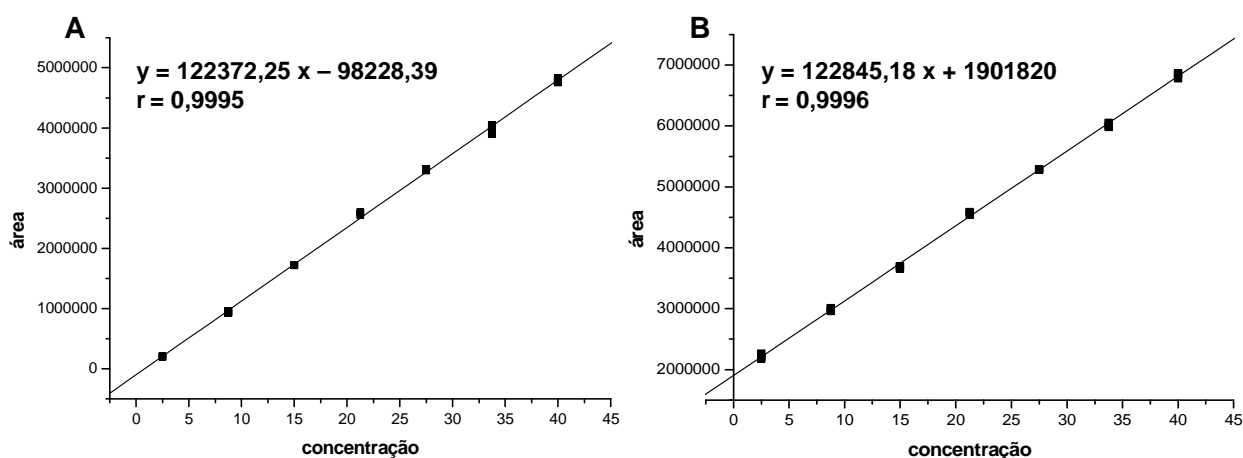


FIGURA 50. Curvas de calibração por padronização externa (A) e por adição de padrão (B) para o método de quantificação de corilagina em extratos de *Phyllanthus*.

Para comparar a quantificação entre as duas regressões obtidas, foi avaliada a concentração de corilagina na matriz (extrato de *P. tenellus*, item 6.6.2). Conforme a curva de calibração por adição de padrão, a concentração de corilagina no extrato foi de 15,85 µg/mL. Utilizando esta mesma área para calcular a concentração através da regressão por padronização externa, encontrou-se o valor de 16,71 µg/mL. Houve, portanto, uma variação de 3,7%, que demonstra não haver influência da matriz, uma vez que a variação está abaixo do critério de aceitação do método.

A regressão obtida por padronização externa foi avaliada quanto a sua validade, ajuste e eficiência, através de testes estatísticos de análise de variância (TABELA 24)¹⁴⁷. Para análise de ajuste do modelo linear, o valor de F calculado ($F = MQ_{fa}/MQ_{ep}$) foi 3,3, inferior a $F_{crítico}$ ($F_{5,14} = 4,69$) com 99% de confiança, portanto a linearidade do método é aceita e o ajuste do modelo é considerado satisfatório. Na análise da validade da regressão, o valor de F calculado ($F = MQR/MQ_r$) foi de 994,

bastante superior ao valor de $F_{crítico}$ ($F_{1,19} = 8,18$) com 99% de confiança, portanto a regressão é bastante significativa. O valor da eficiência da regressão, calculado pelo coeficiente de determinação R ($R = SQR/SQT$) foi de 0,998, o que indica que a variação dos valores de área em torno da média foi explicada pela regressão, ou seja, o resíduo é inferior a 0,2%.

TABELA 24. Análise da variância para o ajuste do modelo linear proposto pelo método de padronização externa.

Fonte de variação	Soma Quadrática	n° de g.l.	Média Quadrática
Regressão	3281,25	1	3281,25
Resíduos	3,30	19	0,174
Falta de ajuste	0,93	5	0,185
Erro puro	0,79	14	0,056
Total	3284,55	20	

* MQ_{fa} = média quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} = média quadrática devida ao erro puro; MQR = média quadrática da regressão; MQ_r = média quadrática dos resíduos; SQR = soma quadrática da regressão; SQT = soma quadrática total; g.l. = graus de liberdade.

Análise da precisão e da exatidão

A precisão e exatidão do método foram determinadas pela análise de amostras preparadas em três diferentes concentrações (denominadas amostras controle de qualidade): baixa (7 $\mu\text{g/mL}$), média (20 $\mu\text{g/mL}$) e alta (32 $\mu\text{g/mL}$), em quintuplicata e em três dias não-consecutivos. A precisão foi determinada pelo cálculo do desvio padrão relativo (coeficiente de variação) entre as áreas obtidas para as replicatas analisadas e a exatidão foi determinada pelo desvio da concentração média experimental em relação à concentração teórica, em valores percentuais. De acordo com a ANVISA, são aceitos desvios de até 15% para a precisão e exatidão nas concentrações acima do limite de quantificação (LQ). A TABELA 25 apresenta os valores obtidos para a precisão e exatidão do método quantitativo proposto, na qual pode-se verificar que a precisão variou entre 0,5 e 4,4% e a exatidão variou entre 97,3 e 102%, ficando todos os valores dentro dos limites aceitáveis pela norma da ANVISA para métodos bioanalíticos.

TABELA 25. Valores percentuais de precisão e exatidão, intra e inter-dias, do método de quantificação do corilagina

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)		Média	
	CV	exatidão	CV	exatidão	CV	exatidão	CV	exatidão
7,0	0,8	102	0,5	101	0,7	101	0,7	101
20,0	1,4	97,4	0,6	98,9	0,6	97,3	0,9	97,9
32,0	1,1	99,2	4,4	98,5	1,1	98,6	2,2	98,8

A exatidão do método também foi verificada pelo chamado teste cego, ou seja, pela análise de amostras de concentrações desconhecidas para o analista. Neste caso, foram analisadas duas amostras, nas quais foram obtidas exatidão de 102% para ambas, conforme TABELA 26.

TABELA 26. Valores de exatidão obtidos na análise de teste cego.

Amostra	Conc. teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%)
1	7,50	7,72	102
2	30,00	30,75	102

Análise de estabilidade de curta duração

Para verificar a estabilidade das soluções em temperatura ambiente, durante o período de análise (tempo de permanência no auto-injetor), foram preparadas amostras em três diferentes concentrações (7, 20 e 32 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata. Essas amostras permaneceram no auto-injetor e foram analisadas logo após serem preparadas (tempo zero) e após de 24 e 48 horas (TABELA 27), sendo avaliadas com relação à precisão e exatidão.

TABELA 27. Valores percentuais de precisão e exatidão obtidos no estudo de estabilidade de curta duração.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	tempo zero (n=3)		24 horas (n=3)		48 horas (n=3)	
	CV	exatidão	CV	exatidão	CV	exatidão
7,0	1,5	105	1,0	104	2,0	104
20,0	0,7	100	1,0	96,0	1,2	95,9
32,0	1,0	101	0,8	100	1,1	98,8

Limite de quantificação e Limite de detecção

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração que pode ser quantitativamente determinada com valores aceitáveis de precisão e exatidão. De acordo com a ANVISA, estes valores devem ser maiores que 15 e menores ou iguais a 20%. A determinação do limite de quantificação foi feita através da análise de amostras preparadas em concentrações decrescentes, em quintuplicata. O limite de quantificação obtido foi de 2,5 µg/mL.

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração que o método é capaz de diferenciar, confiavelmente, do ruído experimental. A ANVISA recomenda que seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. Essa determinação foi feita pela análise de amostras preparadas em concentrações decrescentes (abaixo de 0,5 µg/mL), em triplicata. Quando a altura obtida do sinal foi três vezes mais intensa que o ruído da linha de base, essa concentração foi determinada como sendo o LD, o que foi observado em 0,1 µg/mL.

5.11.3. Aplicação do método

O método cromatográfico validado foi aplicado na quantificação de corilagina em 14 amostras de espécies cultivadas de *Phyllanthus*, 24 amostras não cultivadas de *P. tenellus* e nas 25 amostras comerciais de “quebra-pedra”, preparadas e analisadas conforme descrito no Procedimento Experimental (itens 6.6.1 e 6.6.4). Os resultados quantitativos obtidos no presente trabalho serão discutidos com relação à concentração encontrada de corilagina nos extratos analisados (mg/g de extrato) pois, uma vez que o processo de extração utilizado não foi elaborado com o intuito de otimizar a extração do marcador químico em questão, a extrapolação para a concentração na planta seca se reflete apenas sob as condições utilizadas de extração. Entretanto, as TABELAS 28-30 apresentam as concentrações de corilagina em mg/g de extrato e de planta seca.

5.11.3.1. Amostras cultivadas

A FIGURA 51 apresenta os resultados obtidos (em mg/g de extrato) para as amostras cultivadas de espécies de *Phyllanthus*. A concentração média encontrada de corilagina de $48,28 \pm 17,38$ mg/g de extrato. As maiores concentrações foram encontradas nas amostras de *P. stipulatus*, o que sugere que essa espécie é uma boa fonte desse marcador químico.

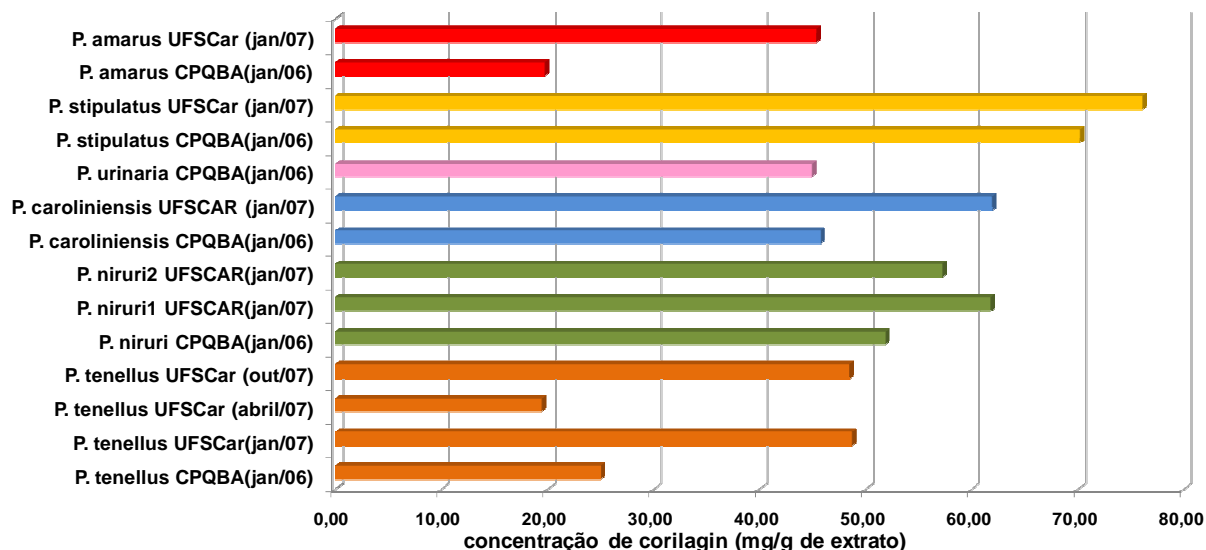


FIGURA 51. Concentração de corilagina em extratos de espécies cultivadas de *Phyllanthus*.

Com relação ao local de cultivo, as concentrações de corilagina nas amostras do *campus* da UFSCar foram maiores que nas do CPQBA, quando se compara as coletas de janeiro/2006 e janeiro/2007, como pode ser observado para *P. amarus* (diferença de 25,58 mg/g) e *P. tenellus* (diferença de 23,73 mg/g). Um dos fatores que pode ter influenciado esse resultado é o teor de matéria orgânica no solo dos canteiros (item 5.1.2), uma vez que, em solos mais pobres em nutrientes (como no canteiro da UFSCar), em geral é verificada uma maior produção de metabólitos secundários, principalmente de derivados fenólicos²⁶.

Para a espécie *P. tenellus*, foram analisadas amostras coletadas em diferentes períodos do ano. A concentração de corilagina apresentou uma variação significativa, sendo que as amostras de janeiro/07 e outubro/07 apresentaram as maiores concentrações (48,70 e 48,47 mg/g, respectivamente). Isso pode ter ocorrido em função da sazonalidade, pois a produção de compostos fenólicos é aumentada em períodos quentes do ano, nos quais há maior incidência luminosa²⁶.

TABELA 28. Concentração de corilagina em espécies cultivadas de *Phyllanthus*.

Amostra	mg/g de extrato	mg/g de planta seca
<i>P. tenellus</i> CPQBA (jan/06)	24,97	4,74
<i>P. tenellus</i> UFSCar (jan/07)	48,70	8,06
<i>P. tenellus</i> UFSCar (abril/07)	19,45	2,51
<i>P. tenellus</i> UFSCar (outubro/07)	48,47	8,78
<i>P. niruri</i> CPQBA (jan/06)	51,82	9,99
<i>P. niruri</i> UFSCar 1 (jan/07)	61,69	8,74
<i>P. niruri</i> UFSCar 2 (jan/07)	57,17	8,10
<i>P. caroliniensis</i> CPQBA (jan/06)	45,68	10,91
<i>P. caroliniensis</i> UFSCar (jan/07)	61,89	9,23
<i>P. urinaria</i> CPQBA (jan/06)	44,90	10,06
<i>P. stipulatus</i> CPQBA (jan/06)	70,14	15,91
<i>P. stipulatus</i> UFSCar (jan/07)	76,09	10,16
<i>P. amarus</i> CPQBA (jan/06)	19,70	4,43
<i>P. amarus</i> UFSCar (jan/07)	45,27	6,97

Os resultados obtidos com a quantificação de corilagina em amostras cultivadas de *Phyllanthus* evidenciaram a significativa influência das condições de cultivo na produção de compostos fenólicos pelo vegetal. O método desenvolvido pode, portanto, ser aplicado em estudos de monitoramento do manejo agrônomo dessas espécies, nos casos em que se pretende otimizar a concentração dessa classe de metabólitos secundários no vegetal.

5.11.3.2. Amostras não cultivadas de *P. tenellus*

Na análise de amostras não cultivadas de *P. tenellus* (FIGURA 52 e TABELA 29), a concentração média de corilagina foi de $41,72 \pm 10,16$ mg/g. A amostra coletada na cidade de Registro/SP (P1) apresentou a maior concentração (74,58 mg/g) e a da cidade de Ourinhos/SP (P14), a menor concentração (22,43 mg/g). Foi observada, portanto, uma variação significativa na concentração do corilagina para essas amostras (24,3%), o que evidencia a grande influência de diferentes *habitats* no metabolismo secundário.

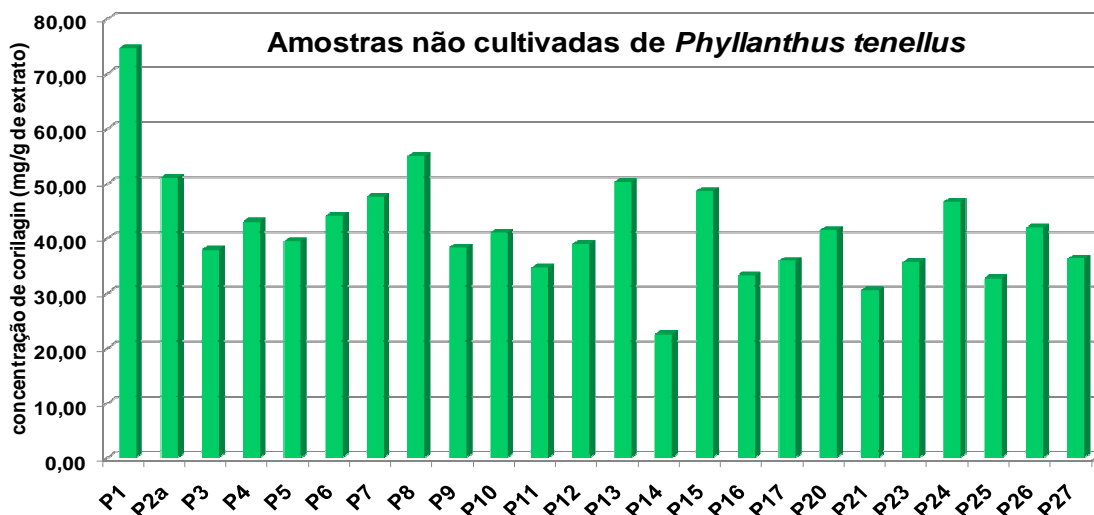


FIGURA 52. Concentração de corilagina em extratos de amostras não cultivadas de *P. tenellus*.

TABELA 29. Concentração de corilagina em amostras não cultivadas de *P. tenellus*.

amostra	cidade (SP)	corilagina (mg/g de extrato)	corilagina (mg/g de planta seca)
P1	Registro	74,58	13,01
P2a	Miracatu	51,05	6,92
P3	Ubatuba	37,91	4,35
P4	Aparecida	43,00	7,45
P5	S. J. Campos	39,40	6,58
P6	Atibaia	43,99	7,54
P7	Campinas	47,65	7,85
P8	Itapetininga	55,03	9,91
P9	Tatuí	38,22	6,26
P10	Botucatu	41,13	5,60
P11	Piracicaba	34,61	5,02
P12	Jaú	38,88	5,85
P13	Bauru	50,32	8,44
P14	Ourinhos	22,43	2,91
P15	Assis	48,47	8,09
P16	Pres. Prudente	33,18	5,27
P17	Birigüi	35,94	6,14
P20	S.J.R. Preto	41,58	5,63
P21	Catanduva	30,50	3,89
P23	Matão	35,61	5,73
P24	Casa Branca	46,74	7,97
P25	Rib. Preto	32,76	4,92
P26	Franca	42,04	7,62
P27	São Carlos	36,36	5,83

5.11.3.3. Amostras comerciais

Os resultados obtidos nas análises de amostras comerciais estão apresentados na FIGURA 53 e na TABELA 30. A concentração média de corilagina foi de $29,29 \pm 8,05$ mg/g, bastante abaixo dos valores médios obtidos em amostras cultivadas de *Phyllanthus* ($48,28 \pm 17,38$ mg/g) e em amostras não cultivadas de *P. tenellus* ($41,72 \pm 10,16$ mg/g). No entanto, em 9 amostras (indicadas na FIGURA 53), a concentração de corilagina encontra-se dentro dos intervalos de variação obtidos para as amostras consideradas como referência.

Em duas amostras comerciais (CHA2 e CHA22) não foi possível a quantificação, pois a banda cromatográfica referente ao corilagina estava ausente ou abaixo do limite de detecção do método. Considerando que a Farmacopéia Brasileira preconiza as espécies *P. tenellus* ou *P. niruri* e que todas as espécies avaliadas no presente trabalho, incluindo estas duas, apresentaram concentrações quantificáveis do marcador analisado, pode-se afirmar que as amostras CHA2 e CHA22 não pertencem a nenhuma dessas espécies de *Phyllanthus* e são, portanto, amostras adulteradas de “quebra-pedra”. Essa informação já havia sido demonstrada com as análises quimiométricas dos perfis cromatográficos dessas amostras, apresentado anteriormente.

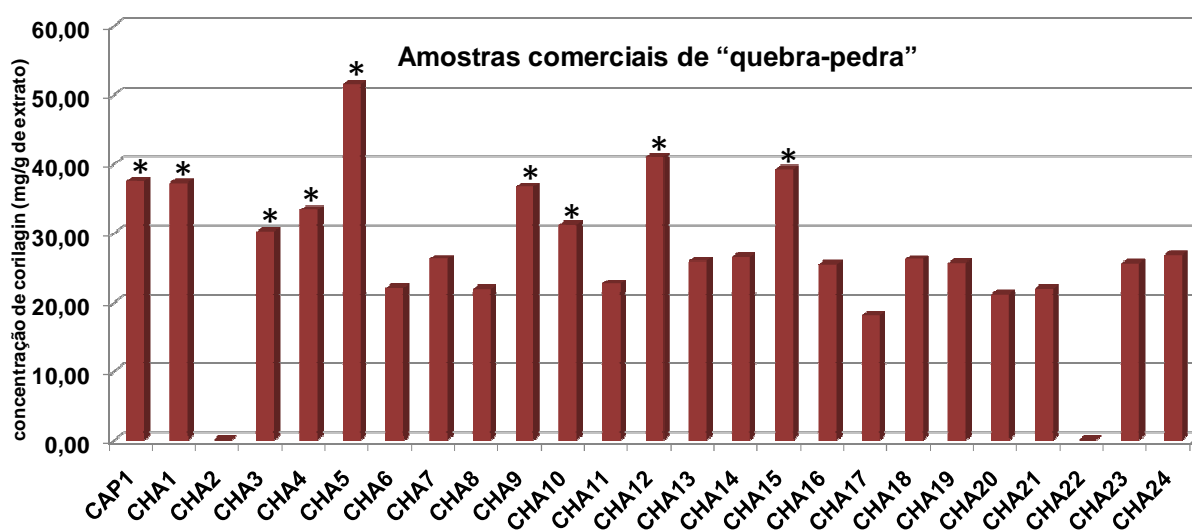


FIGURA 53. Concentração de corilagina em extratos de amostras comerciais de “quebra-pedra”. Amostras indicadas com asterisco (*) apresentam concentrações de corilagina entre a média dos valores encontrados para as amostras de referência.

TABELA 30. Concentração de corilagina em amostras comerciais de “quebra-pedra”

amostra	corilagina (mg/g de extrato)	corilagina (mg/g de planta seca)
CAP1	37,52	4,27
CHA1	37,27	8,00
CHA2	nd	
CHA3	30,25	6,14
CHA4	33,33	6,72
CHA5	51,54	9,59
CHA6	22,00	2,85
CHA7	26,22	4,34
CHA8	21,81	3,19
CHA9	36,68	9,40
CHA10	31,19	5,32
CHA11	22,60	3,19
CHA12	41,00	7,12
CHA13	25,88	3,93
CHA14	26,58	4,61
CHA15	39,18	6,74
CHA16	25,38	2,80
CHA17	18,03	1,50
CHA18	26,18	3,45
CHA19	25,61	3,75
CHA20	21,11	3,01
CHA21	21,86	2,96
CHA22	nd	
CHA23	25,53	3,30
CHA24	26,85	3,99

nd = não detectado

Considerando a oscilação da concentração de corilagina nas próprias amostras de referência, pode-se concluir que o método de quantificação não fornece, *por si só*, informações sobre a autenticidade da grande maioria das amostras comerciais. A amostra CHA18 não foi classificada como nenhuma espécie de *Phyllanthus* pelo método de análise do perfil cromatográfico associado às análises quimiométricas, porém a concentração de corilagina nessa amostra encontra-se dentro do intervalo encontrado em grande parte das amostras comerciais, ou seja, através da quantificação essa amostra não pode ser considerada uma adulteração.

É importante ressaltar que outras espécies vegetais também apresentam esse mesmo marcador em sua composição química, como foi demonstrado por Rangkadilok et al.¹³⁸, em análises quantitativas de corilagina em frutos de *Euphoria longana*, uma espécie da família Sapindaceae.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.1. Materiais e Equipamentos

Os solventes utilizados nas análises cromatográficas foram grau CLAE (J.T. Baker, Philipsburg, EUA), filtrados à vácuo em membrana de nylon de 0,45 µm de porosidade (Millipore, São Paulo, Brasil). A água ultrapura utilizada para preparo dos extratos aquosos e na composição das fases móveis foi obtida em um sistema MILLI-Q (Millipore, São Paulo, Brasil).

As amostras vegetais foram pulverizadas em moinho tipo faca (Marconi[®], modelo MA340) e em liquidificador industrial (Skymesen[®], modelo TA-02). A padronização da granulometria dos pós foi feita em peneira 60 mesh (Bertel[®]). O aquecimento para extração das amostras foi feito em manta de aquecimento (Quimis[®]). Os extratos foram liofilizados em liofilizador (Labconco[®], modelo E-C Modulyo) acoplado à bomba de vácuo (Emerson[®], modelo DV-200N-250). A homogeneização das amostras foi feita em agitador de tubos (Phoenix[®], modelo AP 56). As pesagens foram realizadas em balança analítica (AND[®], modelo HR 200), com precisão de 0,1 mg. Para o preparo de soluções, os volumes de diluentes e reagentes foram pipetados com micropipetas Gilson[®].

Sistemas cromatográficos:

Sistema 1 (analítico): Cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão), composto de uma bomba LC-20AT, com válvula solenóide de quatro linhas, degaseificador DGU-20A₅, auto-injetor SIL-10A, detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp e de ultravioleta SPD-20A; todas essas unidades são interligadas, através de uma interface CBM 20A e operados por computador, através do qual os cromatogramas foram registrados pelo *software* LC SOLUTION.

Sistema 2 (preparativo): cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão), composto de uma bomba LC-6AD, injetor manual Rheodyne com válvula de reciclo e alça de amostragem de 200µL, acoplado a um detector de ultravioleta modelo SPD-10AVvp e interligados por uma unidade de interface SCL-10Avp. Os cromatogramas foram registrados pelo *software* Class VP.

Os espectros de massas foram obtidos com o seguinte sistema: cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão), composto de uma bomba LC-20AD, com válvula solenóide de quatro linhas, degaseificador DGU-20A₅ e bomba infusora, acoplados por um *splitter* a um espectrômetro de massas com fonte

electrospray e analisador tipo *ion trap* modelo Esquire 6000[®] (Brucker Daltonics, Alemanha); os espectros de massas foram registrados pelo *software* DataAnalysis.

Para empacotamento das colunas cromatográficas, foram utilizadas sílicas Luna[®] C₈ (10µm de tamanho de partícula, 100Å de poro), C₁₈ (10µm de tamanho de partícula, 100 Å de poro) e Hexil-fenil (10µm de tamanho de partícula, 120Å de poro), produzidas pela Phenomenex, e sílica Hypersil[®] C₁₈ (5µm de tamanho de partícula, 120 Å de poro), produzida pela Shandon. Foi utilizada uma empacotadora Shandon, utilizando tubos de aço inox (15,0 x 0,46 cm d.i. para coluna analíticas e 25,0 x 0,7 cm para coluna semi-preparativa) sob pressão de 7000 psi. As sílicas foram suspensas em metanol e homogeneizadas em ultrassom (Cole-Palmer[®] 8852) por três minutos antes de serem empacotadas. Após o empacotamento, as colunas foram condicionadas em MeOH por 24 horas, utilizando vazão de 1,0 mL/min, posteriormente foram identificadas e guardadas em temperatura ambiente, em local apropriado.

Os espectros de RMN ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) foram registrados em equipamento Avance[®] (BRUKER), utilizando sinal de TMS como referência interna.

As análises quimiométricas foram feitas em microcomputador com processador Intel Pentium 4 (3,4GHz), utilizando os *softwares*: Pirouette[®] versão 4.0 (Infometrix Inc., Washigton, USA), Excel[®] (Microsoft), Matlab[®] versão R2007b (MathWorks Inc., Natick, USA) e rotina para alinhamento de picos disponibilizada no site http://www.models.kvl.dk/source/DTW_COW/index.asp.

6.2. Cultivo, coleta e processamento de amostras vegetais

6.2.1. Amostras cultivadas no CPQBA/UNICAMP

Amostras vegetais cultivadas e botanicamente identificadas de seis espécies do gênero *Phyllanthus* foram obtidas do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP), em Campinas/SP, em 20 de Janeiro de 2006. As amostras haviam sido previamente secas à sombra por 5 dias e foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante por sete dias, a 40°C. Após esse período, foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e devidamente identificadas.

O material botânico para identificação dessas espécies (exsicatas) encontra-se depositado no Herbário da mesma Instituição, sob os números: CPQBA-481 (*Phyllanthus niruri*), CPQBA-55 (*Phyllanthus tenellus*), CPQBA-479 (*Phyllanthus caroliniensis*), CPQBA-187 (*Phyllanthus amarus*), CPQBA-341 (*Phyllanthus urinaria*) e CPQBA-1336 (*Phyllanthus stipulatus*).

O material vegetal seco foi pulverizado grosseiramente em moinho de facas rotativas e transferido para frascos de vidro âmbar previamente limpos e secos. As amostras foram identificadas e guardadas em armário fechado, protegidas de calor excessivo, luz e umidade. Antes da extração, as amostras foram novamente pulverizadas em liquidificador industrial de aço inox e a granulometria foi padronizada com tamiz 60 mesh (0,25 mm de malha).

6.2.2. Amostras cultivadas na UFSCar

6.2.2.1. Cultivo de espécies de *Phyllanthus*

Juntamente com as amostras vegetais fornecidas pelo CPQBA-UNICAMP, foram obtidas sementes das respectivas espécies, com as quais se realizou o cultivo em condições controladas, no *campus* da UFSCar, durante o ano de 2007.

As sementes permaneceram guardadas em frascos de vidro hermeticamente fechados, sob refrigeração a 5°C, durante 6 meses. Foram germinadas em tubetes plásticos apropriados, os quais foram previamente lavados e descontaminados com solução de hipoclorito de sódio por 12 horas, enxaguados com água corrente e secos ao sol. Para o preparo do substrato, foram utilizados: substrato agrícola comercial (Technes[®]), vermiculita e adubo granulado (N/P/K = 10/10/10), sendo utilizadas 2 partes de substrato agrícola para 1 parte de vermiculita (proporção de volume) e 150 g de adubo granulado. A mistura foi rigorosamente homogeneizada e utilizada para preencher os tubetes, que foram dispostos em plataformas apropriadas.

Antes do plantio, os tubetes foram irrigados abundantemente com água, aguardou-se 24 horas para sedimentação do substrato; o plantio foi realizado em 31 de agosto de 2006. Foram depositadas 5-7 sementes em uma pequena concavidade de cada tubete, em seguida foram cobertas por uma fina camada do

substrato preparado. Cada espécie foi semeada em uma plataforma, que tem capacidade para 172 tubetes. Considerando que a taxa de germinação é, em média, de 60%, seria esperado obter 100 plantas de cada espécie.

As plataformas contendo os tubetes foram colocadas em bancadas no interior de uma estufa agrícola do Departamento de Botânica da UFSCar; no seu interior, há controle de temperatura e umidade do ar, permanecendo a 25°C e 40%, respectivamente. Os tubetes foram irrigados diariamente, com auxílio de um pulverizador mecânico, durante 40 dias.

O canteiro para transplante das mudas foi preparado no *campus* da UFSCar, na área da CEMA (Coordenadoria Especial do Meio Ambiente), compreendendo uma área total de 20,5m de comprimento x 2,0m de largura. A área do canteiro foi capinada e a terra revolvida com sulcação mecanizada; posteriormente os canteiros foram demarcados, sendo que para cada espécie foi reservado um espaço de 3,30 x 2,0m, com corredor de 1,0m separando as mesmas; nenhum tratamento ou adubação do solo foi realizado. Quando a semeadura nos tubetes atingiu 40 dias, foi feito o transplante para os canteiros, selecionando as mudas cuja altura estava entre 15-16 cm. O espaçamento foi de 20cm na linha e 50cm entrelinhas, totalizando 76 plantas/espécie. Após o transplante, o canteiro foi mantido com irrigações diárias e capinas periódicas.

6.2.2.2. Coletas e processamento de amostras

As espécies do gênero *Phyllanthus* cultivadas no campus da UFSCar foram coletadas em 20 de janeiro, 30 de abril e em 30 de outubro de 2007. As coletas foram realizadas no período da manhã, utilizando tesoura apropriada para jardinagem e o corte foi feito 10cm acima do nível do solo. As amostras foram recebidas em sacos plásticos novos, limpos e secos, sem contato com o solo.

A secagem foi feita em estufa de ar circulante a 40°C, por sete dias. Após esse período, as amostras foram transferidas para sacos plásticos transparentes e devidamente identificadas. A moagem e pulverização foram feitas conforme descrito no item 6.2.1.

6.2.3. Coleta de amostras não cultivadas de *Phyllanthus*

Foram coletadas amostras não cultivadas de espécies de *Phyllanthus* em 27 municípios do estado de São Paulo, durante o período de 27 de dezembro de 2007 a 17 de janeiro de 2008. As coletas foram realizadas em períodos variados do dia, utilizando tesoura apropriada para jardinagem, sem entrar em contato com o solo. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos novos, limpos e secos e identificadas com seus respectivos locais de origem.

As amostras permaneceram em local sombreado e arejado até serem transferidas para secagem em estufa com circulação de ar a 40°C, durante 7 dias. Após esse período, as amostras foram transferidas para sacos plásticos transparentes, identificadas e armazenadas em local seco e protegido do sol, calor excessivo e umidade. A moagem e pulverização foram feitas conforme descrito no item 6.2.1.

Em cada local de coleta, foram adquiridas as coordenadas geográficas utilizando equipamento de localização por satélite GPS (Garmin®). Amostras vegetais (n=3) foram herborizadas nos locais de coleta, posteriormente levadas à secagem em estufa a 45°C e encaminhadas para identificação taxonômica no Instituto de Botânica de São Paulo. Após a identificação, foram preparadas exsiccatas e depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFSCar, sob os números 7246 a 7273.

6.2.4. Obtenção e processamento de amostras comerciais

Durante o desenvolvimento de todo o período experimental, foram obtidas 24 amostras comerciais de chás de “quebra-pedra” em diferentes locais, além de uma formulação em cápsula, contendo planta seca e pulverizada, que foi adquirida pela *internet*. Todas as amostras apresentavam-se dentro do prazo de validade estipulado pelos fabricantes. As amostras de chás foram submetidas à moagem e pulverização conforme descrito no item 6.2.1. As cápsulas foram abertas e seu conteúdo foi tamizado com peneira 60 mesh, o pó obtido foi transferido para frasco de vidro limpo e seco e identificado.

6.3. Preparo dos Extratos Aquosos

Extração aquosa 1 (ExtAq 1)⁵³ – pesou-se exatamente 750mg de *Phyllanthus niruri* pó (60 mesh) e transferiu-se para balão de fundo redondo de 50 mL. Adicionou-se 10 mL de água deionizada; adaptou-se coluna de refluxo do tipo ‘vigroux’ e levou-se ao aquecimento em banho de óleo a 120°C; após o início da fervura foram cronometrados 15 minutos. O sistema foi resfriado em temperatura ambiente, o conteúdo do balão foi transferido para balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água; homogeneizou-se e filtrou-se em papel de filtro; 50µL dessa amostra foram injetados no sistema cromatográfico.

Extração aquosa 2 (ExtAq 2)⁵³ – pesou-se exatamente 750mg de *Phyllanthus niruri* pó (60 mesh) e transferiu-se para balão de fundo redondo de 125 mL. Adicionou-se 100 mL de água deionizada; adaptou-se uma coluna de refluxo do tipo ‘vigroux’ e levou-se ao aquecimento em banho de óleo a 85°C, sob homogeneização lenta e constante, com agitador magnético, durante 3 horas. O sistema foi resfriado em temperatura ambiente, o conteúdo do balão foi transferido para balão volumétrico de 250 mL e o volume foi completado com água; homogeneizou-se e filtrou-se em papel de filtro; 50µL dessa amostra foram injetados no sistema cromatográfico.

Extração aquosa 3 (ExtAq 3) - pesou-se exatamente 3g de amostra vegetal em pó (60 mesh) em balão de fundo redondo de duas ou três bocas, com capacidade para 50 mL. Adicionou-se 20 mL de água deionizada e, na boca central do balão, adaptou-se uma coluna do tipo ‘vigroux’; em uma das bocas laterais, adaptou-se um termômetro e vedou-se o sistema com septos. Levou-se ao aquecimento em manta de aquecimento e, quando a temperatura interna atingiu 98°C, foram cronometrados 15 minutos. O sistema foi resfriado em temperatura ambiente, o conteúdo do balão foi filtrado em papel de filtro para balão de fundo redondo de 125 mL, utilizando 30 mL de água para a completa transferência e filtração do material vegetal. A amostra foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada. O extrato liofilizado foi transferido para frasco de vidro tampado, identificado, pesado e mantido em freezer a -20°C.

Para análise, a amostra foi descongelada em temperatura ambiente e exatamente pesada (30 mg) em tudo de ensaio. Adicionou-se 1 mL de água deionizada, homogeneizou-se em agitador de tubos por 1 minuto. A amostra líquida

obtida foi filtrada com algodão hidrófilo comercial, transferida para frasco de amostragem (*vials*) e disposta na bandeja do autoinjeter; 10 µL da amostra foram injetados no sistema cromatográfico.

6.4. Condições analíticas para o perfil cromatográfico de extratos de espécies de *Phyllanthus* e de amostras comerciais de “quebra-pedra”

As amostras obtidas conforme os itens 6.2.1 a 6.2.4 e preparadas conforme procedimentos descritos no item 6.3 foram analisadas empregando-se uma coluna analítica Luna[®] Hexil-fenil (15 x 0,46 cm d.i., 120 Å de diâmetro poro, 10µm de diâmetro de partícula), adaptada a uma pré-coluna C₁₈ (4 x 3 mm, Phenomenex). Utilizou-se vazão de 0,5mL/min e volume de injeção de 10µL.

As análises foram feitas em eluição gradiente no modo reverso, com fase móvel constituída por MeOH (**B**) e solução de ácido fosfórico 0,1%(v/v) (**A**), com a seguinte inclinação: 5-100% de **B** em 50 min ($\Delta\%B = 1,90$), permanecendo isocrático em 100% de **B** por 10 min; o retorno do gradiente foi feito em 5 min (100-5% de **B**). A coluna foi condicionada em 5% de **B** por 30 min entre cada análise.

Os cromatogramas foram registrados com detector de arranjo de diodos em varredura de 190-600 nm, com aquisição em intervalos de 1,23nm, fornecendo 330 cromatogramas por análise.

6.5. Isolamento e caracterização de corilagina

O extrato aquoso liofilizado de *Phyllanthus niruri*, obtido conforme procedimento descrito no item 6.3, foi utilizado para isolamento de marcador químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semi-preparativa, utilizando coluna contendo fase estacionária de sílica Luna[®] Hexil-fenil (25,0 x 0,7 cm d.i.).

A fase móvel utilizada para separação e isolamento de corilagina foi preparada com MeOH e solução de ácido fórmico 0,5% v/v, na proporção de 20:80 v/v. A vazão utilizada foi de 3,1 mL/min, com volume de injeção de 500µL e detecção em 275nm.

As frações correspondentes às bandas cromatográficas de interesse foram coletadas em balões de fundo redondo, concentradas em rotaevaporador,

congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24 horas. Após, as amostras purificadas foram transferidas para frascos de vidro âmbar limpos e secos, tampados, identificados e pesados.

Para a caracterização da amostra purificada (**fração 1**) por RMN, fez-se a diluição de 10 mg em 700 μ L de DMSO- d_6 em tubo apropriado. Para a análise por espectrometria de massas, preparou-se uma solução aquosa de concentração 1 μ g/mL, que foi inserida diretamente na fonte de ionização *electrospray*, por infusão direta. Neste experimento utilizou-se, além da bomba de infusão (vazão de 800 μ L/h), a bomba do sistema cromatográfico, com fase móvel MeOH:ácido fórmico 0,5%(v/v) (20:80) e vazão ajustada em 300 μ L/min. As condições de ionização foram: polaridade negativa; pressão de nebulização de 40 psi com vazão de 9,0 L/min (nitrogênio), temperatura do capilar 350°C, voltagem do capilar +3KV, voltagem do cone (*skimmer*) -34,5V, saída do capilar -197,5V.

Corilagina: pó amorfo levemente amarelado. $[\alpha]_D = -145^\circ$ (25°C, EtOH, c 0,006). Análise elementar: carbono = 49,98% e hidrogênio 4,34%. ESI/MS *m/z* (modo negativo): $[M-H]^-$: 633, 463, 301, 275. RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): 3,88 (1H, dd, J=6 e 1,6Hz, H2'''), 3,99 (1H, dd, J=9 e 11,2Hz, H6'''a), 4,21 (1H, dd, J=8 e 11,2Hz, H6'''b), 4,25 (1H, d, J=2,8Hz, H4'''), 4,36 (1H, dd, J=8 e 9Hz, H5'''), 4,58 (1H, 5 sinais, J=1,6Hz, H3'''), 6,21 (1H, d, J=6Hz, H1'''), 6,46 (s, 1H, H2), 6,53 (s, 1H, H2'), 7,02 (s, 2H, H2'' e H6''). RMN ^{13}C , δ ppm: 61,9 (C4'''), 63,7 (C6'''), 71,5 (C2'''), 76,1 (C5'''), 77,4 (C3'''), 91,9 (C1'''), 105,7 (C2), 106,6 (C2'), 108,7 (C2'' e C6''), 116,8 (C6), 117,3 (C6'), 119,1 (C1''), 120,6 (C1), 125,5 (C1'), 133,9 (C4), 138,3 (C4'), 140,0 (C4''), 144,8 (C3), 144,9 (C3'), 145,4 (C5), 145,6 (C5'), 146,4 (C3'' e C5''), 166,8 (C=O), 168,6 (C=O), 170,2 (C=O).

6.6. Quantificação de corilagina em extratos de amostras cultivadas e não cultivadas de *Phyllanthus* e em amostras comerciais de “quebra-pedra”

6.6.1. Condições analíticas do método quantitativo

A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna analítica Luna[®] hexil-fenil e fase móvel constituída por solução de ácido fosfórico 0,1% v/v (**A**) e MeOH (**B**). Utilizou-se vazão de 1mL/min e volume de injeção de 50 μ L.

As análises foram feitas em eluição isocrática no modo reverso, utilizando 20% de **B** durante 25 min. Para limpeza da coluna, fez-se eluição gradiente: 20-100% de **B** em 5 min, permanecendo em 100% de **B** por 10 min; o retorno do gradiente foi feito em 5 min (100-20% **B**). A coluna foi condicionada em 20% **B** por 25 min entre cada análise.

Os cromatogramas foram registrados com detector de ultravioleta em 230 nm. A banda cromatográfica referente ao corilagina foi determinada pelo tempo de retenção obtido com análise de solução do padrão e a pureza da banda cromatográfica foi assegurada pela análise de amostras de extratos, utilizando o detector de arranjo de diodos, com varredura de 190-600nm.

6.6.2. Preparo das soluções estoque, padrões de calibração e amostras controle de qualidade

A solução estoque de corilagina foi preparada em MeOH, na concentração de 1 mg/mL, em balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, foram preparadas soluções de trabalho, em MeOH, nas concentrações: 25; 87,5; 150; 212,5; 275; 337,5 e 400 µg/mL (para os padrões de calibração) e 70; 200 e 320 µg/mL (para os controles de qualidade).

Curva de calibração por padrão externo:

As soluções de calibração foram preparadas, em triplicata, da seguinte forma: 100 µL das soluções de trabalho foram colocadas em tubos de ensaio, o MeOH foi evaporado em ar comprimido. Após a secagem, as amostras foram solubilizadas em 1 mL de solução de ácido fosfórico 0,1% v/v e agitadas em vórtex por 1 minuto. As concentrações finais dos padrões de calibração foram: 2,5; 8,75; 15,0; 21,25; 27,5; 33,75 e 40 µg/mL. Amostras branco (n=3), constituídas por solução de ácido fosfórico 0,1% v/v, foram analisadas durante a corrida analítica. A curva de calibração foi obtida por regressão linear, a partir da relação entre as áreas dos picos e as concentrações das amostras.

As soluções controle de qualidade foram preparadas analogamente aos padrões de calibração, a partir das soluções de trabalho, em quintuplicata. As

concentrações finais foram: 7, 20 e 32 µg/mL, para os controles de qualidade de baixa, média e alta concentrações, respectivamente.

Curva de calibração por adição de padrão:

Foi preparado um extrato aquoso liofilizado de *P. tenellus*, conforme descrito no item 6.3, a partir da mistura, em partes iguais, de quatro amostras vegetais cultivadas: coleta de Campinas (CPQBA, janeiro de 2006) e da UFSCar, em três períodos (janeiro, abril e outubro de 2007). Esse extrato foi utilizado para a construção da curva de calibração por adição de padrão, preparando-se uma solução estoque com concentração de 0,5 mg/mL do extrato, utilizando solução de ácido fosfórico 0,1% v/v como solvente, em balão volumétrico de 50 mL.

As soluções de calibração foram preparadas, em triplicata, de forma análoga à curva de padrão externo. Entretanto as soluções, após evaporação do MeOH, foram solubilizadas em 1 mL da solução estoque do extrato (0,5 mg/mL), com agitação em vórtex por 1 minuto. As concentrações dos padrões de calibração foram: 2,5; 8,75; 15,0; 21,25; 27,5; 33,75 e 40 µg/mL. A curva de calibração foi obtida por regressão linear, a partir da relação entre as áreas dos picos e as concentrações das amostras. A determinação da concentração de corilagina na solução estoque foi determinada a partir do valor médio das áreas, dividido pelo coeficiente angular da regressão linear obtida.

6.6.3. Limites de Quantificação e de Detecção

O limite de quantificação (LQ) foi determinado pela análise de soluções de concentrações decrescentes de corilagina, em quintuplicata, a partir da concentração 5 µg/mL. A precisão e a exatidão foram verificadas em cada análise, de forma que um desvio maior que 20%, em qualquer um destes parâmetros, foi utilizado como critério para determinação do LQ.

O limite de detecção foi determinado considerando uma relação sinal/ruído de três vezes a linha de base da banda cromatográfica referente ao corilagina, igualmente determinado pela análise de soluções de concentrações decrescentes, a partir de uma solução de concentração 1µg/mL.

6.6.4. Preparo de amostras para aplicação do método

O método quantitativo foi aplicado em extratos aquosos liofilizados de 14 amostras cultivadas de espécies de *Phyllanthus*, 24 amostras de *P. tenellus* não cultivadas e 25 amostras comerciais de “quebra-pedra”. Todas as amostras foram preparadas na concentração de 0,5 mg/mL em solução de ácido fosfórico 0,1% v/v, em balão volumétrico de 10mL.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Atualmente, a utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na análise de extratos vegetais encontra-se inserida na rotina laboratorial, tanto na esfera da pesquisa científica, quanto no setor analítico de indústrias químicas e farmacêuticas. As diferentes possibilidades de aplicação desta poderosa ferramenta analítica de separação têm estimulado o aperfeiçoamento profissional e a exploração de suas potencialidades. Neste contexto, o presente trabalho representa uma contribuição para a aplicação da CLAE no controle de qualidade químico de produtos de origem vegetal.

O desenvolvimento de um método padronizado de extração foi fundamental para que as análises cromatográficas fossem realizadas a partir de amostras preparadas com boa reprodutibilidade. O método cromatográfico desenvolvido para o *fingerprint* dos extratos aquosos apresentou-se apropriado para a representatividade das amostras submetidas ao estudo, com a separação de bandas cromatográficas capazes de caracterizar e distinguir as espécies de *Phyllanthus* analisadas. O procedimento de validação do método demonstrou que os processos de extração, preparo de amostra e análise cromatográfica foram reprodutíveis e forneceram perfis cromatográficos com precisão e repetibilidade adequados.

O presente trabalho demonstrou, através das análises quimiométricas dos perfis cromatográficos, que é possível diferenciar as espécies de *Phyllanthus* estudadas, independentemente de terem sido cultivadas ou não. Isso indica que muitas características químicas peculiares a cada espécie são mantidas em amostras provenientes de *habitats* distintos. A simples inspeção visual comparativa dos perfis cromatográficos obtidos seria ineficaz para contemplar esse objetivo. A utilização da quimiometria se apresentou como a melhor opção para a análise adequada das informações químicas multivariadas que o método cromatográfico forneceu.

Além das análises exploratórias das amostras cultivadas e não-cultivadas de espécies de *Phyllanthus*, o presente trabalho demonstrou a importância da construção e validação de modelos quimiométricos de classificação (KNN, SIMCA e PLS-DA) a partir de amostras autênticas e sua aplicação na determinação da autenticidade de 25 amostras comerciais. Além disso, a

comparação dos resultados fornecidos pelos modelos mostrou ser bastante informativa, pois se verificou que a classificação de amostras desconhecidas pode ser diferente entre eles, uma vez que utilizam mecanismos matemáticos distintos para estabelecer critérios de semelhanças e diferenças entre as amostras. Das 25 amostras comerciais analisadas, nenhuma foi classificada como *P. niruri*, embora 16 amostras fossem rotuladas como tal; 15 amostras foram classificadas pelos modelos KNN e PLS-DA como *P. tenellus* e 2 como *P. amarus*. O modelo KNN classificou todas as demais amostras como *P. tenellus*, enquanto o SIMCA não classificou 17 das 25 amostras. Ambas as espécies *P. niruri* e *P. tenellus* encontram-se descritas na Farmacopéia e podem ser utilizadas como “quebra-pedra”, porém a não conformidade na identificação correta da espécie demonstra que esses produtos não se encontram sob controle de qualidade adequado por parte das empresas que os comercializam. Para dois produtos comerciais, houve inequívoca determinação de adulteração, pois esses não foram classificados como pertencentes a nenhuma espécie de *Phyllanthus*. Desta forma, foi demonstrado que a associação da análise por *fingerprint* cromatográfico de extratos vegetais, associada a técnicas quimiométricas, pode estabelecer parâmetros para a determinação de autenticidade e qualidade de amostras vegetais comerciais, matérias-primas vegetais, extratos padronizados e fitoterápicos, constituindo uma opção apropriada para essas finalidades.

O isolamento e caracterização do marcador químico corilagina tornou possível o desenvolvimento e validação de um método cromatográfico para sua quantificação em espécies de *Phyllanthus*. A utilização da Cromatografia Líquida em escala semi-preparativa, com a finalidade de obtenção do marcador a partir do extrato aquoso bruto de *P. niruri* forneceu, em uma única etapa de purificação, a substância corilagina com elevada pureza e bom rendimento, permitindo sua caracterização espectroscópica e sua quantificação exata e precisa.

A aplicação do método quantitativo em amostras cultivadas de espécies de *Phyllanthus* demonstrou que existem variações na concentração de corilagina em decorrência de diferentes locais de cultivo e da época do ano. Esse resultado pode ser futuramente explorado em estudos de monitoramento de compostos fenólicos em cultivares de *Phyllanthus*, como forma de acompanhamento do manejo agrônomo, ou para a obtenção desse marcador químico com fins medicinais. Para as amostras não-cultivadas de *P. tenellus*, foi observado que há

flutuações na concentração de corilagina, fato que pode ser consequência da influência de diferentes *habitat's* sobre o metabolismo desses vegetais. Em virtude desses resultados, a quantificação desse marcador com a finalidade de avaliar a autenticidade e a qualidade de amostras comerciais não constitui uma abordagem eficiente, pois poderia resultar em conclusões equivocadas sobre essas amostras.

Desta forma, por meio dos resultados obtidos no presente trabalho, ficou demonstrado que ambas as abordagens (quali e quantitativas) apresentam aplicabilidade no estabelecimento de parâmetros de autenticidade e qualidade de amostras de “quebra-pedra”, porém com enfoques diferentes. Enquanto o perfil cromatográfico, associado às análises quimiométricas, permite avaliar semelhanças e diferenças entre espécies de *Phyllanthus* e investigar efetivamente a autenticidade de amostras comerciais e matérias-primas vegetais, a quantificação do marcador químico corilagina pode ser utilizada no acompanhamento do metabolismo secundário dessas espécies em diferentes condições de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 48. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 16 de março de 2004.
2. Alves FNR. Desafio para a Inovação em Fitomedicamentos no contexto da indústria farmacêutica nacional. *Revista Fitos* 2005;1(1):18-29.
3. Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. *Química Nova* 1998;21(1):99-105.
4. Hostettmann K, Queiroz EF, Vieira PC. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos, SP: EdUFSCar; 2003. 152 p.
5. Bassani VL, Gonzáles OG, Petrovick PR. Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Fitoterápicos. *Revista Fitos* 2005;1(1):14-17.
6. Michiles E, Botsaris AS. Medicamentos sintéticos e fitoterápicos: potencialidades de equivalência. *Revista Fitos* 2005;1(1):36-42.
7. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000;33(2):179-189.
8. Zhang X. WHO. International Regulatory Cooperation on Proper Use of Traditional Medicine. 2006; Curitiba, PR.
9. Dias CRC, Romano-Lieber NS. Processo da implantação da política de medicamentos genéricos no Brasil. *Caderno de Saúde Pública* 2006;22(8):1661-1669.
10. Veiga Junior VF. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008;18(2):308-313.
11. Calixto JB. Medicamentos Fitoterápicos. Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó, SC: Editora Argos; 2001. p 500.
12. Freitas A. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Brasil; 2007. p 28.
13. Marques LC, Paris CAM. Pesquisa em Fitoterapia: cenário atual e tendências. *Fármacos & Medicamentos* 2004;28:28-35.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Decreto 5.813: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2006.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 88. Lista de Referências Bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 16 de março de 2004.

16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 89. Lista de registro simplificado de fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.; 16 de março de 2004.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 90. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 16 de março de 2004.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 91. Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 16 de março de 2004.
19. WHO. World Health Organization. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva; 2000. p 1-80.
20. Farias MR. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre, RS; Florianópolis, SC: Editora da UFSC, Editora da UFRGS; 2004. p 263-288.
21. Liang Y-Z, Xie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. Journal of Chromatography B 2004;812(1-2):53-70.
22. WHO. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials.; 1998. p 122.
23. WHO. World Health Organization. Good Manufacturing Practices: updated supplementary guidelines for the manufacture of herbal medicinal products. 2005. p 21.
24. WHO. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials - Revised Draft Update. 2005. p 62.
25. European Medicines Agency. Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP) and Committee for Medicinal Products for Veterinary use (CVMP). London, UK; 2006. p 1-11.
26. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova 2007;30(2):374-381.
27. Marchese JA, Figueira GM. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 2005;7(3):86-96.
28. Rai V, Khatoon S, Bisht SS, Mehrotra S. Effect of cadmium on growth, ultramorphology of leaf and secondary metabolites of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. Chemosphere 2005;61:1644-1650.
29. He X-G. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. Journal of Chromatography A 2000;880(1-2):203-232.

30. Bacchi EM, Oliveira F. Caracterização química da droga e do extrato fluido de *Phyllanthus tenellus* Roxb. - quebra-pedra. *Anais de Farmácia e Química* 1983;23(1):19-27.
31. Mouco G, Bernardino MJ, Cornélio ML. Controle de qualidade de ervas medicinais. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 2003;31:68-73.
32. Nyireddy S. Separation strategies of plant constituents-current status. *Journal of Chromatography B* 2004;812(1-2):35-51.
33. Barreiro EJ, Fraga CAM, Araújo Junior JX. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis, SC / Porto Alegre, RS: Editora da UFSC/Editora da UFRGS; 2004. p 147-210.
34. Von Poser GL, Mentz LA. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis, SC / Porto Alegre, RS: Editora da UFSC/Editora da UFRGS; 2004. p 75-89.
35. Wolfender J-L, Ndjoko K, Hostettmann K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectrometry: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *Journal of Chromatography A* 2003;1000(1-2):437-455.
36. Ong ES. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Journal of Chromatography B* 2004;812(1-2):23-33.
37. Drasar P, Moravcova J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. *Journal of Chromatography B* 2004;812(1-2):3-21.
38. Wang Z, Wang H, Chen S. Analysis of Ginsenosides in Sheng-Mai-Yin Decoction by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography* 2006;24(4):325-330.
39. Beltrame FL, Filho ER, Barros FAP, Cortez DA, Cass QB. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichillia catigua* used as Catuaba. *Journal of Chromatography A* 2006;1119(1-2):257-263.
40. Li H, Chen B, Zhang Z, Yao S. Focused microwave-assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Talanta* 2004;63(3):659-665.
41. Avula B, Choi Y-W, Srinivas PV, Khan IA. Quantitative determination of lignan constituents from *Schisandra chinensis* by Liquid Chromatography. *Chromatographia* 2005;61(9/10):515-518.
42. Montoro P, Carbone V, Quiroz JDZ, De Simone D, Pizza C. Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. *Phytochemical Analysis* 2004;15:55-64.

43. Murugaiyah V, Chan K-L. Determination of four lignans in *Phyllanthus niruri* L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 2007;1154(1-2):198-204.
44. Xie P, Chen S, Liang Y-z, Wang X, Tian R, Upton R. Chromatographic fingerprint analysis--a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *Journal of Chromatography A* 2006;1112(1-2):171-180.
45. Chan W, Hui KM, Poon WT, Lee KC, Cai Z. Differentiation of herbs linked to "Chinese herb nephropathy" from the liquid chromatographic determination of aristolochic acids. *Analytica Chimica Acta* 2006;576(1):112-116.
46. Hendriks MMWB, Cruz-Juarez L, Bont DD, Hall RD. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. *Analytica Chimica Acta* 2005;545(1):53-64.
47. Fan X-H, Cheng Y-Y, Ye Z-L, Lin R-C, Qian Z-Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. *Analytica Chimica Acta* 2006;555(2):217-224.
48. Markom M, Hasan M, Daud WRW, Singh H, Jahim JM. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and Purification Technology* 2007;52(3):487-496.
49. Huie CW. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002;373:23-30.
50. Webster GL. A Revision of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in the Continental United States. *Brittonia* 1970;22:44-76.
51. Bacchi EM. Farmacognosia de algumas espécies de *Phyllanthus* conhecidas como quebra-pedras. *Anais de Farmácia e Química* 1984;24(1,2):39-44.
52. Amaral LG, Ulysséa M. Considerações sobre a identificação de espécies de *Phyllanthus* (quebra-pedra). *Insula* 1993;22:21-38.
53. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 73. *Fascículo 5 da Parte II da 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira*. Monografias 246 e 247. 13 de abril de 2004.
54. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum; 2002. p 127.
55. Amat AG, Vajia ME, Rodriguez ME, Sanchez F. Estudio Farmacobotánico y Farmacognóstico de *Phyllanthus niruri* L. y *Phyllanthus tenellus* Roxb. (*Euphorbiaceae*). *Acta Farmacéutica Bonaerense* 1991;10(3):161-169.
56. Calixto JB, Santos ARS, Cechinel Filho V, Yunes RA. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. *Medicinal Research Reviews* 1998;18(4):225-258.

57. Ganeshpure PA, Schneiders GE, Stevenson R. Structure and synthesis of hypophyllanthin, nirtetralin, phyltetralin and lintetralin. *Tetrahedron Letters* 1981;22(5):393-396.
58. Qian-Cutrone J, Huang S, Trimble J, Li H, Lin PF, Alam M, Klohr SE, Kadow KF. Niruriside, a New HIV REV/RRE Binding Inhibitor from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 1996;59(2):196-199.
59. Petchnaree P, Bunyaphrathasara N, Cordell GA, Cowe HJ, Cox PJ, Howie RA, Patt SL. X-ray crystal and molecular structure of nirurine, a novel alkaloid related to the securiniga alkaloid skeleton, from *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae). *Journal of Chemical Society Perkin Trans* 1986;1:1551-1556.
60. Subeki, Matsuura H, Takahashi K, Yamasaki M, Yamato O, Maede Y, Katakura K, Kobayashi S, Trimurningsih, Chairul and others. Anti-babesial and Anti-plasmodial Compounds from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 2005;68(4):537-539.
61. Ishimaru K, Yoshimatsu K, Yamakawa T, Kamada H, Shimomura K. Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. *Phytochemistry* 1992;31(6):2015-2018.
62. Harish R, Shivanandappa T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chemistry* 2006;95(2):180-185.
63. Prakash A, Satyan KS, Wahi SP, Singh RP. Comparative hepatoprotective activity of three *Phyllanthus* species, *P. urinaria*, *P. niruri* and *P. simplex*, on carbon tetrachloride induced liver injury in the rat. *Phytotherapy Research* 1995;9:594-596.
64. Ueno H, Horie S, Nishi Y, Shogawa H, Kawasaki M, Suzuki S, Hayashi T, Arisawa M, Shimizu M, Yoshizaki M and others. Chemical and Pharmaceutical Studies on Medicinal Plants in Paraguay, Geraniin, an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor from "Paraparai Mi," *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 1988;51(2):357-359.
65. Singh B, Agrawal PK, Thakur RS. Chemical constituents of *Phyllanthus niruri* Linn. *Indian Journal of Chemistry* 1986;25B:600-602.
66. Gupta DR, Ahmed B. Nirurin: a New Prenylated Flavanone Glycoside From *Phyllanthus nirurii*. *J. Nat. Prod.* 1984;47(6):958-963.
67. Joshi BS, Gawad DH, Pelletier SW, Kartha G, Bhandary K. Isolation and Structure (X-Ray Analysis) of Ent-Norsecurinine, an Alkaloid from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod.* 1986;49(4):614-620.
68. Wei WX, Pan YJ, Chen Y, Lin C, Wei TY, Zhao S. Carboxylic acids from *Phyllanthus urinaria*. *Chemistry of Natural Compounds* 2005;41(1):17-21.
69. Wei WX, Gong XG, Ishrud O, Pan YJ. New lignan isolated from *Phyllanthus niruri* Linn. structure elucidation by NMR spectroscopy. *Bulletin of Korean Chemical Society* 2002;23(6):896-898.

70. Chauhan JS, Sultan M, Srivastava SK. Two new glycoflavones from the roots of *Phyllanthus niruri*. *Planta Medica* 1977;32:217-222.
71. Somanabandhu A, Nitayangkura S, Mahidol C, Ruchirawat S, Likhitwitayawuid K, Shieh H-I, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA. 1H- and 13C-Nmr Assignments of Phyllanthin and Hypophyllanthin: Lignans That Enhance Cytotoxic Responses with Cultured Multidrug-Resistant Cells. *J. Nat. Prod.* 1993;56(2):233-239.
72. Calixto JB, Yunes RA, Neto ASO, Valle RMR, Rae GA. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1984;17:313-321.
73. Chang C-C, Lien Y-C, Liu KCSC, Lee S-S. Lignans from *Phyllanthus urinaria*. *Phytochemistry* 2003;63(7):825-833.
74. Sánchez-Lamar A, Fiore M, Cundari E, Ricordy R, Cozzi R, De Salvia R. *Phyllanthus orbicularis* Aqueous Extract: Cytotoxic, Genotoxic, and Antimutagenic Effects in the CHO Cell Line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1999;161(3):231-239.
75. Sutthivaiyakit S, Nakorn NN, Kraus W, Sutthivaiyakit P. A novel 29-nor-3,4-seco-friedelane triterpene and a new guaiane sesquiterpene from the roots of *Phyllanthus oxyphyllus*. *Tetrahedron* 2003;59(50):9991-9995.
76. Saúde na Rede. <http://www.saudeforum.com.br/loja/?p=ps&id=quebrapedra>. data de acesso: 29-09-2008.
77. MaxWay Net.Shopping. http://www.maxway.com.br/loja_maxway/product_details.asp?product_id=70047. data de acesso: 29-09-2008.
78. CHÁ & CIA. <http://www.chaecia.com.br/loja/Default.asp?Loja=129&Pagina=PagDetalhesPrduto&produtoId=2940&vc=1>. data de acesso: 29-09-2008.
79. Freitas AM, Schor N, Boim MA. The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associated with renal stone formation. *BJU International* 2002;89:829-834.
80. Nishiura JL, Campos AH, Boim MA, Heilberg IP, Schor N. *Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients. *Urological Research* 2004;32:362-366.
81. Barros ME, Schor N, Boim MA. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Urological Research* 2003;30:374-379.
82. Hassarajani SA, Mulchandani NB. Securinine type of alkaloids from *Phyllanthus niruri*. *Indian Journal of Chemistry* 1990;29B:801-803.
83. Hussain RA, Dickey JK, Rosser MP, Matson JA, Kozlowski MR, Brittain RJ, Webb ML, Rose PM, Fernandes P. A Novel Class of Non-Peptidic Endothelin

- Antagonists Isolated from the Medicinal Herb *Phyllanthus niruri*. J. Nat. Prod. 1995;58(10):1515-1520.
84. Satyanarayana P, Subrahmanyam P, Viswanatham KN, Ward RS. New Seco- and Hydroxy-Lignans from *Phyllanthus niruri*. J. Nat. Prod. 1988;51(1):44-49.
 85. Singh B, Agrawal PK, Thakur RS. A New Lignan and a New Neolignan from *Phyllanthus niruri*. J. Nat. Prod. 1989;52(1):48-51.
 86. Wei WX, Pan YJ, Zhang H, Iin CW, Wei TY. Two new compounds from *Phyllanthus niruri*. Chemistry of Natural Compounds 2004;40(5):460-464.
 87. Singh B, Agrawal PK, Thakur RS. An acyclic triterpene from *Phyllanthus niruri*. Phytochemistry 1989;28(7):1980-1981.
 88. Chauhan JS, Sultan M, Srivastava SK. Chemical investigation of the roots of *Phyllanthus niruri*. Journal of Indian Chemical Society 1979;56:326.
 89. Singh B, Agrawal PK, Thakur RS. Euphane triterpenoids from *Phyllanthus niruri*. Indian Journal of Chemistry 1989;28B:319-321.
 90. Mellinger CG, Carbonero ER, Noletto GR, Cipriani TR, Oliveira MBM, Gorin PAJ, Iacomini M. Chemical and Biological Properties of an Arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. J. Nat. Prod. 2005;68(10):1479-1483.
 91. Mellinger CG, Carbonero ER, Cipriani TR, Gorin PAJ, Iacomini M. Xylans from the Medicinal Herb *Phyllanthus niruri*. J. Nat. Prod. 2005;68(1):129-132.
 92. Wei WX, Pan YJ. The crystal structure of one natural compound cyclo-(1,10-docandiamino-11,20-docanedioic)amide(1,12-diazacyclodocosane-2,11-dione). Bulletin of Korean Chemical Society 2002;23(11):1527-1530.
 93. Caffarena ER, Lorenzo AC. Conformational and dynamical properties of the niruriside in aqueous solution: a molecular dynamics approach. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM 2005;714(2-3):189-197.
 94. Huang YL, Chen CC, Hsu FL, Chen CF. Two Tannins from *Phyllanthus tenellus*. J. Nat. Prod. 1998;61(4):523-524.
 95. Soares LAL, Gonzáles OG, Bassani VL, Petrovick PR. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. Caderno de Farmácia 1998;14(1/2):21-26.
 96. De Souza TP, Holzschuh MH, Lionço MI, González Ortega G, Petrovick PR. Validation of a LC method for the analysis of phenolic compounds from aqueous extract of *Phyllanthus niruri* aerial parts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2002;30(2):351-356.
 97. Soares LAL, Bassani VL, González Ortega G, Petrovick PR. Total Flavonoid Determination for the Quality Control of Aqueous Extractives from *Phyllanthus niruri* L. Acta Farm. Bonaerense 2003;22(3):203-207.

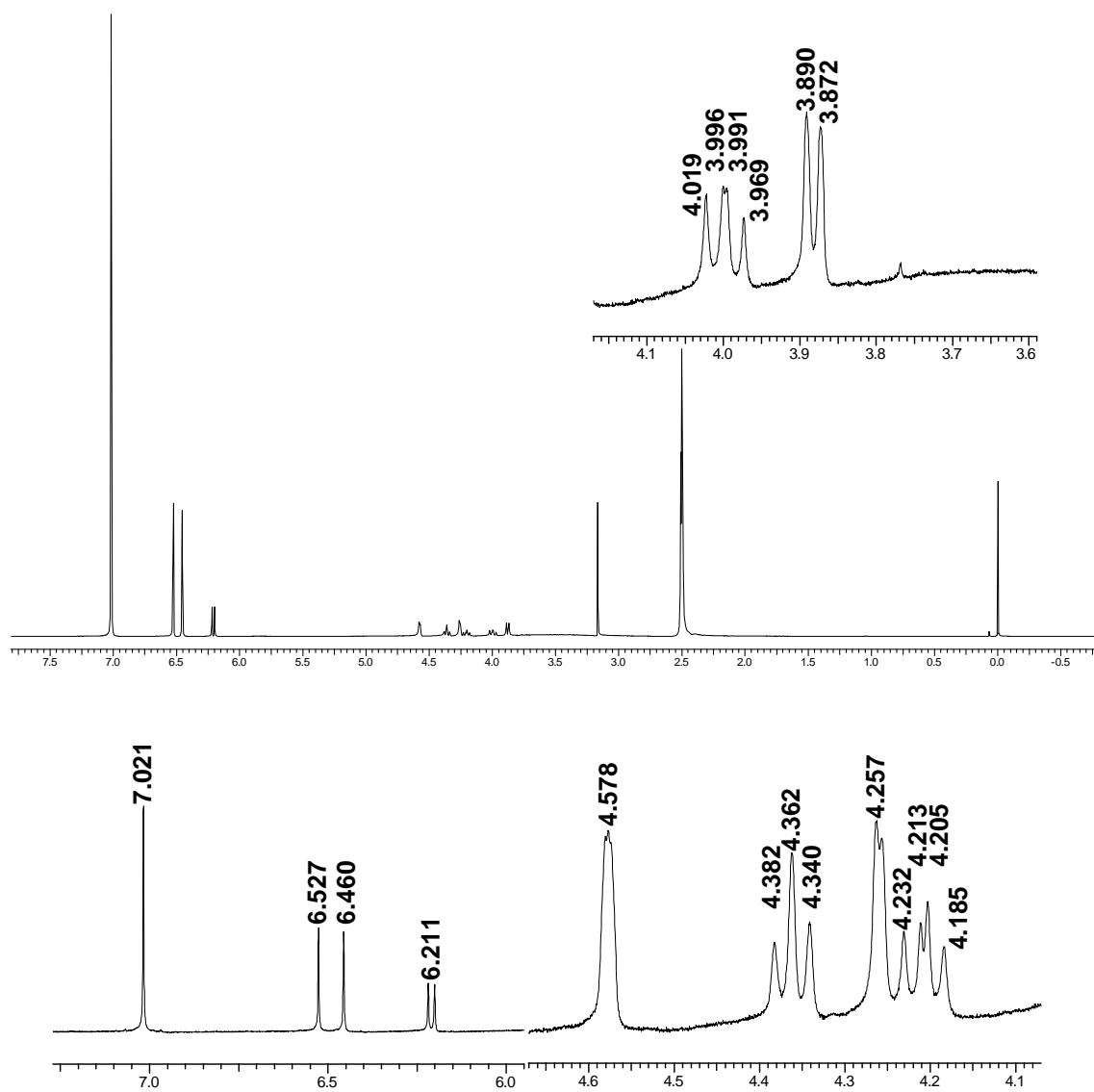
98. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Non-ionic samples: reversed and normal-phase HPLC. In: Practical HPLC method development. New York: Wiley; 1997. p 233-291.
99. Meyer VR. Reversed-phase chromatography. In: Practical High-Performance Liquid Chromatography. Chichester: Wiley; 1993. p 144-157.
100. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Gradient elution. In: Practical HPLC Method Development. 2. ed. New York: Wiley; 1997. p 350-400.
101. Snyder LR, Dolan JW. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run. *Journal of Chromatography A* 1996;721:3-14.
102. Dolan JW, Snyder LR, Saunders DL, Van Heukelem L. Simultaneous variation of temperature and gradient steepness for reversed-phase high-performance liquid chromatography method development: II. The use of further changes in conditions. *Journal of Chromatography A* 1998;803(1-2):33-50.
103. Dolan JW, Snyder LR, Djordjevic NM, Hill DW, Waeghe TJ. Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time: I. Peak capacity limitations. *Journal of Chromatography A* 1999;857(1-2):1-20.
104. Bidlingmeyer BA. Gradient elution chromatography. In: Practical HPLC methodology and applications. New York: Wiley; 1992. p 284-317.
105. Zhu PL, Dolan JW, Snyder LR, Hill DW, Van Heukelem L, Waeghe TJ. Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution III. Selectivity for ionizable samples as a function of sample type and pH. *Journal of Chromatography A* 1996;756(1-2):51-62.
106. Correia PRM, Ferreira MMC. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Química Nova* 2007;30(2):481-487.
107. Brereton RG. Pattern Recognition. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant: Wiley; 2002. p 183-255.
108. Nielsen N-PV, Carstensen JM, Smedsgaard J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A* 1998;805(1-2):17-35.
109. Yao W, Yin X, Hu Y. A new algorithm of piecewise automated beam search for peak alignment of chromatographic fingerprints. *Journal of Chromatography A* 2007;1160(1-2):254-262.
110. Pravdova V, Walczak B, Massart DL. A comparison of two algorithms for warping of analytical signals. *Analytica Chimica Acta* 2002;456(1):77-92.
111. Eilers PHC. Parametric Time Warping. *Anal. Chem.* 2004;76(2):404-411.

112. Xu C-J, Liang Y-Z, Chau F-T, Heyden YV. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography A* 2006;1134(1-2):253-259.
113. Skov T, van den Berg F, Tomasi G, Bro R. Automated alignment of chromatographic data. *Journal of Chemometrics* 2006;20:484-497.
114. Quality & Technnology Department of Food Science. website: http://www.models.kvl.dk/source/DTW_COW/index.asp. data de acesso: 15/10/2008. University of Copenhagen.
115. Brereton RG. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *The Analyst* 2000;125:2125-2154.
116. Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. Pattern Recognition. *Chemometrics: a practical guide*: Wiley; 1998. p 62-111.
117. Barker M, Rayens W. Partial Least Square for Discrimination. *Journal of Chemometrics* 2003;17:166-173.
118. Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis, SC; Porto Alegre, RS: Editora da UFSC; Editora da UFRGS; 5.ed.; 2004.
119. CEPAGRI. Centro de Pesquisas Metereológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. Clima dos Municípios Paulistas. <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>. Campinas/SP. data de acesso: 05-10-2008.
120. Jardins e Flores. <http://www.jardimdeflores.com.br/JARDINAGEM/A26cochonilha.htm>. data de acesso 05-10-2008.
121. Ji Y-B, Xu Q-S, Hu Y-Z, Heyden YV. Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2005;1066(1-2):97-104.
122. Gong F, Liang Y-Z, Xie P-S, Chau F-T. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. *Journal of Chromatography A* 2003;1002(1-2):25-40.
123. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. The column. In: *Practical HPLC Method Development*. 2. ed. New York: Wiley; 1997. p 174-232.
124. Neue UD, O'Gara JE, Méndez A. Selectivity in reversed-phase separations: Influence of the stationary phase. *Journal of Chromatography A* 2006;1127(1-2):161-174.
125. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Ionic samples: reversed-phase, ion-pair and ion-exchange HPLC. In: *Practical HPLC Method Development*. 2. ed. New York: Wiley; 1997. p 292-316.
126. Zhang J, Yang J, Duan J, Liang Z, Zhang L, Huo Y, Zhang Y. Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in leaves of *Adinandra nitida* by high

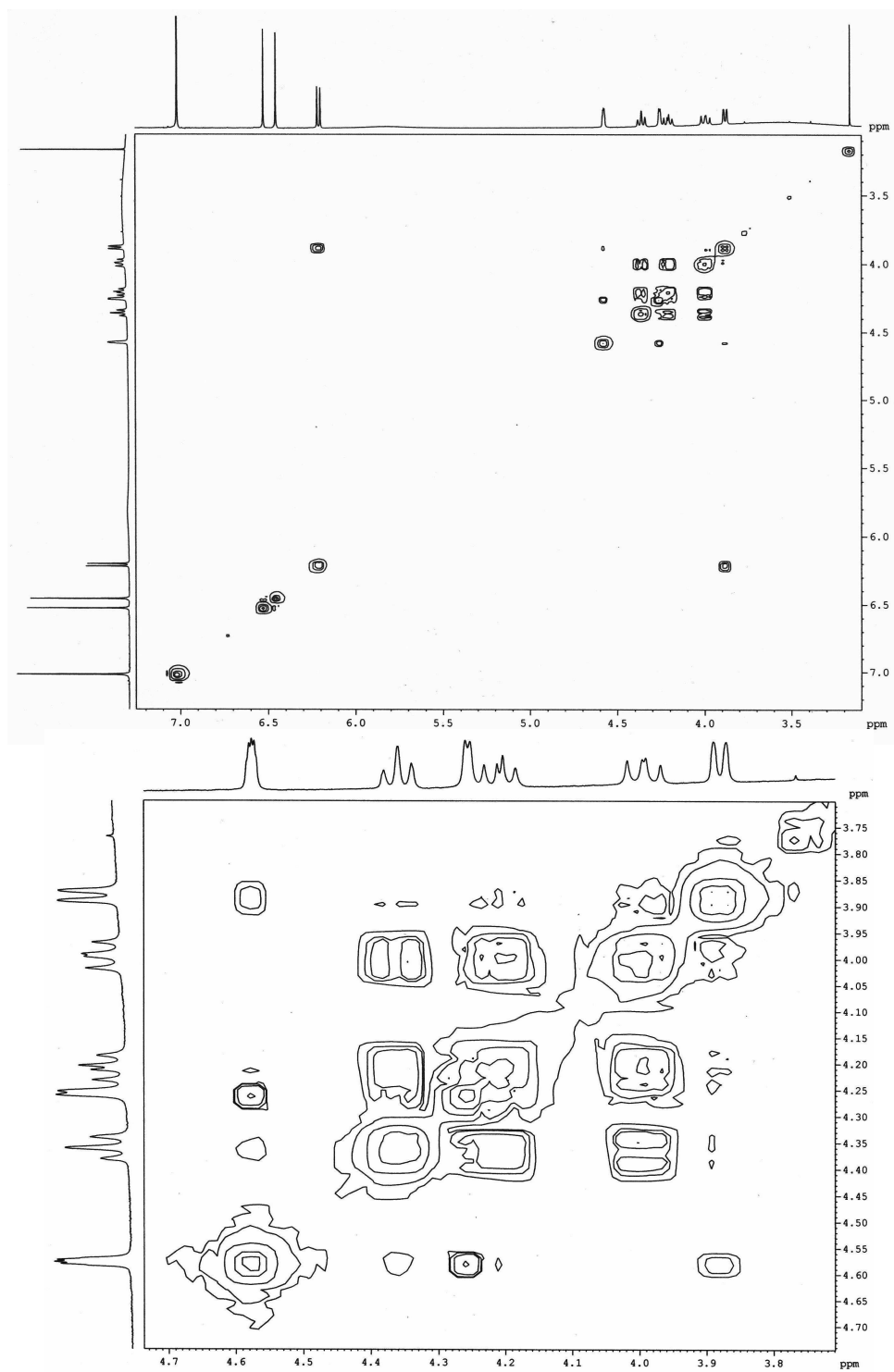
- performance liquid chromatography with UV and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* 2005;532(1):97-104.
127. Svedström U, Vuorela H, Kostianen R, Laakso I, Hiltunen R. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* 2006;1112(1-2):103-111.
 128. He Z, Xia W. Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC-DAD-ESI-MS. *Food Chemistry* 2007;105(3):1307-1311.
 129. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 29 de maio de 2003.
 130. Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB. Preprocessing. *Chemometrics: a practical guide*. New York: Wiley; 1998. p 26-55.
 131. Cass QB, Degani ALG. Cromatografia Preparativa. In: Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. Série Apontamentos. São Carlos, SP: EDUFSCar; 2001. p 57-61.
 132. Nawwar MAM, Hussein SAM, Merfort I. NMR Spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry* 1994;36(3):793-798.
 133. Seikel MK, Hillis WE. Hydrolysable tannins of *Eucalyptus delegatensis* wood. *Phytochemistry* 1970;9:1115-1128.
 134. Conegero LS, Ide RM, Nazari AS, Sarragiotto MH, Dias Filho BP, Nakamura CV, Carvalho JE, Foglio MA. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova* 2003;26(6):825-827.
 135. Fecka I, Cisowski W. Tannins and flavonoids from the *Erodium cicutarium* herb. *Zeitschrift für Naturforschung* 2005;60b:555-560.
 136. Foo LY. Amariin, a di-dehydrohexahydroxydiphenoyl hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. *Phytochemistry* 1993;33(2):487-491.
 137. Liu X, Cui C, Zhao M, Wang J, Luo W, Yang B, Jiang Y. Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 2008;109(4):909-915.
 138. Rangkadilok N, Worasuttayangkurn L, Bennett RN, Satayavivad J. Identification and Quantification of Polyphenolic Compounds in Longan (*Euphoria longana* Lam.) Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53(5):1387-1392.
 139. Duan W, Yu Y, Zhang L. Antiatherogenic effects of *Phyllanthus emblica* associated with corilagin and its analogue. *Yakugaku Zasshi* 2005;125(7):587-591.
 140. Luo H, Chen L, Li Z, Ding Z, Xu X. Frontal Immunoaffinity Chromatography with Mass Spectrometric Detection: A Method for Finding Active Compounds from Traditional Chinese Herbs. *Anal. Chem.* 2003;75(16):3994-3998.

141. Hatano T, Kusuda M, Inada K, Ogawa T-o, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 2005;66(17):2047-2055.
142. Kolodziej H, Burmeister A, Trun W, Radtke OA, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Foo LY. Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005;13(23):6470-6476.
143. Shen ZQ, Dong ZJ, Peng H, Liu JK. Modulation of PAI-1 and tPA activity and thrombolytic effects of corilagin. *Planta Medica* 2003;69:1109-1112.
144. Zhao L, Zhang S-L, Tao J-Y, Pang R, Jin F, Guo Y-J, Dong J-H, Ye P, Zhao H-Y, Zheng G-H. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-d-glucose) in vitro. *International Immunopharmacology* 2008;8(7):1059-1064.
145. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 2004;27(5):771-780.
146. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Quantitation (including trace analysis). In: *Practical HPLC method development*. 2. ed. New York: Wiley; 1997.
147. Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. Como construir modelos empíricos. In: *Como fazer experimentos*. UNICAMP E, editor. Campinas, SP; 2007.

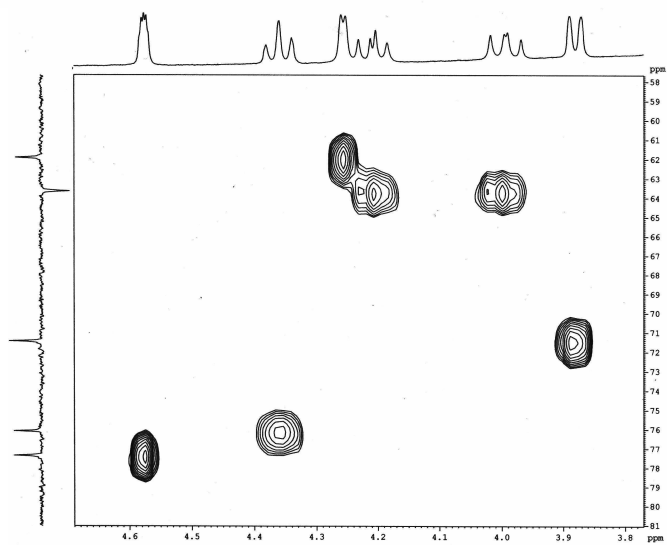
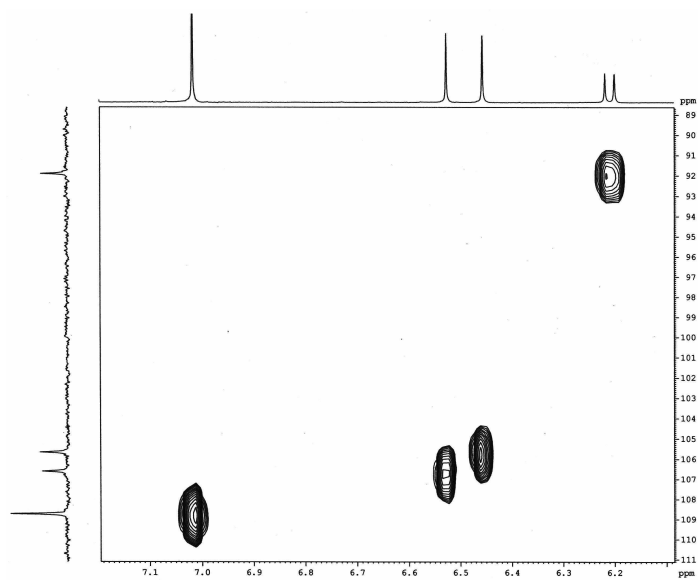
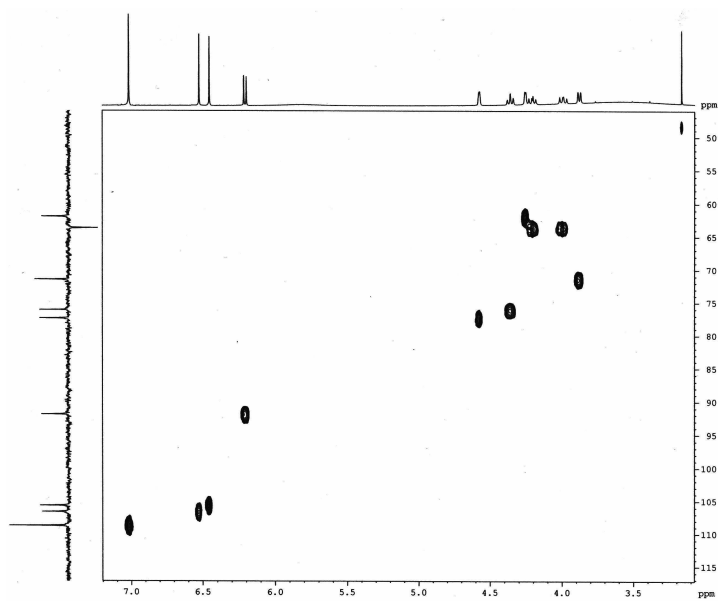
ANEXO 1:
Espectros de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D da
substância corilagina



Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) da substância corilagina.



Espectro bidimensional RMN ^1H - ^1H COSY da substância corilagina.



Espectro bidimensional RMN HSQC da substância corilagina.