

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Caracterização Química por Cromatografia Líquida e Análise Quimio-
métrica de espécies vegetais de *Bauhinia* com aplicação em controle
de qualidade de amostras comerciais de “pata-de-vaca”

Vinicius Augusto Perasolo e Carvalho*

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação como parte dos requisitos
para obtenção do título de mestre em Química,
área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Quezia B. Cass

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

* Bolsista CAPES

São Carlos – SP
2011

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

C331cq

Carvalho, Vinicius Augusto Perasolo e.

Caracterização química por cromatografia líquida e análise quimiométrica de espécies vegetais de *Bauhinia* com aplicação em controle de qualidade de amostras comerciais de “pata-de-vaca” / Vinicius Augusto Perasolo e Carvalho. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

102 f.

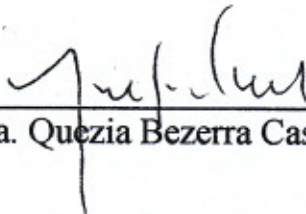
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química orgânica. 2. Quimiometria. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. *Bauhinia*. 5. Pata-de-vaca. I. Título.

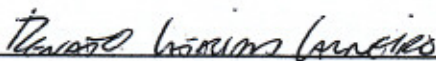
CDD: 547 (20^a)

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

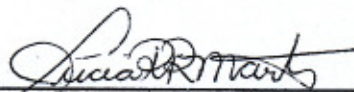
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato **Vinicius Augusto Perasolo e Carvalho**, realizada em 27 de julho de 2011:*



Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass



Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



Profa. Dra. Lucia Regina Rocha Martins

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Medicamentos fitoterápicos no Brasil.....	1
1.2. O fingerprint cromatográfico no controle de qualidade de fitoterápicos e drogas vegetais.....	3
1.3. Aspectos de “Pata-de-vaca”: botânicos, farmacológicos e químicos	9
1.3.1. Aspectos gerais e botânicos	9
1.3.2. Aspectos farmacológicos	12
1.3.3. Aspectos químicos.....	14
1.4. Utilização de ferramentas quimiométricas no controle de qualidade de amostras vegetais	20
1.4.1. Aspectos gerais e históricos	20
1.4.2. Pré-tratamento dos dados quimiométricos	21
1.4.3. Ferramentas quimiométricas de análise não-supervisionadas: HCA e PCA	23
1.4.4. Ferramentas quimiométricas de análise supervisionadas: KNN, SIMCA e PLS-DA.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	28
3.1. Generalidades.....	28
3.2. Coleta, identificação botânica e processamento de amostras do gênero <i>Bauhinia</i>	29
3.3. Aquisição de amostras comerciais de “pata-de-vaca”	31

3.4. Obtenção dos extratos vegetais das amostras vegetais padrão e comerciais	31
3.5. Aquisição dos perfis cromatográficos dos extratos aquosos	32
3.6. Desenvolvimento de modelos quimiométricos: Análise Exploratória e Modelos de classificação	33
4.1. Coleta e identificação botânica de cultivares do gênero <i>Bauhinia</i>	35
4.2. Obtenção de amostras comerciais de “pata-de-vaca”	37
4.3. Padronização e validação do método de extração.....	38
4.4. Otimização das condições cromatográficas para aquisição dos <i>fingerprints</i> dos extratos das diferentes espécies de <i>Bauhinia</i>	41
4.5. Aquisição dos <i>fingerprints</i> dos extratos das diferentes espécies de <i>Bauhinia</i>	48
4.5.1. Amostras coletadas no Centro Pluridisciplinar de Química, Biologia e Agronomia da Unicamp (CPQBA - Unicamp).	48
4.5.2. Amostras coletadas na UFSCar no Campus de São Carlos.....	51
4.5.3. Amostras coletadas na cidade de Jaguariúna.	52
4.5.4. Amostra coletada na cidade de Jarinú.....	54
4.5.5. Amostras coletadas no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).	55
4.5.6. Amostras fornecidas pela empresa Centroflora de Botucatu - SP	59
4.5.7. Obtenção do perfil cromatográfico das amostras comerciais.	60
4.6. Análises quimiométricas	63
4.6.1. Organização e pré-tratamento dos dados.....	63
4.6.2. Análise exploratória dos dados multivariados: PCA e HCA das amostras padrão.....	66
4.6.3. Modelos supervisionados de classificação quimiométrica	76
4.6.4. Avaliação dos modelos quimiométricos de classificação.....	85
5. CONCLUSÕES	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução Específica

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

GC – *Gas Chromatography*

UV-vis – Ultravioleta visível

ELSD – *Evaporative Light Scattering Detector*

MS – *Mass Spectrometry*

APCI – *Atmospheric pressure chemical ionization*

NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

PCA – *Principal Component Analysis*

HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*

SIMCA – *Soft Independent Modeling of Class Analogy*

KNN – *Kth Nearest Neighbor*

PLS-DA – *Partial Least Squares - Discriminant Analysis*

COW – *Correlation Optimized Warping*

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Química Biologia e Agronomia

GPS – *Global Position System*

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

MeOH – metanol

H₂O – água

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1. 1 Utilização do <i>fingerprint</i> em estudos para o controle de qualidade de drogas vegetais	6
Tabela 1. 2 Espécies estudadas e atividades biológicas.....	12
Tabela 1. 3 Substâncias encontradas nas espécies de <i>Bauhinia</i> estudadas.....	14

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Tabela 3. 1 Locais de coleta e coordenadas geográficas das árvores selecionadas para coleta e herborização.....	30
--	----

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tabela 4. 1 Identificação das espécies, locais e datas das coletas.	35
Tabela 4. 2 Cidades de aquisição e espécies indicadas no rótulo de amostras comerciais adquiridas.....	37
Tabela 4. 3 Coef. de variação entre cromatogramas de diferentes extrações de <i>B.forficata</i> . (Repetibilidade)	39
Tabela 4. 4 Coeficiente de variação entre cromatogramas de mesmo extrato de <i>B.forficata</i> .(Precisão de Injeção)	40
Tabela 4. 5 Eluições gradientes otimizados para as fases estacionárias avaliadas.	45
Tabela 4. 6 Valores de rendimento de extração e coeficiente de variação das amostras vegetais de <i>B. forficata</i> (P01 e P02).	48
Tabela 4. 7 Valores de rendimento e variância no procedimento de extração das amostras vegetais de <i>B. variegata</i> (P03 , P04 e P05).....	51
Tabela 4. 8 Valores de rendimento e variação no procedimento de extração das amostras vegetais de <i>B. variegata</i> (P06 a P10).	52

Tabela 4. 9 Valores de rendimento e variação no procedimento de extração das amostras vegetais de <i>Bauhinias</i> (P11 a P25).....	55
Tabela 4. 10 Valores de rendimento e variância no procedimento de extração das amostras vegetais de <i>B. forficata</i> (P26 e P27).	59
Tabela 4. 11 Valores de rendimento e variação no procedimento de extração das amostras comerciais de “pata-de-vaca”.	60
Tabela 4. 12 Quantidade e porcentagem de acertos para a ferramenta KNN na classificação de amostras das espécies padrões – Validação do modelo quimiométrico.	78
Tabela 4. 13 Determinações do modelo de classificação KNN.....	79
Tabela 4. 14 Número de PC’s selecionadas para cada uma das PCA’s calculadas no desenvolvimento do método SIMCA.	80
Tabela 4. 15 Quantidade e porcentagem de acertos para a ferramenta SIMCA na classificação de amostras das espécies padrões – Validação do modelo quimiométrico.	81
Tabela 4. 16 Determinações do modelo de classificação SIMCA.....	82
Tabela 4. 17 Quantidade e porcentagem de acertos para a ferramenta PLS-DA na classificação de amostras das espécies padrões – Validação do modelo quimiométrico.	84
Tabela 4. 18 Número de PC’s selecionadas e parâmetros associados para cada uma das PCA’s calculadas no desenvolvimento do método PLS-DA.	84
Tabela 4. 19 Determinações do modelo de classificação PLS-DA.	84
Tabela 4. 20 Comparação entre as classificações realizadas pelos modelos de classificação	85

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

- Figura 1. 1** Distribuição natural de *Bauhinia forficata* pelo Brasil segundo levantamento realizado por Carvalho^[90]9
- Figura 1. 2** À esquerda forma característica das folhas de *B. forficata* – “Pata-de-vaca” e à direita sua inflorescência^[91] 10
- Figura 1. 3** Cultivar de *B. forficata* com frutos verdes^[92] 11
- Figura 1. 4** Estruturas inéditas e raras das espécies de *Bauhinia*^[94]17
- Figura 1. 5** Estruturas inéditas e raras das espécies de *Bauhinia*^[94] 18
- Figura 1. 6** Estruturas inéditas de *B. variegata* em 2009 segundo Cechinel-Filho et al^[95] 19

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Figura 4. 1** Cromatogramas obtidos de *B. forficata* (**P01**) para o cálculo do coeficiente de variação do método de extração.40
- Figura 4. 2** Cromatograma de extrato aquoso de *B. forficata*. À esquerda a projeção tridimensional e à direita a projeção de contornos e a indicação do comprimento de onda selecionado (254nm) para as análises.42
- Figura 4. 3** Cromatogramas obtidos de *B. forficata* (**P01**) utilizando-se o método de gradiente exploratório nas diferentes fases estacionárias avaliadas. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$43
- Figura 4. 4** Cromatogramas obtidos de *B. forficata* (**P01**) utilizando-se o método gradiente após otimização dos parâmetros nas diferentes fases estacionárias avaliadas. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.44
- Figura 4. 5** Cromatogramas obtidos de extratos de amostras de *B. forficata* (**P01**) com eluição gradiente descrita na Tabela 4.5 para a coluna de fase estacionária Luna® Fenil-hexil em colunas (**A**) fenil nuleosil® e (**B**) fenil-fenil® da Restek®. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.46
- Figura 4. 6** Cromatogramas obtidos de mesmo extrato de amostras de *B. forficata* (**P01**) em (**A**) com a coluna fenil-fenil® nova e (**B**) após a perda de seletividade da

mesma. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.47

Figura 4. 7 Gráfico que relaciona valores de rendimento de extração com a data de coleta da matéria vegetal que deu origem aos extratos duas árvores de *B. forficata* (**P01** e **P02**) do CPQBA da Unicamp.....49

Figura 4. 8 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. forficata* – Árvores **P01** e **P02** de coletas obtidas em diferentes épocas do ano. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.50

Figura 4. 9 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. variegata* – Árvores **P03**, **P04** e **P05** de coletas realizadas no Campus da UFSCar em Novembro de 2008. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.51

Figura 4. 10 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. variegata* – Árvores **P06** a **P10** de coletas realizadas na cidade de Jaguariúna em Maio de 2009. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.53

Figura 4. 11 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. longifolia* - Árvore **P11** da coleta realizada em Janeiro de 2009 em Jarinú. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.54

Figura 4. 12 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. forficata* - Árvores **P12**, **P13**, **P18** a **P21** e **P22** de coletas realizadas em diferentes pontos da Fazenda Santa Elisa em Maio de 2010. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.....57

Figura 4. 13 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. longifolia* - Árvores **P14** a **P17** e **P23** a **P25** de coletas realizadas em diferentes pontos da Fazenda Santa Elisa em Maio de 2010. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.....58

Figura 4. 14 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. forficata* - Árvores **P26** e **P27** fornecidos pela empresa Centroflora em Abril de 2010. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.59

Figura 4. 15 Cromatogramas adquiridos em duplicata dos extratos das amostras comerciais (**AC01** a **AC15**).....62

Figura 4. 16 Cromatogramas antes (à esquerda) e após (à direita) o uso do procedimento de alinhamento.64

- Figura 4. 17** Cromatogramas selecionados para servirem de referência no procedimento de alinhamento dos dados para desenvolvimento do modelo quimiométrico. *B. forficata* árvores **P01**, **P02**, **P18**, **P19** e **P27**, *B. longifolia* árvores **P11**, **P15**, **P23**, **P25** e *B. variegata* árvores **P03** e **P06**.65
- Figura 4. 18** Gráfico e tabela utilizados para a seleção de fatores da **PCA**.67
- Figura 4. 19** Análise de componentes principais (**PC1xPC2**) – Gráfico de *scores* - visualização da distribuição e agrupamento dos dados.68
- Figura 4. 20** Cromatogramas de uma das quintuplicatas de extração das árvores **P01** (*B. forficata*) e **P04** (*B. variegata*).....69
- Figura 4. 21** Análise de componentes principais (**PC1xPC2**) – Gráfico de *scores* - visualização da distribuição e agrupamento dos dados.69
- Figura 4. 22** Gráfico de *loadings* – Visualização do poder de modelagem dos tempos de retenção relacionados70
- Figura 4. 23** Dendrograma gerado pela HCA dos cromatogramas padrão das diferentes espécies de *Bauhinia*.....71
- Figura 4. 24** Destaque das diferenças nos cromatogramas das amostras de *B. variegata* coletadas em Jaguariúna (**P10**) e São Carlos (**P03**).....72
- Figura 4. 25** Destaque das semelhanças nos cromatogramas de amostras de *B. variegata*, coletada em Jaguariúna (**P10**) e *B. forficata*, coletada em Campinas (**P20**).73
- Figura 4. 26** **PCA** calculada com os cromatogramas obtidos dos padrões de *Bauhinia* e também com os cromatogramas obtidos das amostras comerciais.74
- Figura 4. 26** Gráfico que relaciona o número de vizinhos com o número de erros na determinação das espécies de *Bauhinia* na validação da ferramenta **KNN**.77
- Figura 4. 27** Geração das hipercaixas ao redor do agrupamento das amostras padrão de *Bauhinia* no desenvolvimento do **SIMCA** – Os pequenos pontos delimitam a região das hipercaixas e cada cor indica uma espécie diferente.81
- Figura 4. 28** Classificação das amostras comerciais utilizando-se a distribuição das mesmas dentro e ao redor das hipercaixas geradas previamente.82

RESUMO

Caracterização Química por Cromatografia Líquida e Análise Quimiométrica de espécies vegetais de *Bauhinia* com aplicação em controle de qualidade de amostras comerciais de “pata-de-vaca”. A infusão de folhas de espécies de *Bauhinia*, conhecida popularmente como “pata-de-vaca”, é comumente utilizada no tratamento a várias enfermidades, dentre elas o diabetes. Estudos demonstram que a espécie *Bauhinia forficata* é a que apresenta maior atividade hipoglicemiante dentre as espécies do gênero. Porém, devido à grande semelhança morfológica das folhas desta com as de outras espécies, ocasionalmente seu uso popular na decocção de suas folhas é feita de maneira inadequada. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos para o controle de qualidade das drogas vegetais, com o objetivo de atestar a autenticidade destas. Os perfis químicos (*fingerprints*) obtidos por análises cromatográficas de extratos vegetais, trazem uma quantidade grande de informações, constituindo sistemas multivariados que podem ser utilizados como parâmetro de controle químico de qualidade. O presente trabalho relata a otimização da separação dos constituintes do extrato aquoso de espécies de *Bauhinia* por eluição gradiente no modo reverso. Posteriormente os cromatogramas foram alinhados utilizando-se o software MatLab[®] com o algoritmo COW (*Correlation Optimized Warping*) e, logo após, os cromatogramas foram submetidos a análises quimiométricas exploratórias (PCA e HCA) e usados para a criação de modelos quimiométricos supervisionados de classificação (KNN, SIMCA e PLS-DA) utilizando-se o software Pirouette[®]. Cento e setenta cromatogramas de extratos obtidos a partir das folhas de árvores identificadas botanicamente de três diferentes espécies - *B. forficata*, *B. longifolia* e *B. variegata* - foram utilizados para as Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA), que permitiram a visualização da distribuição nos eixos das PC's de 15 amostras comerciais de “pata-de-vaca”. Estas foram também analisadas utilizando-se os modelos supervisionados de classificação, onde de todas elas 3 foram classificadas como *B. forficata*, 6 delas classificadas como *B. longifolia* e 5 classificadas com *B. variegata*. Apenas para uma das amostras não foi possível a classificação de sua espécie devido a uma grande diferença entre as determinações dos três modelos distintos.

ABSTRACT

Chemical characterization by liquid chromatography and chemometric analysis of *Bauhinia* species (popularly known as “pata-de-vaca”) with applications in quality control of commercial samples. The infusion of leaves from *Bauhinia* species, is commonly used in the treatment to combat various diseases, among them diabetes. Studies show that *B. forficata* species possesses the most hypoglycemic activity among the species of the genus. However, due to the extreme morphological similarity between its leaves in comparison to other species', occasionally the popular use in the decoction of leaves is improper. Thus, it is necessary to develop methods of quality control of herbal drugs, in order to certify the authenticity of them. The chemical profiles (fingerprints) obtained by chromatographic analysis of plant extracts, brings a large amount of information, providing multivariable systems that can be used as a good parameter for quality control. The present study reports the separation optimization of the constituents obtained from aqueous extract on *Bauhinia* species by gradient elution on reverse phase. The chromatograms were first aligned using the MatLab[®] software and the COW algorithm (Correlation Optimized Warping) and after, the chromatograms were subjected on exploratory chemometric analysis – Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) – and used to create models for supervised chemometric classification (KNN, SIMCA and PLS-DA) performed using the Pirouette[®] software. 170 chromatograms of extracts obtained from leaves of botanically identified trees from three different species - *B. forficata*, *B. longifolia* and *B. variegata* - were used on analysis by PCA and HCA, which allowed the visualization of the distribution of 15 commercial samples of "pata-de-vaca". Those samples were also analyzed using the supervised classification models, and among them, 3 were classified as *B. forficata*, 6 were classified as *B. longifolia* and 5 of them were classified as *B. variegata*. For one of the samples it was not possible to classify its species due to large difference among the determinations obtained from the three distinct analytic tools.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Medicamentos fitoterápicos no Brasil

Nos últimos anos, a procura e a utilização de medicamentos alternativos, como os fitoterápicos e as drogas vegetais, tem crescido mundialmente. Em países desenvolvidos eles são utilizados comumente como uma opção mais saudável ou menos danosa no tratamento de enfermidades. Já nos países em desenvolvimento, tais medicamentos são uma das principais alternativas resultante da reduzida disponibilidade de medicamentos farmoquímicos para a população economicamente desfavorecida^[1].

Carvalho et al estimam que o mercado de medicamentos de origem vegetal movimentava atualmente US\$ 21,7 bilhões por ano no mundo e no Brasil esse número chega a US\$160 milhões. Este mercado está em ascensão já que apresenta um ritmo de crescimento de 15% ao ano contra 4% dos medicamentos farmoquímicos^[2]. Este grande crescimento é devido ao próprio interesse da população em utilizar tratamentos preventivos e terapias naturais em que esta acredita, erroneamente, que esse tipo de tratamento não apresenta efeitos colaterais.

Paralelamente a esse grande crescimento encontra-se um dado fornecido pelo Ministério da Saúde indicando que o consumo de medicamentos no Brasil acontece de maneira desequilibrada^[3]: 15% da população consomem 48% da produção de medicamentos enquanto 51% consomem apenas 16% da produção, mas somente 40% da população têm poder aquisitivo que lhes permite adquirir medicamentos. Esta dificuldade no acesso aos medicamentos favorece o consumo e a automedicação de fitoterápicos e drogas vegetais, posto seus baixos custos e/ou ampla disponibilidade.

No entanto é preciso salientar que a utilização desta classe de medicamentos deve ser feita assim como as demais: tendo-se um controle de qualidade das matérias-primas utilizadas para a sua manufatura e também sob a supervisão de um médico responsável pelo tratamento, para que o seu uso não seja feito indiscriminadamente.

O órgão responsável pela regulamentação de medicamentos no Brasil é a ANVISA, autarquia do Ministério da Saúde, que tem como principal função proteger e promover a saúde da população, garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços disponíveis no mercado.

A ANVISA define como medicamento fitoterápico todos os medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais empregando-se apenas derivados de drogas vegetais^[4]. Nestes estão incluídos xaropes, tinturas e princípios ativos extraídos apenas de matéria-prima vegetal. Entende-se por droga vegetal uma planta medicinal que não passa por quaisquer transformações para se tornar um medicamento, apenas pela coleta, secagem, trituração e/ou pulverização e pode ser utilizada também de forma íntegra.

Sobre os fitoterápicos, com o intuito de avaliar a qualidade e autenticidade da matéria-prima vegetal para sua manufatura, foi publicada pela ANVISA, a resolução RDC 48 de 16 de março de 2004^[4] posteriormente complementada pela resolução RDC 10 de 9 de março de 2010^[5]. Ambas resoluções foram elaboradas com o objetivo de contribuir com a regulamentação da produção, distribuição e uso de plantas medicinais a partir das experiências cotidianas da população. A última visa garantir e promover a segurança, a eficácia no controle de qualidade e no acesso a este tipo de medicamento, e completa, juntamente com a resolução anterior, a legislação que regulamenta os medicamentos fitoterápicos e as drogas vegetais. Paralelamente a estas, encontra-se o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos^[6], Resolução Específica 899, que preconiza parâmetros a serem medidos e avaliados em procedimentos analíticos, muitas vezes aplicados em etapas de manufatura destas classes de medicamentos.

Assim, para o controle da qualidade da matéria-prima que servirá para a manufatura deste tipo de medicamento, a ANVISA recomenda nessas resoluções que seja feita a quantificação de marcador(es) químico(s) (alcalóides, flavonóides e taninos), preferencialmente o próprio princípio ativo ou alguma substância que tenha correlação com o efeito terapêutico. Entretanto, devido ao fato das plantas serem constituídas por misturas complexas de substâncias, que apresentam ou não atividades biológicas, caso a apresentem, existe a possibilidade destas atividades estarem relacionadas ao efeito sinérgico de várias substâncias agindo ao mesmo tempo no organismo. Este fato reitera a ideia da utilização de métodos mais abrangentes para o controle de qualidade destas matérias-primas.

Ainda tratando-se da composição química da matéria-prima vegetal, deve-se ressaltar que este parâmetro pode variar em decorrência de diversos fatores, tais como: procedência do material vegetal, condições de cultivo, estágio de desenvolvimento da planta, sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes do solo, o uso de defensivos agrícolas e método de coleta, secagem e armazenamento (temperatura, umidade, luminosidade e ventilação)^[7, 8]. Com tantas variáveis relacionadas a sua composição, o estabelecimento e aplicação de um protocolo de análise quantitativa em relação aos constituintes químicos que se aplique a matérias-primas diversas fica claramente comprometido.

Métodos envolvendo diferentes técnicas analíticas (HPLC, GC e Eletroforese capilar) são utilizados no controle de qualidade de medicamentos a base de matérias-primas vegetais. Especificamente na cromatografia líquida, diversos tipos de detectores (UV-vis, fluorescência, ELSD, MS e NMR) são utilizados em análises químicas qualitativas e quantitativas, ultimamente com uma forte tendência para a utilização do *fingerprint* cromatográfico como parâmetro para o controle de qualidade^[9].

1.2. O fingerprint cromatográfico no controle de qualidade de fitoterápicos e drogas vegetais.

De acordo com o exposto e visando o desenvolvimento de métodos que assegurem a qualidade das matérias-primas vegetais para manufatura de fitoterápicos e drogas vegetais, a utilização do perfil cromatográfico como ferramenta analítica começou a crescer mundialmente. Exemplos de trabalhos utilizando-se ferramentas quimiométricas para este fim estão descritas nas revisões de Huang et al^[10], e nos trabalhos de Jiang et al^[11], Liang et al^[9] e Martins et al^[12]. Estas ferramentas fazem parte de procedimentos analíticos recomendados pela ANVISA^[5], assim como a quantificação de marcadores químicos para o controle de qualidade de matérias-primas vegetais.

O perfil cromatográfico vem ganhando maior destaque, pois, além de permitir a comparação, classificação, identificação e avaliação das amostras, pode ainda fornecer uma caracterização mais ampla da matéria vegetal. O termo *fingerprint*, do traduzido do inglês como impressão digital, é utilizado em analogia a essa complexa caracterização. A associação de uma poderosa técnica de separação a

um detector que confere informação estrutural, como DAD^[13, 14] e o MS^[15-18], permite a aquisição de informações adicionais que são úteis não só para quantificação, mas também na elucidação estrutural de seus componentes. Este processo faz ainda com que o *fingerprint* obtido apresente múltiplas variáveis a saber: tempos de retenção, espectros UV-vis para cada banda cromatográfica e espectro de massas das mesmas, o qual pode ser considerado praticamente único.

Em um trabalho de revisão bibliográfica publicada em 2010, Jiang et al ressaltam a importância do controle de qualidade das matérias-primas vegetais para a manufatura de medicamentos fitoterápicos e de drogas vegetais, destacando métodos recentes e constantemente utilizados, incluindo estratégias de *screening*, métodos envolvendo DNA, HPLC-DAD/MS juntamente com a utilização de ferramentas quimiométricas, quantificação de multicomponentes, LC/NMR, dentre outras^[11].

A utilização das técnicas hifenadas relatadas acima (HPLC-DAD/MS) gera, normalmente, uma grande quantidade de informações no decorrer das análises (espectros de absorção no UV-vis, no caso da utilização do DAD ou Espectros de Massa, no caso da MS). Assim, para que tais informações sejam bem utilizadas e interpretadas, faz-se preciso a utilização de programas matemáticos específicos que auxiliam na interpretação destes conjuntos de dados multivariados. A partir destes, métodos quimiométricos de análise podem ser desenvolvidos facilitando a interpretação desta grande quantidade de dados analíticos e auxiliando no desenvolvimento de novas estratégias para o controle de qualidade de medicamentos de origem vegetal^[11, 19-21].

Para que um método quimiométrico possa ser aplicado a um conjunto de dados obtidos por métodos analíticos, se faz necessário que estes sejam adquiridos sob as mesmas condições de análise, para que apenas as diferenças e semelhanças particulares e inerentes de cada amostra sejam evidenciadas. Desta maneira, para a aplicação de métodos quimiométricos no controle de qualidade de matérias-primas vegetais seria necessário que todas as condições, desde as iniciais de cultivo, aplicadas apenas em alguns casos, até a padronização do método para a obtenção dos *fingerprints*, fossem as mesmas. Assim, a padronização das etapas como procedimentos de extração, determinação do número de réplicas preparadas ou obtidas de forma independente para posterior utilização, metodologias de manipulação e preparado da amostra bem como o desenvolvimento de métodos

cromatográficos são de extrema importância e implicam diretamente na qualidade dos modelos quimiométricos a serem desenvolvidos.

Trabalhos que apresentaram a aplicação de ferramentas quimiométricas na busca de desenvolver modelos matemáticos que sejam capazes de diferenciar espécies de localidades distintas e em diferentes tempos de coleta podem ser encontrados na literatura. Hoai et al^[22] utilizaram o *fingerprint* cromatográfico (HPLC-DAD e HPLC-MS) para diferenciar espécies de *Mallotus* bem como identificar o composto responsável pela sua atividade antioxidante, já que esta é utilizada como suplemento alimentar.

Dificuldades na identificação de plantas medicinais, assim como a substituição/adulteração por alguma outra espécie, quando esta serve de matéria-prima vegetal para a fabricação e comercialização de drogas vegetais, podem trazer graves problemas de saúde. Há relatos de casos na Bélgica^[23] de mulheres que após tomarem medicamento para emagrecer a base de ácido aristolóquico extraído de espécies de *Aristolochia* tiveram sintomas de insuficiência renal.

Koh et al^[23] desenvolveram um método utilizando HPLC-DAD e HPLC-APCI-MS/MS para a identificação simultânea de ácido aristolóquico, tetrandrina e fangoquinolina, pois a *Stephania tetrandra* (*Fangji*), planta não tóxica, que possui como componentes majoritários tetrandrina e fangoquinolina, tem sido frequentemente substituída pela tóxica *Aristolochia fangchi* (*Guang fangji*) que contém ácido aristolóquico I. Ambas as ervas são utilizadas para o tratamento de reumatismo e como diuréticos.

Zhao et al^[24] otimizaram um método de *fingerprint* cromatográfico utilizando HPLC-DAD com posterior utilização de ferramentas quimiométricas para a identificação e classificação de raízes de quatro espécies distintas de *Aconitum*. Tal classificação foi de extrema importância já que a espécie *Aconitum kusnezoffii* *Rchb* é utilizada no tratamento de reumatismo, aliviando a dor, porém outras espécies do mesmo gênero apresentam alcaloides diésteres altamente tóxicos na composição de seus extratos.

Lau et al^[25] utilizaram a técnica de HPLC acoplada a UV-vis (203nm) para a obtenção do perfil cromatográfico de amostras cruas e cozidas de *Panax notoginseng*. Com este ensaio identificaram os sinais responsáveis pela diferenciação de ambas as amostras comparando-se também as diferenças quantitativas obtidas devido ao tempo de cozimento. Com este estudo, foi possível concluir que

o processo de cozimento causa a degradação química de saponinas dando origem a novos compostos.

Todos os trabalhos discutidos anteriormente demonstram a vasta aplicação e importância que o *fingerprint* cromatográfico tem apresentado nos últimos anos. A **Tabela 1.1** relaciona outros trabalhos de acordo com o estudo que foi realizado, a espécie estudada e sua referência.

Tabela 1. 1 Utilização do *fingerprint* em estudos para o controle de qualidade de drogas vegetais

Estudo / Objetivo	Espécies	Referências
Presença de substâncias tóxicas encontradas em drogas vegetais ou de espécies relacionadas.	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	[26]
	<i>A. fangchi</i> e <i>S. tetrandra</i>	[23]
	<i>Ferula communis</i>	[27]
	<i>Angelicae dahuricae radix</i>	[28]
Comparação entre duas metodologias para a obtenção de <i>fingerprint</i>	<i>Cassia seeds</i>	[29]
	<i>Clutia richardiana</i>	[30]
	<i>Andrographis paniculata</i>	[31]
	<i>Flos Lonicera japonica</i> Thunb, <i>Flos carthami</i>	[32, 33]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[34]
	<i>Atractylis chinensis</i>	[35]
	<i>Coptis chinensis</i>	[36]
	<i>Radix Salviae Miltiorrhizae</i>	[37]
Comparação entre espécies e entre espécies de diferentes regiões	<i>Trichilia catigua</i>	[38]
	<i>Cimicifuga racemosa</i>	[39]
	<i>Lippia gracilis</i>	[40]
	<i>Phyllanthus sp</i>	[12]
	<i>Houttuynia cordata</i>	[41]
	<i>Gymnadenia conopsea</i>	[42]
	<i>Radix Salviae Miltiorrhizae</i>	[43]
	<i>Angelica sinensis</i>	[44-46]
	<i>Paeonia sp.</i>	[47]
	<i>Ephedra sinica</i>	[48]
<i>Hpericum japomicum</i>	[49]	
<i>Mallotus sp</i>	[50]	

Continua na próxima página

Continuação da **Tabela 1.1**

Comparação entre espécies e entre espécies de diferentes regiões (continuação)	<i>Turnera difusa</i>	[51]
	<i>Cichorium intybus</i>	[52]
	<i>Polygoni Cuspidati</i>	[53]
	<i>Stemona tuberosa</i>	[54]
	<i>Angelica dahurica</i>	[55]
	<i>Centella asiática</i>	[56]
	<i>Clematis huchouensis</i>	[57]
	<i>Ganoderma lucidum</i>	[58, 59]
	<i>Nelumbo nucifera</i>	[60]
	<i>Panax quinquefolium</i>	[61]
	<i>Pericarpium Citri Reticulatae e Viride</i>	[62, 63]
	<i>Prunellae Spica</i>	[63]
	<i>Scutellariae Radix</i>	[64]
	<i>Veratrum nigrum</i>	[65]
Estudos de adulteração visando o controle de qualidade	<i>Bupleurum chinense</i>	[66]
	<i>Cistanche deserticola</i>	[67]
	<i>Cinnamomum cassia</i>	[68]
Estabilidade após processos industriais	<i>Angelica sinensis</i>	[69]
	<i>Cephalotaxus sinensis</i>	[70]
	<i>Dioscorea nipponica</i>	[71]
	<i>Ganoderma lucidum</i>	[72]

Não apenas a utilização do *fingerprint*, mas também o isolamento dos constituintes de um extrato vegetal e de outras fontes naturais também é importante quando se objetiva resultados na busca por produtos naturais farmacologicamente ativos. A seleção da estratégia a ser utilizada neste processo é de extrema importância e visa economia de tempo, de esforços e de reagentes gastos nesta procura. Assim, antes do isolamento em escala preparativa para a utilização de novas substâncias na produção de fármacos, é importante ter o conhecimento dos possíveis componentes químicos presentes no extrato bruto vegetal com o objetivo de se isolar apenas aquele(s) de interesse^[73].

Nesta vertente, técnicas hífenadas como HPLC/UV-vis, HPLC/MS e HPLC/NMR, ou até mesmo as multi-hífenadas HPLC/UV-vis/MS, são utilizadas an-

tes do estágio do fracionamento do extrato com o objetivo de obter um *fingerprint* cromatográfico. Com isso, diminui-se a possibilidade de isolamento de compostos já conhecidos (dereplicação) ou que não se mostraram ativos nos ensaios de atividade biológica^[74]. Este fato por sua vez, possibilita um estudo prévio dos compostos presentes no extrato, visando o interesse estrutural para a posterior direcionamento de seu isolamento^[75, 76].

A identificação de compostos bioativos objetivando a posterior utilização em medicamentos fitoquímicos, tem fundamental importância no processo de desenvolvimento e regulação do mesmo para o tratamento futuro de diversas enfermidades que atualmente são tratadas com procedimentos populares. A dificuldade na identificação de substâncias que apresentam ou não atividade biológica é nítida e se dá devido à infinidade de compostos presentes em um simples chá caseiro. Logo, com o intuito de minimizar ainda mais o tempo investido nestas buscas e focalizar nos compostos que apresentam algum tipo de atividade biológica, outras técnicas de separação, diferentemente das técnicas cromatográficas convencionais (como eluição no modo normal, reverso ou HILIC), estão sendo exploradas e utilizadas para a obtenção de *fingerprints*.

A mistura do extrato estudado com biomacromoléculas (como DNA, proteínas, enzimas e até mesmo células) antes da injeção do mesmo no sistema cromatográfico ou ainda, a imobilização das mesmas na fase estacionária da coluna cromatográfica, são alternativas que vem surgindo ultimamente na busca por compostos bioativos^[15, 77, 78]. Na primeira opção pode-se comparar o *fingerprint* obtido antes com aquele obtido após a mistura do extrato com as macromoléculas e então determinar possíveis moléculas candidatas a futuros fármacos^[15, 79-85]. Já na segunda opção, a separação cromatográfica se baseia nos princípios de afinidade e ganhou destaque por ser rápida, econômica, sensível e altamente específica, já que a identificação dos compostos bioativos acontece *on-column*^[86-89], com a interação direta do promitente fármaco com a enzima/macromolécula em questão.

1.3. Aspectos de “Pata-de-vaca”: botânicos, farmacológicos e químicos

1.3.1. Aspectos gerais e botânicos

O gênero *Bauhinia* conta com aproximadamente 300 espécies distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas-quente da América, África, Ásia e Oceania^[90]. No Brasil, a distribuição natural de *Bauhinia forficata* pode ser visualizada na **Figura 1.1**. Tal mapa foi criado por Carvalho et al^[90] em levantamento bibliográfico feito sobre esta espécie em particular.



Figura 1. 1 Distribuição natural de *Bauhinia forficata* pelo Brasil segundo levantamento realizado por Carvalho^[90].

A espécie *Bauhinia forficata* se apresenta como uma arvoreta caducifolia¹ com 4 a 10 metros de altura e com 10 a 20 centímetros DAP (Diâmetro à altura do peito) chegando a existir também como um árvore de até 20 metros de altura com DAP de 30 centímetros na idade adulta quando em florestas fechadas. Seus troncos são tortuosos, curtos e delgados e ela ainda apresenta fustes² curtos e que raramente atinge 5 metros de comprimento. Suas cascas apresentam espessura de até 7 milímetros, de coloração cinza-escuro e superfície lisa ou finamente fissurada, sendo a casca interna branca e fibrosa.

Suas folhas são alternadas, simples, ovadas, coriáceas³, com até 10cm de comprimento e até 6cm de largura. São bilobadas, com dois lóbulos que juntos apresentam forma de pata-de-vaca, característica esta que dá origem ao seu nome popular. Sua lâmina foliar é lisa, com a face superior brilhante e com glândula na base. Quando jovens, apresentam os ramos com dois espinhos curvos como estípulas na base do pecíolo. Característica esta que popularmente, pode ser utilizada na distinção desta espécie. A **Figura 1.2** ilustra a forma de suas folhas e flores^[91].



Figura 1. 2 À esquerda forma característica das folhas de *B. forficata* – “Pata-de-vaca” e à direita sua inflorescência^[91].

As flores de *B. forficata* são brancas e de abertura noturna. Vistosas, apresentam pétalas de até 9cm de comprimento e com dez estames comprimidos. Seus frutos são leguminosos aplainados de coloração marrom-acinzentado e de

¹ Nome dados a plantas que apresentam característica de perder suas folhas numa determinada época do ano, geralmente nos meses mais frios.

² Parte do caule entre as raízes e as ramificações mais baixas.

³ Aspecto semelhante ao couro

até 20cm de comprimento e 2,5cm de largura. Com deiscência⁴ elástica e valvas lignificadas abrindo-se em duas partes contendo de 5 a 10 sementes internamente. Estas se mostram de cor castanha ou pretas, achatadas com poros e medem 1cm de comprimento. A **Figura 1.3**^[92] ilustra uma árvore de *B. forficata* com seus frutos ainda verdes.



Figura 1. 3 Cultivar de *B. forficata* com frutos verdes^[92].

No estado de São Paulo, devido ao clima, a floração ocorre de Outubro a Janeiro e o amadurecimento dos frutos de Maio a Dezembro, sendo que o processo reprodutivo se inicia ao redor de 2 anos de idade em plantios. A espécie é maleável quanto ao solo ocorrendo em quase todos os tipos, mas prefere os profundos, permeáveis e de boa fertilidade química, assim como a maioria das Angiospermas. Em relação à temperatura é uma espécie heliófila⁵, medianamente tolerante às baixas temperaturas. Árvores adultas toleram temperaturas mínimas de até -6°C.

Devido à presença de suas belas flores por um longo período do ano espécies de *Bauhinia* são constantemente utilizadas como árvore ornamental em parques e jardins de várias cidades do país. Outro fato que favorece sua utilização ornamental nas ruas e avenidas é o fato de ela não atingir uma grande altura, sen-

⁴ Característica de abertura espontânea, por maturidade, da estrutura do fruto.

⁵ Plantas com preferência de locais com alto índice de luminosidade solar.

do recomendada assim na arborização de ruas estreitas e sob a rede elétrica^[93]. A espécie mais comumente utilizada para este fim é a *Bauhinia variegata*.

1.3.2. Aspectos farmacológicos

No Brasil, a utilização de medicamentos provenientes de fontes alternativas é frequente. Folhas de espécies de *Bauhinia* têm sido utilizadas popularmente para o tratamento de algumas enfermidades. Com relação às diferentes atividades biológicas atribuídas a espécies do gênero *Bauhinia*, diversas pesquisas têm sido publicadas, principalmente com relação à atividade hipoglicemiante das mesmas^[94-99]. Apesar de existirem resultados ambíguos com relação ao efeito hipoglicemiante dessas espécies, alguns modelos experimentais têm demonstrado que a utilização do chá de “pata-de-vaca” contribui para o controle da glicemia, principalmente para a espécie *B. forficata*^[95]. A **Tabela 1.2**^[100] relaciona as atividades biológicas com a espécie em questão.

Tabela 1. 2 Espécies estudadas e atividades biológicas^[100]

Espécies	Atividades Biológicas
<i>B. candicans</i>	Hipoglicemiante, diminuição da absorção de glucose no intestino
<i>B. forficata</i>	Hipoglicemiante, atividade anticoagulante contra veneno de cobras, mimetizador de insulina
<i>B. monandra</i>	Hipoglicemiante
<i>B. megalandra</i>	Diminuição da absorção de glucose no intestino
<i>B. scandens</i>	Antitumoral
<i>B. variegata</i>	Antitumoral
<i>B. terapotensis</i>	Antiinflamatória
<i>B. cheilandra</i>	Hipoglicemiante
<i>B. racemosa</i>	Antiinflamatória e analgésica
<i>B. purpurea</i>	Antimalárica, antibacteriana, antiinflamatória e antifúngica

A maneira mais comumente utilizada pela população para consumo destas como drogas vegetais é através da decocção de suas folhas. Elas podem

ser adquiridas em mercados municipais, ervanarias, farmácias de manipulação e até mesmo em drogarias.

Normalmente, a população em busca de meios alternativos de tratamentos utilizam-se deste mercado e adquirem, de forma informal, material vegetal para confecção de chás caseiros utilizando-se de recomendações que, muitas vezes, foram transmitidas através de gerações sem um estudo aprofundado a respeito do procedimento e das substâncias contidas nesta droga vegetal.

Em relação às *Bauhinias* existe uma grande quantidade de estudos para expandir o conhecimento a respeito de sua ação hipoglicemiante. Da Cunha et al^[96] avaliaram a atividade *in vivo* de extratos secos de *B. forficata* que foram produzidos através de uma extração com etanol/água (1:2) de suas folhas secas, assim como a influência do processo de secagem feitos por três tipos de procedimentos distintos (*spray dryer*, estufa e granulação seca) e do tamanho das partículas formadas pelos mesmos. Os testes foram realizados com ratos que tiveram sua atividade hipoglicêmica analisada. Os autores concluíram que, dentre os processos de secagem, os mais indicados que não afetam as atividades biológicas das substâncias presentes no extrato são a secagem por *spray dryer* ou em estufa, porém neste estudo não foram avaliados outros solventes para extração das substâncias presentes nas folhas, como por exemplo, a utilização de 100% de água.

O trabalho desenvolvido por Pepato et al^[97] avaliou parâmetros físicos e metabólicos ministrando ou não extratos de *B. forficata* a ratos diabéticos e não diabéticos. Já o de Raj Kapoor et al^[101] estudou o efeito antitumoral de extratos de *B. variegata*. Ambos trabalhos são de extrema importância e possibilitaram o aumento de conhecimento a respeito das espécies. Além destes, outros estudos relacionaram atividades biológicas com estas espécies^[98, 102-107].

É importante ressaltar que existem pesquisas que foram realizadas a respeito da toxicidade dos extratos de *Bauhinia*. É o caso de outro trabalho de Raj Kapoor et al^[108]. Neste, foi testada a atividade de uma flavona isolada de extratos de caule de *B. variegata*. O autor concluiu que esta substância apresenta atividade citotóxica não só a células cancerígenas, mas também para as sadias, inviabilizando assim o tratamento.

Outros estudos que objetivem a descoberta de novas aplicações na utilização de extratos de *Bauhinia* e também com o intuito de complementar aqueles que já foram realizados devem ser feitos. Os que foram desenvolvidos até o

momento dão grande indicação que as espécies de *Bauhinia* têm um grande potencial farmacológico, não só de efeito hipoglicêmico mas também para outras enfermidades. Desta maneira, extratos de *Bauhinia* poderiam ser utilizados de modo alternativo como droga vegetal ou medicamento fitoterápico.

1.3.3. Aspectos químicos

Tendo-se verificado a vasta atividade biológica das diferentes espécies de *Bauhinia*, pesquisadores desenvolveram trabalhos com o objetivo de identificar estruturalmente as moléculas responsáveis por tais atividades.

Até o ano de 2002 a espécie *B. forficata* era a que apresentava maior quantidade de estudos a respeito de sua propriedade hipoglicemiante. Porém, além dela, outras espécies já haviam sido estudadas quanto as substâncias presentes em seus extratos com atividades variadas. A **Tabela 1.3** apresenta as substâncias relatadas por Silva et al^[100] em revisão publicada em 2002. Neste trabalho os autores apresentaram também algumas estruturas novas ou raras encontradas em extratos de *Bauhinia*. As **Figuras 1.4 e 1.5**^[100] ilustram suas estruturas.

Tabela 1. 3 Substâncias encontradas nas espécies de *Bauhinia* estudadas.

Espécie	Classe	Composto
<i>B. candicans</i>	Esteróides	Sitosterol; Campesterol; Estigmasterol; Colesterol; Estigmasta-2,5-dieno-7-ona; Sitosterol 3-O-β-glucosídeo; Sitosterol 3-O-α-D-xilorono-furanosídeo
	Flavonóides	Kaempferol 3-O-β-rutinosídeo; Kaempferol 3-O-β-rutinosídeo 7-O-α-rhamno-piranosídeo
	Alcalóides	Trigonelina
	Álcoois	Triacontanol
	Poliálcoois	3-O-metil-D-inositol (D-pinitol)
<i>B. championii</i>	Benzenóides	Ácido gálico
	Glicosídios	Bauhinina
<i>B. forficata</i>	Flavonóides	Kaempferitrina; Kaempferol-3-O-α-Diraminosídeo
	Esteróides	Sitosterol
<i>B. guianensis</i>	Esteróides	Sitosterol; Estigmasterol
	Flavonóides	4-hidroxi-7-metoxiflavona
	Quinonas	Lapachol; Di-hidro-α-lapachona

Continua na próxima página

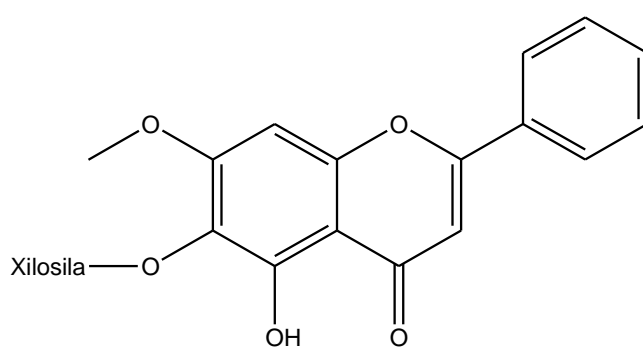
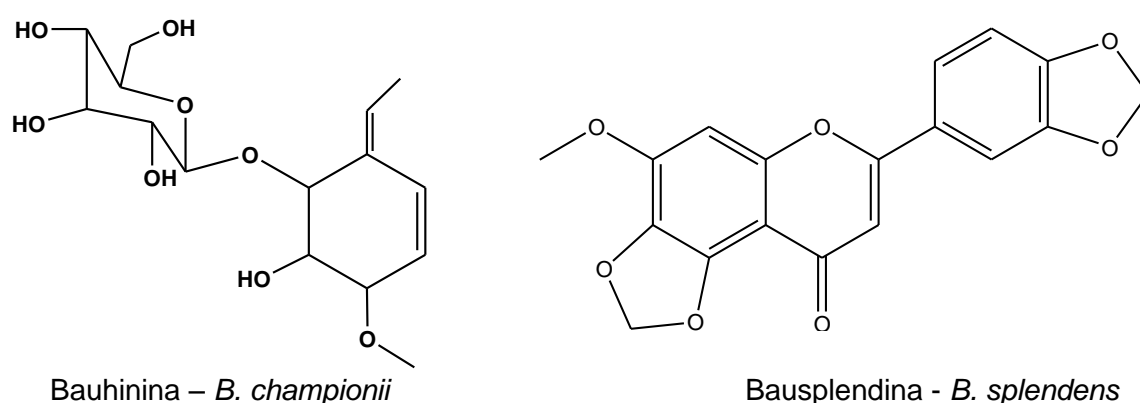
Continuação da Tabela 1.3

<i>B. manca</i>	Esteróides	Sitosterol; Sitosterol-3-O- β -D-glucosídio; Estigmasta-4-eno-3-ona; Estigmasta-4-eno-3,6-diona
	Benzenóides	Ácido cinâmico; Cinnamoil- β -D-glucose; Éster metílico do ácido (E)-4-hidroxi-cinâmico; Éster metílico do ácido (E)-4-hidróxi-3-metoxicinâmico; Ácido gálico; Galato de metila; Éster metílico do Ácido 4-hidróxi-3-metoxibenzóico; Éster metílico do Ácido 3,4-dihidroxibenzóico; ω -Hidroxiopropioguaiacona; Siringaresinol; (7S, 8R, 8'R)-5,5-dimetoxilariciresinol
<i>B. manca</i>	Flavonóides	Apigenina; Chisoeriol; Luteolina 5,3-dimetoxi; Kaempferol; Isoliquiritigenina; Isoliquiritigenina 2-metoxi; Isoliquiritigenina 4-metoxi; Echinatina; 2,4-di-hidroxi-4-metoxi-di-hidrochalcona; (2S)-Narigenina (2S)-Eriodictiol; (2S)-Liquiritigenina; (2S)-Liquiritigenina 7-metoxi; (2S)-Liquiritigenina 4-metoxi; (2S)-7,4-Dihydroxiflavona; (2S)-7,3-Dimetoxi-4-hidroxi-flavona; (2S)-3,4-Dimetoxi-7-hidroxi-flavona; (2S)-7,4-Dimetoxi-3-hidroxi-flavona
	Estilbenóides	Obtustireno
	Outros	5,7-di-hidroxicromona; (2R,3R)-3-O-galoilepicatequina
<i>B. purpurea</i>	Flavonóides	Isoquercitrina; Quercetina; Astragalina; 5,6-dihidroxi-7-metoxi-flavona-6-O- β -D-xilopiranosídio
	Aminoácidos	Ácido aspártico; Treonina; Serina; Ácido glutâmico; Prolina; Glicina; Alanina; Valina; Metionina; Isoleucina; Leucina; Tirosina; Fenilalanina; Histidina; Cisteína; Lisina; Triptofano
<i>B. racemosa</i>	Cromanos	Pacharina; Racemosol; Des-O-metilracemosol
<i>B. reticulata</i>	Flavonóides	Quercetina
<i>B. rufescens</i>	Estilbenóides	5,6-di-hidro-11-metoxi-2,2,12-trimetil-2H-nafto-[1,2- ξ][1]-benzopirano-8,9-diol; 11-metoxi-2,2,12-trimetil-2H-nafto-[1,2- ξ][1]-benzopirano-8,9-diol; 1,7,8,12b-tetra-hidro-2,2,4-trimetil-2H-benzo-[6,7]-ciclo-hepta-[1,2,3-de[1]benzopirano-5,10,11-triol
	Esteróides	Sitosterol; Estigmasterol
<i>B. splendens</i>	Ácidos graxos	Ácido esteárico
	Flavonóides	Bausplendina; Quercetina; Rutina
	Benzenóides	Galato de etila
<i>B. tomentosa</i>	Flavonóides	Isoquercitrina; Quercetrina; Rutina

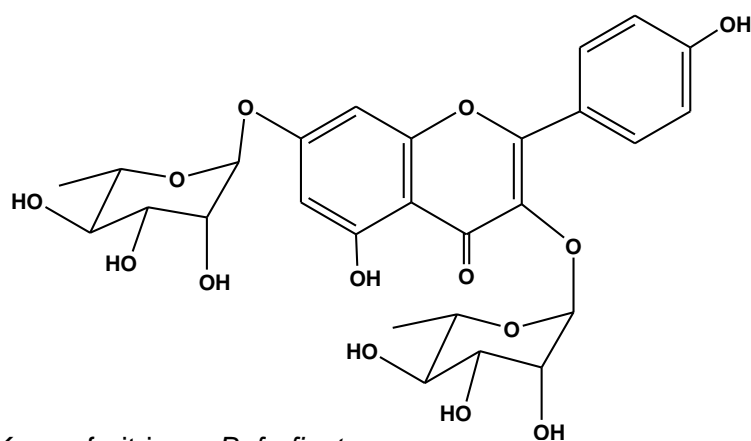
Continua na próxima página

Continuação da **Tabela 1.3**

<i>B. thonningii</i>	Lactona	Grifonilida
<i>B. uruguayensis</i>	Esteróides	Estigmasta-1,3,5-trieno; Estigmasta 3,5-dieno; Campesterol; Estigmasterol; Sitosterol; Estigmasta-4,6-dien-3-ona; Sitosterol-3-O- α -D-riburono-furanosídeo; Sitosterol -3-O- β -D-xilopiranosídeo; Sitosterol-3-O- α -D-xiluronofuranosídeo; Sitosterol -3-O- β -D-glucopiranosídeo
	Flavonóides	Quercetina -3-O- α -L-ramnopiranosídeo; Kaempferol -3-O- α -L-ramnopiranosídeo
	Aminoácidos	Ácido aspártico; Treonina; Serina; Ácido glutâmico; Prolina; Glicina; Alanina; Valina; Metionina; Isoleucina; Leucina; Tirosina; Fenilalanina; Histidina; Colina
	Outros	Hidrocarbonetos; Álcoois lineares
<i>B. vahlii</i>	Esteróides	Campesterol; Estigmasterol; Sitosterol
	Flavonóides	Quercetina; Quercetina-3-glucosídeo; Kaempferol; Agathisflavona
	Triterpenóides	Ácido betulínico
<i>B. megalandra</i>	Flavonóides	5,7,5'-tri-hidroxi-2'-O-ramnosil-flavona; 5,7,2'-trihidroxi-5'-O-ramnosil-flavona
<i>B. variegata</i>	Esteróides	Sitosterol
	Triterpenóides	Lupeol
	Flavonóides	Narigenina-5,7-dimetoxi-4-ramnoglicosídeo; Kaempferol-3-galactosídeo; Kaempferol-3-ramno-glucosídeo



5-hidroxi-7-metoxiflavona-6-O- β -xilopiranosídeo - *B. purpurea*



Kaempferitrina – *B. forficata*

Figura 1. 4 Estruturas inéditas e raras das espécies de *Bauhinia*^[94].

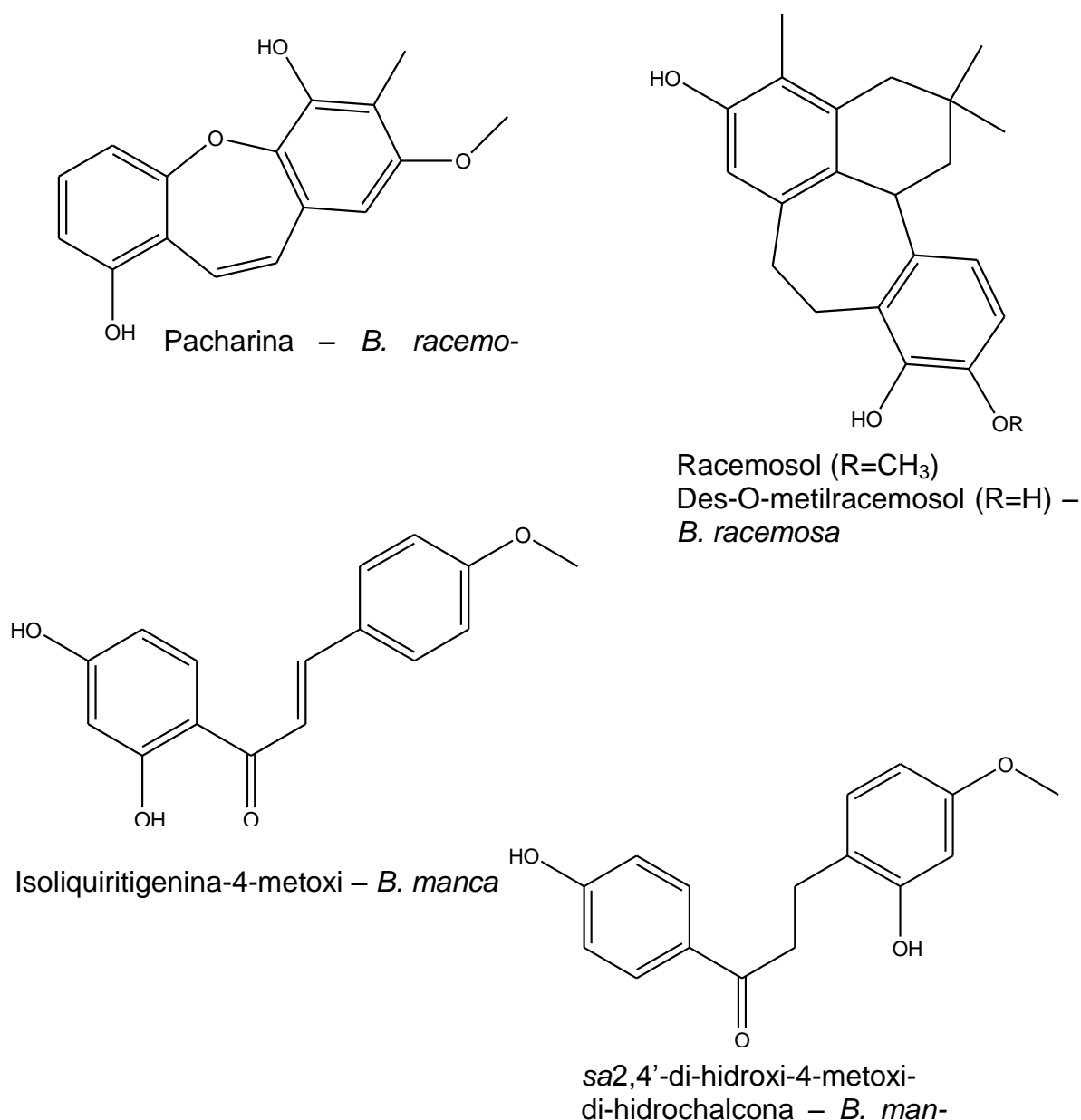


Figura 1. 5 Estruturas inéditas e raras das espécies de *Bauhinia*^[94].

Segundo Engel et al^[109] em trabalho publicado em 2008, a substância kaempferitrina, representada na **Figura 1.4**, é encontrada apenas em *B. forficata*. Tendo isto em vista, os autores sugeriram que esta substância pode ser utilizada como marcador químico para o desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de espécies de *Bauhinia*. Neste trabalho, foi desenvolvido um método de quantificação por HPLC-DAD deste marcador a partir de um extrato utilizando-se 100% de metanol, onde o mesmo foi testado em amostras comerciais de *Bauhinia*. Os autores concluem que das amostras comerciais testadas, apenas em ses-

senta por cento das mesmas foi encontrada a kaempferitrina. Eles ressaltam ainda que a metodologia desenvolvida pode ser utilizada, porém com cautela, pois foram encontradas substâncias que eluem no mesmo tempo de retenção que a kaempferitrina.

Nesta vertente, não há nenhuma recomendação oficial feita pela Farmacopéia Brasileira no que concerne o uso da “pata-de-vaca” como droga vegetal de efeito hipoglicemiante ou qualquer outro uso terapêutico.

Mais recentemente foi publicada outra revisão bibliográfica reunindo informações complementares sobre aspectos biológicos, toxicológicos e fitoquímicos, descobertos após 2002, para as espécies de *Bauhinia*. Nesta são apresentadas as estruturas de alguns novos constituintes de *B. variegata* como terpenos, esteróis, alcalóides e especialmente flavonóides, que previamente não haviam sido determinadas. Esta revisão não mostrou novas substâncias de *B. forficata*. A **Figura 1. 6** ilustra as estruturas identificadas^[95].

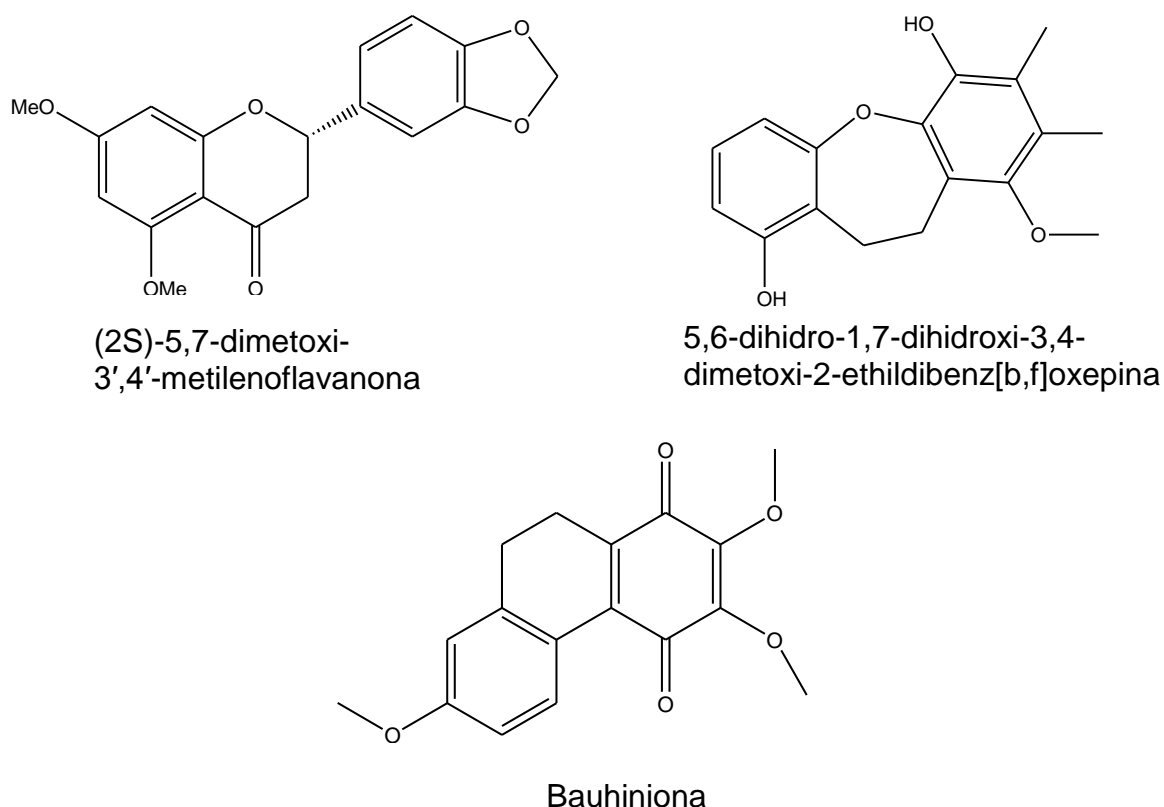


Figura 1. 6 Estruturas inéditas de *B. variegata* em 2009 segundo Cechinel-Filho et al^[95].

1.4. Utilização de ferramentas quimiométricas no controle de qualidade de amostras vegetais

1.4.1. Aspectos gerais e históricos

Atualmente a aplicação da quimiometria é vasta nas diversas áreas da Química e, no Brasil, o primeiro trabalho data de 1981. A partir deste, juntamente com o desenvolvimento computacional, a produção científica na área vem crescendo anualmente^[110]. A aplicação de ferramentas quimiométricas na cromatografia data de 1989, quando Poppi^[111] desenvolveu seu projeto de mestrado utilizando-se da calibração multivariada de dados.

A quimiometria utiliza-se de métodos matemáticos ou estatísticos para planejar ou selecionar procedimentos otimizados de medidas e de experimentos para a análise de dados multivariados^[112] como espectros, cromatogramas, propriedades físicas, concentrações, entre outros. Tais procedimentos têm como objetivo extrair o máximo de informação de um conjunto de dados complexos, fazendo com que estes se tornem mais fáceis de ser interpretados.

Desta forma, para que a utilização da quimiometria em cromatografia seja satisfatória como uma ferramenta de análise e classificação de uma quantidade grande de dados, utilizados para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, é essencial que todos os extratos a serem analisados sejam obtidos a partir do mesmo procedimento. Assim, a garantia de que a composição do extrato seja sempre a mesma para amostras replicadas aumenta. Do mesmo modo, também é essencial que os cromatogramas a serem obtidos a partir destes extratos passem pelas mesmas condições cromatográficas, garantindo que a única variável de diferenciação entre as amostras seja simplesmente as propriedades intrínsecas destas.

A presença ou ausência de um determinado pico cromatográfico e também, diferenças nas intensidades das bandas de mesmo tempo de retenção de amostras obtidas de matérias vegetais distintas, são parâmetros fundamentais nos modelos quimiométricos de classificação e, conseqüentemente, podem ser usados no controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos e demais produtos de origem vegetal.

Dentro das ferramentas quimiométricas utilizadas mais frequentemente em cromatografia pode-se citar aquelas chamadas de (I) Análises não-supervisionadas as quais abrangem a análise exploratória de dados que pode ser feita utilizando-se a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - **PCA**)^[113] e a Análise Hierárquica de Agrupamento (*Hierarchical Cluster Analysis* - **HCA**) e (II) As análises supervisionadas: **SIMCA** (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*), **KNN** (*Kth Nearest Neighbor*) e **PLS-DA** (*Partial Least Square for Discriminant Analysis*).

As análises não-supervisionadas apresentam os dados em agrupamentos (**PCA** e **HCA** apenas projeta em scores) levando em conta tendências entre as amostras e permite também a verificação das variáveis. No caso da cromatografia, o tempo de retenção ou até mesmo o comprimento de onda analisado, representam as informações mais importantes das amostras e também suas correlações. Muitos trabalhos já utilizaram a **PCA** como ferramenta para o controle de qualidade utilizando-se de dados cromatográficos como Chen et al^[19], Ni et al^[114] com os estudos das sementes de *Cassia*, Yi et al^[115] que fez estudos envolvendo a mudança dos metabólitos secundários de árvores de tangerina e Qin et al^[116] que também desenvolveram um trabalho envolvendo espécies de citrus utilizados com fins medicinais.

As análises supervisionadas são também conhecidas como métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões e são comumente utilizados na comparação entre amostras vegetais conhecidas ou não^[21, 114, 117, 118]. Tais métodos utilizam-se de semelhanças e diferenças entre as amostras conhecidas e desconhecidas em que, o primeiro grupo supervisiona a classificação/determinação de alguma característica do segundo. Desta maneira, pode-se utilizar este procedimento no controle de qualidade de espécies utilizadas na produção de medicamentos fitoterápicos.

1.4.2. Pré-tratamento dos dados quimiométricos

Antes de realizar qualquer análise quimiométrica com os dados oriundos de diversos cromatogramas, é necessário que estes passem por um pré-tratamento organizando-se os dados em uma única matriz com o intuito de remover

ruídos experimentais, corrigir desvios de linha de base e, principalmente, alinhar as bandas cromatográficas^[12]. Tal desalinhamento é o principal obstáculo na utilização de ferramentas quimiométricas, pois quaisquer diferenças, sejam de intensidade de sinal ou de tempo de retenção dos mesmos compostos entre cromatogramas obtidos a partir da mesma amostra, podem fazer com que a análise seja prejudicada obtendo-se resultados errôneos ou imprecisos^[119-121].

Desta maneira, com o intuito de minimizar erros na análise, predição e classificação de dados, várias ferramentas de alinhamento de bandas cromatográficas^[120-124] têm sido desenvolvidas. Estas ferramentas são aplicadas para corrigir a variabilidade nos tempos de retenção das bandas cromatográficas devido a pequenas variações na composição da fase móvel, perda de desempenho da coluna, variações na temperatura, vazão, entre outros. As ferramentas mais utilizadas e citadas são: *Dynamic Time Warping (DTW)*^[123], *Parametric Time Warping (PTW)*^[121], *Correlation Optimized Warping (COW)*^[124], *Target Peak Alignment (TPA)*^[120] e *Semi-Parametric Time Warping (STW)*^[121], sendo que cada uma dessas ferramentas utiliza-se de um procedimento matemático diferente entre si com o mesmo propósito: alinhar as bandas cromatográficas sem que se altere o teor das informações iniciais retidas pelos cromatogramas.

Na literatura encontra-se também alguns trabalhos que comparam essas diferentes ferramentas de alinhamento de bandas cromatográficas^[121, 123]. Um trabalho desenvolvido em 2004 por Gong et al^[125] esboça a importância fundamental que o alinhamento de bandas apresenta em uma análise quimiométrica. Neste trabalho os autores primeiramente testaram um método de alinhamento por interpolação com cromatogramas hipotéticos, e assim que verificaram o funcionamento deste, comparam duas análises de componentes principais distintas de cromatogramas obtidos a partir de extratos reais de diferentes espécies de plantas que apresentavam cromatogramas semelhantes (*Cortex cinnamomi*, *Rhizoma chuanxiong*, *Radix angelicae* e *Herba menthae*): uma das **PCA's** foi realizada sem que os dados passassem pelo processo de alinhamento e a outra realizando este procedimento. Com isso, os resultados foram conclusivos: o alinhamento dos cromatogramas, seja por qualquer uma das técnicas disponíveis, é fundamental antes de se fazer qualquer análise quimiométrica. Porém, mesmo com o pré-processamento de dados já feito, deve-se utilizar as ferramentas quimiométricas com atenção, pois ainda assim podem haver erros no agrupamento de dados, como retratado pelo

trabalho. Mesmo tratando-se de um trabalho não muito recente, atualmente a comunidade científica considera o pré-tratamento de dados cromatográficos uma etapa tão ou mais importante do que a simples utilização/aplicação das técnicas quimiométricas em si.

1.4.3. Ferramentas quimiométricas de análise não-supervisionadas: HCA e PCA

Atualmente, uma grande quantidade de trabalhos tem sido desenvolvida utilizando-se de ferramentas quimiométricas de análise não supervisionadas para facilitar e melhorar a interpretação de dados cromatográficos. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Li et al^[126] que utiliza da análise hierárquica de agrupamentos (**HCA**) para diferenciar *Lonicerae japonicae*, uma espécie de planta comumente utilizada no preparo de chás contra doenças bacterianas e virais, além de febres, de outras espécies com *Lonicerae hypoglauciae* Miq., *Lonicerae confusa* DC. e *Lonicerae dasystyla* Rehd, que eram espécies também recomendadas anteriormente pelo Farmacopéia Chinesa de 2005 como espécies ativas contra tais enfermidades.

Neste trabalho, os *fingerprints* de todas as espécies analisadas foram obtidos de extratos aquosos e alcoólicos. Os extratos aquosos foram obtidos em eluição gradiente em uma coluna C₁₈ e os alcoólicos utilizando-se eluição isocrática com a mesma fase estacionária. Posteriormente, após o alinhamento das bandas cromatográficas, utilizando-se um *software* recomendado pela **SFDA** (*Chinese State Food and Drug Administration*), as 20 amostras derivadas de 6 espécies distintas foram classificadas em 5 grupos de acordo com as semelhanças e diferenças entre seus cromatogramas. Tais propriedades, assim como citado pelos autores, são devidas à diferenças no local de cultivo e também à condições climáticas aplicadas a cada uma das plantas. Este fato permite que seja possível a identificação até mesmo da cidade de origem de uma amostra desconhecida.

Neste caso é importante salientar que, quanto maior a quantidade de amostras que o método detém, mais robustez é agregada a essa ferramenta de classificação. O conjunto de dados a ser analisado precisa ser representativo e por isso há a necessidade de grande quantidade de amostras constituintes, pois exis-

tem muitas fontes de variação. Isto é válido não só para **HCA**, mas também para **PCA** e outros métodos de classificação discutidos a seguir.

Outra ferramenta de análise não supervisionada que é utilizada para facilitar a interpretação dos dados e a classificação destes é a Análise de Componente Principais (**PCA**). No trabalho desenvolvido por Xie et al^[127] publicado em 2006, essa ferramenta foi utilizada com o intuito de avaliar sua eficácia no controle de qualidade de plantas medicinais tradicionais chinesas. Eles também demonstraram que com a técnica é possível visualizar os dados apresentados em gráficos, avaliando quais amostras são semelhantes entre si, de um modo mais simples e rápido, assim como na de **HCA**, porém com uma forma de visualização ainda mais fácil.

A **PCA** serve satisfatoriamente como uma ferramenta de análise exploratória de dados. Porém, na utilização desta como ferramenta classificatória para o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos o seu uso deve ser feito com parcimônia já que, assim como pode ser visto em trabalhos citados^[125, 127], observa-se que as ferramentas de análise não-supervisionadas não são as mais indicadas para esta finalidade. No próximo tópico serão discutidas ferramentas quimiométricas recomendadas na utilização de modelos classificatórios de dados.

1.4.4. Ferramentas quimiométricas de análise supervisionadas: KNN, SIMCA e PLS-DA

Para a classificação de dados multivariados é fundamental a utilização de ferramentas dotadas de procedimentos e cálculos mais complexos e confiáveis a fim de minimizar as chances de erro de predição, e maximizar a confiabilidade do modelo de classificação. Dentre as ferramentas quimiométricas atualmente conhecidas destacam-se a **KNN**, a **SIMCA** e a **PLS-DA**, cada uma com sua particularidade.

O **SIMCA** (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*) é considerado um método de classificação de amostras baseado em suas similaridades a partir de uma análise de componentes principais^[128]. Neste modelo, faz-se necessário o uso de amostras padrão para que, a partir destas, seja calculada uma análise de **PCA** em que as amostras desconhecidas serão classificadas.

Tal classificação é feita comparando-se a amostra desconhecida a todas as outras amostras presentes na **PCA**. Dessa maneira, é extremamente necessário que a quantidade de amostras conhecidas de diferentes características sejam equivalentes, pois uma diferença muito grande nestas quantidades pode fazer com que a análise seja comprometida, já que o **SIMCA** é uma técnica de classificação paramétrica, ou seja, que segue uma distribuição normal. Isso permite que a amostra desconhecida seja classificada em uma classe ou mais, ou até mesmo nenhuma, devido a formação de hipercaixas ao redor das amostras padrões onde as amostras desconhecidas poderão ou não ser incluídas quando apresentadas no mesmo gráfico da **PCA** original.

No trabalho de classificação publicado por Soares et al^[129], os autores demonstram estratégias de extração utilizando-se de folhas de *Bauhinia* e também ferramentas quimiométricas como a **HCA**, **PCA** e **SIMCA**. O autor utiliza-se de três cultivares de *Bauhinia forficata* e três cultivares de *Bauhinia variegata* (amostras padrão) para ser calculada a **PCA** inicial. Tal fato evidencia a característica essencial discutida acima, em relação à quantidade de amostras a serem utilizadas. No trabalho, o autor também discute e compara os resultados obtidos por **PCA**, **HCA** e **SIMCA** demonstrando a correlação entre estes.

Outra ferramenta bastante utilizada na classificação de amostras desconhecidas, e até mais simples do que a **SIMCA**, é a **KNN**. Nela, a amostra desconhecida é classificada devido à menor distância em relação a outra de característica conhecida (amostra padrão), classificando-a como de mesma classe que a amostra padrão. Assim, a classificação é mais simples, porém tende a ser menos exata, pois desta maneira as informações sobre a total distribuição da população das amostras não é considerada.

Utilizando-se esta metodologia as amostras desconhecidas sempre serão classificadas como pertencentes a algumas das classes, e a somente uma delas, mesmo que seus perfis cromatográficos sejam completamente diferentes. No trabalho desenvolvido por Ni et al^[117], publicado em 2008, o autor demonstra a utilização do **KNN** utilizando-se de cromatogramas e concentrações obtidas por ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrophotometry*), porém não dispensa a utilização de outra ferramenta de classificação (**LDA** - *Linear Discriminant Analysis*) para dar suporte e confiabilidade a seus resultados. Estes demonstraram que de todas as classificações realizadas utilizando-se essa meto-

dologia, 94% pelo menos foram feitas corretamente utilizando-se até cinco vizinhos mais próximos. Utilizando-se apenas um vizinho essa porcentagem aumenta para 98% e se torna bastante confiável.

Assim como o trabalho de Ni et al, aquele desenvolvido por Martins et al^[12], trás a comparação entre as ferramentas quimiométricas de classificação até aqui discutidas, juntamente com a **PLS-DA**. Esta, por sua vez, trata-se de uma ferramenta mais robusta de classificação e apresenta em sua rotina, cálculos e procedimentos mais complexos de regressão. O trabalho de Martins et al^[12] teve como objetivo a utilização dos diferentes modelos de classificação para o controle de qualidade de espécies de *Phyllanthus*, conhecidas popularmente como “quebra-pedra”. Comparando-se as ferramentas de análise supervisionadas foram encontradas discordâncias na classificação das amostras desconhecidas. Tais discordâncias podem ser esperadas já que cada um dos modelos utiliza-se de critérios diferentes para a classificação. Justamente por isso, é recomendada a utilização de mais de uma ferramenta de classificação para que se possa avaliar com cautela os resultados dos diferentes modelos.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

1. Diferenciar espécies de *Bauhinia* através de perfil cromatográfico e técnicas quimiométricas.

2.2. Específicos

1. Desenvolver um método de extração para obtenção de extratos aquosos de material vegetal de diferentes espécies de *Bauhinia*.

2. Desenvolver e validar um método analítico para a obtenção de perfil cromatográfico utilizando-se de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) para a caracterização química de espécies de *Bauhinia*.

3. Utilizar de técnicas quimiométricas para análise exploratória dos perfis cromatográficos e elaborar modelos de classificação quimiométricos.

4. Aplicar o método analítico cromatográfico desenvolvido, juntamente com os modelos quimiométricos na avaliação da autenticidade de produtos vegetais conhecidos e utilizado como “pata-de-vaca”.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. Generalidades

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca SHIMADZU[®] (Tokio, Japão), composto por uma bomba LC20-AT, um desgaseificador de membrana DGU 20 A₅, um detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10Avp e um auto-injetor SIL10-A. O equipamento apresentava-se acoplado a uma interface CBM-20A e os cromatogramas foram registrados através de um software LCSolution versão 1.21 sp.1.

Os solventes para as análises cromatográficas foram de grau HPLC (MALLINCKRODT[®], J. T. BAKER[®], TEDIA[®]), a água ultrapura utilizada para o preparo dos extratos aquosos e na composição das fases móveis foi obtida em um sistema MILLI-Q[®] (Millipore, São Paulo, Brasil). Todas as soluções foram filtradas, a vácuo, em um sistema MILLIPORE, utilizando-se membranas de nylon PHENOMENEX[®] (Torrance, EUA) de 0,45µm.

Para a pulverização das amostras vegetais fez-se o uso de um liquidificador industrial da marca SKYMPSEN[®] (Brusque, Brasil) modelo TA-02.

O aquecimento para extração das amostras foi feito em manta de aquecimento QUIMIS[®] (São Paulo, Brasil). Os extratos foram liofilizados em liofilizador LABCONCO[®] modelo E-C Modulyo (Kansas City, EUA) acoplado à bomba de vácuo EMERSON[®] modelo DV-200N-250. A homogeneização das amostras foi realizada em agitador de tubos PHOENIX[®] modelo AP-56 (Araraquara, Brasil).

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada balança analítica AND[®] modelo HR200 (San Jose, Canadá), com precisão de $\pm 0,1$ mg. As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro QUALXTRON[®] modelo 8010 (Araraquara, Brasil), com precisão de $\pm 0,01$ unidades de pH, conectado a um eletrodo de vidro combinado. A calibração do pHmetro foi feita com soluções tampão pH 4,00 e 7,00 CHEMIS[®] (São Paulo, Brasil). As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram da marca GILSON[®] (Middleton, EUA).

Para o empacotamento das colunas cromatográficas, foram empregadas sílicas Luna[®] C₈ (10µm de tamanho de partícula, 100Å de poro), Luna[®] C₁₈ (10µm de tamanho de partícula, 100Å de poro) e Luna[®] fenil-hexil (10µm de tamanho de partícula, 120Å de poro), produzidas pela PHENOMENEX[®] (Torrance, EUA)

e sílica fenil nucleosil[®] (10µm de tamanho de partícula, 100 Å de poro) fabricada pela MACHEREY-NAGEL[®] (Düren, Alemanha) que foram empacotadas no próprio laboratório^[130].

O empacotamento das colunas foi realizado por uma empacotadora SHANDON[®] (Pittsburgh, EUA), utilizando tubos de aço inox (15,0cm x 0,46cm d.i. para colunas analíticas) sob pressão de 7.000psi. As sílicas foram suspensas em metanol e homogeneizadas em banho de ultrassom COLE-PALMER[®] modelo 8852 (Illinois, EUA), por três minutos antes de serem empacotadas. Após o empacotamento, as colunas foram condicionadas em metanol por 24 horas, com vazão de 1,0 mL/min, posteriormente foram identificadas e armazenadas em temperatura ambiente, em local apropriado.

Foi avaliada também uma coluna analítica comercial com fase estacionária bifenil (fenil-fenil) da marca RESTEK[®] (Bellefonte, Pennsylvania, EUA) de 15cm (5µm de tamanho de partícula, 120Å de poro). Para todas as análises cromatográficas foi utilizada uma coluna guarda de fase C₁₈ (10µm de tamanho de partícula, 100Å de poro), produzidas pela PHENOMENEX[®] (Torrance, EUA).

As análises quimiométricas foram feitas em microcomputador com processador Intel Pentium 4 (3,4GHz), utilizando os programas computacionais: Pirouette[®] versão 4.0 (Infometrix Inc., Bothell, WA, EUA), Excel[®] (Microsoft), Matlab[®] versão R2007b (MathWorks Inc., Natick, EUA) e rotina para alinhamento de bandas cromatográficas disponibilizada no site da Faculdade de Ciências da Vida da Universidade de Copenhagen (http://www.models.kvl.dk/DTW_COW).

3.2. Coleta, identificação botânica e processamento de amostras do gênero *Bauhinia*

O material vegetal (caule, folhas, flores e frutos) foi coletado de diferentes árvores em diferentes localidades do estado de São Paulo: em Campinas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA Unicamp - 2 árvores) em um período de um ano com alternância de três em três meses a partir de Outubro de 2008, em Jaguariúna (6 árvores) em Maio de 2009, Jarinu (1 árvore) em Janeiro de 2009, em São Carlos (3 árvores) em Novembro de 2008 e no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC – 14 árvores) em Maio de 2010.

Além destas, em Março de 2010, amostras de material vegetal seco de duas árvores foram gentilmente fornecidas pelo grupo Centroflora^[131]. Em cada local de coleta, com exceção das amostras cedidas pela empresa, foram adquiridas coordenadas geográficas utilizando equipamento de localização por satélite (GPS – Foston[®]). A **Tabela 3.1** relaciona os locais de coleta e as coordenadas geográficas de cada um dos cultivares aos quais foram coletadas amostras vegetais e exsiccatas para identificação botânica.

Tabela 3. 1 Locais de coleta e coordenadas geográficas das árvores selecionadas para coleta e herborização.

Amostra	Cidade	Coordenadas Geográficas
P01	CPQBA - Unicamp	S 22,79676° x O 47,11209°
P02	Campinas	S 22,79730° x O 47,11241°
P03		S 21,98263° x O 47,88020°
P04	São Carlos	S 21,98813° x O 47,88280°
P05		S 21,98791° x O 47,87979°
P06		S 22,70160° x O 46,98610°
P07		S 22,70149° x O 46,98600°
P08	Jaguariúna	S 22,70215° x O 46,98909°
P09		S 22,70211° x O 46,98895°
P10		S 22,70358° x O 46,99024°
P11	Jarinú	S 23,15277° x O 46,71277°
P12		S 22,87123° x O 47,07398°
P13		S 22,86795° x O 47,06915°
P14		S 22,86864° x O 47,06839°
P15		S 22,86905° x O 47,06853°
P16		S 22,86501° x O 47,08581°
P17		S 22,86445° x O 47,08683°
P18	IAC - Campinas	S 22,86420° x O 47,08681°
P19		S 22,86400° x O 47,08683°
P20		S 22,86293° x O 47,08923°
P21		S 22,86066° x O 47,09062°
P22		S 22,86070° x O 47,08913°
P23		S 22,86315° x O 47,08922°
P24		S 22,86565° x O 47,08827°
P25		S 22,87255° x O 47,08494°
P26	Centroflora	Não fornecido
P27	Botucatu	Não fornecido

A identificação taxonômica foi feita pela Dra. Angela Studart da F. Vaz do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, após herborização de

cada árvore coletada. As exsiccatas identificadas, posteriormente, foram depositadas no herbário da UFSCar.

Tais amostras vegetais, após coletadas, foram secas em estufa ventilada a 40° C por sete dias. Após esse período, foram pulverizadas, a granulometria dos pós foi obtida e padronizada em peneira 60 mesh (Bertel[®]) e posteriormente foram identificadas em frasco apropriado e armazenadas sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz e de umidade.

3.3. Aquisição de amostras comerciais de “pata-de-vaca”

Para o estudo, foram obtidas quinze amostras comerciais de pata-de-vaca em diferentes datas e locais dentro do estado de São Paulo. Em todas elas, a embalagem trazia informações a respeito da espécie a qual se tratava a amostra.

Tais amostras, conforme foram sendo adquiridas, passaram pelo mesmo processamento das amostras padrão no que diz respeito aos procedimentos de moagem e armazenamento (item 3.2). A extração e liofilização foram realizadas de acordo com os métodos padronizados (item 3.4) a fim de minimizar as variações não inerentes às propriedades intrínsecas de cada uma das amostras vegetais. Todas as amostras apresentavam-se dentro do prazo de validade estipulado pelos fabricantes/fornecedores.

3.4. Obtenção dos extratos vegetais das amostras vegetais padrão e comerciais

A obtenção dos extratos aquosos foi realizada utilizando um método de extração previamente estudado pelo grupo^[132] que foi inicialmente otimizado e padronizado. O procedimento encontra-se descrito a seguir.

As extrações foram realizadas em quintuplicatas para as amostras padrão identificadas e em duplicatas para as amostras comerciais adquiridas utilizando-se o seguinte método: pesou-se 3g de amostra vegetal em pó (60mesh) em balão de fundo redondo de duas ou três bocas, com capacidade para 50mL. Adici-

onou-se 20mL 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 125mL, utilizando 30mL de água para a completa transferência e filtração do material vegetal. O extrato foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. Após a liofilização o extrato seco foi transferido para frasco de vidro tampado, identificado, pesado e mantido em *freezer* a -20°C.

3.5. Aquisição dos perfis cromatográficos dos extratos aquosos

Para as análises cromatográficas, os extratos secos foram descongelados a temperatura ambiente e pesados (30mg) em um becker. Adicionou-se 1mL de água deionizada, homogeneizou-se em agitador de tubos por 1 minuto. As soluções obtidas (30mg/mL) foram filtradas com algodão hidrófilo comercial, transferidas para frascos de amostragem (*vials*) e dispostas na bandeja do autoinjeter; 40µL de cada uma delas foram introduzidos no sistema cromatográfico. Para cada uma das fases estacionárias avaliadas foi desenvolvido e otimizado um método gradiente de eluição.

O método selecionado para obtenção dos *fingerprints* foi de eluição gradiente no modo reverso com fase móvel constituída por metanol (solvente **B**) e tampão fosfato (solvente **A**) 0,01M, pH=3, com a seguinte configuração: 4% de **B** isocrático por 7,5min.; 4-21% de **B** em 1min.; 21-75% de **B** em 27min.; permanecendo em 75% de **B** por 10min; 75-4% de **B** em 5min. (retorno do gradiente); utilizando-se vazão de 0,75mL/min.

Os cromatogramas foram registrados com detector de arranjo de diodos em varredura de 190-800nm, com aquisição em intervalos de 1,23nm, fornecendo 495 espectros por unidade de tempo de análise. Para a utilização dos mesmos nos modelos quimiométricos, selecionou-se os cromatogramas obtidos com comprimento de onda de 254nm.

Para as amostras comerciais de “pata-de-vaca”, após a obtenção dos extratos aquosos em duplicata, as análises cromatográficas foram efetuadas para cada uma delas de modo similar às amostras padrão, dando origem a trinta cromatogramas. Posteriormente, através de uma média simples, estes deram origem a quinze cromatogramas que foram utilizados como dados de amostras de espécies desconhecidas para classificação pelos modelos quimiométricos desenvolvidos.

3.6. Desenvolvimento de modelos quimiométricos: Análise Exploratória e Modelos de classificação

Os cromatogramas obtidos das amostras padrão (botanicamente identificadas) e das amostras comerciais foram inicialmente transformados em uma planilha de dados no Excel[®], separando-se inicialmente os cromatogramas das amostras padrão daqueles das amostras comerciais. Esta planilha, aqui chamada de matriz **X**, foi composta por 4.221 linhas e 200 colunas, em que cada coluna representa um cromatograma com as absorvâncias do comprimento de onda selecionado para aquisição e tratamento dos dados e cada linha um tempo de retenção a este relacionado. É importante ressaltar que a matriz **X** no Excel[®] estava transposta e após a transferência para o Matlab[®], a mesma ficou configurada como 200 x 4.221.

Todos os cromatogramas foram submetidos a um procedimento de alinhamento de dados multivariados desenvolvido por Skov et al, o **COW**^[133] (*Correlation Optimized Warping*). Após esse procedimento, utilizando-se o software Pirouette[®] (4.0 ver.2, Infometrix) calculou-se, com a matriz **X** já alinhada, uma PCA^[113] e uma HCA, ambas com os dados autoescalados e a última com a distância euclidiana calculada com o método de conexão *Incremental*.

Logo após, também com a utilização do mesmo software, desenvolveram-se três tipos de modelos quimiométricos de classificação: SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*), KNN (*Kth Nearest Neighbor*) e PLS-DA (*Partial Least Squares – Discriminant Analysis*). Antes da aplicação destes modelos para a classificação das amostras comerciais de “pata-de-vaca” eles passaram por um processo de validação. O procedimento constitui na retirada de 20% das amostras padrão do conjunto de dados e posterior classificação destas pelos modelos. A validação é feita comparando-se os acertos na predição das espécies destas amos-

tras padrão comparando-se com a espécie determinada botanicamente. O mesmo conjunto de treinamento foi aplicado para a validação dos três modelos. Os modelos desenvolvidos foram aplicados para a classificação das amostras comerciais de “pata-de-vaca”.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Coleta e identificação botânica de cultivares do gênero *Bauhinia*

No Brasil, árvores do gênero *Bauhinia* são constantemente utilizadas como ornamentais devido a sua exuberância e florescência por grandes períodos. Devido a este fator, é encontrada com facilidade em ruas e avenidas de cidades com o intuito de embelezar e fornecer sombra. Tendo essa abundância em vista, coletou-se material vegetal para herborização e para provimento de amostras de diferentes árvores de cidades distintas dentro do estado de São Paulo: Campinas, Jaguariúna, Jarinú e São Carlos. Sabendo-se que o metabolismo secundário de plantas superiores é constantemente afetado por diferentes fatores, como exemplo: umidade, condições de solo, incidência luminosa dentre outros^[7], espera-se que existam também diferenças na constituição dos extratos obtidos entre as mesmas espécies de regiões distintas.

A **Tabela 4.1** relaciona as cidades dos cultivares nas quais foram obtidas as amostras vegetais, os números de registro das exsicatas no herbário da UFSCar e CPQBA após a identificação botânica e a data das coletas e herborizações de cada uma delas. No caso das amostras coletadas no CPQBA da Unicamp, o código a qual a tabela faz referência trata-se do número de depósito no herbário da própria Instituição.

Tabela 4. 1 Identificação das espécies, locais e datas das coletas.

Amostra	Cidade	Espécie	Herbário UFSCar	Data da Coleta
P01	CPQBA Unicamp	<i>B. forficata</i>	755*	Out/08**
P02	Campinas	<i>B. forficata</i>	1112*	Out/08**
P03	São Carlos	<i>B. variegata</i>	7650	Nov/08
P04		<i>B. variegata</i>	7652	Nov/08
P05		<i>B. variegata</i>	7653	Nov/08
P06		<i>B. variegata</i>	7655	Mai/09
P07		<i>B. variegata</i>	7656	Mai/09
P08	Jaguariúna	<i>B. variegata</i>	7657	Mai/09
P09		<i>B. variegata</i>	7658	Mai/09
P10		<i>B. variegata</i>	7659	Mai/09
P11	Jarinú	<i>B. longifolia</i>	7651	Jan/09

Continua na próxima página

Continuação da **Tabela 4.1**

P12		<i>B. forficata</i>	8332	Mai/10
P13		<i>B. forficata</i>	8333	Mai/10
P14		<i>B. longifolia</i>	8325	Mai/10
P15		<i>B. longifolia</i>	8326	Mai/10
P16		<i>B. longifolia</i>	8327	Mai/10
P17		<i>B. longifolia</i>	8328	Mai/10
P18	IAC	<i>B. forficata</i>	8334	Mai/10
P19	Campinas	<i>B. forficata</i>	8335	Mai/10
P20		<i>B. forficata</i>	8336	Mai/10
P21		<i>B. forficata</i>	8337	Mai/10
P22		<i>B. forficata</i>	8338	Mai/10
P23		<i>B. longifolia</i>	8329	Mai/10
P24		<i>B. longifolia</i>	8330	Mai/10
P25		<i>B. longifolia</i>	8331	Mai/10
P26	Centroflora	<i>B. forficata</i>	-	Abr/10
P27	Botucatu	<i>B. forficata</i>	-	Abr/10

* Registros no herbário do CPQBA.

** As coletas das amostras **P01** e **P02** foram feitas de 3 em 3 meses durante um ano com início em Out/08 totalizando 4 coletas de cada árvore.

As amostras vegetais coletadas dos cultivares nas cidades de São Carlos, Jaguariúna e Jarinú situavam-se em ruas e avenidas destas cidades e foram escolhidas aleatoriamente para realização do presente trabalho (situavam-se a uma distância mínima de 10m e máxima de 1km entre si). Logo após a coleta e a herborização, a matéria vegetal foi submetida a procedimentos de secagem com posterior processo de moagem (incluindo folhas e pequenos galhos) e ao final seguida de tamisação dos pós que passariam pelo processo de extração (item 4.2).

A tamisação, procedimento realizado para padronizar o tamanho de partícula da matéria vegetal moída, visa à uniformidade dos pós com o intuito de minimizar esta influência no procedimento de extração, e foi determinado de acordo com o proposto por Sonaglio et al^[8].

4.2. Obtenção de amostras comerciais de “pata-de-vaca”

Amostras comerciais de “pata-de-vaca”, de diferentes fabricantes e diferentes localidades, foram adquiridas durante todo o período do presente trabalho em farmácias, de manipulação e homeopáticas. A **Tabela 4.2** apresenta as informações de data e local da compra assim como a espécie indicada no rótulo.

Tabela 4. 2 Cidades de aquisição e espécies indicadas no rótulo de amostras comerciais adquiridas.

Amostra	Data da compra	Cidade de Aquisição	Espécie indicada no rótulo
AC01	Jan/2010	São Carlos – SP	<i>Bauhinia sp.</i>
AC02	Dez/2009	Goiânia – GO	<i>Bauhinia sp.</i>
AC03	Jan/2010	São Carlos – SP	<i>B. forficata</i>
AC04	Jan/2010	São Carlos – SP	<i>B. forficata</i>
AC05	Jan/2010	São Carlos – SP	<i>B. forficata</i>
AC06	Jan/2010	São Carlos – SP	não informado
AC07	Ago/2008	Aracaju – SE	não informado
AC08	Jan/2009	São Carlos – SP	<i>B. forficata</i>
AC09	Jan/2009	Jaguariúna – SP	<i>B. forficata</i>
AC10	Jan/2009	São Carlos – SP	<i>Bauhinia sp.</i>
AC11	Dez/2009	Goiânia – GO	<i>Bauhinia sp.</i>
AC12	Jan/2009	São Carlos – SP	<i>Bauhinia sp.</i>
AC13	Jan/2009	São Carlos – SP	<i>Bauhinia sp.</i>
AC14	Dez/2009	Goiânia – GO	não informado
AC15	Fev/2010	Paraibúna – SP	<i>B. candicans</i>

As amostras apresentavam marca, nome comercial, lote, data de fabricação, validade e a descrição da espécie. Porém, em várias delas as espécies foram apresentadas somente com *sp* e para algumas delas, nenhuma informação foi fornecida. Isto pode ser observado analisando a **Tabela 4.2 (AC06, AC07 e AC14)**. Estas amostras foram adquiridas em farmácias de manipulação (**AC06 e AC14**) enquanto a **AC07** em feira-livre.

Todas as amostras estavam secas, algumas delas se caracterizavam por folhas inteiras, outras já estavam trituradas e àquelas que foram adquiridas de farmácias de manipulação estavam pulverizadas dentro de capsulas. Os procedi-

mentos de extração e manuseio foram realizados assim como para as amostras vegetais padrão, descrito no item 4.4, porém em duplicata.

4.3. Padronização e validação do método de extração

Estudos publicados demonstram que a utilização de diferentes solventes, quando empregados nos procedimentos de extração de amostras vegetais, influencia na constituição do extrato e conseqüentemente no perfil cromatográfico^[20, 134-136].

Tendo em vista a utilização popular da “pata-de-vaca” na forma de chás de suas folhas segundo a recomendação da Farmacopéia Brasileira^[4], utilizou-se o método descrito como citado em 4.4 para proceder o preparo dos extratos a serem analisados por HPLC.

O uso de extratos aquosos para controle de qualidade de perfis cromatográficos já foi utilizado com êxito pelo grupo em trabalho anterior^[12, 132], o que motiva o emprego deste tipo de extrato. Outra razão que justifica a utilização de água como solvente para os procedimentos de extração é o fato deste solvente não ser agressivo ao meio ambiente e reduzir drasticamente a geração de resíduos danosos durante o desenvolvimento do trabalho.

O método de extração utilizado visou à padronização das variáveis relacionadas ao processo de extração como: quantidade de água utilizada no processo, quantidade e tamanho das partículas do material vegetal (padronizado antes da extração), temperatura e o tempo de extração além de procedimentos de manuseio do mesmo durante todo processo.

A liofilização foi realizada após a obtenção dos extratos, com o objetivo de, primeiramente evitar processos de degradação por oxidação e/ou hidrólise das substâncias presentes no extrato e, posteriormente obter uma mistura homogênea e sólida dos componentes liofilizados, fato que permite a posterior padronização da concentração das soluções a serem introduzidas no sistema cromatográfico. Todos os extratos preparados foram liofilizados e mantidos em *freezer* (-20°).

A padronização do método de extração se faz necessária e é fundamental, pois para as análises quimiométricas a serem realizadas quaisquer possíveis interferências são decisivas. Estas, provenientes do meio externo ou do analis-

ta, são passíveis de gerar no *fingerprint* grandes diferenças, que por sua vez podem acarretar em erros nos modelos de classificação a serem desenvolvidos. Dessa maneira, com o intuito de avaliar o método de extração e demonstrar que este não alteraria o perfil cromatográfico a ser obtido dos diferentes extratos, os coeficientes de variação de tempo de retenção e área de cinco bandas cromatográficas (indicadas na **Figura 4.1**) foram calculados para dez diferentes cromatogramas (dez amostras preparadas independentemente de *B. forficata* – **P01**). Os resultados obtidos estão relacionados na **Tabela 4.3**.

Tabela 4. 3 Coeficiente de variação entre cromatogramas de diferentes extrações de *B.forficata*. (Repetibilidade)

Banda	Tempo de Retenção (Média, n=10)	Coef. de Variação (%)	Área (Média, n=10)	Coef. de Variação (%)
1	2,93	0,30	3249,20	0,54
2	4,18	0,54	4449,90	0,85
3	5,36	1,01	5605,90	1,82
4	21,13	0,52	21429,90	0,53
5	22,43	0,50	22692,80	0,45

Analisando-se a **Tabela 4.3** é possível observar coeficientes de variação máximos de 1,01% e 1,82% que foram obtidos para os tempos de retenção e área das bandas, respectivamente. Tais valores representam que o método de extração não influenciará muito nos modelos quimiométricos de classificação.

As bandas cromatográficas 1 a 5 selecionadas para a avaliação da repetibilidade do método de extração estão destacadas nos cromatogramas apresentados na **Figura 4.1**. Os cromatogramas foram obtidos utilizando-se uma coluna analítica de 15cm x 0,46cm d.i. empacotada com sílica Luna[®] fenil-hexil (10µm de tamanho de partícula e 100Å de poro) com eluição gradiente como descrito no item 3.5.

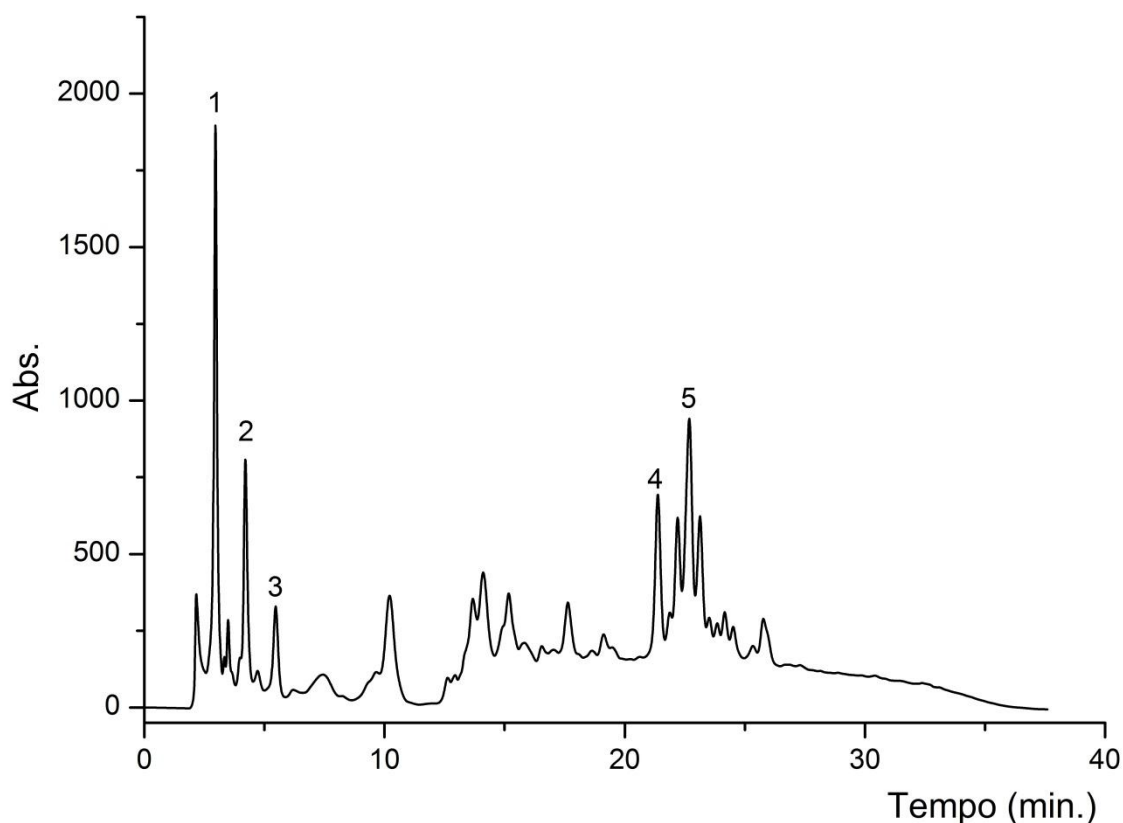


Figura 4. 1 Cromatogramas obtidos de *B. forficata* (P01) para o cálculo do coeficiente de variação do método de extração.

Com o intuito de analisar a precisão de injeção, característica do auto-injetor do sistema cromatográfico utilizado, os mesmos parâmetros, tempo de retenção e coeficiente de variação, foram calculados a partir de análises em quintuplicata de injeção de uma mesma solução de extrato de *B. forficata* (P01). Os coeficientes de variação estão apresentados na **Tabela 4.4**.

Tabela 4. 4 Coeficiente de variação entre cromatogramas de mesmo extrato de *B. forficata*. (Precisão de Injeção)

Banda	Tempo de Retenção (Média, n=5)	Coef. de Variação(%)	Área (Média, n=5)	Coef. de Variação(%)
1	3,02	0,38	3268,80	1,70
2	4,73	0,58	5040,80	1,17
3	5,73	1,28	5992,20	1,52
4	21,54	0,46	21813,00	0,44
5	22,84	0,42	23079,80	0,36

Assim como pode ser observado na **Tabela 4.4**, os coeficientes de variação máximos obtidos foram de 1,28% e 1,70% para tempo de retenção e área da banda, respectivamente. Dessa maneira, pode-se afirmar que parte do coeficiente de variação calculado anteriormente e demonstrado na **Tabela 4.3** seja devido às variações instrumentais e não a possíveis pequenas diferenças no procedimento de extração. Tais valores de coeficiente de variação para precisão de injeção também não terão grande influência na predição dos modelos quimiométricos de classificação a serem desenvolvidos, devido aos coeficientes de variação encontrados.

4.4. Otimização das condições cromatográficas para aquisição dos *fingerprints* dos extratos das diferentes espécies de *Bauhinia*

Após a padronização e validação do método de extração, cinco extratos foram preparados individualmente para cada amostra vegetal de cultivar coletado, perfazendo um total de 170 extratos oriundos de amostras vegetais coletadas e identificadas (10 extrações de **P01** para a validação do método de extração, 5 extrações para cada coleta realizada em **P01** e **P02** e 5 extrações de cada um dos outros 26 cultivares). Além dos extratos das amostras padrão foram preparados 30 extratos oriundos das amostras comerciais adquiridas.

A qualidade do perfil cromatográfico, no que diz respeito à maior quantidade de informações (bandas cromatográficas), está diretamente ligada à separação cromatográfica e a intensidade das bandas nele obtido^[137, 138]. Assim, parte fundamental no desenvolvimento do método quimiométrico está ligada diretamente ao desenvolvimento do método cromatográfico, que se caracteriza pela escolha correta da fase estacionária, bem como propriedades da coluna cromatográfica (tamanho de partícula, comprimento da coluna e diâmetro), estabelecimento de fase móvel apropriada, determinação da vazão e seleção do comprimento de onda a ser usado para a aquisição dos dados. Todos estes parâmetros estão diretamente ligados ao posterior sucesso da caracterização/diferenciação pelos modelos quimiométricos.

Cabe colocar que, uma vez escolhida tais condições, estas serão utilizadas na obtenção de todos os demais *fingerprints* cromatográficos, já que a varia-

ção destes influenciaria diretamente na qualidade dos perfis cromatográficos a serem obtidos. Assim, é desejável que o método a ser desenvolvido apresente boa seletividade e resolução com a utilização de uma fase móvel de composição simples, com pH aplicável ao sistema e à coluna cromatográfica (pH entre 2 e 8), conferindo maior robustez e confiabilidade ao mesmo.

Com o intuito de se obter cromatogramas bem resolvidos para que estes permitissem o melhor desenvolvimento dos modelos quimiométricos, foram avaliadas as seguintes variáveis na otimização do método cromatográfico para futura obtenção dos *fingerprints*: fase estacionária, natureza do modificador orgânico, parâmetros de eluição gradiente (concentração do modificador orgânico, tempo, inclinação e vazão) e comprimento de onda para aquisição dos dados.

Para que as figuras de mérito precisão de injeção e repetitividade fossem avaliadas (item 4.2) e também para a posterior aquisição dos perfis cromatográficos para composição dos modelos quimiométricos, primeiramente foi necessária a seleção de um comprimento de onda adequado para que tais dados fossem coletados. Selecionou-se um comprimento de onda que fornecesse uma maior quantidade de bandas cromatográficas. A **Figura 4.2 – A** ilustra um cromatograma em 3D obtido a partir de uma das replicatas de extração de *B. forficata* (**P01**) com a utilização do gradiente descrito no item 3.5. Para esta etapa foi utilizada uma coluna de 150mm x 4,6cm d.i. e de fase estacionária Luna® fenil-hexil (10µm de tamanho de partícula, 120Å de poro), foi injetado 40µL de extrato vegetal ressolubilizado de concentração de 30mg/mL

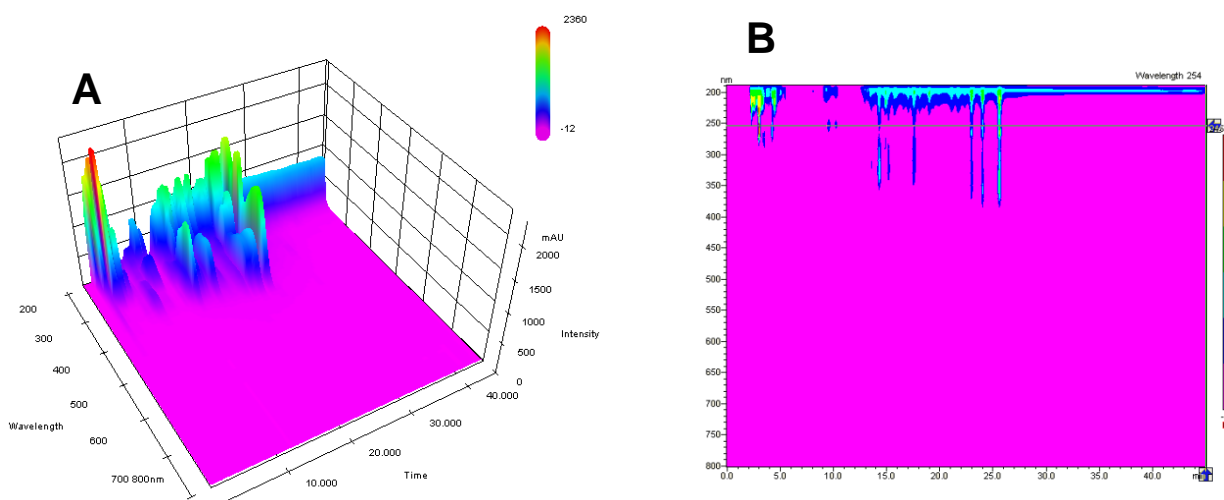


Figura 4. 2 Cromatograma de extrato aquoso de *B. forficata*. À esquerda a projeção tridimensional e à direita a projeção de contornos e a indicação do comprimento de onda selecionado (254nm) para as análises.

É possível observar o comprimento de onda indicado (**Figura 4.2 – B**) que foi selecionado (254nm). De acordo com os espectros obtidos, neste comprimento de onda, o cromatograma apresentou boa resolução e intensidade de absorvância, características que permitirão a obtenção de *fingerprints* com maior quantidade de informações permitindo melhor acuidade e precisão dos modelos quimiométricos.

Para a avaliação das fases estacionárias, inicialmente selecionou-se 3 tipos de fases distintas para avaliação da seletividade das mesmas: sílicas Luna® C₈ (10µm de tamanho de partícula, 100Å de poro), Luna® C₁₈ (10µm de tamanho de partícula, 100Å de poro) e Luna® fenil-hexil (10µm de tamanho de partícula, 120Å de poro). Posteriormente utilizou-se a sílica fenil nucleosil® (10µm de tamanho de partícula, 100 Å de poro) e por último uma coluna comercial da Restek® (5µm de tamanho de partícula, 120Å de poro) de fase fenil-fenil.

As colunas foram avaliadas utilizando-se o método de gradiente exploratório preconizado por Snyder e Kirkland^[139]. Para isto, foi injetado no sistema cromatográfico 40µL de extrato de *B. forficata* (**P01**), ressolubilizado em água ultra-pura a uma concentração de 30mg/mL, em eluição gradiente com a fase móvel constituída de água (solvente **A**) e acetonitrila (solvente **B**) com $\Delta\mathbf{B}$: 5-100% em 60min; permanecendo em 100% de **B** por 15min (limpeza da coluna cromatográfica) e 100-5% de **B** em 5min (retorno do gradiente) para a estabilização da coluna para a próxima injeção, permanecendo nesta condição por 15min. com uma vazão de 2mL/min. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na **Figura 4.3**.

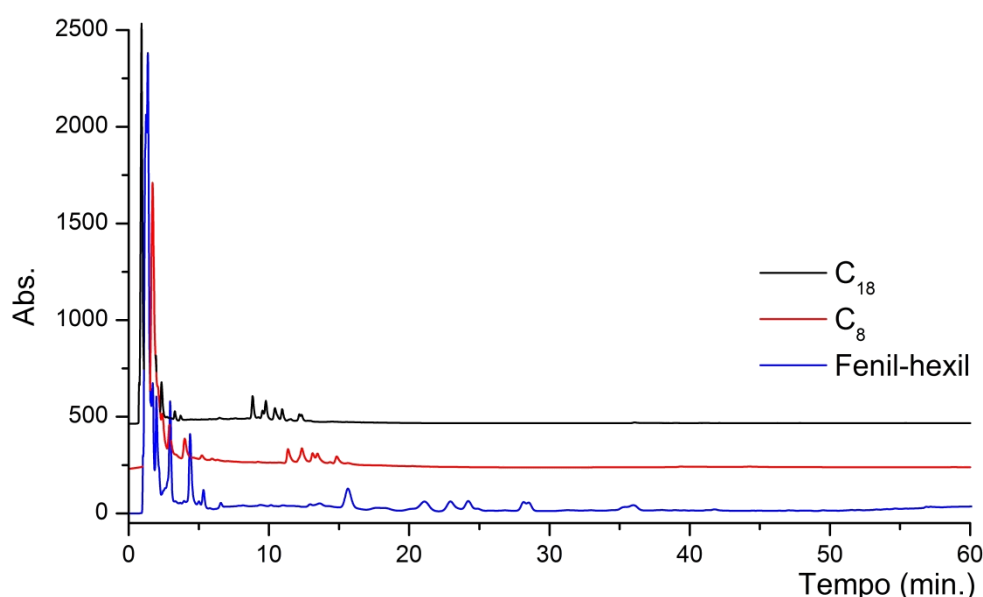


Figura 4. 3 Cromatogramas obtidos de *B. forficata* (**P01**) utilizando-se o método de gradiente exploratório nas diferentes fases estacionárias avaliadas. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$.

Comparando-se os *fingerprints* obtidos, é possível perceber que, com o gradiente exploratório utilizado, os cromatogramas não apresentam um número grande de bandas cromatográficas, além de baixa resolução. Pode-se inferir que isto se deve, principalmente, à elevada característica hidrofílica das substâncias constituintes do extrato que faz com que a maior parte das moléculas eluam com um tempo de retenção muito baixo já que, tratando-se dessa fase inicial, a fase móvel é constituída de 95% de água. Outro fator que influi na baixa separação cromatográfica é a inclinação do gradiente, uma vez que no tempo de 20 minutos, tempo em que praticamente não são mais observadas bandas cromatográficas, o percentual de acetonitrila é cerca de 37%.

Assim, com o intuito de obter cromatogramas que apresentassem maior quantidade de bandas cromatográficas e melhores resoluções das mesmas, foram realizadas modificações na inclinação do gradiente de solventes, troca do modificador orgânico e mudanças na vazão da fase móvel.

Os cromatogramas apresentados na **Figura 4.4** ilustram os resultados obtidos nas otimizações realizadas com as diferentes fases estacionárias. As condições cromatográficas estão apresentadas na **Tabela 4.5**. Os solventes **A** e **B** são: solução tampão fosfato 0,01M, pH=3 e metanol, respectivamente.

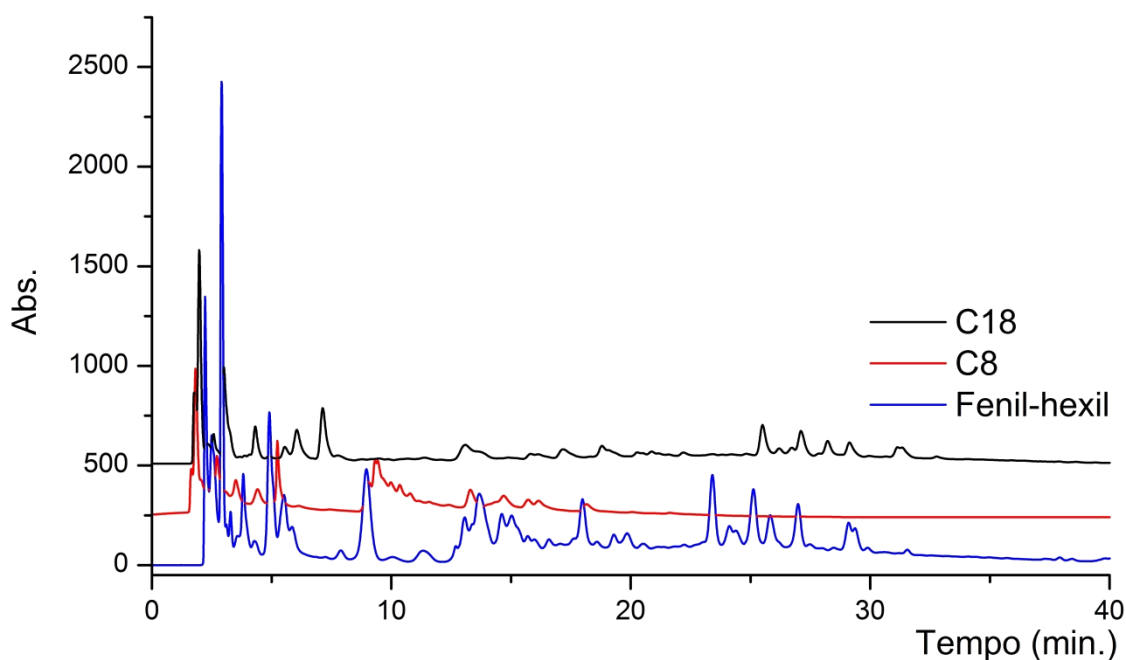


Figura 4. 4 Cromatogramas obtidos de *B. forficata* (**P01**) utilizando-se o método gradiente após otimização dos parâmetros nas diferentes fases estacionárias avaliadas. Injeção de 40 μ L de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254$ nm a uma vazão de 0,75mL/min.

Tabela 4. 5 Métodos de eluição gradiente otimizados para as fases estacionárias avaliadas.

		Fases Estacionárias					
		Luna [®] C ₁₈		Luna [®] C ₈		Luna [®] Fenil-hexil	
Gradientes Otimizados	Tempo (min.)	Conc. B (%)	Tempo (min.)	Conc. B (%)	Tempo (min.)	Conc. B (%)	
	0	5	0	5	0	4	
	10	12	5	5	7,5	4	
	30	55	6	30	8,5	21	
	35	70	16	50	35,5	75	
	40	70	21	60	45,5	75	
	45	5	31	60	50,5	4	
	60	5	36	5	65,5	4	
	-	-	51	5	-	-	

Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL, $\lambda = 254\text{nm}$; vazão de 0,75mL/min.

Observando-se os cromatogramas apresentados na **Figura 4.4**, após a otimização dos métodos de eluição gradiente, pode-se visualizar uma melhor resolução e melhor distribuição das bandas utilizando-se as três fases estacionárias relacionadas. Este fato permite a obtenção de *fingerprints* mais ricos de informação que, posteriormente, conferirão maior confiabilidade aos modelos de classificação quimiométricos.

Ainda na tentativa da obtenção de um *fingerprint* que apresentasse o maior número de bandas cromatográficas possível, aplicou-se as condições otimizadas de eluição da coluna de fase estacionária Luna[®] Fenil-hexil para as colunas de fases estacionárias Fenil Nucleosil[®] e Fenil-fenil da Restek[®]. Assim, usando as mesmas condições de injeção do extrato de *B. forficata* (**P01**) feitos anteriormente, foram obtidos os perfis cromatográficos ilustrados na **Figura 4.5**.

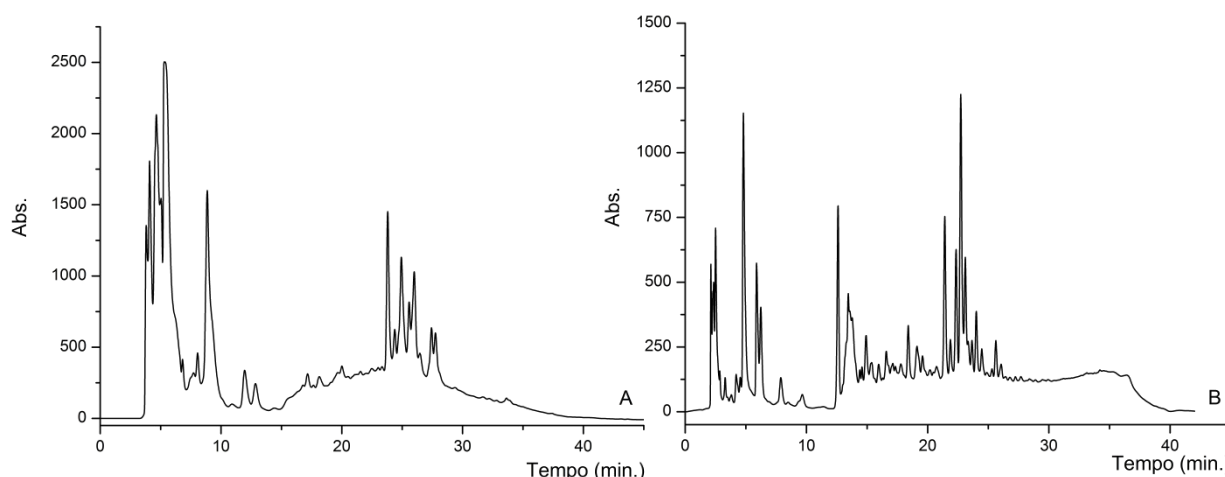


Figura 4. 5 Cromatogramas obtidos de extratos de amostras de *B. forficata* (P01) com eluição gradiente descrita na Tabela 4.5 para a coluna de fase estacionária Luna® Fenil-hexil em colunas (A) fenil nucleosil® e (B) fenil-fenil® da Restek®. Injeção de 40µL de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254\text{nm}$ a uma vazão de 0,75mL/min.

Com a finalidade de otimizar as condições cromatográficas obtidas para as colunas Fenil Nucleosil® e Fenil-fenil®, foram feitas alterações no percentual do modificador orgânico em função do tempo, tempo de análise e vazão da fase móvel. Porém, não foi possível observar melhoras nos perfis cromatográficos.

A comparação dos diferentes cromatogramas obtidos nas diferentes fases estacionárias avaliadas, após as respectivas otimizações, mostra que as colunas Fenil-fenil® e Luna® Fenil-hexil foram as que propiciaram perfis cromatográficos com o maior número de bandas e maior resolução para a amostra *B. forficata* (P01) analisada.

Assim, foi proposto a obtenção de dois conjuntos de dados distintos: um deles adquiridos com a coluna de fase estacionária Luna® Fenil-hexil e o segundo utilizando a coluna comercial da Restek® de fase Fenil-fenil. O objetivo final seria o desenvolvimento e a comparação dos resultados obtidos a partir de dois modelos quimiométricos distintos oriundos dos mesmos extratos, porém utilizando-se diferentes fases estacionárias. Com isto, a comparação da influência das fases estacionárias na discriminação e classificação dos modelos quimiométricos propostos neste trabalho poderia ser feita.

Porém, após cerca de 50 injeções dos extratos na coluna Fenil-fenil Restek®, foi notado perda de resolução. É importante ressaltar que, a cada 10 injeções, a coluna era limpa a uma vazão de 1mL/min. inicialmente com 95% de água, para remoção do tampão, por 20 minutos, e posteriormente, com uma mistura de

MeOH:H₂O, na proporção de 1:1 (v/v) por 30 minutos e, finalmente, com 100% de MeOH, por 20 minutos. Após este procedimento, a coluna era reequilibrada com H₂O:MeOH na proporção 95:5 (v/v) para a retomada das análises. A **Figura 4.6** mostra os cromatogramas obtidos para uma amostra do extrato de *B. forficata* (**P01**), A) com a coluna nova e B) após perda de seletividade.

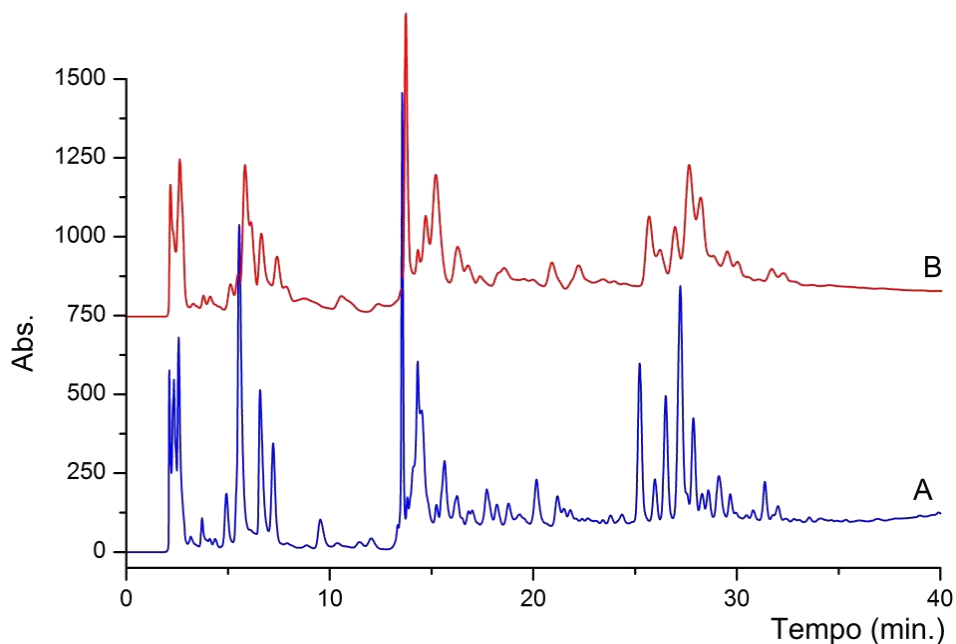


Figura 4. 6 Cromatogramas obtidos de mesmo extrato de amostras de *B. forficata* (**P01**) em (A) com a coluna fenil-fenil[®] nova e (B) após a perda de seletividade da mesma. Injeção de 40 μ L de amostra de concentração 30mg/mL, λ = 254nm a uma vazão de 0,75mL/min.

Levando-se em consideração a perda de seletividade observada com a coluna comercial Fenil-fenil Restek[®], o método de limpeza foi também aplicado para a coluna Luna[®] Fenil-hexil, preparada no laboratório. Porém, para evitar perda de seletividade, o intervalo do procedimento de limpeza foi reduzido de 10 para 5 injeções.

Com isso, convencionou-se que todos os dados cromatográficos seriam obtidos utilizando-se a coluna cromatográfica preparada com fase estacionária Luna[®] Fenil-hexil.

4.5. Aquisição dos *fingerprints* dos extratos das diferentes espécies de *Bauhinia*

4.5.1. Amostras coletadas no Centro Pluridisciplinar de Química, Biologia e Agronomia da Unicamp (CPQBA - Unicamp).

Após os procedimentos de coleta, herborização e processamento do material vegetal para posterior análise cromatográfica, foram calculados os rendimentos das extrações, tomando-se inicialmente 3g de matéria vegetal processadas, assim como os coeficientes de variação do processo de extração. Os valores obtidos se encontram na **Tabela 4.6**.

Tabela 4. 6 Valores de rendimento de extração e coeficiente de variação das amostras vegetais de *B. forficata* (P01 e P02).

Coletas	Amostras	Extratos (mg) (média, n = 5)	Rendimento (%) (média, n = 5)	Coef. de Variação(%)
Out/2008	P01	0,566	18,9	9,40
	P02	0,647	21,6	6,43
Jan/2009	P01	0,432	17,0	3,25
	P02	0,388	12,9	5,15
Abr/2009	P01	0,434	14,5	2,45
	P02	0,436	14,5	1,85
Jul/2009	P01	0,529	17,6	14,2
	P02	0,416	13,9	3,90

O gráfico apresentado na **Figura 4.7** representa os dados de rendimentos fornecidos na **Tabela 4.6**. Isto foi feito com o intuito de facilitar a visualização da relação entre o rendimento dos extratos e a época do ano em que a matéria vegetal foi coletada. Os dados apontam que as épocas do ano em que estas duas árvores produzem maior quantidade de substâncias é no inverno e início do verão (entre Junho e Outubro).

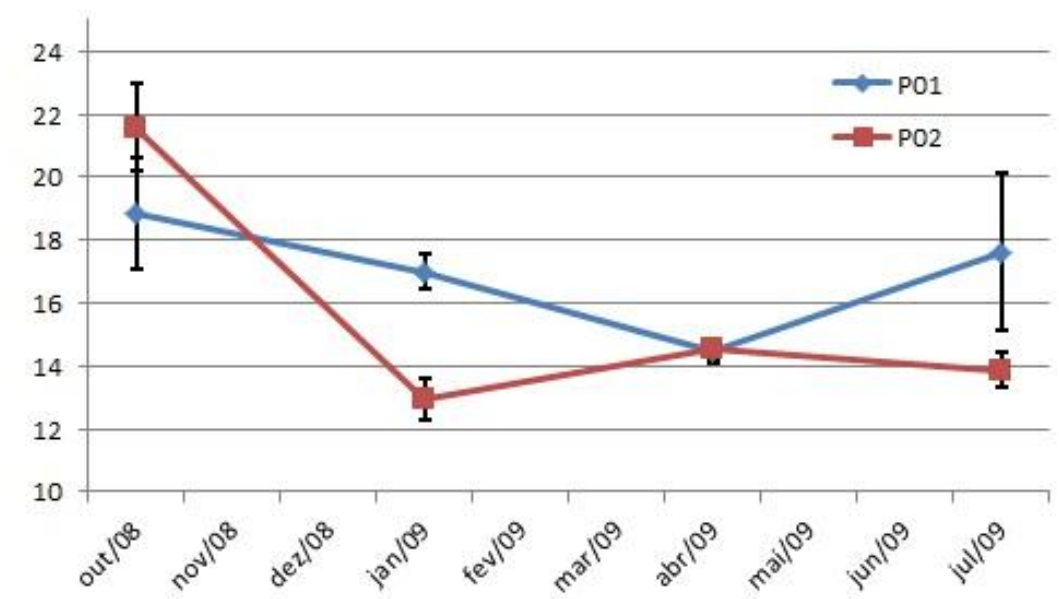


Figura 4. 7 Gráfico que relaciona valores de rendimento de extração com a data de coleta da matéria vegetal que deu origem aos extratos duas árvores de *B. forficata* (**P01** e **P02**) do CPQBA da Unicamp.

A **Figura 4.8** ilustra os perfis cromatográficos obtidos em quintuplicata para as amostras dos extratos aquosos de *B. forficata* – Cultivares **P01** e **P02** – de coletas feitas em diferentes épocas do ano. É possível, após inspeção visual, observar variações nos diferentes cromatogramas, de acordo com a época da coleta.

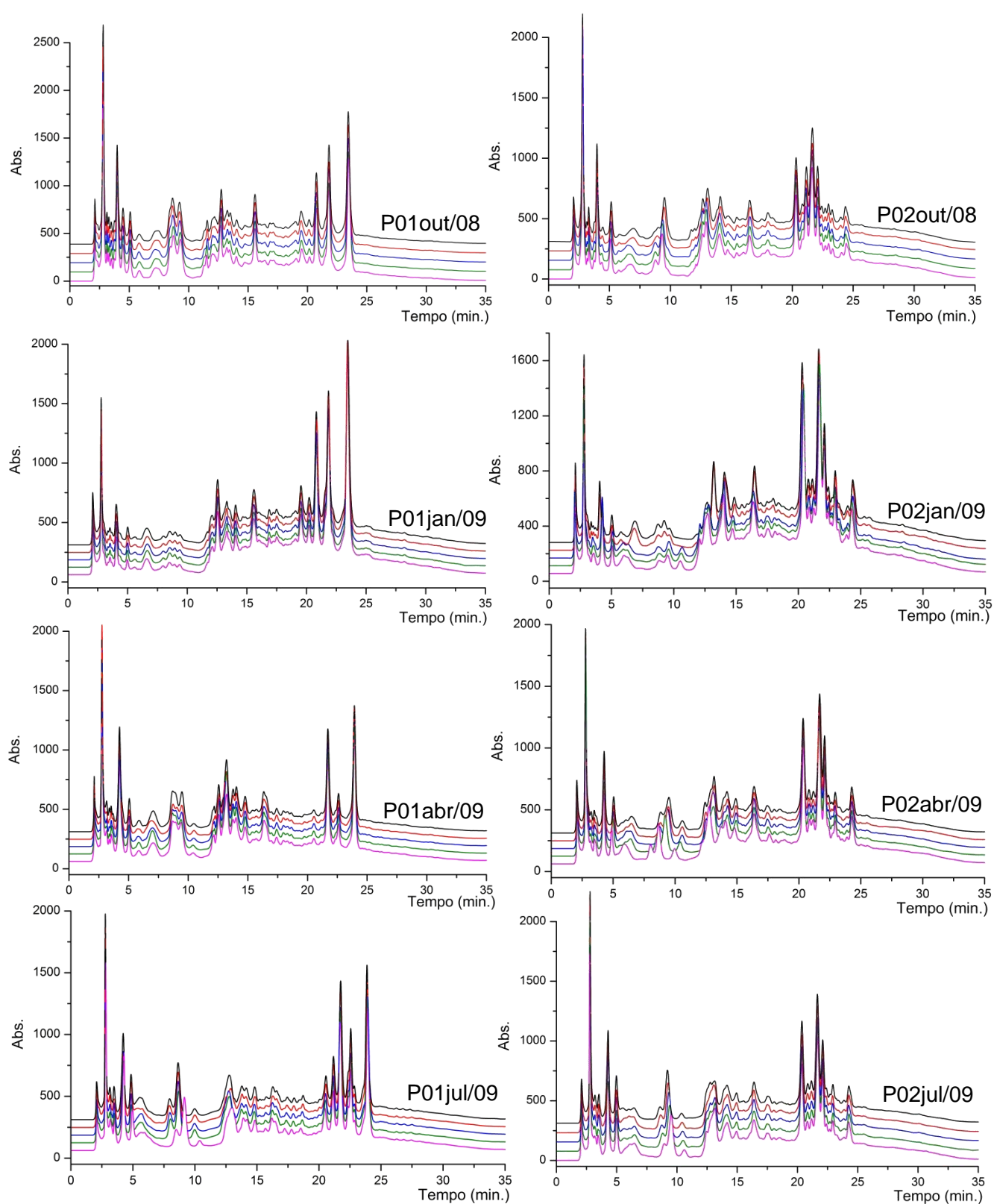


Figura 4. 8 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. forficata* – Árvores P01 e P02 de coletas obtidas em diferentes épocas do ano. Injeção de 40 μ L de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254$ nm a uma vazão de 0,75mL/min.

4.5.2. Amostras coletadas na UFSCar no Campus de São Carlos.

Em São Carlos, distribuídas pelo campus da UFSCar, três árvores de *B. variegata* tiveram seus materiais vegetais coletados em Novembro de 2008. Os procedimentos de coleta e análise foram utilizados assim como descrito nos itens 3.2, 3.4 e 3.5. Os rendimentos das extrações assim como os coeficientes de variação se encontram descritos na **Tabela 4.7**.

Tabela 4. 7 Valores de rendimento e variância no procedimento de extração das amostras vegetais de *B. variegata* (**P03, P04 e P05**).

Amostra	Extrato (g) (média, n = 5)	Rendimento (%) (média, n = 5)	Coef. de Variação(%)
P03	0,279	9,29	26,1
P04	0,485	16,1	7,01
P05	0,084	2,78	15,3

A **Figura 4.9** ilustra os cromatogramas que foram adquiridos em quintuplicata para as amostras das três árvores (**P03, P04 e P05**). As condições cromatográficas são as descritas no item 3.5.

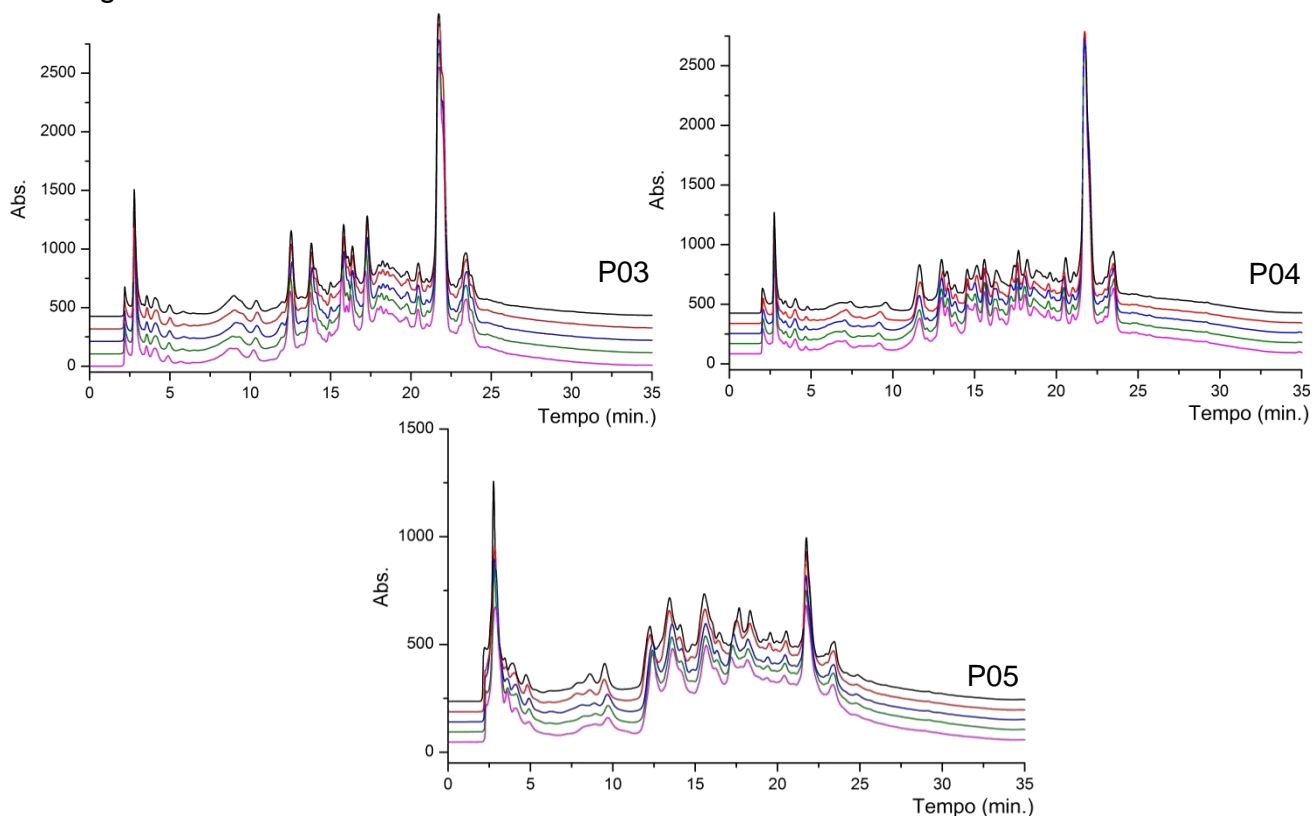


Figura 4. 9 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. variegata* - Cultivares **P03, P04 e P05** de coletadas no Campus da UFSCar em Novembro de 2008. Injeção de 40 μ L de amostra de concentração 30mg/mL. Acompanhou-se $\lambda = 254$ nm a uma vazão de 0,75mL/min.

A inspeção visual mostra diferenças significativas entre os cromatogramas dos cultivares de *B. forficata* (coletadas em Campinas – **Figura 4.8**) com as de *B. variegata* (coletadas em São Carlos – **Figura 4.9**), mesmo quando se comparam cromatogramas de amostras obtidas na mesma época do ano: **P01out08** e **P02out08** (*B. forficata*) com **P03**, **P04** e **P05** (*B. variegata*). Desta maneira pode-se inferir que tais diferenças nos *fingerprints* estão relacionadas principalmente ao fato de se tratarem de espécies diferentes do gênero *Bauhinia*, porém, não somente a isto. Como já anteriormente discutido, outros fatores externos, não ligados a diferenças genéticas, tais como clima, solo, quantidade de luz, disponibilidade hídrica, contaminação por micro-organismos dentre outros, podem ser responsáveis por modificarem drasticamente o perfil cromatográfico do extrato vegetal, justificando a diferença dos perfis de **P05**, **P03** e **P04**.

4.5.3. Amostras coletadas na cidade de Jaguariúna.

Na cidade de Jaguariúna, em Maio de 2009, foram coletados seis cultivares de *Bauhinias*. Todas as exsicatas foram identificadas como *B. variegata*, com exceção de uma que, segundo a Dra. Angela Studart Vaz, não apresentava material vegetal suficiente para a identificação. Este cultivar foi, portanto, descartado. Os rendimentos das extrações assim como os coeficientes de variação se encontram descritos na **Tabela 4.8**.

Tabela 4. 8 Valores de rendimento e variação no procedimento de extração das amostras vegetais de *B. variegata* (**P06 a P10**).

Amostra	Extrato (g) (média, n = 5)	Rendimento (%) (média, n = 5)	Coef. de Variação(%)
P06	0,493	16,4	7,01
P07	0,358	11,9	6,64
P08	0,361	12,0	24,2
P09	0,311	10,3	3,14
P10	0,380	12,7	11,1

A **Figura 4.10** ilustra os cromatogramas obtidos das amostras das cultivares coletadas em Jaguariúna. As condições cromatográficas estão descritas no item 3.5.

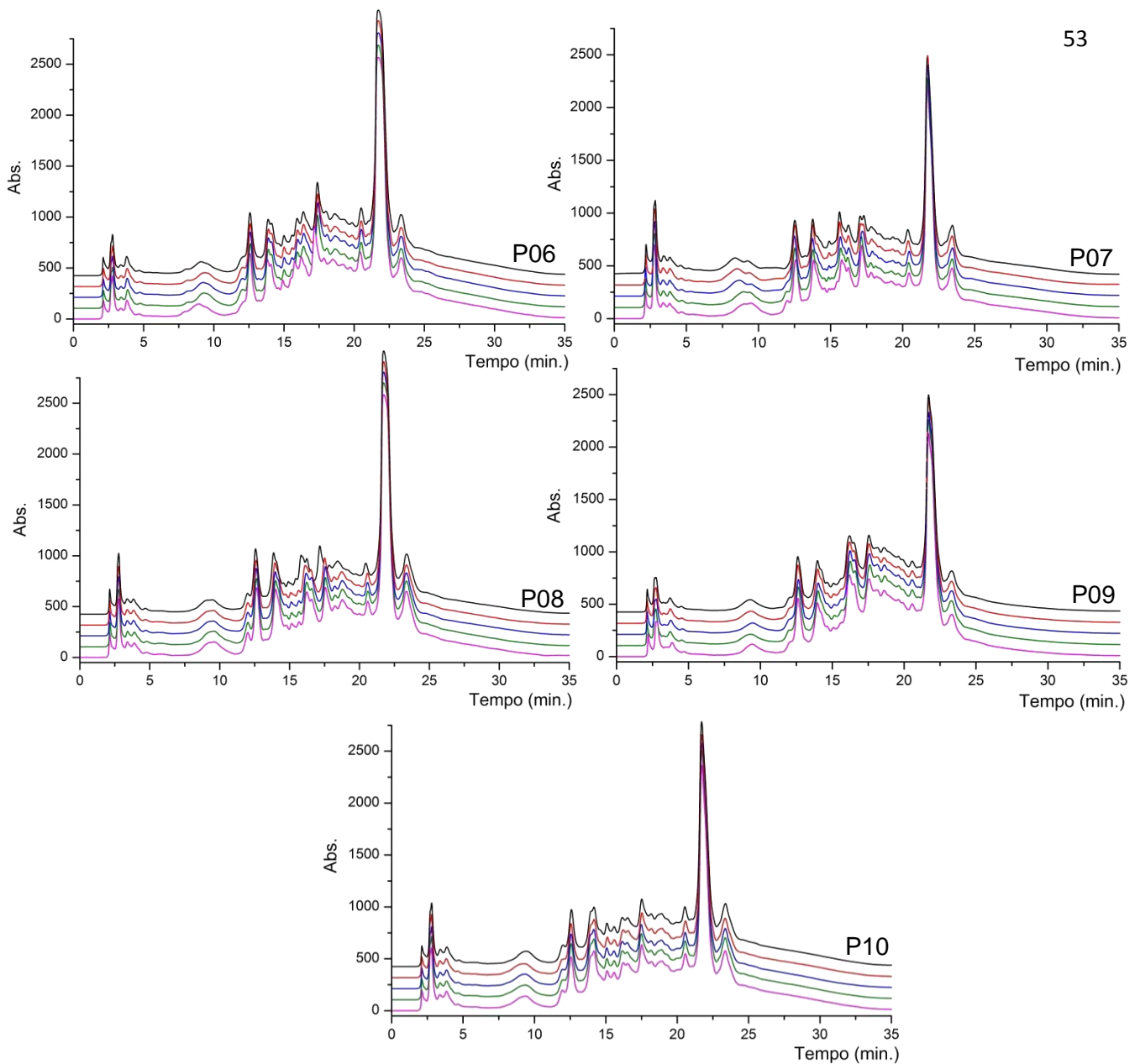


Figura 4. 10 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. variegata* - Cultivares **P06** a **P10** de coletas realizadas na cidade de Jaguariúna em Maio de 2009. Injeção de 40 μ L de amostra de concentração 30mg/mL, λ = 254nm a uma vazão de 0,75mL/min.

Segundo a identificação botânica realizada, os cromatogramas das **Figuras 4.9 e 4.10**, foram obtidos de amostras vegetais da mesma espécie, *B. variegata*. Com isso, quando visualmente comparados os perfis cromatográficos desses cultivares, é possível perceber similaridade entre eles. Porém, quando se comparam estes com os *fingerprints* obtidos dos cultivares de *B. forficata* (**P01** e **P02**) tal semelhança não é visualizada.

Esta análise qualitativa visual é passível de ser feita, porém para a classificação de amostras desconhecidas ou para o controle de qualidade de matéria vegetal, é preciso parcimônia. Recomenda-se a utilização de um modelo quimi-

ométrico que é capaz de conferir mais precisão e confiabilidade neste tipo de comparação.

4.5.4. Amostra coletada na cidade de Jarinú.

Na cidade de Jarinú foi coletada, em Janeiro de 2009, uma amostra vegetal da espécie *B. longifolia*. Após identificação da exsicata, iniciou-se o processo de procura por outras cultivares desta mesma espécie (*B. longifolia*) com o objetivo de não comprometer o método quimiométrico a ser desenvolvido devido a grandes desigualdades na quantidade das amostras de diferentes espécies. Cultivares desta mesma espécie foram posteriormente localizadas no Instituto Agrônomo de Campinas.

Para esta cultivar, os valores de rendimento e coeficiente de variação foram calculados e apresentaram-se com valores de 9,91% e 41,9%, respectivamente. Este último, bastante elevado se comparado aos demais valores já colocados para estes coeficientes, demonstra a variação obtida nos rendimentos (massas obtidas dos extratos) após o procedimento de extração. Apesar do valor elevado, analisando-se visualmente os cromatogramas adquiridos dos extratos (**Figura 4.11**) não foi possível observar diferenças significativas capazes de influenciarem os modelos quimiométricos a serem desenvolvidos.

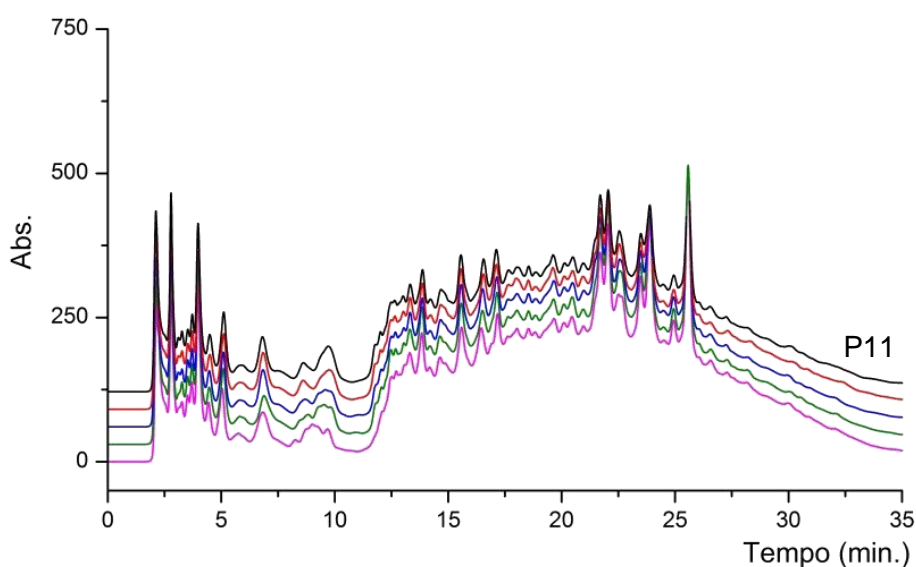


Figura 4. 11 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. longifolia* - Cultivar **P11** da coleta realizada em Janeiro de 2009 em Jarinú. Injeção de 40 μ L de amostra de concentração 30mg/mL, λ = 254nm a uma vazão de 0,75mL/min.

O perfil cromatográfico dos extratos obtidos da matéria vegetal coletada em Jarinú é claramente diferente dos demais apresentados. Tais diferenças são devidas às respectivas composições de metabólitos secundários por eles apresentados e, principalmente relacionadas ao fato de pertencerem a diferentes espécies de *Bauhinia*.

4.5.5. Amostras coletadas no Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Em Maio de 2010 foram coletadas quatorze amostras vegetais de *Bauhinias* de cultivares distintos (**P12 a P25**) localizados dentro da Fazenda Santa Elisa do IAC, em Campinas. Esta última coleta foi realizada com a intenção de primeiramente aumentar a quantidade de cultivares aos quais forneceriam amostras vegetais para o desenvolvimento do modelo quimiométrico e igualar, ou ao menos equiparar, a quantidade de cultivares das diferentes espécies de *Bauhinias*. Os rendimentos das extrações bem como os coeficientes de variação obtidos para extração das amostras destes cultivares estão descritos na **Tabela 4.9**.

Tabela 4. 9 Valores de rendimento e variação no procedimento de extração das amostras vegetais de *Bauhinias* (**P11 a P25**).

Amostra	Extrato (mg) (média, n = 5)	Rendimento (%) (média, n = 5)	Coef. de Variação(%)
P12	0,364	12,1	10,8
P13	0,512	17,0	5,65
P14	0,277	9,22	3,36
P15	0,280	9,34	6,65
P16	0,255	8,48	8,12
P17	0,336	11,2	8,53
P18	0,379	12,6	23,2
P19	0,540	18,0	4,54
P20	0,480	16,0	19,5
P21	0,486	16,2	6,69
P22	0,476	15,8	18,3
P23	0,349	11,6	8,93
P24	0,220	11,0	44,6
P25	0,281	14,0	15,3

Os *fingerprints* adquiridos das amostras vegetais em questão estão apresentados nas **Figuras 4.12 e 4.13**, divididas por espécie: *B. forficata* e *B longifolia*, respectivamente.

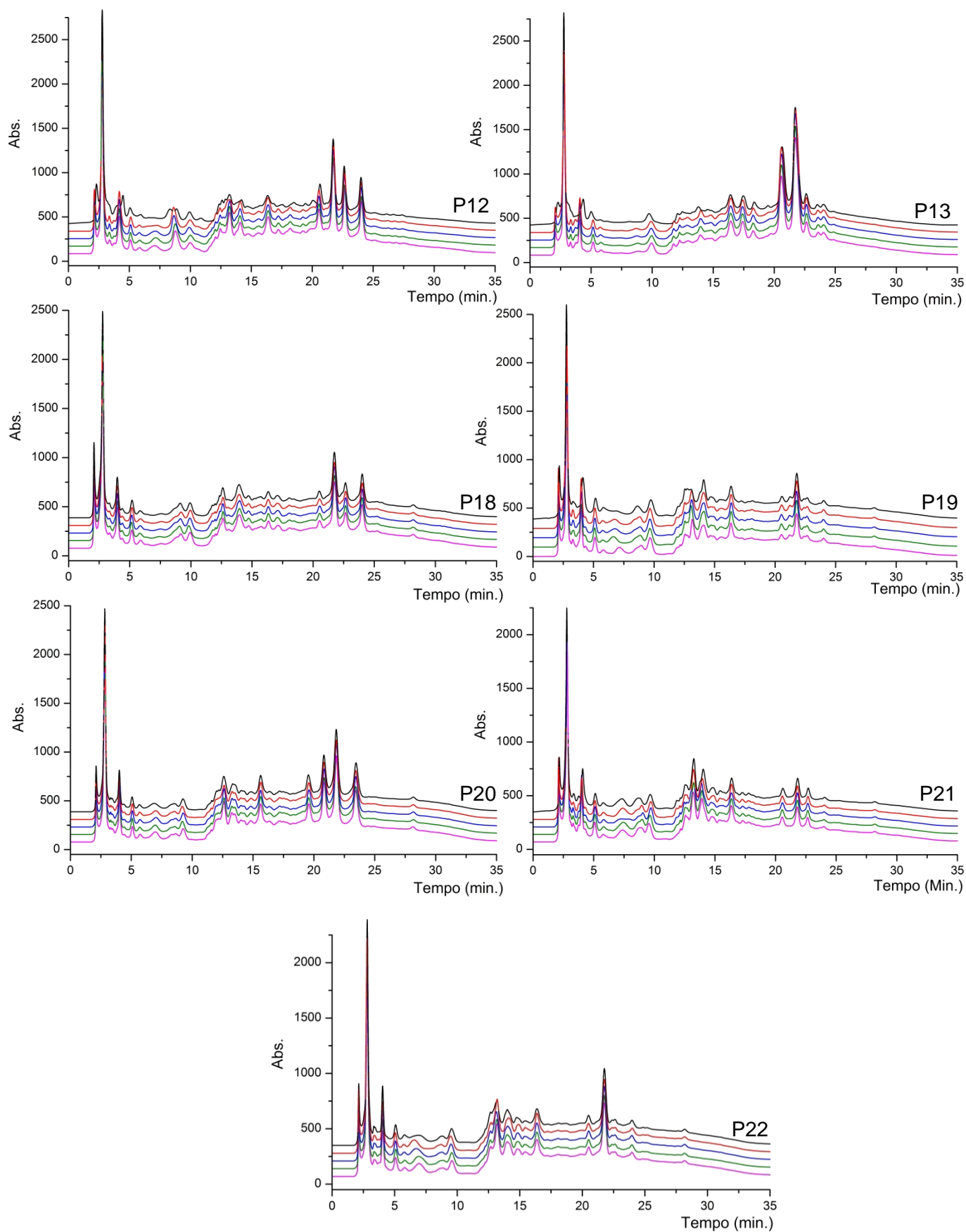


Figura 4. 12 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. forficata* - Cultivares **P12**, **P13**, **P18** a **P21** e **P22** de coletas realizadas em diferentes pontos da Fazenda Santa Elisa em Maio de 2010. Injeção de 40 μ L de amostra de concentração 30mg/mL, λ = 254nm a uma vazão de 0,75mL/min.

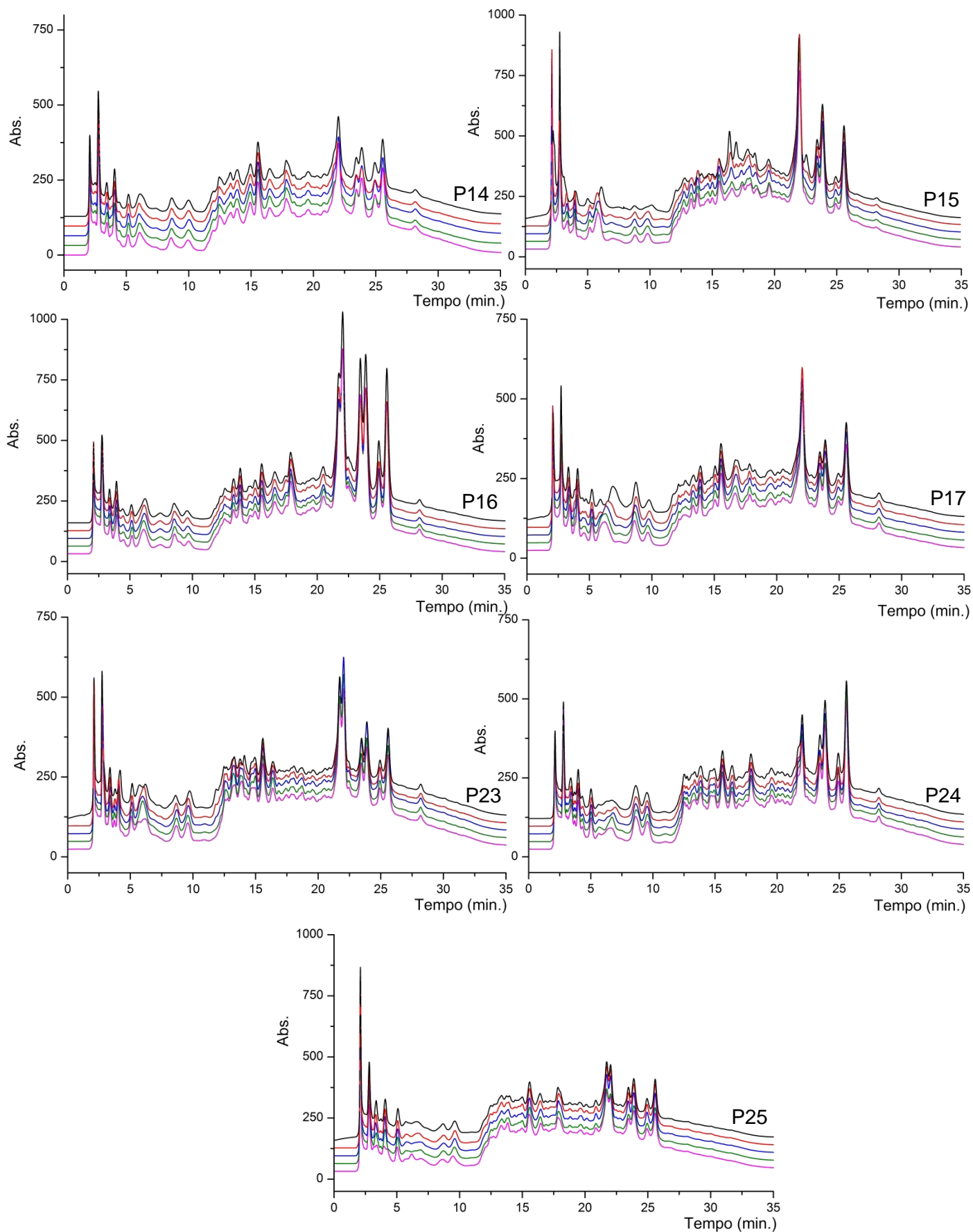


Figura 4. 13 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. longifolia* - Cultivares **P14** a **P17** e **P23** a **P25** de coletas realizadas em diferentes pontos da Fazenda Santa Elisa em Maio de 2010. Injeção de 40 μ L de amostra de concentração 30mg/mL, λ = 254nm a uma vazão de 0,75mL/min.

4.5.6. Amostras fornecidas pela empresa Centroflora de Botucatu - SP

Foram fornecidas duas amostras de cultivares distintos de *B. forficata* pela empresa Centroflora de Botucatu - SP para completar e aumentar a quantidade de cultivares desta espécie. Tais amostras foram identificadas pela Dra. Inês Cordeiro, pesquisadora do herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, porém os números de depósito em herbário das referidas amostras não foram fornecidos. Os rendimentos calculados para as extrações bem como os coeficientes de variação para estes cultivares estão apresentados na **Tabela 4.10**. Para visualização, os cromatogramas adquiridos estão colocados na **Figura 4.14** e tiveram o método analítico descrito em 3.5 para sua obtenção.

Tabela 4. 10 Valores de rendimento e variância no procedimento de extração das amostras vegetais de *B. forficata* (P26 e P27).

Amostra	Extrato (mg) (média, n = 5)	Rendimento (%) (média, n = 5)	Coef. de Variação(%)
P26	0,353	11,8	5,01
P27	0,292	13,0	36,5

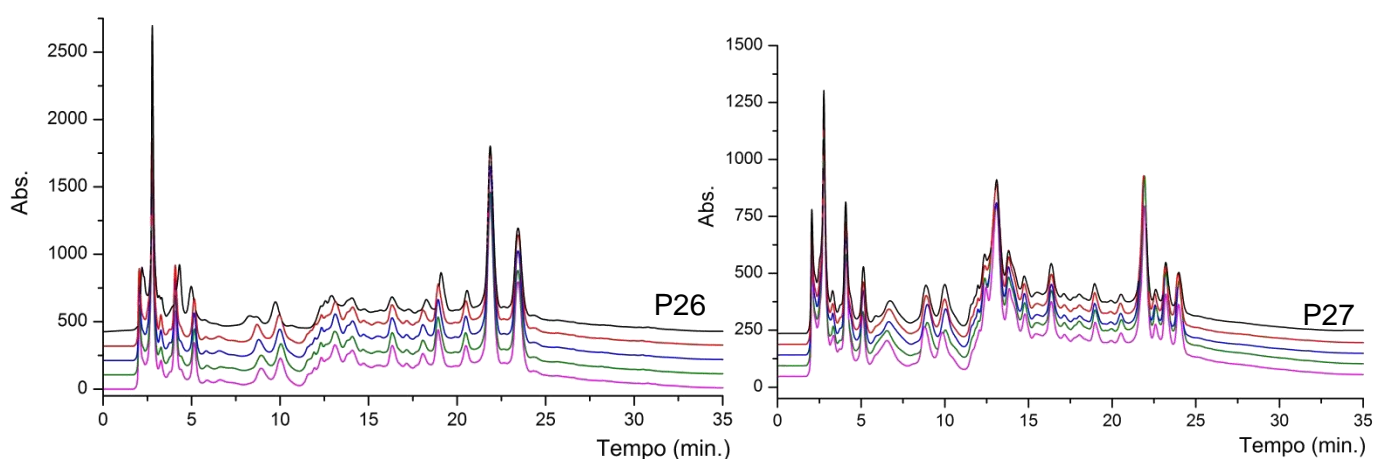


Figura 4. 14 Cromatogramas em quintuplicata obtidos dos extratos aquosos de amostras de *B. forficata* - Cultivares P26 e P27 fornecidas pela empresa Centroflora em Abril de 2010. Injeção de 40 μ L de amostra de concentração 30mg/mL. λ = 254nm a uma vazão de 0,75mL/min.

Comparando-se visualmente os cromatogramas adquiridos dos cultivares **P26** e **P27** fornecidas pelo grupo Centroflora, pode-se observar que mesmo sendo cultivares de mesma espécie segundo identificação botânica, seus extratos apresentam perfis cromatográficos diferentes entre si. Este fato contribui e é importante para o desenvolvimento dos modelos quimiométricos, pois, utilizando-se de dados que apresentam grande variabilidade pertencendo a mesma espécie, fazem os modelos adquirirem maior robustez.

4.5.7. Obtenção do perfil cromatográfico das amostras comerciais.

Assim como as matérias vegetais usadas como padrão para os modelos quimiométricos, aquelas que foram adquiridas comercialmente, em forma de folhas também passaram pelos mesmos procedimentos de trituração e extração, previamente descritos no item 3.2. Isto foi feito com o intuito de padronizar todas as etapas que poderiam influir no perfil cromatográfico a ser adquirido e, consequentemente, minimizar os erros na aplicação dos modelos quimiométricos.

Os rendimentos das extrações assim como os coeficientes de variação para este processo também foram calculados e estão descritos na **Tabela 4.11**.

Tabela 4. 11 Valores de rendimento e variação no procedimento de extração das amostras comerciais de “pata-de-vaca”.

Amostra	Extrato (mg) (média, n = 2)	Rendimento (%) (média, n = 2)	Coef. de Variação(%)
AC01	0,188	6,27	29,3
AC02	0,232	7,74	14,0
AC03	0,303	10,1	4,43
AC04	0,237	11,6	7,92
AC05	0,366	12,2	12,5
AC06	0,290	9,65	30,2
AC07	0,221	7,37	4,48
AC08	0,228	7,62	3,40
AC09	0,483	16,1	2,78
AC10	0,176	5,89	3,60
AC11	0,220	7,35	0,96
AC12	0,278	9,28	2,28
AC13	0,184	6,14	1,15
AC14	0,221	7,36	0,00
AC15	0,429	14,3	2,47

A **Figura 4.15** ilustra os cromatogramas adquiridos para as amostras comerciais utilizando-se o procedimento cromatográfico desenvolvido para as amostras padrão apresentado no item 3.5. Embora a inspeção visual permita que sejam reconhecidas diferenças e semelhanças entre os diferentes perfis cromatográficos, destas amostras comerciais quando comparados com os das amostras padrão, as ferramentas quimiométricas facilitam e formalizam a classificação de amostras desconhecidas.

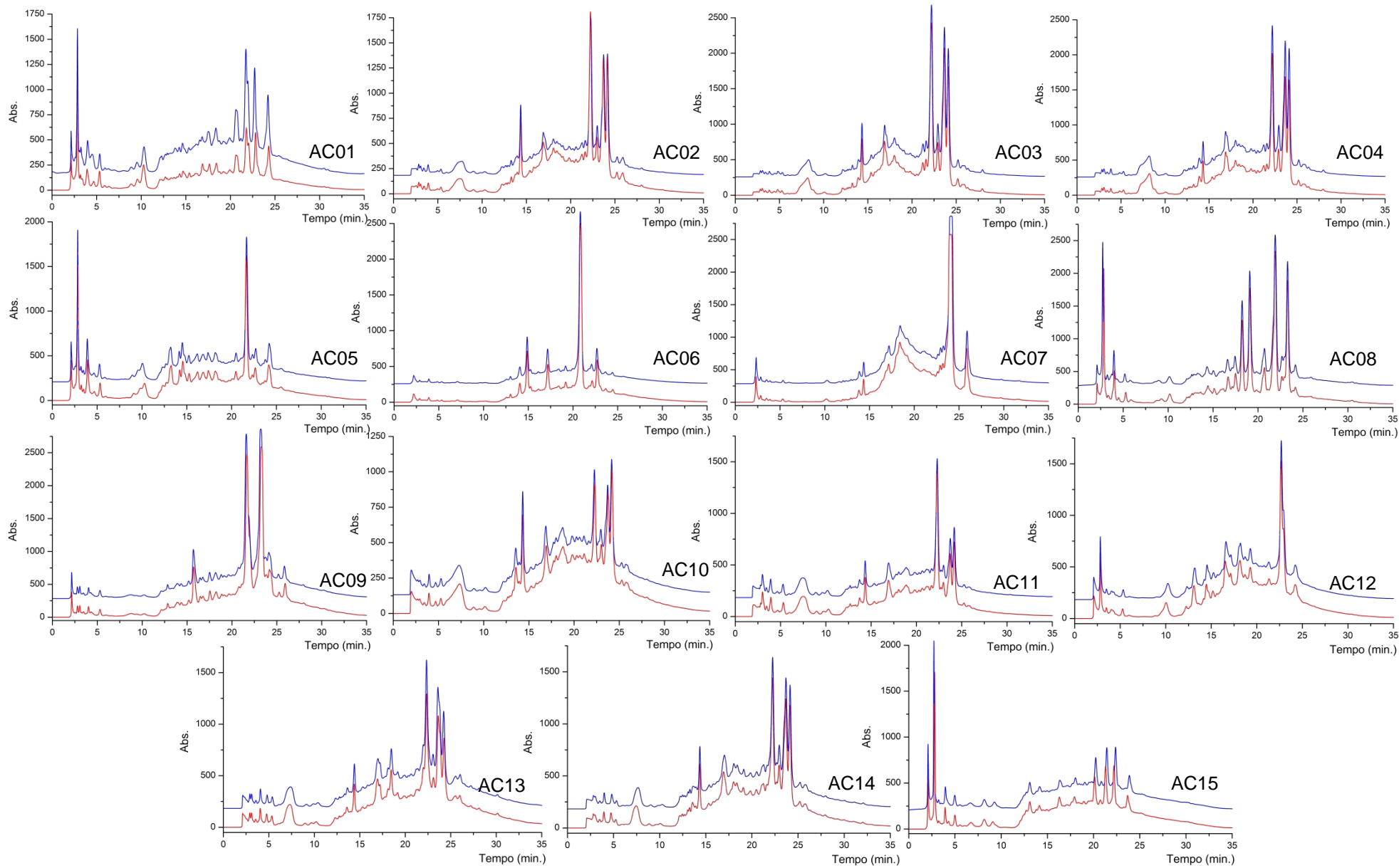


Figura 4. 15 Cromatogramas adquiridos em duplicata dos extratos das amostras comerciais (AC01 a AC15).

4.6. Análises quimiométricas

4.6.1. Organização e pré-tratamento dos dados

Para que as análises quimiométricas sejam realizadas é preciso inicialmente que haja uma organização e um pré-tratamento dos dados. Com isto, submetem-se estes ao programa que executará os cálculos matemáticos e estatísticos. Assim, como citado no item 4.6 os cromatogramas foram organizados em uma planilha do Microsoft Excel®, matriz **X**, compostas por 4.221 linhas e 200 colunas. Nestas colunas constam:

- ✓ 45 cromatogramas obtidos dos extratos das matérias vegetais que foram coletadas em diferentes épocas dos cultivares do CPQBA da Unicamp – Amostras **P01** e **P02** (10 replicatas de extração da matéria vegetal do cultivar **P01** em Out/08, 5 replicatas para coleta realizada do cultivar **P02** em Out/08 e 5 replicatas de cada um dos cultivares – **P01** e **P02** – realizada nos demais meses – Jan/09, Abr/09 e Jul/09).
- ✓ 15 cromatogramas obtidos dos extratos das matérias vegetais coletadas dos cultivares de São Carlos – Amostras **P03** a **P05** (5 replicatas para cada cultivar).
- ✓ 25 cromatogramas obtidos dos extratos das matérias vegetais coletadas dos cultivares de Jaguariúna – Amostras **P06** a **P10** (5 replicatas para cada cultivar).
- ✓ 5 cromatogramas obtidos dos extratos da matéria vegetal coletada do cultivar de Jarinú – Amostra **P11**.
- ✓ 70 cromatogramas obtidos dos extratos das matérias vegetais coletadas dos cultivares do IAC – Amostras **P12** a **P25**.
- ✓ 10 cromatogramas obtidos dos extratos das matérias vegetais fornecidas pelo grupo Centroflora – Amostras **P26** e **P27**.
- ✓ 30 cromatogramas obtidos dos extratos das matérias vegetais adquiridas comercialmente como “pata-de-vaca” – Amostas **AC01** a **AC15** (2 replicatas por amostra)

O pré-tratamento que foi utilizado foi o **COW** desenvolvido por Skov et al^[133]. Trata-se de um algoritmo matemático que se utiliza de cromatogramas de referência de cada grupo das espécies e calcula a elasticidade de todos os demais sem que estes percam a sua identidade principal, preservando a área e altura da banda cromatográfica. Para o desenvolvimento deste modelo quimiométrico foram selecionados, utilizando-se o software Matlab[®], 13 cromatogramas que servirão de referência para o alinhamento do conjunto de dados. Estes cromatogramas, ilustrados na **Figura 4.17**, foram selecionados, pois de acordo com o software, apresentavam um elevado índice de similaridade com relação ao conjunto total de dados.

No procedimento de alinhamento dos dados é preciso otimizar os parâmetros que influenciarão diretamente na qualidade do resultado e que também têm a capacidade de deslocar as bandas cromatográficas, por isso, atenção e cautela neste procedimento são importantes. Estes parâmetros são o *segment length* (*m*) e o *slack size* (*t*) que foram otimizados até se obter valores de 373 e 281, respectivamente. Chegou-se a estes valores otimizando-se intervalos de variação dos mesmos até que estes convergissem ao valor determinado.

A utilização desta ferramenta é fundamental para reduzir possíveis erros nos modelos quimiométricos em desenvolvimento que podem surgir devido a pequenas diferenças nos tempos de retenção das bandas cromatográficas e em relação a diferenças de linha de base. A **figura 4.16** mostra os cromatogramas antes e após a utilização do algoritmo e permite a visualização da diminuição dessas variações, que não estavam ligadas diretamente às características intrínsecas de cada amostra.

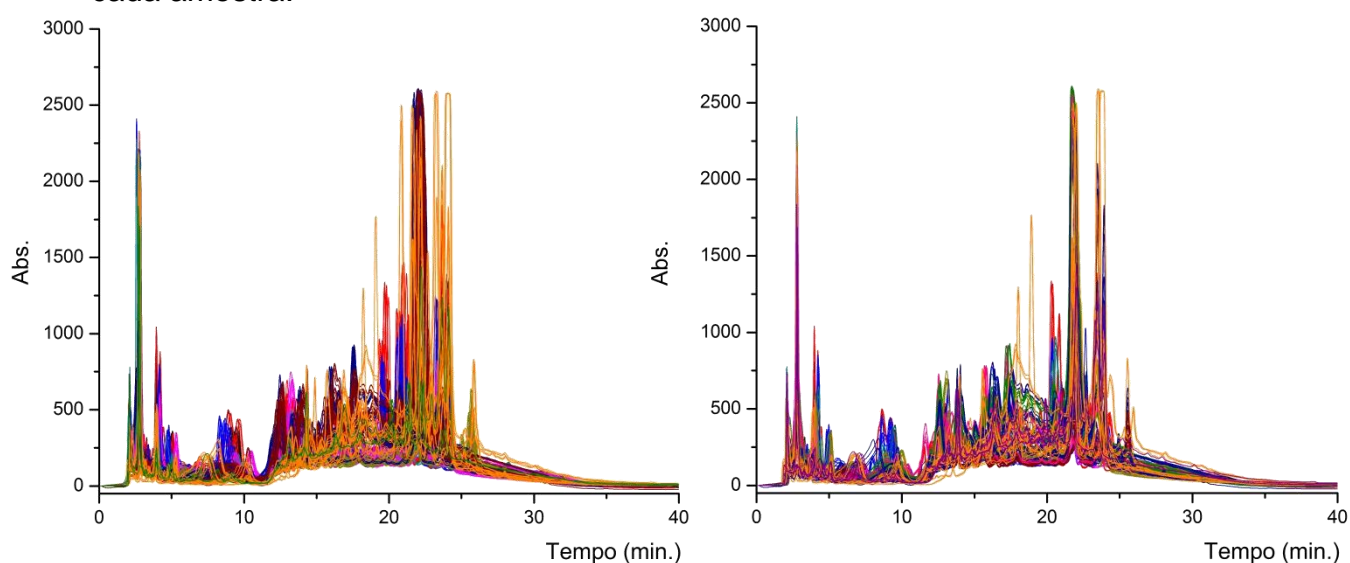
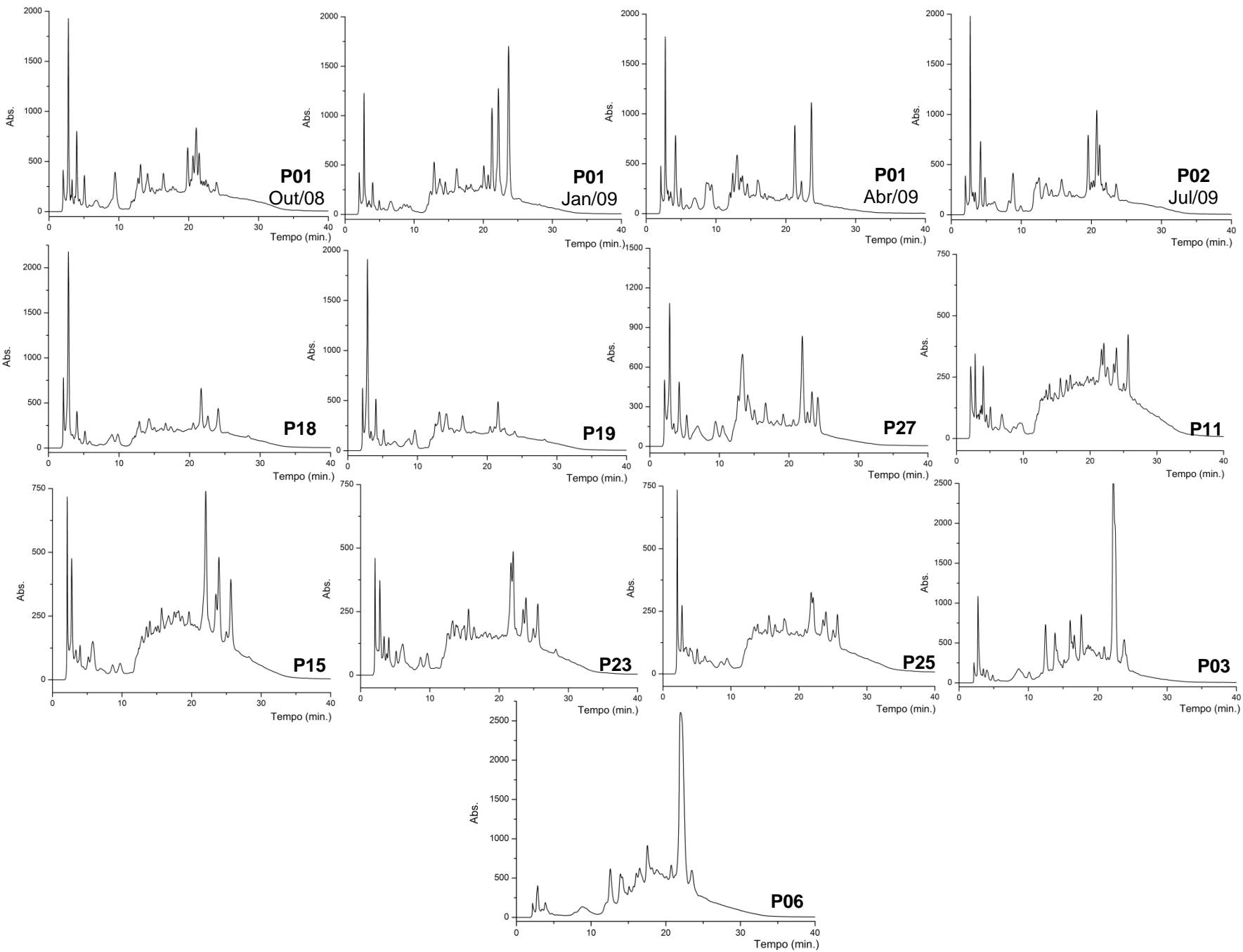


Figura 4. 16 Cromatogramas antes (à esquerda) e após (à direita) o uso do procedimento de alinhamento.

Figura 4. 17 Cromatogramas selecionados para servirem de referência no procedimento de alinhamento dos dados para desenvolvimento do modelo quimiométrico. *B. forficata* cultivares **P01**, **P02**, **P18**, **P19** e **P27**, *B. longifolia* cultivares **P11**, **P15**, **P23**, **P25** e *B. variegata* cultivares **P03** e **P06**.



Observando-se o conjunto dos cromatogramas antes e após o alinhamento é possível notar que as diferenças anteriormente presentes nos tempos de retenção foram minimizadas e isso influirá de forma positiva nos modelos quimiométricos exploratórios e classificatórios.

4.6.2. Análise exploratória dos dados multivariados: PCA e HCA das amostras padrão.

Com o conjunto de dados alinhados, a primeira ferramenta que foi utilizada foi a **PCA**^[113], disseminada em dados químicos por Wold et al em 1987. Na **PCA**, cada um dos cromatogramas, que constitui um conjunto de dados multivariados, se torna um *spot* (objeto) em um espaço virtual definido por eixos ortogonais que correlacionam a variância total dos dados no plano a qual pertence. Com essa distribuição, é possível a observação da organização não supervisionada dos dados, ou seja, eles se autoorganizam de acordo com suas similaridades e diferenças, possibilitando a formação de agrupamentos desses *spots*.

Antes que se faça a utilização desta ferramenta, é preciso na grande maioria das análises quimiométricas que seja feito algum tipo de pré-processamento de dados. Com o intuito de atribuir a mesma importância a todas as variáveis é utilizado o autoescalamento dos dados. Este pré-tratamento de dados, quando utilizado em cromatografia, faz com que qualquer pequeno detalhe nos cromatogramas tenha a mesma importância no momento das análises quimiométricas, assim como bandas cromatográficas maiores e mais abundantes. Essa propriedade é fundamental, pois tratando-se de amostras de mesmo gênero vegetal, estas pequenas diferenças nos *fingerprints* poderão ser decisivas no desenvolvimento dos modelos quimiométricos de classificação.

Todas as ferramentas utilizadas neste trabalho tiveram como pré-processamento dos dados o autoescalamento. A **Figura 4.18** mostra um gráfico e uma tabela para a seleção de Componentes Principais (PC's). Recomenda-se selecionar um número de fatores a partir do qual a variância explicada apresenta uma diminuição monotônica, ou seja, uma redução não

acentuada nos valores de percentual explicado. Assim, analisando-se o gráfico e os valores da tabela, selecionou-se para a primeira **PCA** calculada um valor de 4 PC's, que corresponde a 66,4% de variância explicada dos dados. Após a 4ª componente principal o aumento no percentual explicado não é significativo e não justifica a adição de mais uma PC para explicar um percentual tão pequeno de variância acumulada.

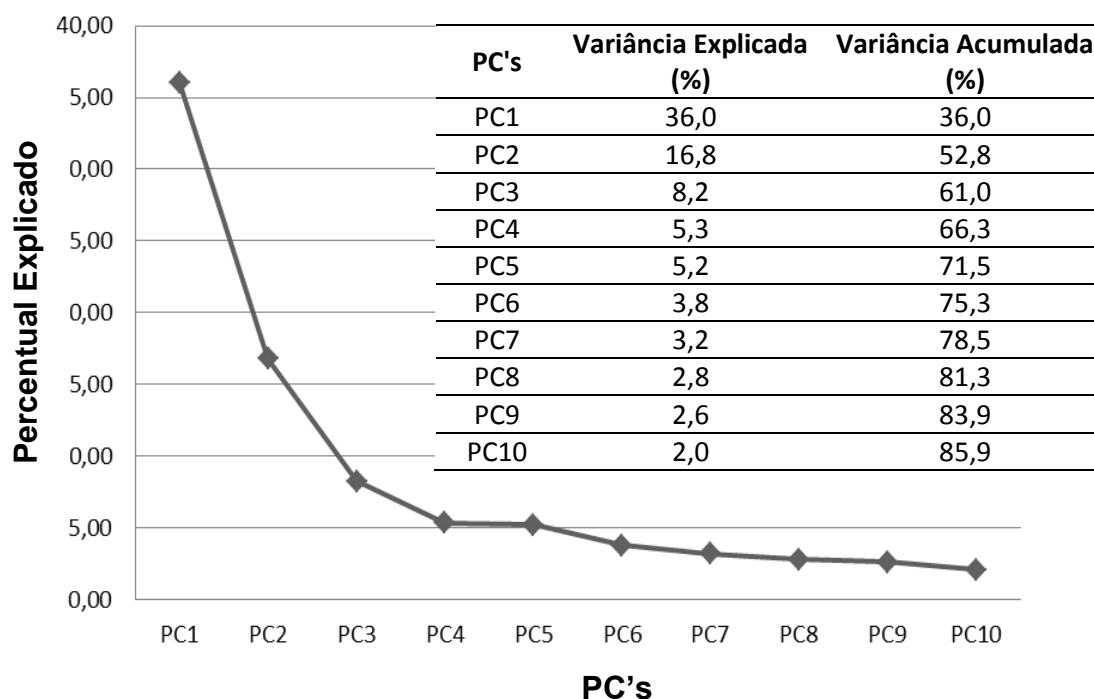


Figura 4. 18 Gráfico e tabela utilizados para a seleção de fatores da **PCA**.

Após a seleção dos fatores pode-se visualizar a distribuição dos dados em um gráfico de *scores*. A **Figura 4.19** demonstra a distribuição das amostras entre os eixos de **PC1 versus PC2**, que de acordo com a tabela da **Figura 4.18**, retém 36,0% e 16,8% dos dados totalizando uma variância acumulada de 52,8%. Este gráfico é conhecido como gráfico de *scores* e através dele pode-se visualizar a distribuição das três diferentes espécies de *Bauhinia* estudadas em três agrupamentos distintos. Este tipo de diferenciação era esperado já que tratava-se de três espécies diferentes, e através de inspeção visual era possível perceber as distinções entre os *fingerprints*. Assim, amostras de uma mesma espécie, devido à maior similaridade entre elas, acabam por se agrupar mais próximas umas das outras do que amostras de espécies diferentes, que apresentam semelhanças, entretanto, menos acentuadas.

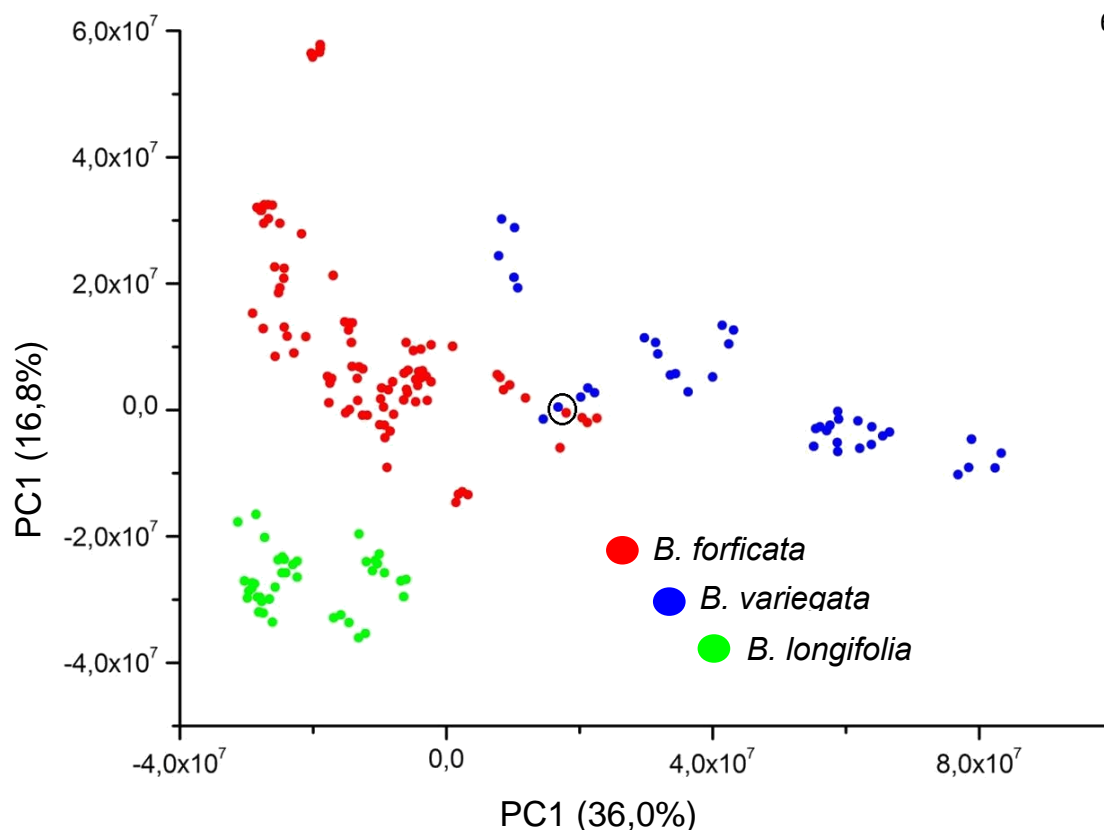


Figura 4. 19 Análise de componentes principais (**PC1xPC2**) – Gráfico de scores - visualização da distribuição e agrupamento dos dados.

É importante lembrar que cada um dos pontos do gráfico são cromatogramas e que os seus agrupamentos ocorrem naturalmente de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos, daí a maneira como se classifica: ferramenta quimiométrica de análise **não-supervisionada**.

Porém, ainda com a auto-organização dos dados, observando-se o ponto central do gráfico de PC's (PC1 = $2,0 \times 10^7$ e PC2 = 0,0 aproximadamente) pode-se observar que dois *spots* referentes aos cromatogramas das espécies *B. forficata* (círculos vermelhos) e *B. variegata* (círculos azuis) se misturam na intersecção dos referidos grupos (identificação por um círculo). Analisando os dois cromatogramas que são apresentados na **Figura 4.20**, referentes aos respectivos *spots*, é possível analisar a semelhança entre eles.

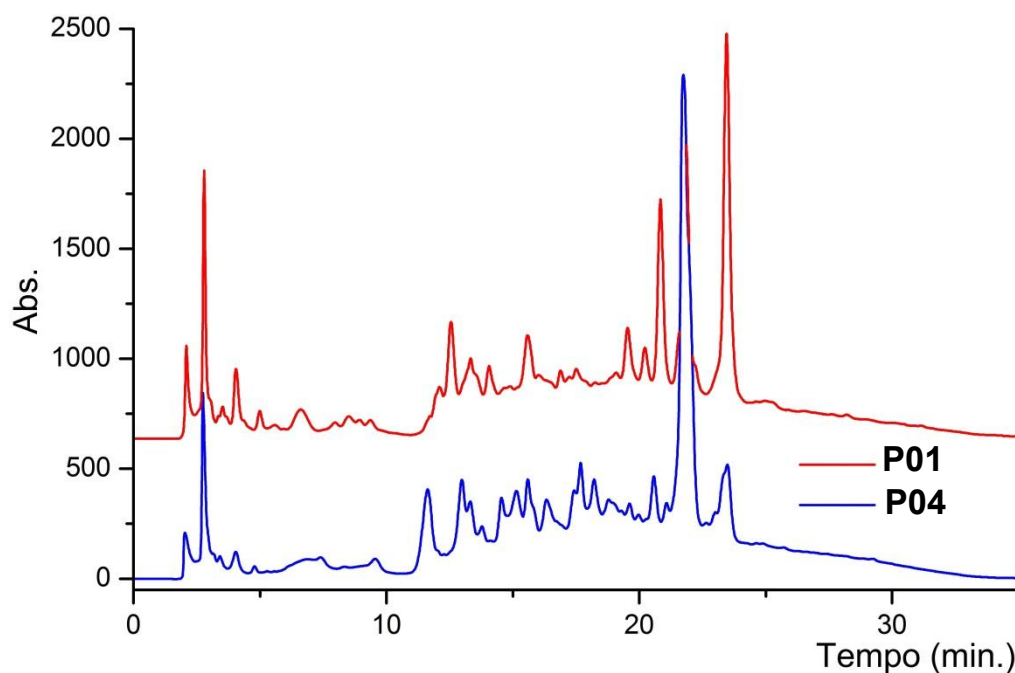


Figura 4. 20 Cromatogramas de uma das quintuplicatas de extração dos cultivares **P01** (*B. forficata*) e **P04** (*B. variegata*).

Ainda que sejam de espécies diferentes, a semelhança dos perfis cromatográficos faz com que os mesmos se encontrem distribuídos muito perto um do outro no gráfico de **PCA** no plano **PC1** x **PC2**. Cabe lembrar que, como foram selecionados 4 PC's, como número máximo de fatores, existem outros planos e até mesmo espaços de três ou quatro dimensões, nas quais poder-se-iam visualizar a distribuição dos dados de forma diferente. A **Figura 4.21** ilustra os gráficos de scores de **PC1** x **PC3** e **PC2** x **PC3**, respectivamente, indicando a localização dos *spots* referentes as amostras dos cromatogramas representados na **Figura 4.20**.

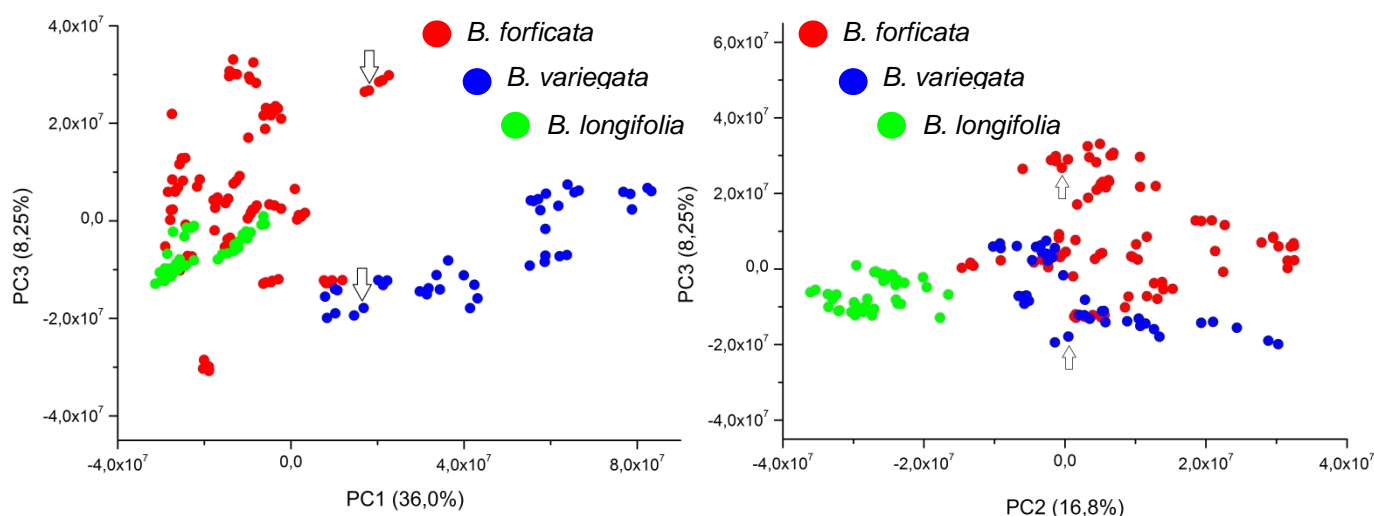


Figura 4. 21 Análise de componentes principais (**PC1xPC2**) – Gráfico de scores - visualização da distribuição e agrupamento dos dados.

O peso das variáveis (tempo de retenção) na distribuição das amostras nos eixos das PC's pode ser visualizado no gráfico de *loadings*, **Figura 4.22**.

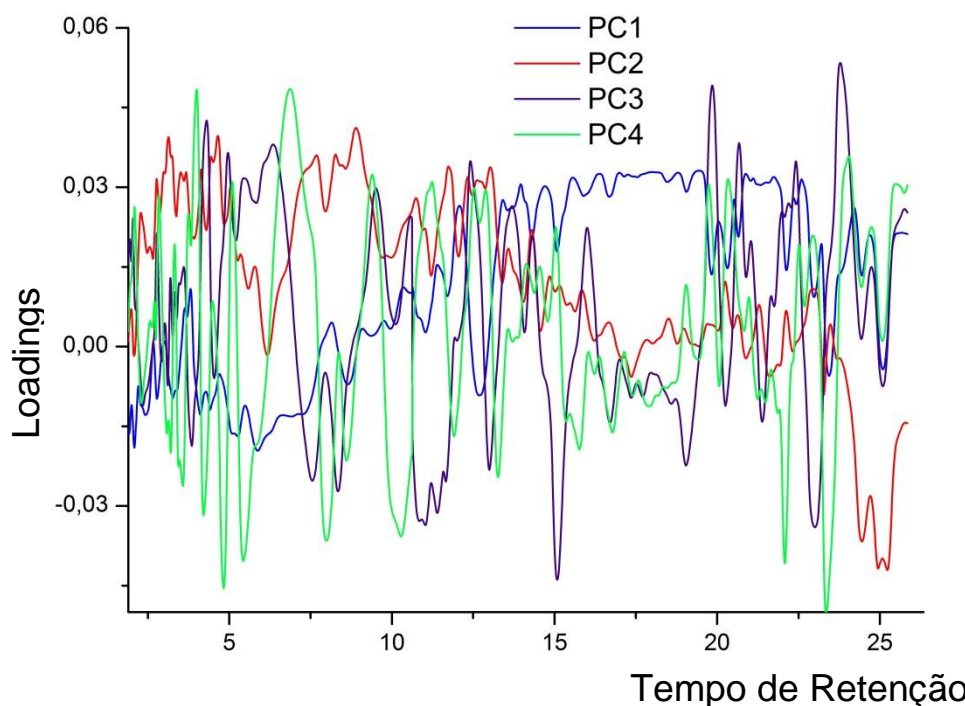


Figura 4. 22 Gráfico de *loadings* – Visualização do poder de modelagem dos tempos de retenção relacionados

Observando-se o gráfico de *loadings* pode-se inferir que todos tempos de retenção tem grande poder de modelagem por todo o cromatograma. Não foram observados tempos de retenção com pesos baixos (muito próximos a zero) assim, não efetuou-se uma seleção de variáveis.

Uma segunda ferramenta utilizada como método exploratório na visualização dos dados foi a **HCA**^[19, 24, 140]. Com a utilização desta, as amostras têm suas distâncias Euclidianas calculadas entre si. Aqueles que estão mais próximos são mais similares e na **HCA** essa similaridade é mostrada numa escala de 0 (nada de similaridade) a 1 (cromatogramas idênticos) em um dendrograma. A **HCA** calculada com os cromatogramas das amostras vegetais padrão está apresentada na **Figura 4.23**.

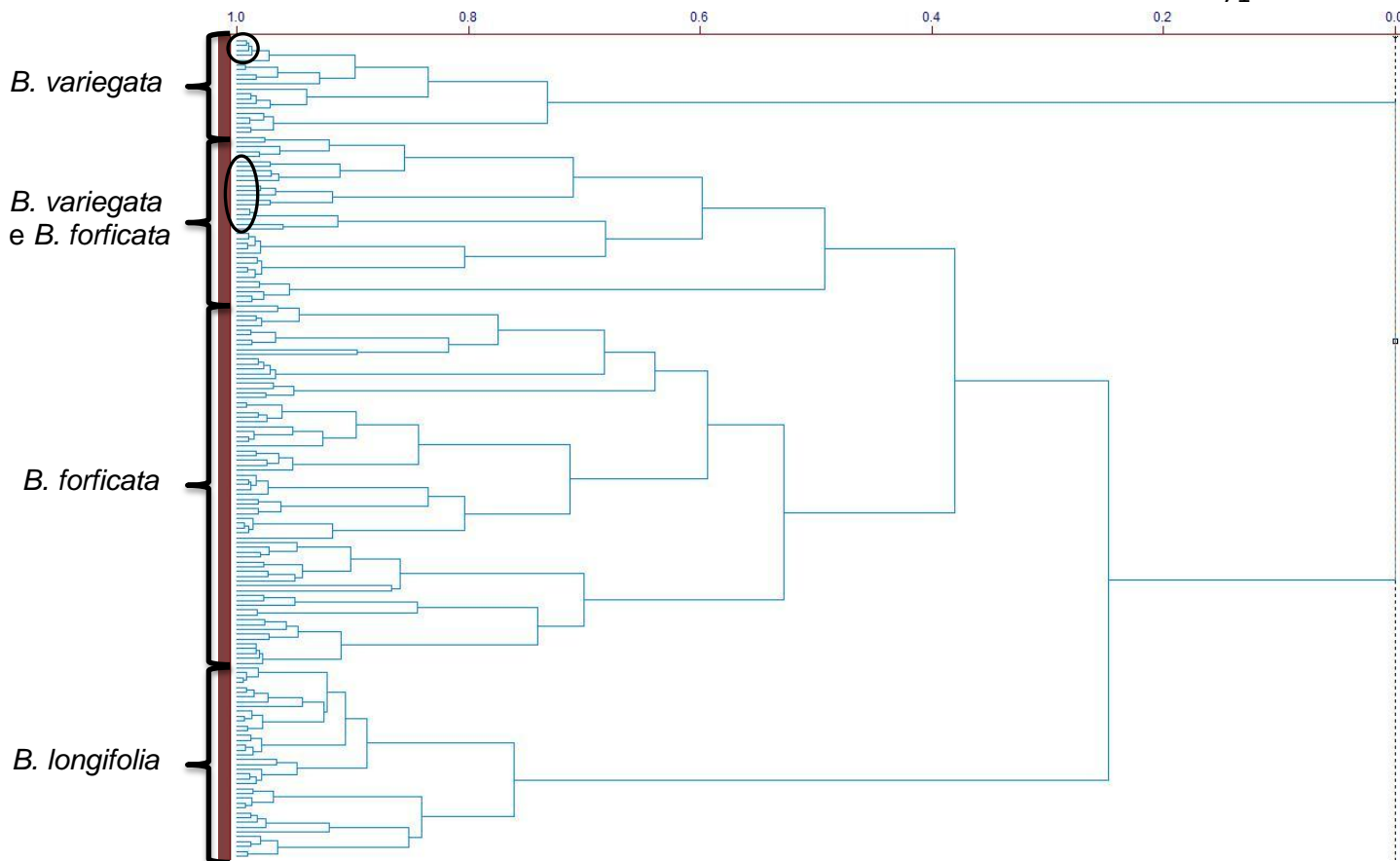


Figura 4. 23 Dendrograma gerado pela **HCA** dos cromatogramas padrão das diferentes espécies de *Bauhinia*.

Na **HCA** são relacionadas todas as distâncias Euclidianas simultaneamente entre todos os cromatogramas. Na prática, cromatogramas semelhantes estarão perto um do outro na distribuição realizada pela **PCA**, e aqueles distintos terão uma maior distância. No dendrograma, também é possível a observação da organização autônoma dos dados e esta também permite a visualização de agrupamentos de dados semelhantes.

De acordo com o dendrograma, observa-se a formação de dois grupos extremamente distintos, um deles formado por *B. variegata* que tiveram suas matérias vegetais coletadas em Jaguariúna e o outro deles formado pelas demais *Bauhinias* (*B. forficata*, *B. variegata* e *B. longifolia*). Com o intuito de ilustrar essa diferença dentro da mesma espécie, foram selecionadas duas amostras de *B. variegata* (selecionadas das regiões circuladas na **Figura 4.23**) e os cromatogramas apresentados na **Figura 4.24**. As amostras selecionadas são: uma proveniente de Jaguariúna (**P10**), que pertence ao grupo menor na parte superior do dendrograma, e outra proveniente de São Carlos (**P03**) que se distribui no grande grupo da parte inferior do dendrograma.

Normalmente, a **HCA** ilustra a mesma distribuição das amostras que a **PC1** da **PCA** e esta similaridade pode ser observada quando se analisa os cromatogramas apresentados nas **Figuras 4.19 e 4.23**.

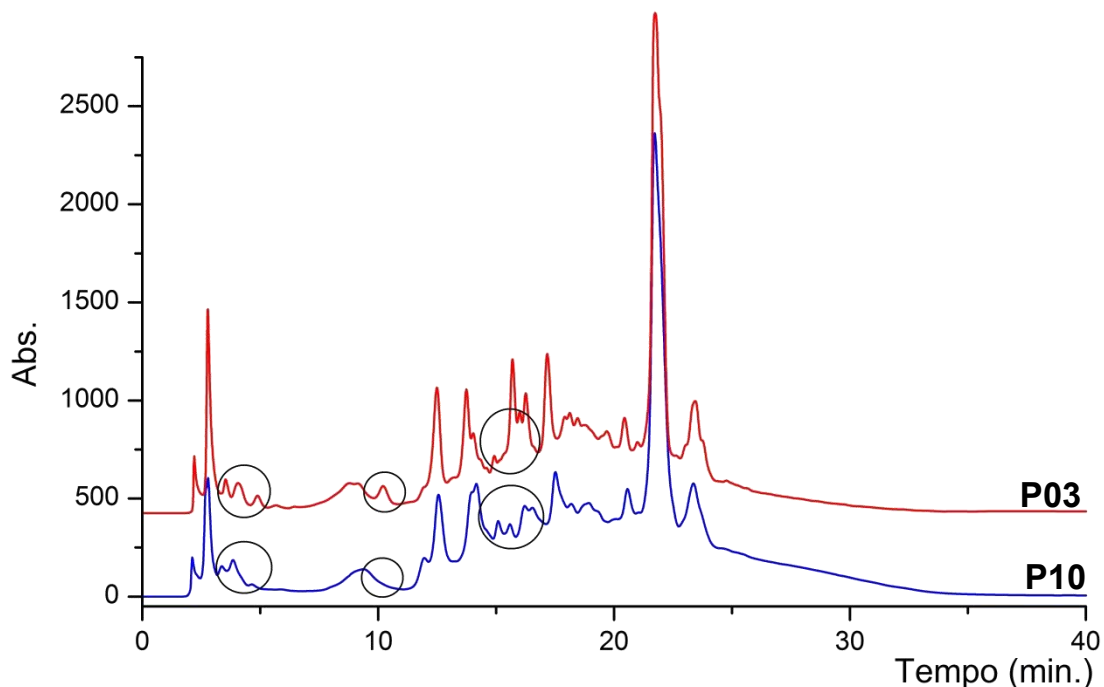


Figura 4. 24 Destaque das diferenças nos cromatogramas das amostras de *B. variegata* coletadas em Jaguariúna (**P10**) e São Carlos (**P03**).

Na **Figura 4.24** estão ressaltadas diferenças entre os perfis nos mesmos tempos de retenção. Estas pequenas diferenças são as responsáveis por fazerem com que as suas distâncias euclidianas sejam maiores colocando-as em diferentes grupos no dendrograma da **Figura 4.23**.

Para efeito de comparação, o cromatograma da amostra de *B. variegata* (**P10**), proveniente de Jaguariúna, está colocado na **Figura 4.25** juntamente com um cromatograma da amostra de *B. forficata* (**P20**), proveniente de Campinas. Na figura, é possível observar as semelhanças dos cromatogramas obtidos de espécies diferentes, justificando os agrupamentos da **HCA**.

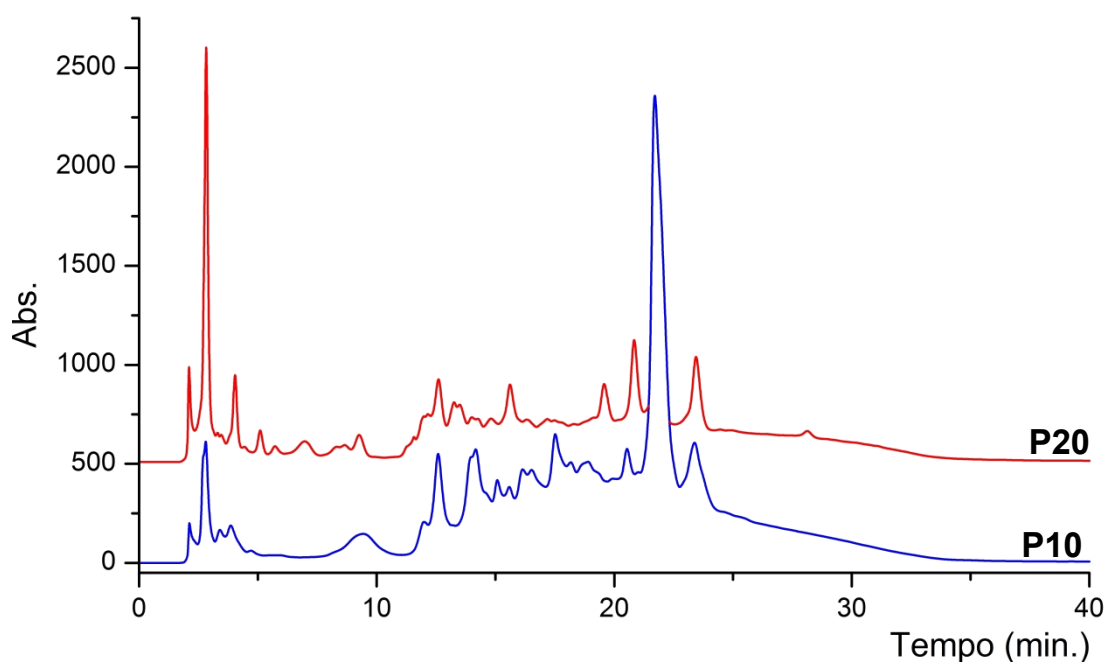


Figura 4. 25 Destaque das semelhanças nos cromatogramas de amostras de *B. variegata*, coletada em Jaguariúna (P10) e *B. forficata*, coletada em Campinas (P20).

Com o intuito de ilustrar a característica de auto-organização dos dados, demonstrando que a distribuição nos eixos das PC's é dependente diretamente das amostras as quais se utilizam para se fazer os cálculos, calculou-se uma PCA incluindo-se as amostras comerciais. A **Figura 4. 26** ilustra o gráfico de **PC1 versus PC2**, de **PC1 versus PC3** e de **PC2 versus PC3** que correspondem a 23,5% (**PC1**), 18,5% (**PC2**) e 8,6% (**PC3**) da variância dos dados. É possível observar que os *spots* se organizam de maneira diferente do que anteriormente (comparando-se com a **Figura 4.19** e **4.21**) devido a presença dos cromatogramas das amostras comerciais. Estas também não se agrupam em um 4º grupo distinto das demais, pois de acordo com suas distribuições nos gráficos, apresentam semelhanças com todas as espécies e principalmente com a *B. variegata* (círculos azuis) observando-as pelos diferentes planos.

É importante salientar também notável diminuição da explicação dos dados nas **PCs** calculadas com cromatogramas das amostras padrões e comerciais (por exemplo, **PC1** = 23,5%), comparadas com os valores das **PCs** calculadas apenas com os cromatogramas das amostras padrão (neste caso, **PC1** = 36,0%). Essa diminuição é devida justamente ao fato de terem sido inseridas amostras de características distintas ao do modelo anterior,

fazendo com que a auto-organização dos dados se dê de uma maneira diferente, gerando assim, uma menor explicação dos dados. A **Figura 4.27** ilustra o gráfico utilizado para a seleção de **PC's**, neste caso, quatro componentes principais foram selecionadas.

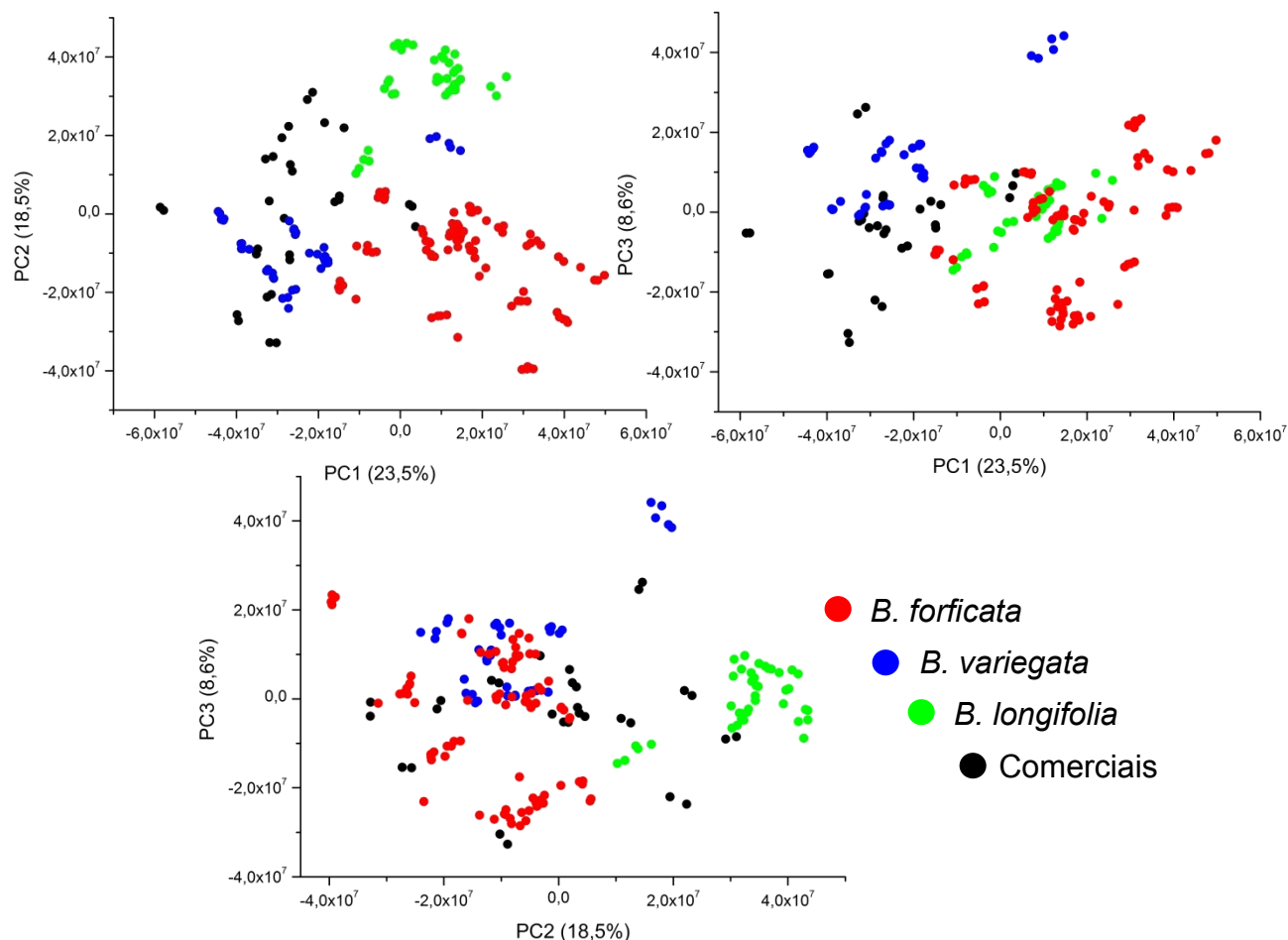


Figura 4. 26 PCAs calculadas com os cromatogramas obtidos dos padrões de *Bauhinia* e também com os cromatogramas obtidos das amostras comerciais.

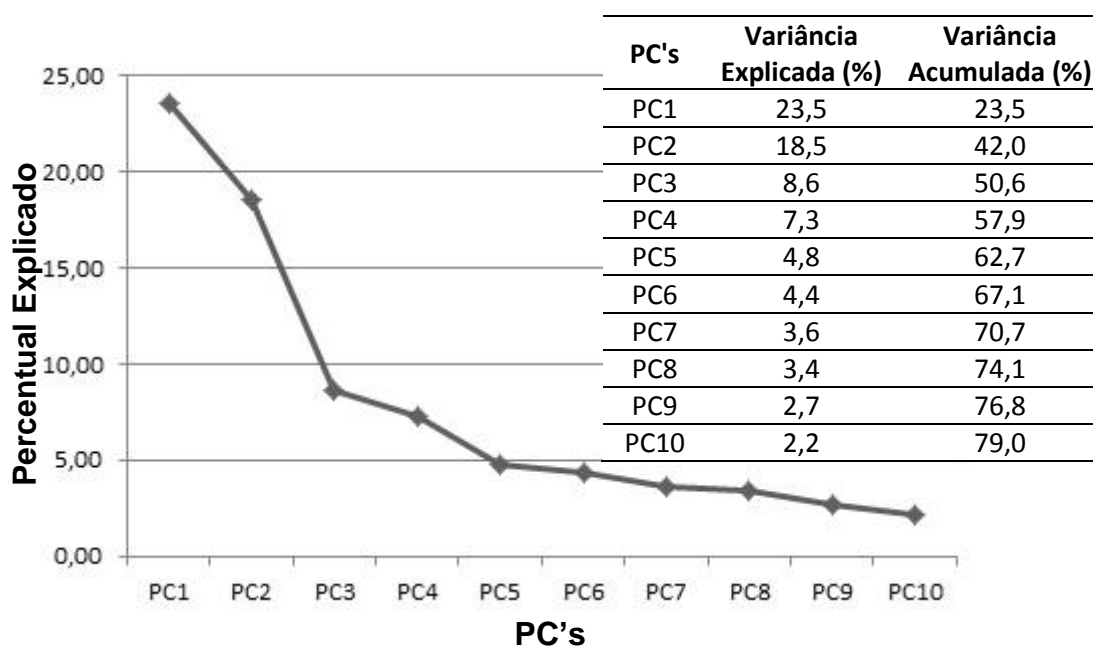


Figura 4. 27 Gráfico e tabela utilizados para a seleção de fatores da **PCA**.

O peso das variáveis (tempo de retenção) na distribuição das amostras nos eixos das PC's pode ser visualizado no gráfico de loadings, **Figura 4.28**.

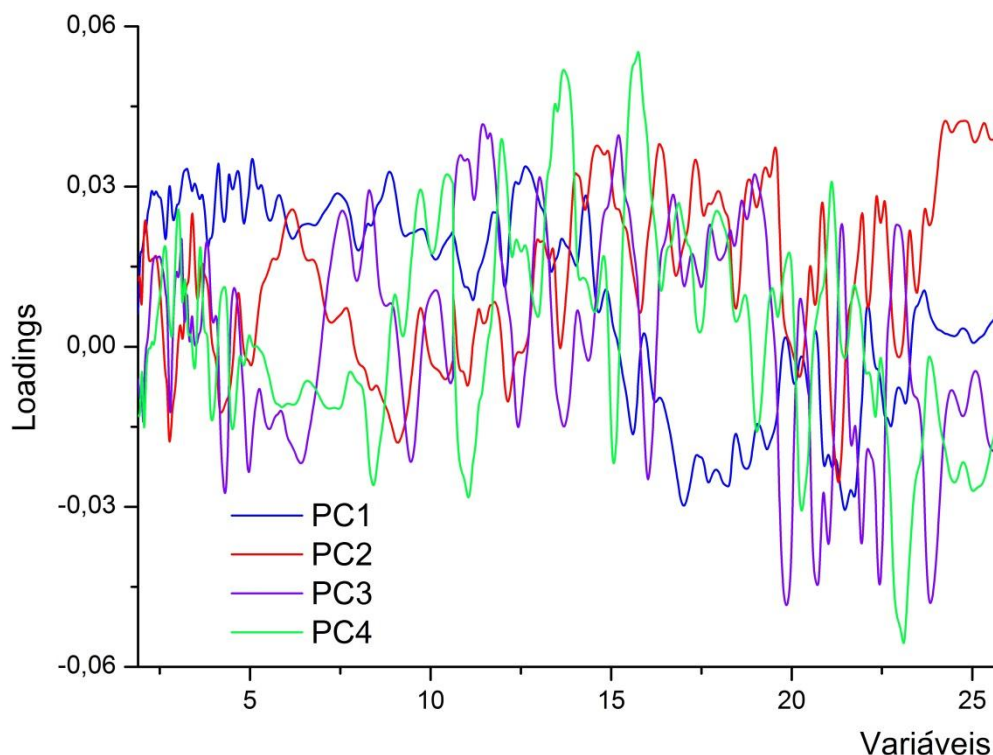


Figura 4. 28 Gráfico de *loadings* – Visualização do poder de modelagem dos tempos de retenção relacionados.

É importante ressaltar que a utilização da **PCA** na análise qualitativa de classificação das amostras de espécie desconhecidas (amostras comerciais) utilizando-se ferramentas não-supervisionadas, como as **PCA's** da **Figura 4.26**, pode estar sujeita a erros grosseiros. Isto ocorre pois, além de ser uma ferramenta de análise exploratório dos dados podem existir diferentes planos de visualização na **PCA**, e desta maneira, o plano ao qual se faz a visualização pode gerar classificações errôneas e imprecisas que dependerão apenas julgamento do analista (observação de tendências de agrupamento das amostras desconhecidas). Desta forma utilizou-se de ferramentas de classificação supervisionadas que serão discutidas nas sessões que se seguem.

4.6.3. Modelos supervisionados de classificação quimiométrica

Para a classificação de amostras não identificadas botanicamente para o controle de qualidade pode-se utilizar a **PCA** e a **HCA** para observar qualitativamente a distribuição das mesmas entre as amostras padrão, porém estes métodos apesar de serem mais simples, rápidos e fáceis não conferem segurança na identificação das mesmas por se tratarem de métodos quimiométricos não supervisionados de análise.

Comparando a **figura 4.19** e **4.26** pode-se perceber que as amostras se organizam de maneira invertida. Isto acontece pelo fato dos cromatogramas oriundos de amostras de espécies desconhecidas (amostras comerciais) terem sido adicionados no segundo cálculo da **PCA**. Caso fosse feita uma **HCA** o mesmo poderia ser observado, uma redistribuição dos dados.

Com essa distribuição dos *spots* é possível inferir a respeito da espécie das amostras comerciais, porém como esta classificação ficaria a cargo do analista, no que diz respeito da interpretação dos dados, não se trata de uma determinação muito precisa e com repetibilidade. Assim, com o intuito de desenvolver modelos confiáveis de classificação, ferramentas quimiométricas supervisionadas de análise foram utilizadas.

4.6.3.1. KNN (Kth Nearest Neighbor)

A **KNN** é a ferramenta classificatória supervisionada mais simples das utilizadas no presente trabalho e já foi utilizada em trabalhos envolvendo este e outros modelos de classificação^[117, 141]. Nesta ferramenta de análise, é calculada a distância euclidiana entre a amostra desconhecida e àquelas de espécies conhecidas, tendo-se como os eixos todas as variáveis envolvidas, neste caso, todos os tempos de retenção dos cromatogramas. Com essas distâncias determinadas, a amostra desconhecida é classificada segundo a espécie daquela ao qual se localizou mais próxima. Por exemplo,

se um *spot* que representa uma amostra comercial se distribui mais perto do *spot* que representa um cromatograma de uma amostra de *B. forficata*, esta amostra comercial será classificada como tal, ou seja, a espécie das amostras comerciais será determinada levando-se em conta a sua distância entre os *spots* de sua vizinhança.

Com o intuito de assegurar a qualidade de predição desta ferramenta, antes de aplicá-la às amostras comerciais, um simples procedimento de validação é realizado. Neste, amostras padrões são retiradas aleatoriamente do montante total, totalizando 20% de todas as amostras e das três espécies envolvidas, e são posteriormente testadas como se fossem amostras desconhecidas. A validação se dará comparando-se a classificação feita com a classificação botânica da amostra.

A escolha do número de *spots* de amostras padrão que serão usadas para classificar a amostra desconhecida é um parâmetro importante em KNN. Para determinar o melhor valor deste parâmetro, o programa gera um gráfico que relaciona o número de vizinhos com o número de acertos quando do procedimento de validação desta ferramenta. A **Figura 4.29** ilustra este gráfico para o modelo desenvolvido.

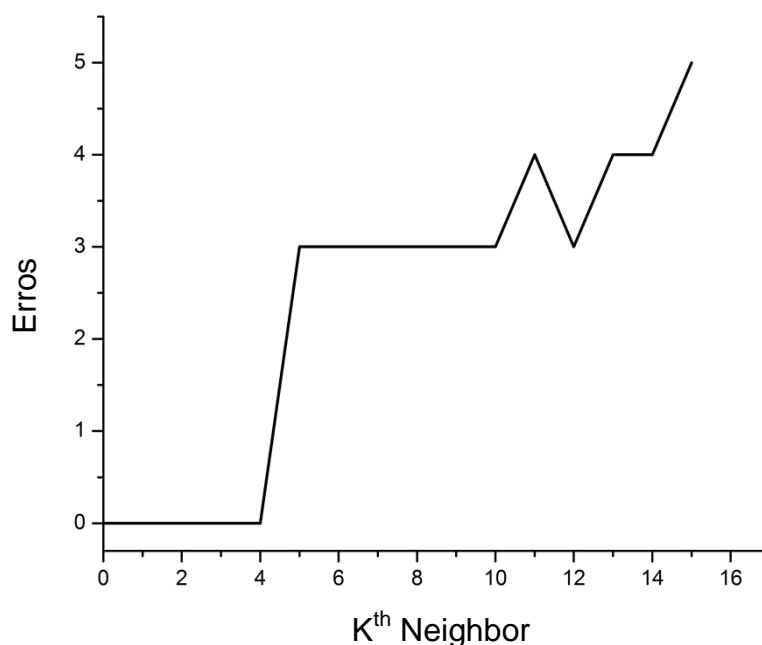


Figura 4. 29 Gráfico que relaciona o número de vizinhos com o número de erros na determinação das espécies de *Bauhinia* na validação da ferramenta **KNN**.

É desejável que o número de vizinhos seja o menor possível e ímpar (para não ocorrer impates), e ao mesmo tempo, que o erro na determinação seja mínimo. Assim, de acordo com o gráfico que foi gerado na validação da ferramenta, pôde-se determinar que o número de vizinhos que não expressou nenhum erro na determinação das espécies das amostras padrão no procedimento de validação desta ferramenta, foi de um vizinho. Utilizando-se 2, 3 ou 4 vizinhos, o erro ainda permanece igual a zero, porém números pares de vizinhos pode fazer com que o modelo opte pelo segundo critério de desempate, que é a menor distância acumulada. O valor um de vizinhos foi utilizado como parâmetro para a validação e obtenção dos resultados apresentados na **Tabela 4.12**.

Recomenda-se para a validação deste modelo, retirar 20% do total das amostras de cada uma das espécies e após as predições comparar os resultados. No presente trabalho, os resultados de tal procedimento, em porcentagem de acertos estão apresentados na **Tabela 4.12**. De todas as amostras retiradas do conjunto total de dados e testadas com a **KNN**, o modelo previu todas elas corretamente. Todas foram classificadas segundo esta ferramenta assim como a sua espécie previamente determinada pela identificação botânica.

Tabela 4. 12 Quantidade e porcentagem de acertos para a ferramenta **KNN** na classificação de amostras das espécies padrões – Validação do modelo quimiométrico.

Espécie	Nº de Amostras	Nº de Cromatogramas	Acertos
<i>B. forficata</i>	5	30	30
<i>B. variegata</i>	2	10	10
<i>B. longifolia</i>	1	5	5
Porcentagem	-	-	100%

Quando aplicou-se esta ferramenta para a classificação das amostras comerciais, verificou-se o resultado apresentado na **Tabela 4.13** que apresenta a informação da espécie contida no rótulo e a espécie que foi determinada pela ferramenta **KNN** para simples comparação.

Nela, em verde foram destacadas as duas amostras que foram determinadas como *B. forficata* segundo a ferramenta de classificação **KNN** e que concordam com as informações contidas no rótulo, **AC05** e **AC08**. As

amostras **AC01** e **AC10** também foram classificadas pelo modelo como pertencentes a espécie *B. forficata*, porém no rótulo da embalagem a informação que constava era apenas o gênero das mesmas.

Tabela 4. 13 Resultado da classificação das amostras comerciais pelo modelo KNN.

Amostra	Rótulo	Determinação KNN
AC01	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. forficata</i>
AC02	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>
AC03	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>
AC04	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>
AC05	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>
AC06	Não informado	<i>B. longifolia</i>
AC07	Não informado	<i>B. variegata</i>
AC08	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>
AC09	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>
AC10	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. forficata</i>
AC11	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>
AC12	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. variegata</i>
AC13	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>
AC14	Não informado	<i>B. longifolia</i>
AC15	<i>B. candicans</i>	<i>B. longifolia</i>

Um aspecto negativo desta ferramenta em específico é o fato de que as amostras desconhecidas sempre serão classificadas, mesmo que na distribuição espacial dos *spots* estes estejam muito distantes dos *spots* das amostras padrão. Por esta razão as amostras desconhecidas serão classificadas de acordo com a espécie da amostra mais próxima, independentemente da distância, o que torna esta ferramenta não muito confiável já que classificações errôneas podem ocorrer devido a este fato.

Assim, com o intuito de certificar a autenticidade da classificação feita por esta ferramenta, e utilizar-se de outros métodos classificatórios supervisionados para conferir maior credibilidade à determinação das espécies das amostras comerciais, foram feitos usos de mais duas ferramentas quimiométricas de classificação supervisionadas, o **SIMCA** e o **PLS-DA**.

4.6.3.2. SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*)

A ferramenta de classificação supervisionada **SIMCA** (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) gera hipercaixas ao redor dos agrupamentos das amostras padrão em uma **PCA** para cada espécie. Após a formação destas hipercaixas, essa configuração espacial é retida e uma nova **PCA** apenas com as amostras comerciais a serem classificadas é calculada utilizando-se os mesmos parâmetros da **PCA** anterior. As amostras comerciais têm suas espécies determinadas de acordo com a sua localização, dentro ou fora das hipercaixas, tendo suas espécies classificadas ou não. Por exemplo, se uma amostra comercial após o cálculo da **PCA** se localiza dentro de uma hipercaixa que foi gerada ao redor do agrupamento da espécie *B. forficata*, esta amostra é classificada segundo esta espécie. Caso existam amostras que não se disponham dentro destas hipercaixas, suas espécies não são determinadas. Além disso, amostras posicionadas na fronteira entre duas hipercaixas podem ter sua classe atribuída a duas espécies.

Na construção deste modelo, é preciso otimizar o número de PC's nas **PCA's** para cada uma das espécies em separado. A **Tabela 4.14** apresenta o número de fatores selecionados para cada uma das espécies levando-se em conta a primeira redução monotônica.

Tabela 4. 14 . Número de PC's selecionadas para cada uma das **PCA's** calculadas no método **SIMCA**.

Espécie	PC's	Variância Acumulada (%)
<i>B. forficata</i>	3	43,7
<i>B. longifolia</i>	2	58,8
<i>B. variegata</i>	3	77,8

Assim como o **KNN**, o **SIMCA** também deve ser validado. Com isso, da mesma maneira, para este procedimento foram retiradas 20% das amostras de cada uma das espécies padrão (mesmo conjunto utilizado para a validação da **KNN**), e estas foram classificadas pelo modelo **SIMCA** desenvolvido. Os resultados da validação estão apresentados na **Tabela 4.15**.

Tabela 4. 15 Quantidade e porcentagem de acertos para a ferramenta **SIMCA** na classificação de amostras padrões – Validação do modelo quimiométrico.

Espécie	Nº de Amostras	Nº de Cromatogramas	Acertos
<i>B. forficata</i>	5	30	19
<i>B. variegata</i>	2	10	9
<i>B. longifolia</i>	1	5	5
Porcentagem	-	-	73%

De todas as amostras retiradas do conjunto total de dados e testadas com o **SIMCA**, o modelo não classificou 12 replicatas, originando 73% de acerto nas previsões.

A **Figura 4.30** demonstra a geração das hipercaixas ao redor dos agrupamentos das amostras padrão (delimitação através das nuvens pontilhadas). Após a geração das hipercaixas a **Figura 4.29** demonstra a distribuição das amostras comerciais no gráfico de PC's.

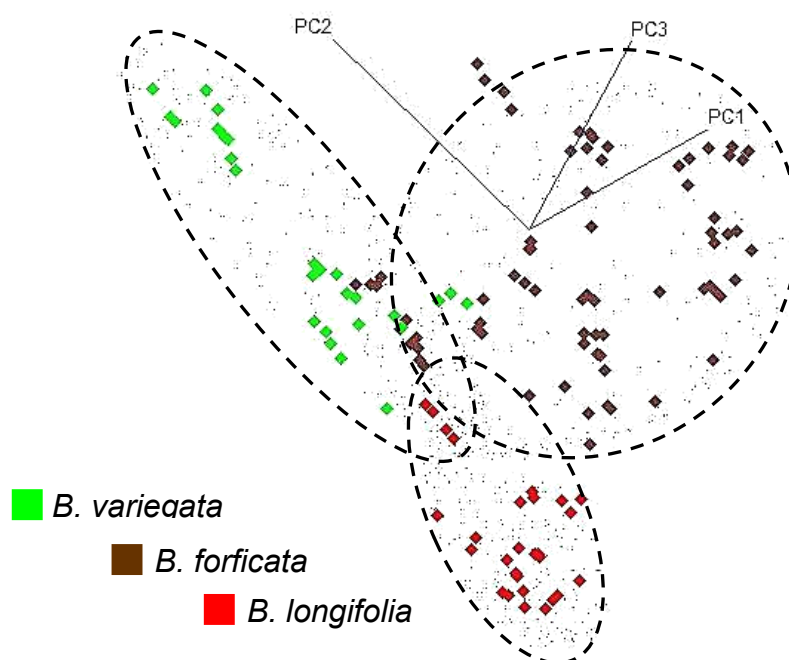


Figura 4. 30 Geração das hipercaixas ao redor do agrupamento das amostras padrão de *Bauhinia* no desenvolvimento do **SIMCA** – A delimitação das hipercaixas é dada utilizando-se os pequenos pontos pretos.

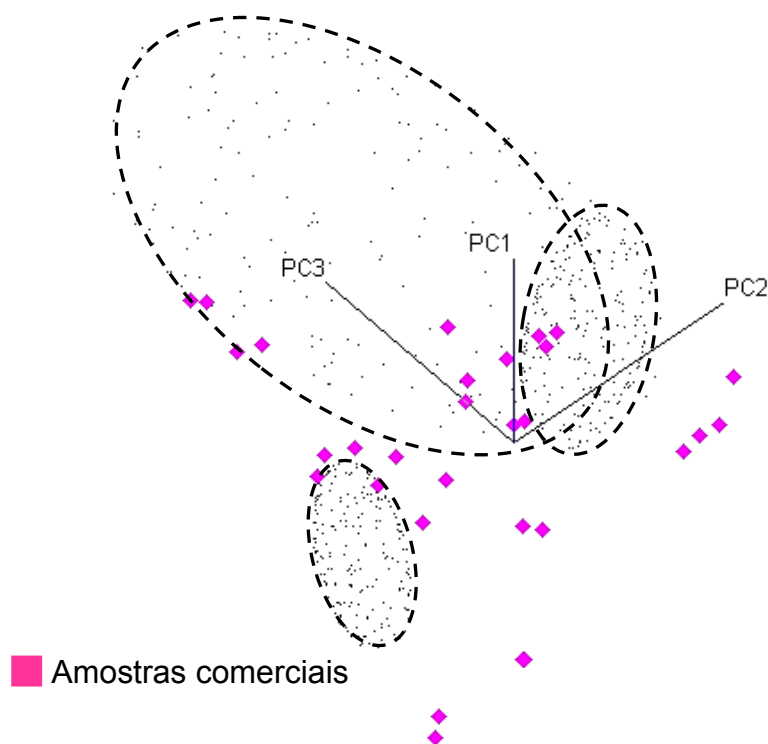


Figura 4. 31 Classificação das amostras comerciais utilizando-se a distribuição das mesmas dentro e ao redor das hipercaixas geradas previamente.

Analisando-se as **Figuras 4.30** e **4.31**, é possível observar que nem todas as amostras comerciais analisadas foram distribuídas dentro das hipercaixas do modelo **SIMCA**. Com isso, o modelo foi capaz de classificar somente quatro das 15 amostras comerciais, assim como apresentado na **Tabela 4.16**.

Tabela 4. 16 Determinações do modelo de classificação **SIMCA**.

Amostra	Rótulo	Determinação SIMCA
AC01	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. forficata</i>
AC02	<i>Bauhinia sp.</i>	Não Classificada
AC03	<i>B. forficata</i>	Não Classificada
AC04	<i>B. forficata</i>	Não Classificada
AC05	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>
AC06	Não informado	Não Classificada
AC07	Não informado	Não Classificada
AC08	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>
AC09	<i>B. forficata</i>	Não Classificada
AC10	<i>Bauhinia sp.</i>	Não Classificada
AC11	<i>Bauhinia sp.</i>	Não Classificada
AC12	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. forficata</i>
AC13	<i>Bauhinia sp.</i>	Não Classificada
AC14	Não informado	Não Classificada
AC15	<i>B. candicans</i>	Não Classificada

As quatro amostras comerciais **AC01**, **AC05**, **AC08** e **AC12**, foram classificadas pelo modelo como *B. forficata*. Dentre estas, apenas as amostras **AC05** e **AC08**, marcadas em verde na **tabela 20**, concordaram com as informações dos respectivos rótulos. As amostras **AC1** e **AC12**, destacadas em vermelho, foram classificadas como *B. forficata*, porém os rótulos não apresentavam informações específicas a cerca de suas espécies, apenas do gênero. As amostras comerciais **AC03**, **AC04** e **AC09**, que traziam no rótulo a informação de pertencerem à espécie *B. forficata*, não foram classificadas. Todas as demais amostras também não foram classificadas.

O modelo de classificação **SIMCA**, apesar de não classificar todas as amostras, confere maior segurança na determinação de amostras desconhecidas se comparado ao modelo **KNN**, uma vez que este modelo classifica apenas amostras de elevada semelhança com as amostras padrão.

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

Outro modelo utilizado na classificação das amostras comerciais foi o **PLS-DA**. Esta ferramenta envolve o procedimento matemático mais complexo dentre os três utilizados, fornecendo assim um resultado mais confiável dentre elas. Trata-se de um cálculo de mínimos quadrados parciais entre as amostras e suas variáveis independentes. Além disto, apresenta em seu desenvolvimento um processo de validação cruzada, que testa todas as variações na classificação. Este procedimento é feito de forma sistemática retirando-se uma a uma as amostras (5 replicatas) do conjunto total de dados. Esta ferramenta tem sido utilizada no controle de qualidade de medicamentos a base de fontes vegetais^[19, 118].

Assim como para as outras ferramentas de classificação, o **PLS-DA** também passou pelo procedimento de validação. Foram retiradas 20% das amostras de cada uma das espécies padrão (utilizou-se o mesmo conjunto para as outras duas ferramentas – **KNN** e **SIMCA**), e estas foram classificadas. De todas as amostras retiradas, o **PLS-DA** classificou corretamente 100% das replicatas. Os resultados da validação estão apresentados na **Tabela 4.17**.

Tabela 4. 17 Quantidade e porcentagem de acertos para a ferramenta **PLS-DA** na classificação de amostras padrão – Validação do modelo quimiométrico.

Espécie	Nº de Amostras	Nº de Cromatogramas	Acertos
<i>B. forficata</i>	5	30	30
<i>B. variegata</i>	2	10	10
<i>B. longifolia</i>	1	5	5
Porcentagem	-		100%

No **PLS-DA** também se faz a seleção de fatores nos modelos de regressão PLS para cada uma das classes. Nesta seleção consideram-se os mais baixos valores de resíduos e coeficientes de correlação adequados. A **Tabela 4.18** demonstra as seleções de fatores para cada uma das classes juntamente com estes parâmetros associados, **PRESS Val** (Soma dos quadrados dos resíduos de validação), **SEV** (raiz quadrada de **PRESS Val**, neste caso com $n = 1$) e **rVal** (Coeficiente de correlação da regressão).

Tabela 4. 18 Número de PC's selecionadas e parâmetros associados para cada uma das **PCA's** calculadas no modelo **PLS-DA**.

Espécie	PC's	PRESS Val	SEV	rVal
<i>B. forficata</i>	3	3,9485	0,1756	0,9352
<i>B. longifolia</i>	3	2,2517	0,1326	0,9473
<i>B. variegata</i>	4	0,6949	0,0737	0,9840

Com o número de fatores otimizados, o método desenvolvido foi aplicado na determinação das espécies das amostras comerciais. A **Tabela 4.19** apresenta como estas foram classificadas segundo este modelo.

Tabela 4. 19 Determinações do modelo de classificação **PLS-DA**.

Amostra	Rótulo	Determinação PLS-DA
AC01	<i>Bauhinia sp.</i>	Não Classificada
AC02	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>
AC03	<i>B. forficata</i>	Não Classificada
AC04	<i>B. forficata</i>	Não Classificada
AC05	<i>B. forficata</i>	Não Classificada
AC06	Não informado	<i>B. longifolia</i>
AC07	Não informado	Não Classificada
AC08	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>
AC09	<i>B. forficata</i>	Não Classificada

AC10	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>
AC11	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>
AC12	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. variegata</i>
AC13	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>
AC14	Não informado	<i>B. longifolia</i>
AC15	<i>B. candicans</i>	Não Classificada

Como pode-se observar, apenas a amostra comercial **AC08**, marcada em verde na **Tabela 4.19**, teve sua espécie determinada de modo condizente com a informação trazida no rótulo, *B. forficata*. Além destas, outras sete amostras comerciais foram classificadas, porém nenhuma delas como *B. forficata*. Com exceção da **AC08**, todas as demais amostras comerciais que traziam no rótulo pertencerem à espécie *B. forficata*, não foram classificadas por este modelo.

4.6.4. Avaliação dos modelos quimiométricos de classificação

A **Tabela 4.20** relaciona os resultados obtidos pelos três modelos de classificação simultaneamente.

Tabela 4. 20 Comparação entre as classificações realizadas pelos modelos de classificação

Amostra	Rótulo	Determinação KNN	Determinação SIMCA	Determinação PLS-DA
AC01	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>	Não Classificada
AC02	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>	Não Classificada	<i>B. longifolia</i>
AC03	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>	Não Classificada	Não Classificada
AC04	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>	Não Classificada	Não Classificada
AC05	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>	Não Classificada
AC06	Não informado	<i>B. longifolia</i>	Não Classificada	<i>B. longifolia</i>
AC07	Não informado	<i>B. variegata</i>	Não Classificada	Não Classificada
AC08	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>	<i>B. forficata</i>
AC09	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>	Não Classificada	Não Classificada
AC10	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. forficata</i>	Não Classificada	<i>B. longifolia</i>
AC11	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>	Não Classificada	<i>B. longifolia</i>
AC12	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. variegata</i>	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>
AC13	<i>Bauhinia sp.</i>	<i>B. longifolia</i>	Não Classificada	<i>B. longifolia</i>
AC14	Não informado	<i>B. longifolia</i>	Não Classificada	<i>B. longifolia</i>
AC15	<i>B. candicans</i>	<i>B. longifolia</i>	Não Classificada	Não Classificada

Assim como seria esperado, de acordo com a característica intrínseca do **KNN**, este modelo classificou todas as amostras comerciais. O modelo **SIMCA** não classificou 11 das 15 amostras (73,3%) e o **PLS-DA** deixou de classificar 7 das 15 (46,7%) devido também às singularidades de ambos.

Comparando-se a concordância dos modelos, **KNN** e **SIMCA** concordam em apenas 3 das 15 amostras comerciais classificadas (20% de concordância), **KNN** e **PLS-DA** concordam em 46,7% das classificações (7 do total) e **SIMCA** e **PLS-DA** concordam em 6 das 15 amostras comerciais, o que corresponde a 40% de classificações idênticas.

Analisando-se a **Tabela 4.20** pode-se observar que a amostra **AC10**, marcada em vermelho, foi a única que não teve concordância alguma entre os três modelos e sua embalagem não trazia informação exata de espécie, apenas de gênero. A grande discordância entre os modelos pode ser devido a alta similaridade deste cromatograma com alguns cromatogramas de espécies distintas, assim como foi previamente discutido e demonstrado na **Figura 4.20**. Nesta observam-se os cromatogramas de duas espécies diferentes, porém bastante similares. Com isso, pode-se inferir que esta amostra ou pertence a uma das espécies ou a nenhuma delas relacionadas. A **Figura 4.32** ilustra o cromatograma da amostra **AC10** juntamente com cromatogramas das espécies *B. variegata* (**P03**), *B. forficata* (**P01**) e *B. longifolia* (**P11**).

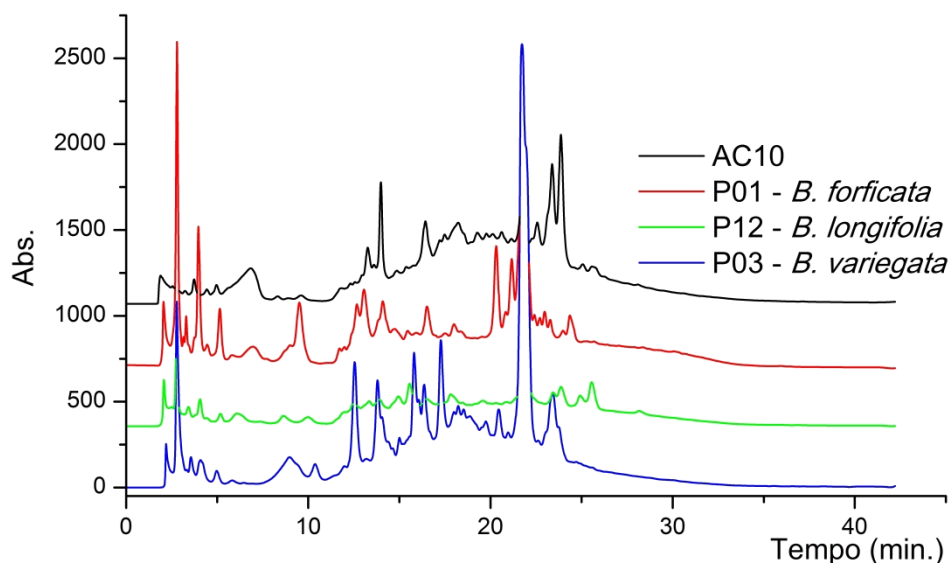


Figura 4. 32 Ilustração da amostra comercial AC10 juntamente com amostras de espécies de *Bauhinia*.

As amostras **AC03**, **AC04**, **AC09** e **AC15**, cujos rótulos traziam informações definidas de espécie, foram classificadas somente pelo **KNN** e como sendo pertencentes a uma espécie diferente da contida no rótulo. Para estas e para a amostra **AC07**, que também foi classificada apenas pelo modelo **KNN** é preciso cuidado na análise dos resultados. O procedimento ao qual este modelo utiliza para a classificação das amostras está relacionado à distância entre as amostras desconhecidas e todas as amostras padrão e ainda ao número de votos de cada classe.

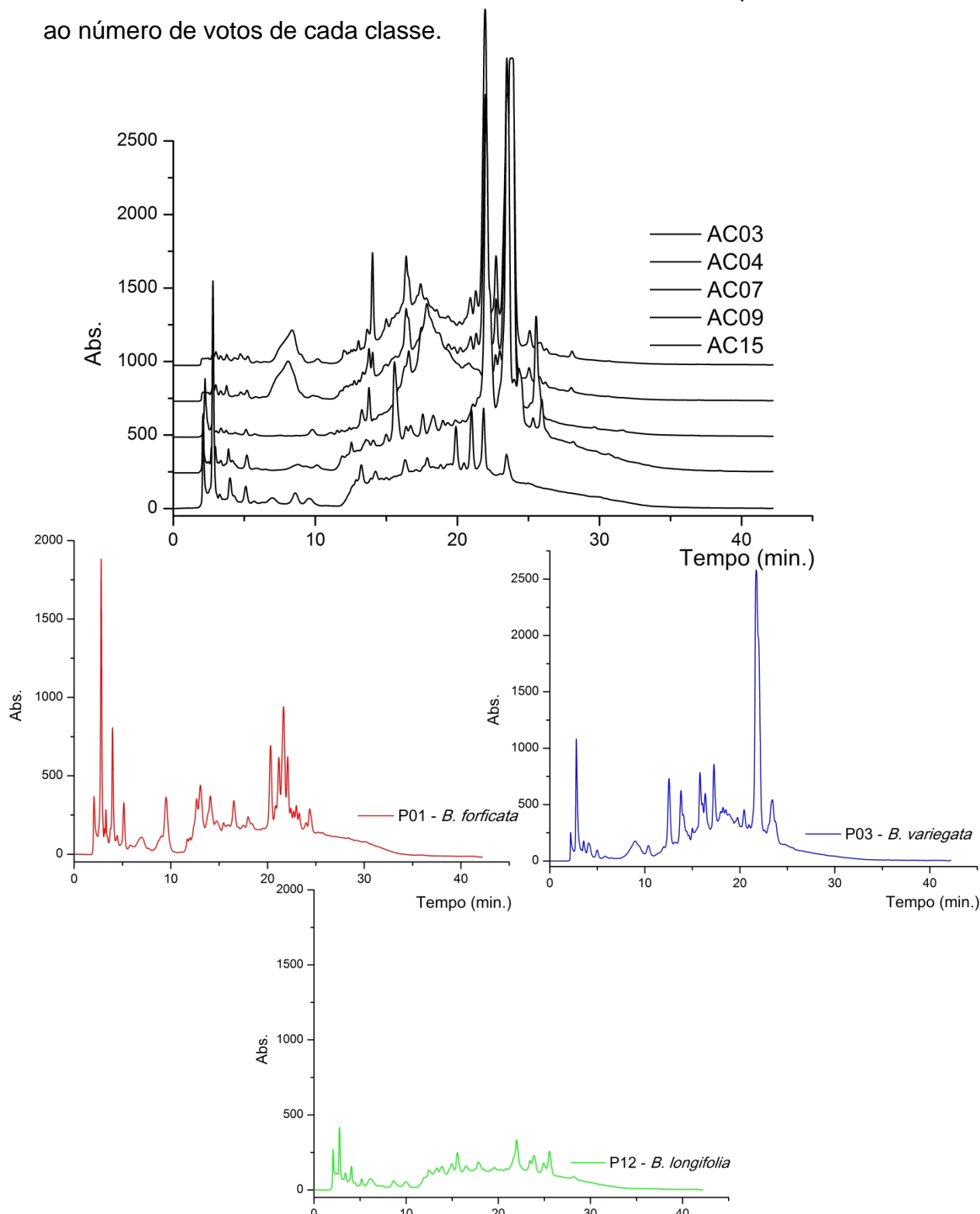


Figura 4. 33 Amostras comerciais e padrão para visualização. Tempo (min.)

Devido a isto, as amostras colocadas na **Figura 4.33** podem realmente pertencer às espécies determinadas pelo **KNN** ou apenas terem sido classificadas desta forma devido a singularidade deste modelo. Analisando-se a **Figura 4.34**, que ilustra uma **PCA** das amostras padrão e comerciais juntas (referente à **Figura 4.26**), pode-se visualizar que de todas as comerciais (círculos pretos) apenas 5 delas (10 replicatas circuladas em vermelho) apresentam uma ligeira diferença às demais presentes no gráfico de scores (**AC10**, **AC12** a **AC15**).

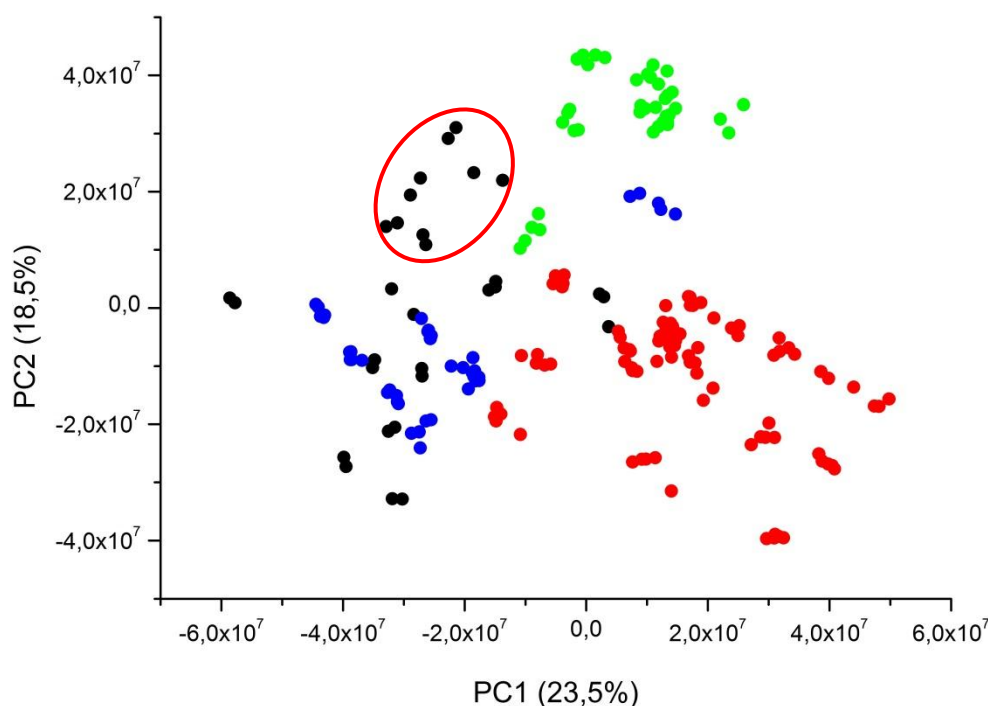


Figura 4. 34 PCA calculada com os cromatogramas obtidos das amostras padrão de *Bauhinia* e também com os cromatogramas obtidos das amostras comerciais.

As amostras cujos rótulos trouxeram apenas informação de gênero, como a **AC01**, **AC02**, **AC11**, **AC12** e **AC13**, tiveram concordância na classificação de suas espécies por pelo menos dois modelos simultaneamente, fato que reforça a possibilidade de pertencerem às espécies relacionadas. Para caráter de ilustração, as **Figuras 4.35**, **4.36** e **4.37** mostram os cromatogramas das amostras comerciais relacionadas acima comparados aos cromatogramas das amostras padrões das espécies aos quais foram determinadas pelos modelos.

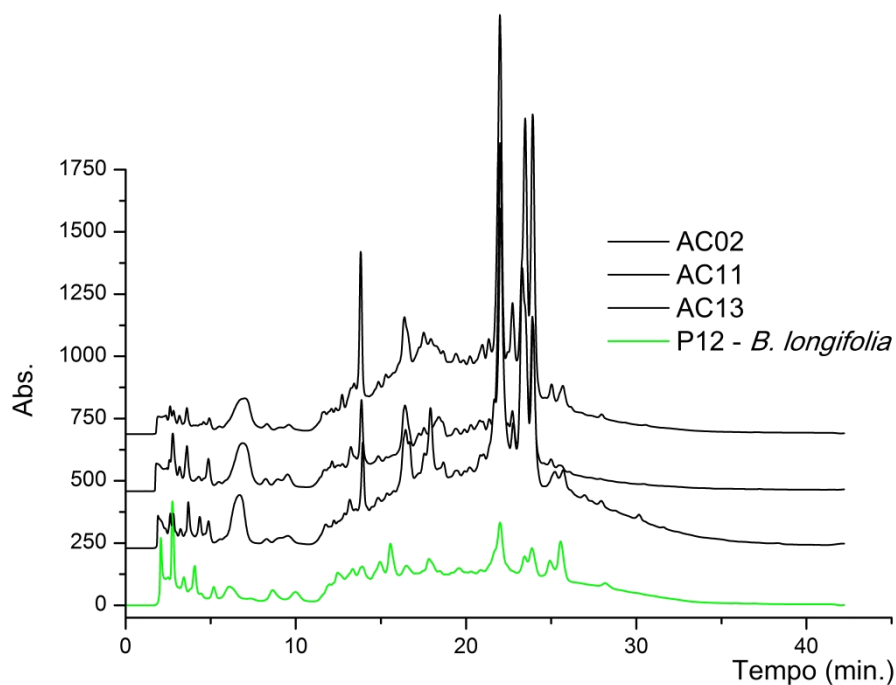


Figura 4. 35 Cromatogramas das amostras comerciais **AC02**, **AC11** e **AC13** que foram determinadas como *B. longifolia* por pelo menos dois modelos concomitantemente.

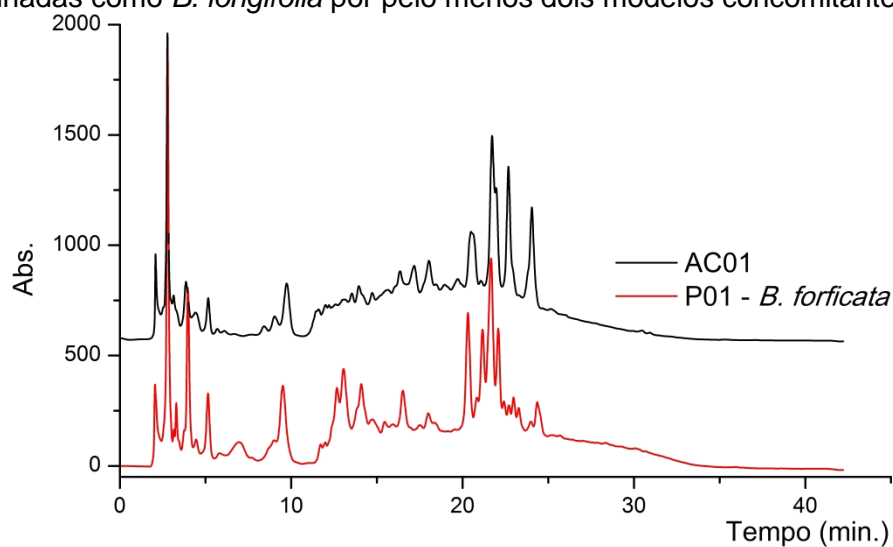


Figura 4. 36 Cromatograma da amostra comercial **AC01** que foi determinada como *B. forficata* por pelo menos dois modelos concomitantemente.

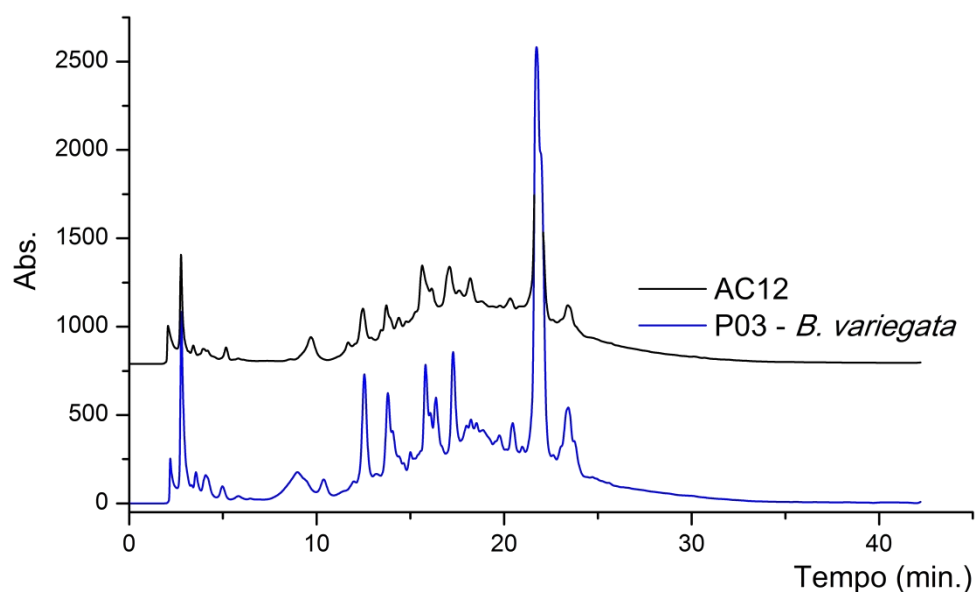


Figura 4. 37 Cromatograma da amostra comercial **AC12** que foi determinada como *B. variegata* por pelo menos dois modelos concomitantemente.

Visualmente, os cromatogramas das amostras **AC01** e **AC12** são mais semelhantes aos cromatogramas das amostras padrão de *B. forficata* (Figura 4.36) e *B. variegata* (Figura 4.37), do que as amostras **AC02**, **AC11** e **AC13** em comparação ao cromatograma da amostra padrão de *B. longifolia* (Figura 4.35), porém é importante salientar que as figuras demonstram apenas um dos cromatogramas das amostras padrão, com o intuito de facilitar a visualização, logo pode(m) existir outro(s) cromatograma(s) de amostras padrão que sejam visualmente mais semelhantes às amostras **AC02**, **AC11** e **AC13**.

As amostras **AC06**, **AC07** e **AC14**, que não traziam nenhuma informação de espécie e gênero no rótulo, foram classificadas como *B. longifolia*, no caso da **AC06** e **AC14**, por dois modelos (**KNN** e **PLS-DA**). Enquanto a amostra **AC07** foi classificada como *B. variegata* apenas pelo modelo **KNN**. As Figuras 4.38 e 4.39 ilustram os cromatogramas das amostras comerciais e padrão destas três ocorrências.

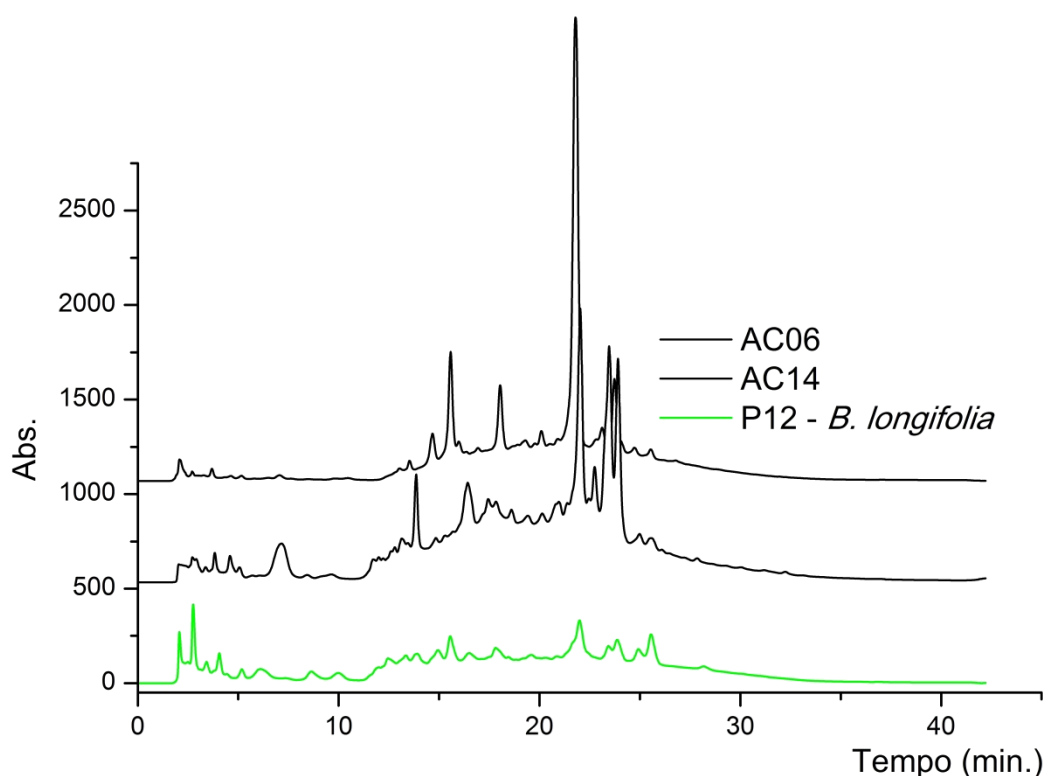


Figura 4. 38 Cromatogramas das amostras comerciais **AC06** e **AC14** que foram determinadas como *B. longifolia* pelos modelos **KNN** e **PLS-DA** concomitantemente.

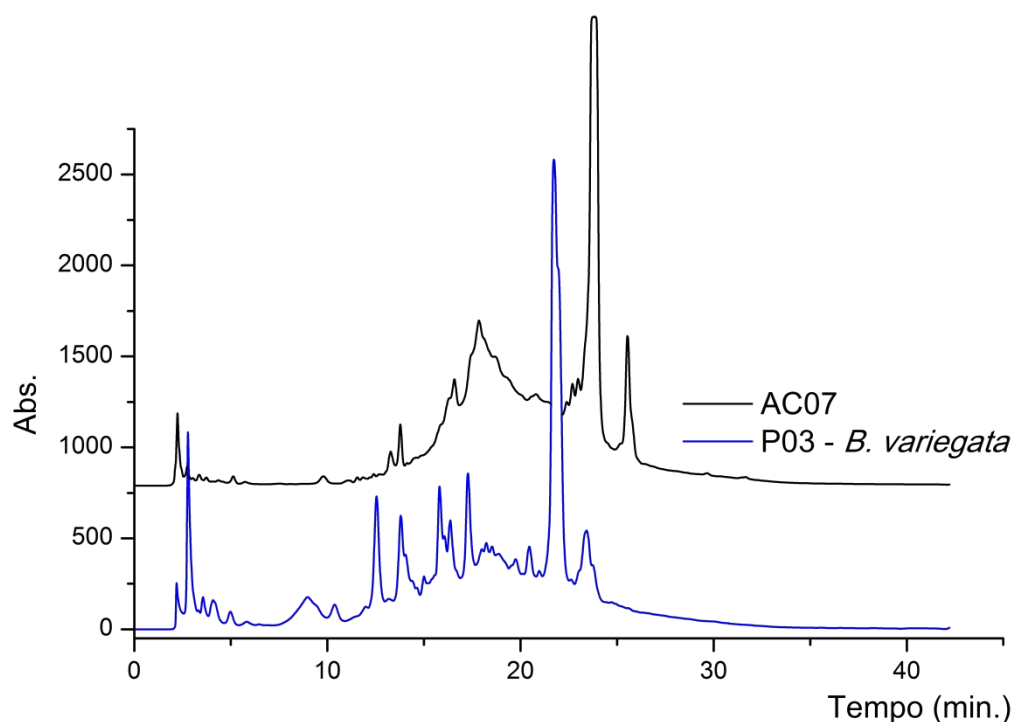


Figura 4. 39 Cromatograma da amostra comercial **AC07** que foi determinada como *B. variegata* pelo modelo **KNN**.

A amostra **AC05** que trazia a informação de pertencer à espécie *B. forficata* apresentada no rótulo teve sua espécie determinada como tal por dois modelos simultaneamente, **KNN** e **SIMCA**. Também da espécie *B. forficata* segundo o rótulo, a amostra **AC08** foi classificada como tal pelos três modelos concomitantemente. A **Figura 4.39** ilustra os cromatogramas destes casos.

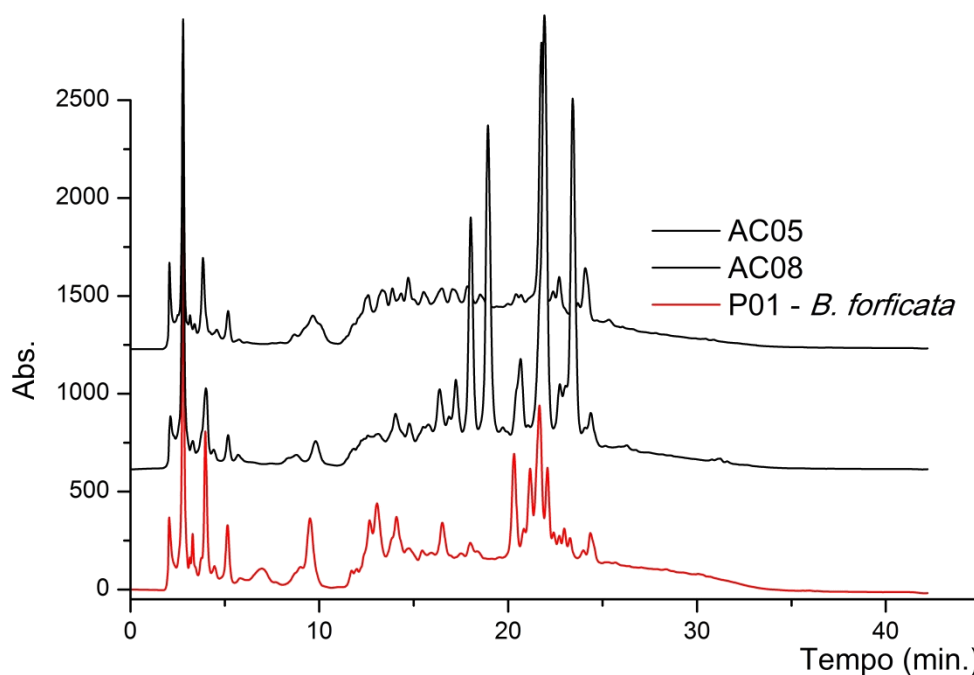


Figura 4. 40 Cromatogramas das amostras comerciais **AC05** e **AC08** que foram determinadas como *B. forficata* pelos modelos **KNN** e **SIMCA**, no caso da **AC05**, e pelos três modelos no caso da **AC08**.

5. CONCLUSÕES

O método validado de extração das amostras vegetais apresentou reprodutibilidade o que viabiliza a posterior utilização das ferramentas de análises quimiométricas. O método de eluição gradiente desenvolvido se mostrou satisfatório já que, após a obtenção dos *fingerprints* dos extratos vegetais, foi possível, não só o alinhamento dos perfis cromatográficos, mas também sua utilização nos modelos quimiométricos de análise exploratória e de classificação.

Com as ferramentas de análise exploratórias foi possível observar o agrupamento das amostras padrão segundo suas espécies no gráfico de *scores* (**PCA**) e também na geração do dendograma (**HCA**), porém quando essas ferramentas foram utilizadas com as amostras comerciais, com a finalidade de classificação, estes métodos não se mostraram satisfatórios. Existiu um leve agrupamento em um quarto grupo de amostras, mas também houve a distribuição dos *spots* por todo gráfico de *scores*. Este fato dificulta a determinação precisa e inequívoca da espécie de amostras desconhecidas utilizando-se tais modelos para este fim.

Com isso, a utilização dos modelos quimiométricos supervisionados de classificação permitiu que amostras comerciais tivessem suas espécies classificadas com maior segurança. Das quinze amostras comerciais utilizadas frente aos modelos, apenas 3 delas foram classificadas como *B. forficata* (**AC01**, **AC05** e **AC08**), 6 delas classificadas como *B. longifolia* (**AC02**, **AC06**, **AC11**, **AC13**, **AC14** e **AC15**) e 4 delas classificadas com *B. variegata* (**AC03**, **AC04**, **AC07**, **AC09**, **AC12**). Apenas para uma das amostras comerciais (**AC10**) não foi possível atribuir uma espécie utilizando-se da classificação das ferramentas, já que não existiu concordância na determinação desta entre os modelos. Para todas as outras esta concordância existiu e permitiu a determinação de suas espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Freitas, A.d., *Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira*. 2007, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Executiva. Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento. Núcleo Nacional de Economia da Saúde: Brasília. p. 28.
2. Carvalho, A.C.B., et al., *Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008. **18**(2): p. 314-319.
3. C. R. C. Dias, N.S.R.-L., *Processo da Implantação da política de medicamentos genéricos no Brasil*. Caderno de Saúde Pública, 2006. **22**(8): p. 1661-1669.
4. Brasil, *Resolução RDC no. 48*, M.d. Saúde, Editor. 2004: Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA
5. Brasil, *Resolução RDC no. 10*, M.d. Saúde, Editor. 2010: Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA.
6. Brasil, *Resolução RE no 899: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, M.d. Saúde, Editor. 2003: Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA.
7. Gobbo-Neto, L., Lopes .N.P., *Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários*. Química Nova, 2007. **30**(2): p. 374-381.
8. Sonaglio, D., Ortega G. G., Petrovick P.R., Bassani V. L., *Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Vol. 1. 2004, Florianópolis, SC - Porto Alegre: Editora da UFSC.
9. Liang, X.M., et al., *Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(11): p. 2033-2044.
10. Huang, X.D., et al., *Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2004. **812**(1-2): p. 71-84.
11. Jiang, Y., et al., *Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines-A review*. Analytica Chimica Acta, 2010. **657**(1): p. 9-18.
12. Martins, L.R.R., E.R. Pereira, and Q.B. Cass, *Chromatographic profiles of Phyllanthus aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **400**(2): p. 469-481.
13. Jin, X.F., et al., *Chemical fingerprint and quantitative analysis of Salvia plebeia R.Br. by high-performance liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **48**(1): p. 100-104.
14. Li, H., et al., *Simultaneous Chromatographic Fingerprinting and Quantitative Analysis of Flemingia philippinensis by LC-DAD*. Chromatographia, 2009. **70**(3-4): p. 447-454.

15. Guo, M., et al., *Characterization of interaction property of multicomponents in Chinese Herb with protein by microdialysis combined with HPLC*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **556**(1): p. 183-188.
16. Zhou, H., et al., *Rapid identification of Vinca alkaloids by direct-injection electrospray ionisation tandem mass spectrometry and confirmation by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. *Phytochemical Analysis*, 2005. **16**(5): p. 328-333.
17. Nagy, K., et al., *High performance liquid chromatography-mass spectrometry based chemometric characterization of olive oils*. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1078**(1-2): p. 90-97.
18. Qian, G.S., et al., *Differentiation of Rhizoma Et Radix Polygoni Cuspidati from closely related herbs by HPLC fingerprinting*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2006. **54**(8): p. 1179-1186.
19. Chen, Y., et al., *Quality control and original discrimination of Ganoderma lucidum based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **623**(2): p. 146-156.
20. Fu, C.M., et al., *Improved chromatographic fingerprints for facile differentiation of two Ganoderma spp.* *Biomedical Chromatography*, 2009. **23**(3): p. 280-288.
21. Garza-Juarez, A., et al., *Development and Validation of Fingerprints of Turnera diffusa Extracts Obtained by Use of High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Chemometric Methods*. *Acta Chromatographica*, 2009. **21**(2): p. 217-235.
22. Hoai, N.N., et al., *Development of HPLC fingerprints for Mallotus species extracts and evaluation of the peaks responsible for their antioxidant activity*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009. **50**(5): p. 753-763.
23. Koh, H.L., et al., *Detection of aristolochic acid I, tetrandrine and fangchinoline in medicinal plants by high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006. **40**(3): p. 653-661.
24. Zhao, Y.Y., et al., *An expeditious HPLC method to distinguish Aconitum kusnezoffii from related species*. *Fitoterapia*, 2009. **80**(6): p. 333-338.
25. Lau, A.J., et al., *High-performance liquid chromatographic method with quantitative comparisons of whole chromatograms of raw and steamed Panax notoginseng*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1057**(1-2): p. 141-149.
26. Zhao, Y.-y., et al., *An expeditious HPLC method to distinguish Aconitum kusnezoffii from related species*. *Fitoterapia*, 2009. **80**(6): p. 333-338.
27. Arnoldi, L., et al., *HPLC-DAD-MS identification of bioactive secondary metabolites from Ferula communis roots*. *Fitoterapia*, 2004. **75**(3-4): p. 342-354.
28. Wang, X.-H., et al., *Study of the destructive effect to inherent quality of Angelicae dahuricae radix (Baizhi) by sulfur-fumigated process using chromatographic finger-*

- printing analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **49**(5): p. 1221-1225.
29. Ni, Y., et al., *Multi-wavelength HPLC fingerprints from complex substances: An exploratory chemometrics study of the Cassia seed example*. Analytica Chimica Acta, 2009. **647**(2): p. 149-158.
 30. Ehab, A.A., et al., *HPLC fingerprinting and estimation of the bioactive components of *Clutia richardiana* L. as a potential hypoglycemic herbal tea*. Phytotherapy Research, 2003. **17**(6): p. 657-660.
 31. Alpana, S., et al., *Chemical fingerprinting of *Andrographis paniculata* using HPLC, HPTLC and densitometry*. Phytochemical Analysis, 2004. **15**(5): p. 280-285.
 32. Famei, L., et al., *Fingerprint analysis of Flos Lonicerae japonicae using binary HPLC profiling*. Biomedical Chromatography, 2006. **20**(6-7): p. 634-641.
 33. Xie, G., et al., *Fingerprint Analysis of Flos Carthami by Pressurized CEC and LC*. Chromatographia, 2006. **64**(11): p. 739-743.
 34. Grata, E., et al., *Metabolite profiling of plant extracts by ultra-high-pressure liquid chromatography at elevated temperature coupled to time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(30): p. 5660-5668.
 35. Ni, Y., Y. Peng, and S. Kokot, *Fingerprinting of complex mixtures with the use of high performance liquid chromatography, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and chemometrics*. Analytica Chimica Acta, 2008. **616**(1): p. 19-27.
 36. Chen, J., et al., *Analysis of alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by accelerated solvent extraction combined with ultra performance liquid chromatographic analysis with photodiode array and tandem mass spectrometry detections*. Analytica Chimica Acta, 2008. **613**(2): p. 184-195.
 37. Liu, M., et al., *Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae**. Journal of Chromatography A, 2007. **1157**(1-2): p. 51-55.
 38. Daolio, C., et al., *Classification of commercial *catuaba* samples by NMR, HPLC and chemometrics*. Phytochemical Analysis, 2008. **19**(3): p. 218-228.
 39. He, K., et al., *Cimicifuga species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products*. Journal of Chromatography A, 2006. **1112**(1-2): p. 241-254.
 40. Gomes, S.V.F., et al., *Differentiation of *Lippia gracilis* Schauer Genotypes by LC Fingerprint and Chemometrics Analyses*. Chromatographia, 2010. **72**(3-4): p. 275-280.
 41. Meng, J., et al., *Establishment of HPLC-DAD-MS Fingerprint of Fresh *Houttuynia cordata**. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2005. **53**(12): p. 1604-1609.
 42. Cai, M., et al., *Chemical fingerprint analysis of rhizomes of *Gymnadenia conopsea* by HPLC-DAD-MSn*. Journal of Chromatography B, 2006. **844**(2): p. 301-307.

43. Hu, P., et al., *Quality Assessment of Radix Salviae Miltiorrhizae*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2005. **53**(5): p. 481-486.
44. Zhao, K.J., et al., *Molecular Genetic and Chemical Assessment of Radix Angelica (Danggui) in China*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(9): p. 2576-2583.
45. Lu, G.-H., et al., *Development of high-performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing Chinese Angelica from related umbelliferae herbs*. Journal of Chromatography A, 2005. **1073**(1-2): p. 383-392.
46. Wang, S., et al., *Fingerprint quality control of Angelica sinensis (Oliv.) Diels by high-performance liquid chromatography coupled with discriminant analysis*. Talanta, 2007. **72**(2): p. 434-436.
47. Xu, S., et al., *Species differentiation and quality assessment of Radix Paeoniae Rubra (Chi-shao) by means of high-performance liquid chromatographic fingerprint*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(11): p. 2163-2168.
48. Schaneberg, B.T., et al., *The role of chemical fingerprinting: application to Ephedra*. Phytochemistry, 2003. **62**(6): p. 911-918.
49. Wei-Na, G., L. Jian-Guang, and K. Ling-Yi, *Quality evaluation of *Hpericum japomicum* by using high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detector and electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Biomedical Chromatography, 2009. **23**(9): p. 1022-1030.
50. Nguyen Hoai, N., et al., *Development of HPLC fingerprints for Mallotus species extracts and evaluation of the peaks responsible for their antioxidant activity*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **50**(5): p. 753-763.
51. Garza-Juárez, A., et al., *Development and validation of fingerprints of Turnera diffusa extracts obtained by use of high-performance liquid chromatography with diode array detection and chemometric methods*. Acta Chromatographica, 2009. **21**(2): p. 217-235.
52. Innocenti, M., et al., *Evaluation of the Phenolic Content in the Aerial Parts of Different Varieties of Cichorium intybus L.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(16): p. 6497-6502.
53. Qian, G., et al., *Differentiation of Rhizoma Et Radix Polygoni Cuspidati from Closely Related Herbs by HPLC Fingerprinting*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2006. **54**(8): p. 1179-1186.
54. Yan, Z., et al., *Analyses of *Stemona* alkaloids in *Stemona tuberosa* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(6): p. 1030-1038.
55. Kang, J., et al., *Chromatographic fingerprint analysis and characterization of furcoumarins in the roots of Angelica dahurica by HPLC/DAD/ESI-MSn technique*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **47**(4-5): p. 778-785.

56. Zhang, X.-G., et al., *Chemical Fingerprinting and Hierarchical Clustering Analysis of Centella asiatica from Different Locations in China*. Chromatographia, 2009. **69**(1): p. 51-57.
57. Chaudhary, M.I., et al., *Clematis huchouensis TAMURA: A Traditional Chinese Herbal Medicine and Its Quality Control Using a High Performance Liquid Chromatography Technique*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007. **30**(1): p. 165-168.
58. Chen, Y., et al., *Quality control and original discrimination of Ganoderma lucidum based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods*. Analytica Chimica Acta, 2008. **623**(2): p. 146-156.
59. Chun-Mei, F., et al., *Improved chromatographic fingerprints for facile differentiation of two *Ganoderma* spp.* Biomedical Chromatography, 2009. **23**(3): p. 280-288.
60. Wu, J.-Z., et al., *Evaluation of the quality of lotus seed of Nelumbo nucifera Gaertn from outer space mutation*. Food Chemistry, 2007. **105**(2): p. 540-547.
61. Chen, J., et al., *Development of a quality evaluation system for Panax quinquefolium. L based on HPLC chromatographic fingerprinting of seven major ginsenosides*. Microchemical Journal, 2007. **85**(2): p. 201-208.
62. Yi, L.-z., et al., *Quality control and discrimination of Pericarpium Citri Reticulatae and Pericarpium Citri Reticulatae Viride based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and multivariate statistical analysis*. Analytica Chimica Acta, 2007. **588**(2): p. 207-215.
63. Lee, M.K., et al., *Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of Prunellae Spica: Determination of triterpenic acids*. Analytica Chimica Acta, 2009. **633**(2): p. 271-277.
64. Zhang, L., et al., *Development of the Fingerprints for the Quality Evaluation of Scutellariae Radix by HPLC-DAD and LC-MS-MS*. Chromatographia, 2007. **66**(1): p. 13-20.
65. Wang, L., D. Zhao, and Y. Liu, *Quality Assessment of Veratrum nigrum L. by LC-ELSD Fingerprints and LC Quantitative Analysis*. Chromatographia, 2008. **68**(11): p. 961-967.
66. Tian, R.-t., P.-s. Xie, and H.-p. Liu, *Evaluation of traditional Chinese herbal medicine: Chaihu (Bupleuri Radix) by both high-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic fingerprint and chemometric analysis*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(11): p. 2150-2155.
67. Jiang, Y., et al., *Differentiation of Herba Cistanches by fingerprint with high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(11): p. 2156-2162.
68. He, Z.-D., et al., *Authentication and Quantitative Analysis on the Chemical Profile of Cassia Bark (Cortex Cinnamomi) by High-Pressure Liquid Chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(7): p. 2424-2428.
69. Lü, J.-L., et al., *Quality Evaluation of Angelica sinensis by Simultaneous Determination of Ten Compounds Using LC-PDA*. Chromatographia, 2009. **70**(3): p. 455-465.

70. Li, W., et al., *Chromatographic fingerprint analysis of Cephalotaxus sinensis from various sources by high-performance liquid chromatography-diodearray detection-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **45**(1): p. 38-46.
71. Liu, C.-Z., H.-Y. Zhou, and Q. Yan, *Fingerprint analysis of Dioscorea nipponica by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection*. Analytica Chimica Acta, 2007. **582**(1): p. 61-68.
72. Chen, Y., et al., *Development of a chromatographic fingerprint for the chloroform extracts of Ganoderma lucidum by HPLC and LC-MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **47**(3): p. 469-477.
73. Staerk, D., et al., *Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC-PDA-MS-SPE-NMR: Quinolinone alkaloids of Haplophyllum acutifolium*. Phytochemistry, 2009. **70**(8): p. 1055-1061.
74. Wolfender, J.L., K. Ndjoko, and K. Hostettmann, *Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites*. Journal of Chromatography A, 2003. **1000**(1-2): p. 437-455.
75. Kurt Hostettmann, E.F.Q., Paulo C. Vieira, *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. Vol. IV. 2003, São Carlos: EdUFSCar - Editora da Universidade Federal de São Carlos.
76. Marston, A. and K. Hostettmann, *Natural Product Analysis over the Last Decades*. Planta Medica, 2009. **75**(7): p. 672-682.
77. Zheng-Ming, Q., et al., *Binding study of Flos Lonicerae Japonicae with bovine serum albumin using centrifugal ultrafiltration and liquid chromatography*. Biomedical Chromatography, 2008. **22**(2): p. 202-206.
78. Su, X.Y., et al., *Screening and analysis of bioactive compounds with biofingerprinting chromatogram analysis of traditional Chinese medicines targeting DNA by microdialysis/HPLC*. Journal of Chromatography A, 2005. **1076**(1-2): p. 118-126.
79. Beigi, F., Y. Qing, and P. Lundahl, *Immobilized-liposome chromatographic analysis of drug partitioning into lipid bilayers*. Journal of Chromatography A, 1995. **704**(2): p. 315-321.
80. Liu, X.-Y., et al., *Effect of liposome type and membrane fluidity on drug-membrane partitioning analyzed by immobilized liposome chromatography*. Journal of Chromatography A, 2001. **913**(1-2): p. 123-131.
81. Liu, X.-Y., et al., *Immobilized liposome chromatography to study drug-membrane interactions: Correlation with drug absorption in humans*. Journal of Chromatography A, 2002. **961**(1): p. 113-118.
82. He, L., S. Wang, and X. Geng, *Coating and fusing cell membranes onto a silica surface and their chromatographic characteristics*. Chromatographia, 2001. **54**(1): p. 71-76.
83. Zhang, W.P., et al., *Screening and Identification of Permeable Components of Radix et Rhizoma Rhei Extract by Use of Immobilized Artificial Membrane Chromatography*. Chromatographia, 2009. **70**(9-10): p. 1321-1326.

84. Zhang, W., et al., *Screening and Identification of Permeable Components of Radix et Rhizoma Rhei Extract by Use of Immobilized Artificial Membrane Chromatography*. Chromatographia, 2009. **70**(9): p. 1321-1326.
85. Sheng, L.-H., et al., *Separation of compounds interacting with liposome membrane in combined prescription of traditional Chinese medicines with immobilized liposome chromatography*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005. **38**(2): p. 216-224.
86. Wang, H., et al., *Screening and analysis of biologically active compounds in Angelica sinensis by molecular biochromatography*. Chromatographia, 1999. **50**(7): p. 439-445.
87. Wang, H.L., et al., *Fractionation and analysis of Artemisia capillaris Thunb. by affinity chromatography with human serum albumin as stationary phase*. Journal of Chromatography A, 2000. **870**(1-2): p. 501-510.
88. Tian, R., et al., *Characterization of small-molecule-biomacromolecule interactions: From simple to complex*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(9): p. 810-825.
89. Su, X.Y., et al., *Affinity chromatography with immobilized DNA stationary phase for biological fingerprinting analysis of traditional Chinese medicines*. Journal of Chromatography A, 2007. **1154**(1-2): p. 132-137.
90. Carvalho, P.E.R.d., *Espécies arbóreas Brasileiras*. 21 ed. Vol. 01. 2003, Colombo, PR: Embrapa informação tecnológica.
91. Site:
www.geocities.com/regismesquita/for111.jpg&imgrefurl=http://www.geocities.com/regismesquita/fortificata.html&h=274&w=365&sz=51&hl=ptBR&start=2&tbnid=gBK06K7e6y9wCM:&tbnh=91&tbnw=121&prev=/images%3Fq%3Dpata%2Bde%2Bvaca%26qbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Dpt-BR%26sa%3DG.
92. Site:
http://webdrm.cpqba.unicamp.br/cpma/banco_de_dados/index.php?centro=select&N_ENTRADA=1681.
93. Lorenzi, H. and F.J. Matos, *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. 2 ed. Vol. 1. 2002, Nova Odessa, SP: Plantarum.
94. Frankish, N., et al., *Enhancement of Insulin Release from the beta-Cell Line INS-1 by an Ethanolic Extract of Bauhinia variegata and Its Major Constituent Roseoside*. Planta Medica, 2010. **76**(10): p. 995-997.
95. Cechinel, V., *Chemical Composition and Biological Potential of Plants from the Genus Bauhinia*. Phytotherapy Research, 2009. **23**(10): p. 1347-1354.
96. da Cunha, A.M., et al., *Hypoglycemic activity of dried extracts of Bauhinia forficata Link*. Phytomedicine, 2010. **17**(1): p. 37-41.
97. Pepato, M.T., et al., *Anti-diabetic activity of Bauhinia forficata decoction in streptozotocin-diabetic rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2002. **81**(2): p. 191-197.

98. Pinheiro, T.S.D.B., et al., *Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of Bauhinia forficata Link*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(2): p. 431-436.
99. Sartorelli, P. and D.S. Correa, *Constituents of essential oil from Bauhinia forficata link*. Journal of Essential Oil Research, 2007. **19**(5): p. 468-469.
100. Silva K. L. and Cechinel Filho V., *Plantas do gênero Bauhinia: Composição química e potencial farmacológico*. Química Nova, 2002. **25**(3): p. 449-454.
101. Raj Kapoor, B., B. Jayakar, and N. Muruges, *Antitumour activity of Bauhinia variegata on Dalton's ascitic lymphoma*. Journal of Ethnopharmacology, 2003. **89**(1): p. 107-109.
102. Pokhrel, N.R., R.P. Adhikari, and M.P. Baral, *In-vitro evaluation of the antimicrobial activity of Bauhinia variegata, locally known as koiralo*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002. **18**(1): p. 69-71.
103. Fuentes, O., P. Arancibia-Avila, and J. Alarcon, *Hypoglycemic activity of Bauhinia candicans in diabetic induced rabbits*. Fitoterapia, 2004. **75**(6): p. 527-532.
104. Almeida, E.R., et al., *Hypoglycemic effect of Bauhinia cheilandra in rats*. Fitoterapia, 2006. **77**(4): p. 276-278.
105. Bodakhe, S.H. and A. Ram, *Hepatoprotective properties of Bauhinia variegata bark extract*. Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2007. **127**(9): p. 1503-1507.
106. Mohamed, M.A. and M. Rabee, *Anti-inflammatory activity of a new triterpenoidal saponin from Bauhinia variegata Linn. (Fabaceae)*. Planta Medica, 2007. **73**(9): p. 914-915.
107. Agrawal, R.C. and S. Pandey, *Evaluation of Anticarcinogenic and Antimutagenic Potential of Bauhinia variegata Extract in Swiss Albino Mice*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2009. **10**(5): p. 913-916.
108. Raj Kapoor, B., N. Muruges, and D.R. Krishna, *Cytotoxic activity of a flavanone from the stem of Bauhinia variegata Linn*. Natural Product Research, 2009. **23**(15): p. 1384-1389.
109. Engel, I.C., et al., *Controle de qualidade de drogas vegetais a base de Bauhinia forficata Link (Fabaceae)*. Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2008. **18**(2): p. 258-264.
110. Neto, B.D.B., I.S. Scarminio, and R.E. Bruns, *25 years of chemometrics in Brazil*. Química Nova, 2006. **29**(6): p. 1401-1406.
111. Poppi, R.J., *Quantificação de picos cromatográficos superpostos por métodos de calibração multivariada*, in Departamento de Química. 1989, Unicamp: Campinas.
112. Vandeginste, B.G.M., *Chemometrics - General Introduction and Historical Development*. Topics in Current Chemistry, 1987. **141**: p. 1-42.

113. Wold, S., K. Esbensen, and P. Geladi, *Principal Component Analysis*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1987. **2**(1-3): p. 37-52.
114. Ni, Y.N., et al., *Multi-wavelength HPLC fingerprints from complex substances: An exploratory chemometrics study of the Cassia seed example*. Analytica Chimica Acta, 2009. **647**(2): p. 149-158.
115. Yi, L.Z., et al., *Fingerprinting alterations of secondary metabolites of tangerine peels during growth by HPLC-DAD and chemometric methods*. Analytica Chimica Acta, 2009. **649**(1): p. 43-51.
116. Qin, X.M., et al., *Discrimination of Three Medicinal Materials from the Citrus Genus by HPLC Fingerprint Coupled With Two Complementary Software*. Phytochemical Analysis, 2009. **20**(4): p. 307-313.
117. Ni, Y.N., Y.Y. Peng, and S. Kokot, *Fingerprinting of complex mixtures with the use of high performance liquid chromatography, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and chemometrics*. Analytica Chimica Acta, 2008. **616**(1): p. 19-27.
118. Ye, J., et al., *Chemical fingerprinting of Liuwei Dihuang Pill and simultaneous determination of its major bioactive constituents by HPLC coupled with multiple detections of DAD, ELSD and ESI-MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **49**(3): p. 638-645.
119. Zheng, L., et al., *A chemometric study of chromatograms of tea extracts by correlation optimization warping in conjunction with PCA, support vector machines and random forest data modeling*. Analytica Chimica Acta, 2009. **642**(1-2): p. 257-265.
120. Xu, C.J., et al., *Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines*. Journal of Chromatography A, 2006. **1134**(1-2): p. 253-259.
121. van Nederkassel, A.M., et al., *A comparison of three algorithms for chromatograms alignment*. Journal of Chromatography A, 2006. **1118**(2): p. 199-210.
122. Eilers, P.H.C. and G.B. Dijksterhuis, *A parametric model for time-intensity curves*. Food Quality and Preference, 2004. **15**(3): p. 239-245.
123. Pravdova, V., B. Walczak, and D.L. Massart, *A comparison of two algorithms for warping of analytical signals*. Analytica Chimica Acta, 2002. **456**(1): p. 77-92.
124. Nielsen, N.P.V., J.M. Carstensen, and J. Smedsgaard, *Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping*. Journal of Chromatography A, 1998. **805**(1-2): p. 17-35.
125. Gong, F., et al., *Correction of retention time shifts for chromatographic fingerprints of herbal medicines*. Journal of Chromatography A, 2004. **1029**(1-2): p. 173-183.
126. Li, F.M., et al., *Fingerprint analysis of Flos Lonicerae japonicae using binary HPLC profiling*. Biomedical Chromatography, 2006. **20**(6-7): p. 634-641.
127. Xie, P.S., et al., *Chromatographic fingerprint analysis - a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine*. Journal of Chromatography A, 2006. **1112**(1-2): p. 171-180.

128. Lonni, A.A.S.G., et al., *Differentiation of species of the Baccharis genus by HPLC and chemometric methods*. Analytical Sciences, 2003. **19**(7): p. 1013-1017.
129. Soares, P.K. and I.S. Scarminio, *Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus Bauhinia*. Phytochemical Analysis, 2008. **19**(1): p. 78-85.
130. Q. B. Cass, R.F.G., S. A. Calafatti, J. Pedrazolli Jr., *Determination of amoxicillin in human plasma by direct injection and coupled-column high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2003. **987**(1-2): p. 235-241.
131. Site: <http://www.centroflora.com.br/>.
132. Martins, L.R.R., *Perfil Cromatográfico e Análise Multivariada para o Controle de Qualidade de Amostras Comerciais do gênero Phyllanthus (quebra-pedra)*, in *Departamento de Química*. 2009, UFSCar: São Carlos.
133. Skov T., v.d.B.F., Tomasi G., Bro R., *Automated alignment of chromatographic data*. Journal of Chemometrics, 2006. **20**: p. 484-497.
134. Abourashed, E.A., et al., *HPLC fingerprinting and estimation of the bioactive components of Clutia richardiana L. as a potential hypoglycemic herbal tea*. Phytotherapy Research, 2003. **17**(6): p. 657-660.
135. Faghihi, J., et al., *Reproducibility of the high-performance liquid chromatographic fingerprints obtained from two soybean cultivars and a selected progeny*. Journal of Chromatography A, 2001. **915**(1-2): p. 61-74.
136. Lee, M.K., et al., *Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of Prunellae Spica: Determination of triterpenic acids*. Analytica Chimica Acta, 2009. **633**(2): p. 271-277.
137. Ji, Y.B., et al., *Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2005. **1066**(1-2): p. 97-104.
138. Gong, F., et al., *Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control*. Journal of Chromatography A, 2003. **1002**(1-2): p. 25-40.
139. Snyder, L.R., J.J. Kirkland, and J.L. Glajch, *Gradient elution*, in *Practical HPLC Method Development* 1997, Wiley: New York. p. 350-400.
140. Wang, Y., et al., *LC Fingerprint and Hierarchical Cluster Analysis of Crocus sativus L. from Different Locations in China*. Chromatographia, 2009. **70**(1-2): p. 143-149.
141. Tian, R.T., P.S. Xie, and H.P. Liu, *Evaluation of traditional Chinese herbal medicine: Chaihu (Bupleuri Radix) by both high-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic fingerprint and chemometric analysis*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(11): p. 2150-2155.