Maria Célia Hibari Reimberg

**Estudo de algumas variáveis que interferem na concentração de
flavonóides do cultivo de folhas de de *Passiflora incarnata* L.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências (Química Analítica)

Orientadora: Profa. Dra. Janete H. Yariwake

São Carlos

2006

DEDICATÓRIA

À Profa. Elizabeth Teràn (*in memorian*) , com muita admiração , gratidão e saudade por todo o respeito, incentivo e integridade que promoveu a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Janete H. Yariwake pela paciência , compreensão e ensinamentos.

Aos meus pais , Pedro e Maria e meus irmãos pelo apoio incondicional.

Ao Grupo Centroflora por todo o suporte e viabilização deste trabalho.

À Dra. Márcia M.C. Ferreira, pelo inestimável auxílio.

Aos meus companheiros do campo experimental , sem os quais não seria possível realizar o trabalho : Beatriz, Raquel e Prof. Jorge.

Aos meus companheiros de trabalho no laboratório: Vera Roife, Fernanda, Carla, Renata, Aline, Katbe, Patrícia, Sandra, Deise, Luciana, Irani , Vera Lúcia , Eliana , Melissa e Marcelo.

Ao Instituto de Química de São Carlos por todo o suporte.

Ao amigo Renato, companheiro nas horas difíceis.

A Deus.

"Penso 99 vezes e nada descubro. Deixo de pensar, mergulho no silêncio, e a verdade me é revelada."

Albert Einstein

RESUMO

O gênero *Passifloraceae* possui mais de 400 espécies, sendo uma delas *Passiflora incarnata* L., detentora de diversas aplicações, principalmente no âmbito farmacêutico como uma planta capaz de atuar no sistema nervoso central para o tratamento de distúrbios da ansiedade. As substâncias mais abundantes existentes nas folhas dessa espécie pertencem à classe dos flavonóides, principalmente os C-glicosilados, que podem estar diretamente relacionados à atividade farmacológica da planta. Assim, o objetivo do presente trabalho, foi avaliar a influência (ou não) de fatores externos na concentração dos flavonóides, em um cultivo experimental realizado na região de Botucatu. Os flavonóides analisados foram a luteolina, homoorientina, vitexina, isovitexina e orientina, com sua quantificação realizada por HPLC-UV/DAD e expressos em flavonóides totais calculados com base no padrão de rutina, através do método descrito por Pereira (2002). Realizou-se a correlação quimiométrica destes resultados pela análise multivariada, através de PCA (análise de componentes principais) e HCA (análise hierárquica de agrupamentos), para avaliar se ocorreu a influência direta de determinados elementos do solo (pH, macronutrientes e micronutrientes) e do ambiente (temperatura e umidade) no teor de flavonóides encontrados nas folhas. Concluiu-se que as amostras se apresentaram de forma heterogênea no decorrer do cultivo (quanto à classificação), porém que alguns minerais presentes no solo (por exemplo, ferro, boro e cobre), possuem relação inversa à concentração dos flavonóides totais encontrados nas folhas de *P. incarnata*.

ABSTRACT

Passifloraceae genus has more than 400 species and one of them is *Passiflora incarnata* L., which holds different application, mainly on the pharmaceutical scope as an herb capable to act on the central nervous system to the treatment of anxiety disturbs. The more copious compounds that exist on the leaves of this specie belong to flavonoid category, mainly C-glicosilates that could have direct relationship with pharmacologic properties of the herb. So, the objective of this task was to evaluate concentration in experimental growth made on Botucatu's place. Analysed flavonoids were luteolin, homoorientin, vitexin, isovitexin and orientin, which were quantified by HPLC-UV/DAD and expressed as total flavonoids as rutin, through described method from Pereira (2002). Results were analysed through chemometric's correlation, with PCA (principal components analysis) and HCA (hierarchic clusters analysis), to evaluate if some soil members (pH, macro and micronutrients) and ambient members (temperature and humidity) affected or not the flavonoids content on the leaves. It was conclude that all samples appeared heterogeneous in the course of growth, but some members present on the soil (as example iron, cupper and bore), have opposite relationship with total flavonoids content on the leaves of *P. incarnata*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos flavonóides : unidade básica de benzo- γ -pirona	12
Figura 2 – Estrutura de alguns flavonóides encontrados por Marchart et al. [36] em <i>Passiflora incarnata</i>	14
Figura 3 – Estruturas da apigenina e luteolina	15
Figura 4 – Antocianinas, diferenciação em pH básico e pH neutro	19
Figura 5 – Esquematização de um sistema típico de HPLC	21
Figura 6 – Estrutura do grupo silanol	23
Figura 7 – Esquematização da distribuição de equilíbrio do analito	25
Figura 8 – Pico gaussiano visualizado no cromatograma	25
Figura 9 – Esquematização dos eixos em PCA: transformação da informação linear em eixos ortogonais entre si	31
Figura 10 - Croqui esquematizado da área de cultivo experimental de <i>P. incarnata</i> . A numeração de 1 a 11 corresponde aos canteiros preparados para recebimento das sementes e para análise do solo , com números dispostos ao acaso , realizado em triplicata . Árvores foram mantidas para manutenção do ecossistema local.	38
Figura 11 -Fotografias de <i>P. incarnata</i> , observação fenotípica , onde <i>a</i> corresponde aos canteiros 9,10 e 11 (esquerda para a direita) e <i>b</i> ao canteiro 9 com algumas flores, planta mais desenvolvida.	47
Figura 12 -Espectros UV-DAD de alguns padrões de flavonóides	50
Figura 13 -Cromatograma representativo da fração flavonoídica de <i>P. incarnata</i> .	55
Figura 14 -Espectros de absorção dos picos assinalados no cromatograma da figura 13.	56

Figura 15 -Dados brutos : variáveis (a) e scores (b)	63
Figura 16 -Relação amostras: flavonóides totais versus homoorientina	63
Figura 17 -Relação entre flavonóides totais e classes (condições climáticas versus trimestres)	64
Figura 18 -Scores	65
Figura 19 -Loadings	66
Figura 20 -Dendograma obtido após análise de HCA para avaliar os agrupamentos das amostras analisadas de <i>P. incarnata</i> .	67
Figura 21 -Dendograma das variáveis	68
Figura 22 -Loadings : flavonóides totais versus elementos do solo	69
Figura 23 -Visualização gráfica de outliers ou amostras anômalas	70
Figura 24 -Dendograma com apresentação de três clusters ou categorias a partir dos flavonóides totais e minerais do solo	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações de período, data de amostragem e locais coletados de folhas de <i>P. incarnata</i> .	40
Tabela 2 – Gradiente utilizado para análise por HPLC onde “A” é composto por ácido fórmico a 2% em água e “B” é acetonitrila .	43
Tabela 3 – Resultados das análises do solo	45
Tabela 4 – Parâmetros indicativos da qualidade do solo, Raij[59]	46
Tabela 5 – Condições morfológicas observadas durante as 20 semanas de coleta de amostras de <i>P. incarnata</i> .	48
Tabela 6 - Equações de reta para os padrões de flavonóides .	49
Tabela 7 – Área dos picos e tempos de retenção de orientina , vitexina, isovitexina, homoorientina, luteolina e rutina em diferentes concentrações.	51
Tabela 8 – Tempos de retenção dos picos assinalados no cromatograma da figura 13.	55
Tabela 9 – Resultados das análises de flavonóides totais em <i>P. incarnata</i> (expressos como rutina) , por semana de coleta e período.	57
Tabela 10 - Resultados obtidos em amostra de <i>P. incarnata</i> oriunda da Itália e <i>P. incarnata</i> cultivada no Brasil, conforme os resultados de Pereira [16].	59
Tabela 11 - Avaliação de componentes principais	65
Tabela 12 - Avaliação de componentes principais entre flavonóides totais e elementos do solo .	69
Tabela 13 – Relação entre variáveis e componentes principais	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SNC – Sistema Nervoso Central

RDC 48 – Regulamentação lei determinado pela Anvisa, em que estabelece a legislação para produtos fitoterápicos

HPLC – High Performance Liquid Chromatography – termo em inglês

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

mmol/dm^3 - unidade de medida dos elementos do solo : milimol por decímetro cúbico

mg/dm^3 - unidade de medida dos elementos do solo : miligrama por decímetro cúbico

M.O. – matéria orgânica

CTC – capacidade de troca catiônica

V% - Volume porcentual, correspondente à SB (soma das bases) dividido pelo CTC x 100

UV – Ultravioleta

IV – Infravermelho

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

CE- MS- Eletroforese capilar acoplada a espectrômetro de massas

NMR – Ressonância nuclear magnética

HPTLC –

ESI - ionização eletrospray

HCl – ácido clorídrico

KOH – hidróxido de potássio

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

N – número de pratos teóricos calculado como

H – altura equivalente a um prato teórico calculado como

DM – coeficiente de difusão do analito na fase móvel

DE – coeficiente de difusão do analito na fase estacionária

k – fator de retenção

APCI-MS - Ionização à pressão atmosférica acoplado a espectrômetro de massas

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Passiflora incarnata</i> Linné	1
1.2. Cultivo	4
1.3. Agricultura Orgânica	7
1.4. Flavonóides	11
1.5. Análise por HPLC	20
1.6. Análise quimiométrica	29
1.7. Objetivos deste trabalho	36
 CAPÍTULO 2- EXPERIMENTAL	 38
2.1. Cultivo de <i>Passiflora incarnata</i>	38
2.2. Coleta do material vegetal	39
2.3. Parte analítica – materiais e reagentes	41
2.4. Extração do material vegetal	42
2.5. Análise por HPLC- UV/DAD	43
2.6. Tratamento de dados por quimiometria	44

CAPÍTULO 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1. Análise do solo	45
3.2. Aspectos fenotípicos e morfológicos	47
3.3. Análise por HPLC	49
3.4. Análise quimiométrica	59
 CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO	 72
 CAPÍTULO 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 72

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 *Passiflora incarnata* Linné

Entre as mais de 500 espécies da família *Passifloraceae*, a espécie *Passiflora incarnata* L. é uma das mais estudadas no âmbito farmacológico, principalmente quanto ao uso de suas folhas [1]. Outro aspecto importante dessa planta diz respeito às suas características ornamentais, sendo muito utilizada na América do Norte em jardins, devido à beleza de suas flores [2].

Passiflora incarnata é uma espécie oriunda do hemisfério norte, resistente aos rigorosos invernos nos países em que ocorre [3], sendo de ocorrência natural da região sudeste do EUA. A espécie *P. incarnata* é bastante difundida também pelo cultivo das folhas para o mercado farmacêutico, incluindo o mercado europeu [4].

Os principais estudos farmacológicos relativos à *Passiflora incarnata* L. configuram uma planta que, inicialmente pelo uso popular, apresentou atividade sedativa do Sistema Nervoso Central (SNC) [5], sendo utilizada no tratamento de distúrbios da ansiedade, além de outras aplicações farmacêuticas [5,6,7], em contraste às espécies nativas do Brasil, *P. alata* e *P. edulis* [8,9].

Apesar do mecanismo farmacológico não ter sido devidamente elucidado bem como o estudo da interação das substâncias presentes na espécie *P. incarnata*, sabe-se que dentre várias atividades farmacológicas além da ansiolítica, por exemplo, as folhas podem ser utilizadas no tratamento de insônia [6], auxiliares no tratamento da doença de Parkinson [7], para reversão da tolerância aos opiáceos [10] ou, até mesmo, efeitos afrodisíacos [11].

Para a *Passiflora incarnata*, descrevem-se também os diferentes efeitos no SNC a dosagens ativas entre 100 a 400 mg/Kg, além de efeitos sedativos semelhantes ao pentobarbital [12]. Também apresenta ação depressora do SNC, anticonvulsivante e antiinflamatória [5,12].

Em relação aos estudos de toxicidade de *P. incarnata*, há indícios de segurança e eficiência terapêutica, desde que as folhas sejam administradas em dosagem adequada [13]. Porém, há indicações na literatura quanto a provável interação medicamentosa ou reação de hipersensibilidade na administração do fitomedicamento composto pelas folhas de *P. incarnata*, como por exemplo, toxicidade aguda [14] , rash cutâneo e urticária [15] ; porém, esses casos necessitam ser melhor elucidados.

Além disso, a importância da padronização dos extratos produzidos a partir das folhas de *P. incarnata* é fundamental para a confirmação da qualidade e segurança do fitomedicamento produzido [16], fora a necessidade de avaliação dos resíduos químicos procedentes de agrotóxicos, como por exemplo, os organoclorados e organofosforados [17], pois algumas das reações agudas podem estar relacionadas à hipersensibilidade dos pacientes a esses componentes.

Dentre os vários componentes químicos existentes nas folhas de *P. incarnata*, há os alcalóides de núcleo indólico, carboidratos, aminoácidos, fenóis, maltol, cianoglicosídeos, compostos voláteis, entre outros [9]. Dhawan et al. descrevem a presença de uma molécula inédita, uma benzoflavona, ainda não publicada quanto à sua caracterização devido a uma patente em progresso [12].

Os principais marcadores de *P. incarnata*, devido à abundância dessas substâncias nas folhas são os flavonóides, notadamente os C-glicosilados - isovitexina, luteolina, kaempferol, vitexina , schaftosídeo, entre outros [18]. Para o controle de qualidade no uso de plantas como matéria-prima para a produção de fitomedicamentos, *P. incarnata* é descrita em vários compêndios oficiais , como por exemplo, Farmacopéia Européia [19] , Farmacopéia Portuguesa [20] , Farmacopéia Francesa [21] e pela Comissão E [22] ; podendo ser registrada para a produção de fitomedicamentos conforme o descrito na RDC 48, que regulamenta o mercado brasileiro [23].

Pereira [16] descreveu os parâmetros adequados para a identificação de diferentes espécies de *Passiflora*, sendo que um dos principais focos do trabalho foi a determinação dos flavonóides por métodos analíticos instrumentais (HPLC, HPTLC e LC-MS) como ferramenta para o controle de qualidade da planta, além do uso de métodos macroscópicos e microscópicos de identificação [16, 24].

No Brasil, as principais espécies cultivadas para a indústria (principalmente para a produção de frutos para a indústria de sucos) são a *Passiflora edulis* Sims (ou maracujá azedo) e *Passiflora alata* Dryander (ou maracujá doce) [25], sendo essa última espécie a descrita oficialmente pela Farmacopéia Brasileira [26]. Há pouca informação sobre a adaptação da *P. incarnata* no Brasil para fins comerciais.

Neste trabalho, devido às necessidades do mercado, foi feita a avaliação dos flavonóides em *P. incarnata* e de algumas variáveis no decorrer do processo de cultivo experimental , a fim de se obter um melhor entendimento

sobre as características de *P. incarnata* e sua adaptação na região de Botucatu, interior do estado de São Paulo.

1.2 Cultivo

P. incarnata não é cultivada para a produção de frutos para a indústria de sucos, devido à pouca adaptabilidade da planta no Brasil [27], pois além da baixa produtividade de campo, o fruto não é tão saboroso quanto o das espécies *P. edulis* e *P. alata* para o paladar do brasileiro.

Segundo Bruckner e Picanço [27], os principais estados produtores no Brasil do fruto do maracujá são Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Pará: um bom negócio para essas regiões, pois a cultura do maracujá promove o desenvolvimento dessas regiões, já que o suco de maracujá é o 3º suco mais produzido e vendido no Brasil (em 1º, a laranja e em 2º, o caju).

A espécie *P. incarnata* que pertence ao subgênero *granadilla*, série *incarnatae*, provém principalmente dos EUA com ocorrência nativa naquele país desde o estado da Virgínia ao Missouri, além de outras localidades como a Flórida, Texas, Bermuda, Caribe, Guiana, Guiana Francesa e Venezuela [27].

O nome vulgar de *P. incarnata* é “maracujá vermelho”, sendo as flores polinizadas por abelhas [2, 27], apresentando frutos comestíveis. Apesar da semelhança no âmbito morfológico entre as espécies *P. incarnata* e *P. edulis* [28], há diferenças significativas entre ambas as espécies, já que *P. incarnata* possui brácteas biglandulares e coloração diferenciadas das sépalas, pétalas e corona [27], características distintas em relação à *P. edulis*. No hemisfério

norte, *P. incarnata* é uma trepadeira glabra, com caule cilíndrico, apresentando as folhas próprias para cultivo em regiões temperadas [3].

Geralmente as passifloráceas apresentam como características de cultivo : o florescimento em dias longos, produção de ocorrência durante todo o ano, propagação através de insetos polinizadores notadamente abelhas - no Brasil , mamangavas – sendo que a frutificação da planta depende de polinização adequada, já que a espécie é caracteristicamente alógama, ou seja, originária de cruzamentos [27].

Um dos maiores desafios no cultivo das passifloráceas está na superação de limites tecnológicos, pois o manejo irregular pode acarretar uma baixa qualidade e longevidade das plantações [27]. Às vezes, a *P. incarnata* é utilizada para permitir o cultivo de *P. edulis*, com o intuito de se aumentar a tolerância dessa última espécie ao frio, através de técnicas específicas como por exemplo, a enxertia.

Mc Guire [2] observou o crescimento de *P. incarnata* durante uma estação, na região de Ithaca – estado de Nova Iorque (EUA) , concluindo que as principais variações encontradas se relacionavam à genética. O tempo de abertura das flores, mudanças fenotípicas , variação de densidade e “arquitetura” da planta foram avaliados. Nesse estudo, o cultivo teve início em maio e junho, com o transplante das sementes para o campo, em solo arenoso e bem drenado, sem uso de irrigação e / ou fertilizantes. As flores foram polinizadas manualmente até o mês de agosto, porém sem a exclusão de insetos das flores, que foram produzidas antes do período de inverno, em meados de outubro.

Fiallo [28] descreveu instruções técnicas para o cultivo de *P. incarnata* nas condições climáticas e de solo de Cuba, já que outro cultivo mais comum em Cuba é o de *P. edulis*. Nesse trabalho, descrevem-se características interessantes no decorrer do desenvolvimento de *P. incarnata*, como por exemplo, a formação de raízes rizomáticas de direção ortogonal, promovendo o desenvolvimento de caules subterrâneos [28] (o que pode indicar como a planta se preserva durante os longos períodos de inverno no hemisfério norte) . Há informações relativas ao cuidado para o plantio, tipo de solo, irrigação e controle de pragas, inclusive com o curioso fato de mencionar que *P. incarnata* é do tipo trepadeira no Brasil podendo alcançar até 9 metros de altura [28]. Essa informação provavelmente se deve às confusões de identificação entre as espécies de *P. edulis* e *P. incarnata*, de morfologias semelhantes.

No site “Plants for a Future” [4] são descritas as condições de cultivo para *P. incarnata* no hemisfério norte, com o estabelecimento de características do desenvolvimento da planta nos EUA, como por exemplo: crescimento até 6 metros, planta com folhagem completa, trepadeira e resistente a pragas, doenças e fungos ; necessidade de sol e umidade para promoção do crescimento efetivo. Além disso, há a informação sobre o aparecimento de flores entre junho e julho (primavera) e sementes disponibilizadas entre setembro e novembro.

Técnicas de cultivo de maracujá dentro das condições brasileiras foram descritas por Silva [25] . As espécies comentadas e analisadas tecnicamente quanto ao aspecto agrônomo, foram as espécies comerciais que correspondem atualmente à maior área plantada no território nacional, *P. alata* Dryander e *P. edulis* Sims var. *flavicarpa* Degener. Não há menção ainda de cultivo em escala

comercial de folhas ou de frutos de *P. incarnata* no Brasil, porém há a possibilidade de comercialização de suas sementes no futuro através da Embrapa [29].

Segundo Silva [25], as informações descritivas quanto ao cultivo dos “maracujás” no Brasil compreendem a época de plantio (fevereiro até março, para plantios sem irrigação), solo areno-argiloso profundo e bem drenado, pH do solo entre 6,0 a 6,5 , adubação , polinização manual e necessidade de uso de insumos químicos. Também na descrição de Bruckner e Picanço [27] , a produção para fins industriais do fruto de *P. edulis* indica boa produtividade, principalmente nas regiões norte e nordeste do Brasil, devido às condições de luminosidade e temperatura nessas localizações .

O solo bem drenado , profundo e rico em material orgânico seria o ideal, mas observa-se que a cultura de *P. edulis* é viável em praticamente em todos os solos e tipos de terrenos [27] . Os nutrientes básicos que a cultura de maracujá necessita são, principalmente: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre , ferro, manganês e zinco [27].

1.3 Agricultura orgânica

Atualmente, a nova tendência mundial e, até certo ponto, uma tendência irreversível, é a promoção de ações integradas para a preservação do meio ambiente terrestre – isso também se reverte em práticas agrícolas focadas na preservação, sendo uma das tendências de produção de hortifruti e plantas medicinais, a Agricultura Orgânica.

Além da agricultura orgânica, há várias tendências, com a conseqüente formação de “escolas” que pregam o mesmo objetivo de preservação, como a agricultura biodinâmica, agricultura biológica, agricultura ecológica, agricultura natural e permacultura (ou “ Permanent Agriculture” , termo em inglês) [17].

Como o cultivo de *P. incarnata* analisado neste trabalho, foi baseado na Agricultura Orgânica, é dado ênfase a seguir, na explanação do funcionamento dessa escola.

Quanto maior o conhecimento, a interação entre o governo, a pesquisa agrária, ONGs , agricultores e o próprio consumidor, a agricultura orgânica se mostra mais eficiente, com uma difusão de experiências que realmente demonstram os resultados favoráveis da prática como : produção mais barata, uso de pouca mão-de-obra, riscos menores , ganho de produtividade , qualidade do produto orgânico e respeito ao meio-ambiente, principalmente [17].

O aumento do fomento da agricultura orgânica, principalmente na década de 90, se fez necessário devido ao diagnóstico pouco favorável quanto às práticas “modernas” na agricultura, que ocasionam degradação do solo e erosão devido à produção contínua; contaminação ambiental por resíduos químicos; aumento da resistência de pragas devido à alta incidência de defensivos agrícolas; uso de insumos sintéticos e perda da autonomia no campo do pequeno produtor rural [17] .

Além desses aspectos, o que mais denigre a imagem do uso das técnicas modernas (utilizadas principalmente a partir do século XX) no cultivo de grandes produções agrícolas, diz respeito à contaminação das plantas por resíduos de agrotóxicos, levando a uma alta incidência de intoxicações agudas

em seres humanos ao consumir os produtos oriundos desses cultivos, segundo pesquisa da OMS [17]. A consciência do consumidor, gerada pelo conhecimento e disseminação das informações, bem como a preocupação com o ambiente e a ecologia, fazem com que a agricultura orgânica e o consumo de produtos procedentes desse conceito, sejam significantes em relação à economia local e a determinação de aspectos importantes da qualidade de vida dos indivíduos com tal consciência.

Assim, os pontos positivos da agricultura orgânica, agregam principalmente, qualidade superior (incluindo nutricional) dos produtos orgânicos, plantas saudáveis e sem a presença de agrotóxicos ou adubos químicos. Para um produto ser considerado orgânico, há o estabelecimento de rigorosas técnicas para a preservação da qualidade do produto e do meio ambiente, considerando, também, as relações humanas (sociais e trabalhistas) envolvidas no campo.

Dessa maneira, os métodos e técnicas naturais inseridos no campo de cultivo orgânico são diversificadas de forma a promover o equilíbrio ecológico, com uso de biofertilizantes ou o chamado “adubo verde”, oriundos da matéria orgânica disponível na natureza.

O conceito de agricultura orgânica foi delimitado em 1984 pelo Departamento de Agricultura dos EUA [30], baseado na exploração de forma sustentável a longo prazo, de maneira estável e formação de ecossistemas. Para tanto, a agricultura orgânica deve ser economicamente produtiva, tanto em grande, média e em pequena escala, sempre priorizando as questões sociais envolvidas na prática. Além disso, o uso de recursos naturais é efetuado de forma altamente eficiente, objetivando a longo prazo, à estruturação social e

produtiva, com o intuito de se obter o equilíbrio do ambiente e a preservação da saúde em todos os aspectos (humana, social e ambiental).

O manejo orgânico, com processo de compostagem para a preservação dos nutrientes do solo, bem como o aumento dos níveis de matéria orgânica (que conseqüentemente aumenta os níveis de nutrição e de saúde da planta), são condições prioritárias na agricultura orgânica. Para iniciar esse tipo de processo, há a necessidade prévia de se construir um agrossistema produtivo [17] e/ou a sua conversão, para se conseguir características semelhantes aos ecossistemas naturais, baseados na estabilidade, equilíbrio e produtividade – ou seja, a base ecológica da “sustentabilidade”.

Antes é necessário que ocorra a conversão do ambiente, através de várias ações, como por exemplo [17] : a utilização da reciclagem, uso de fontes renováveis de energia, uso de insumos de ocorrência natural, manejo de pragas, doenças e ervas adventícias (na agricultura orgânica, esse é o nome dado às “ervas daninhas”, como são conhecidas na agricultura convencional).

Com esses cuidados, procura-se o re-estabelecimento das relações biológicas de ocorrência natural, para se obter as melhores alternativas para os padrões de cultivo e como há diversificação, adapta-se o potencial biológico e genético às condições naturais, sem, no entanto, modificá-los (uma das principais causas do desequilíbrio ambiental) [17].

Além disso, com a diversificação fomentada para o estabelecimento do equilíbrio ecológico, permite-se a trofobiose, teoria baseada no conceito que todo ser vivo depende de alimento adequado e disponível no ambiente [17]. Por isso, há a necessidade da conservação dos recursos biológicos , solo, água e energia.

Finalmente, essas ações procuram a sustentabilidade a longo prazo, estabelecendo as relações mais saudáveis possíveis no âmbito educativo, biológico e mesmo normativo – por exemplo, os solos e ambientes de determinado local que antes utilizava-se de técnicas convencionais de cultivo (por exemplo, agrotóxicos) , são considerados “em conversão” na agricultura orgânica, por um período de 2 a 4 anos, até que todo o processo orgânico e de equilíbrio do ecossistema , re-equilíbrio do solo e das relações envolvidas no processo , sejam devidamente efetivadas [31].

No Brasil, os principais certificadores orgânicos são o IBD [31] , Ecocert , entre outros, que estabelecem as normas e diretrizes de produção no processo orgânico – não apenas quanto ao cultivo de hortifruti , mas também quanto ao âmbito de produção animal e de plantas medicinais. A área utilizada para o cultivo experimental de *Passiflora incarnata* , na região de Botucatu, está inserida nesse contexto, cujas observações serão delineadas no capítulos 2 .

1.4 Flavonóides

Em *Passiflora incarnata* encontram-se diversas substâncias, dentre elas, em maior concentração, os flavonóides C-glicosilados [16,32]. Compreende o grupo dos flavonóides várias classes de substâncias : antocianinas, flavanas, proantocianidinas, flavonóides C-glicosilados, flavonóides O-glicosilados, biflavonóides, triflavonóides, isoflavonóides, neoflavonóides, flavonas, flavonóis, flavona e flavonóis glicosilados, chalconas, auronas, diidrochalconas, flavanonas e diidroflavonóis [32].

Os flavonóides são constituídos estruturalmente por uma unidade básica de benzo- γ -pirona, conforme a figura 1.

Figura 1 - Estrutura dos flavonóides: unidade básica de benzo- γ -pirona

Essas várias classes de flavonóides são possíveis de serem encontradas graças ao nível diferenciado de oxidação do anel carbônico, caracterizadas de acordo com o número de grupos hidroxila que podem ser substituídos, além da possibilidade de glicosilação desses grupos [33].

Os cromóforos existentes dos flavonóides se devem à presença de hidroxilas fenólicas [34], conferindo a cor resultante dos flavonóides passíveis de observação a olho nu: por exemplo, para flavonóides glicosilados, coloração amarelada; para antocianinas, cor vermelha a azul [32,34].

Como há uma grande quantidade de flavonóides na natureza que inclusive são encontrados nas Briófitas [33] – as substâncias conhecidas dessa classe chegam ao incrível número de 6000 substâncias identificadas [35], sendo necessária a análise e identificação correta para cada um desses flavonóides. Para tanto, os principais métodos para identificação química são: ressonância nuclear magnética (^1H e ^{13}C NMR), o ultravioleta (UV), além da

espectrometria de massas [32]. As reações de identificação dos flavonóides ocorrem de acordo com a reação da cromona (reações da cianidina, oxalobórica ou pentacloreto de antimônio) ou dos grupos hidroxila ligados aos núcleos aromáticos (reação com base, com sais metálicos ou sais de diazônio), conferindo as respectivas colorações visíveis, para posterior identificação [34].

Antes da identificação propriamente dita, há a necessidade de se separar os flavonóides, com o objetivo de seu isolamento a um alto grau de pureza, necessitando-se, assim, das informações relativas às constantes físicas e espectros de absorção (UV e IV) dos flavonóides em estudo [34].

Como os flavonóides estão nos tecidos superficiais da planta – camadas em paliçada, parênquimas esponjosos [34] – eles se encontram na forma de cristais e substâncias amorfas coradas de amarelo (no caso de heterosídeos) no suco celular da planta. Os flavonóides possuem características físico-químicas pertinentes, sendo solúveis em bases (gerando coloração alaranjada ou amarelada); reagem com KOH a 5% em água (gerando, por exemplo, para a hesperidina, a cor amarela) e com vapores de HCl concentrado, formam cristais de cloreto nas cores amarela (indicando núcleo flavônico) ou avermelhada (núcleo antociânico). Os heterosídeos são pouco solúveis em água fria, mas facilmente solúveis em água quente, solúveis em etanol e metanol, e insolúveis em éter, clorofórmio, benzeno e sulfeto de carbono [34]*.

**Nota: a exceção dessas propriedades diz respeito às flavonas e chalconas, que não se combinam com açúcares, com conseqüente diminuição da solubilidade em água. As reações com formação de cor dessas substâncias também apresentam diferenciação na coloração, geralmente de vermelha a violácea.*

Com ácidos, os heterosídeos flavônicos (formas *O* e *C*-heterósidos) formam sais na forma alcalina, ou os denominados fenolatos que podem ser facilmente decompostos pela água, mas que são mais estáveis que suas formas livres [34]. Assim, com hidróxidos, os flavonóides formam fenolatos solúveis em água, mas que regeneram-se à sua composição original, com adição de ácido em excesso.

Quanto à *Passiflora incarnata*, os flavonóides *C*-glicosilados são os mais abundantes [32], sendo que Marchart et al. [36] encontraram entre vários flavonóides, os seguintes (figura 2) : orientina, 2- vicenina, homoorientina, vitexina e isovitexina.

Figura 2-Estrutura de alguns flavonóides encontrados por Marchart et al.[36] em *Passiflora incarnata*.

Assim , em *P. incarnata* são encontradas C-glicosil-flavonas [32] , derivados da apigenina e luteolina (figura 3) , com substituição nas posições 6 ou 8, indicando características específicas do grupo de flavonóides em relação à sua identificação e quantificação.

Figura 3 – Estruturas da apigenina e luteolina.

Um dos processos para identificação dos flavonóides *C* e *O*-glicosilados, pode ser, por exemplo, pela precipitação ácida, podendo ocorrer a formação de um, dois, três ou uma mistura complexa de produtos, que aliado a sistemas cromatográficos, pode haver distinção entre as substâncias mono- *C*, di-*C* e *O*-glicosilados [32].

As principais colunas utilizadas para a separação dos flavonóides *C*-glicosilados por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência, ou CLAE) , são as colunas de fase reversa [32] . Schaufelberger e Hostettmann [37] , através do uso de cromatografia líquida de fase reversa e detecção com arranjo de diodos (HPLC-DAD) , conseguiu a separação e identificação de vários flavonóides através da derivatização pós –coluna. O mesmo procedimento foi usado na identificação de metoxiflavonas na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) , trabalho descrito por Colombo et al. [38] .

Pela ressonância nuclear magnética (NMR), é possível a identificação do resíduo C6 ou C8, além da identificação da posição dos grupos *O*-glicosila

ou *O*-acila e confirmação da ligação glicosídica formada [32]. Segundo Harborne [32], o uso de solvente DMSO d_6 , tanto para ^{13}C NMR quanto para ^1H NMR é altamente efetivo para os glicosídeos flavonoídicos. No trabalho de Pereira [16], o uso de LC-MS, através de sistema de interface ESI (ionização eletrospray), possibilitou a identificação de vários flavonóides em diversas espécies de *Passiflora*, sendo os principais a orientina, isoorientina, vitexina e a isovitexina para *P. incarnata*.

Quanto à técnica de isolamento de glicosilflavonas, podem ser utilizadas resinas de troca iônica (XAD-2, XAD-8) ou dietilaminoetilcelulose (DEAE). Para as primeiras, ocorre adsorção dos flavonóides (através de forças de van der Waals) e dos fenóis presentes nesses materiais. De acordo com o pKa das substâncias adsorvidas, o uso de diferentes valores de pH na solução de eluição pode promover uma desorção eficiente, com conseqüente liberação dos flavonóides C-glicosilados [32].

No caso da DEAE, com o aumento de pH (para 7,5, por exemplo), ocorre a complexação dos flavonóides com a resina, sendo que a eluição pode ser seletiva para a isovitexina e a isoorientina com o uso de HCl 0,01 M [32].

O custo dos flavonóides isolados pode ser relativamente barato [39], com preços variando de U\$ 16,00 a U\$25,00/Kg – como, por exemplo, a hesperidina e a rutina, devido à facilidade de isolamento dessas substâncias – claro que de acordo com a concentração das mesmas na matéria-prima vegetal [39]. O isolamento, por exemplo, para a hesperidina é feito pelo uso de metanol e adição de base, com formação de fenolatos (sais sódicos, solúveis em metanol) e posterior adição de ácido (por exemplo, H_2SO_4), com conseqüente regeneração da hesperidina através da acidificação. Finalmente, adiciona-se

água, onde a hesperidina precipitada (insolúvel em água), pode ser, assim, isolada [39].

O isolamento por uso de fluido supercrítico também é descrito [40], por exemplo, para a extração de prenilflavonóides do lúpulo (*Humulus lupulus* L.), onde variáveis como solvente, pressão e temperatura foram usados para o aumento de rendimento na extração de alguns flavonóides encontrados nessa planta com potencial uso contra o câncer de mama (isoxantohumol; xantohumol, deidrocicloxantumol) [40].

Em relação às propriedades biológicas, os flavonóides são uma das classes de substâncias mais estudadas nas últimas décadas, com potenciais benefícios à saúde humana, desempenhando papéis fundamentais, inclusive na constituição das plantas. Como são substâncias com mais de 1 bilhão de anos de existência [32], há indícios que os flavonóides possuem papel na evolução de diversas plantas, pois através da diferenciação bioquímica foi possível a existência dessas espécies na superfície terrestre. Encontrados principalmente em plantas vasculares, os flavonóides estão envolvidos em diversos processos das plantas como: fotossensibilização, transferência energética, ação nos hormônios reguladores do crescimento da planta, controle da respiração e fotossíntese, morfogênese e determinação sexual, defesa da planta contra agentes agressores e expressão gênica [32].

Stapleton [41] avaliou que os flavonóides poderiam funcionar como filtros protetores contra os danos causados pela radiação ultravioleta – avaliação confirmada em plantas que eram geneticamente deficientes quanto a essas substâncias (notadamente antocianinas), em *Zea mays*.

Papéis importantes dos flavonóides também se relacionam ao estímulo visual dos insetos para a seleção de comida (atração à planta, portanto) . Por exemplo, a flordizina, flavonóide encontrado na maçã (*Pyrus malus* L.) atrai insetos, enquanto que a isoquercetrina encontrada na amora (*Morus nigra* L.), é importante para atrair o bicho-da-seda [32].

Propriedade oposta, ou seja, a repelência dos insetos também pode ser promovida pelos flavonóides : por exemplo, vitexina em *Triticum aestivum* e rutina em *Lycopersicum esculentum* – que em pequenas quantidades, possuem efetiva ação contra insetos predadores [32]. Assim esses flavonóides, podem ser utilizados para o aumento da resistência natural das plantas, como por exemplo, o uso de proantocianidinas em *Sorghum bicolor* promove a condensação de taninos que protegem a planta contra a ação de insetos e pássaros predadores, além de fungos antes e durante a germinação. O único inconveniente observado foi uma considerável diminuição nos valores nutricionais da planta [32].

Outras propriedades bioquímicas e farmacológicas dos flavonóides se devem à associação com diferentes plantas e animais, podendo ser precursores de substâncias tóxicas [32]. Interessante notar que alguns flavonóides podem ser mutagênicos “*in vitro*” , mas não “*in vivo*”, podendo inclusive inibir a carcinogênese “*in vivo*” . Também apresentam propriedades antialérgicas, antiinflamatórias, antivirais, antiproliferativas e potenciais no tratamento de distúrbios neurológicos e neurodegenerativas [32].

Uma das características dos flavonóides está relacionado à promoção de cor em folhas, flores, frutos , cascas e raízes [34]. Para tal é necessário que haja o acúmulo de flavonóides nos vacúolos das plantas, devendo também

permanecerem estáveis de horas a semanas, sempre dependendo das condições físico-químicas do meio. Os flavonóides também podem sofrer copigmentação devido à associação com outras moléculas químicas (exemplo, proteínas e metais), havendo variação na intensificação das cores e também nos efeitos biológicos [32]. Exemplo disso é a interessante incorporação dos flavonóides às cores das asas de borboletas, devido à existência dessas substâncias nas plantas que são consumidas pelas borboletas : orientina, isoorientina, isovitexina, isovitexina-7-glicosídeo e vitexina 7-glicosídeo [32].

Quanto às chalconas e às auronas, as mesmas apresentam como característica pouca coloração (cor detectável ao olho humano), são altamente estimulantes aos olhos dos insetos. Também há o exemplo das antocianinas, que dependendo do meio (ácido, básico ou neutro), tendem a apresentar diferenciação em sua coloração ($\text{pH} > 7$, coloração avermelhada; $\text{pH} < 7$, coloração azulada), conforme a figura 4, sendo muito utilizadas em química analítica para demonstração do equilíbrio ácido/base (papel indicador de pH, por exemplo) [42].

Figura 4 – Antocianinas, diferenciação em pH básico e pH neutro

Finalmente, os flavonóides também foram descritos e confirmados como substâncias altamente antioxidantes, devido aos grupos fenólicos que compõem a sua estrutura, o que permite o “seqüestro” de radicais livres – vistos como responsáveis pela maioria das doenças degenerativas atuais : câncer, aterosclerose, diabetes, doenças cardio e neurovasculares e o envelhecimento [33].

1.5 Análise por HPLC

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou CLAE (termo em inglês, HPLC), é uma das mais difundidas técnicas cromatográficas da atualidade, popularizada na década de 50 por Martin e Synge (prêmio Nobel de Química em 1952) e utilizada para separação de diversas substâncias, inclusive para análises qualitativas e quantitativas.

É um método que, além de extremamente adequado à separação de substâncias que não se volatizam ou que são termoinstáveis, é bastante conhecido devido à sua agilidade, sensibilidade e acuracidade das medições realizadas através do equipamento, que apesar de sofisticado e de preço elevado, possui aplicabilidade em diversos tipos de matrizes como: fitoterápicos, pesticidas, antibióticos, fármacos em geral, aminoácidos, hidrocarbonetos, carboidratos, entre outros [43].

Como fundamento da técnica, a amostra a ser analisada que contém o soluto (substância de interesse) irá se distribuir entre as fases móvel e

estacionária, proporcionando por diferentes maneiras a separação de acordo com o grau de retenção e tipo de equilíbrio envolvido, como por exemplo: partição entre líquidos, adsorção, troca iônica ou permeação molecular [43].

A fase móvel é um líquido, no caso da HPLC. Já a fase estacionária compreende uma fase fixa de um líquido em sólido, ou sólido fixo, ou material orgânico aderido a uma superfície sólida ou uma resina de troca iônica, ou um líquido presente em um sólido polimérico [43,44] – a fase estacionária é o recheio da “coluna” do sistema. Na representação esquemática dos principais componentes do equipamento de HPLC (figura 5), temos:

Figura 5 – Esquematização de um sistema típico de HPLC

- Reservatório de fase móvel
- Bomba (s) → sem pulsos (até 6000 psi de pressão), com grande flexibilidade para atingir vazões de 0,1 a 10,0 mL.min⁻¹, com reprodutibilidade e pequena margem de erro.

- Válvula injetora ou injetor → geralmente através do uso de microseringa de pressão, utiliza-se o “loop” ou válvula de amostragem para a manutenção do volume constante requerido pela análise (geralmente em μL).
- Coluna → geralmente de tubo de aço inoxidável, capaz de suportar até 6000 psi de pressão, de diversos comprimentos, diâmetros e fases estacionárias com composição determinada, composta por material pelicular (polímero ou vidro não poroso entre 30 e 40 μm) ou poroso (os mais comuns : micropartículas homogêneas de 3 a 10 μm – geralmente de sílica, recobertas por filmes orgânicos diversos).
- Detector → pode ser de absorbância , absorbância acoplado a arranjo de diodos, fluorescência, IR (índice de refração) ou ESLD (espalhamento de luz por evaporação), podendo, também, possuir interface com MS (espectrômetro de massas). Deve ser sensível o bastante para detectar o analito, por isso a necessidade de estabelecimento do volume e do comprimento da célula detectora de menor tamanho possível, para não prejudicar a detecção da substância , já que durante o processo de separação ocorre uma diluição natural do analito.
- Integrador de dados → promove a integração dos dados, geralmente através de um sistema computadorizado, gerando o cromatograma que corresponde ao sinal detectado da concentração do analito em função do tempo.

A separação propriamente dita se inicia pelo bombeamento contínuo do solvente (fase móvel) através da bomba (geralmente de pistão), promovendo o fluxo através da coluna (fase estacionária), forçando a separação do analito em “bandas” no decorrer do comprimento da coluna.

Cada banda é detectada ao término da saída da coluna, através do detector , quando obtém-se o cromatograma pela integração dos dados (sinal analítico em função do tempo).

Dentre os vários tipos de cromatografia, a mais utilizada para a análise de *P. incarnata* [16] é a cromatografia de partição, classificada em dois diferentes tipos: partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária é líquida e de fase ligada, na qual a fase estacionária é ligada quimicamente à superfície [43,44]. O tipo de coluna utilizada na maioria das pesquisas em cromatografia é aquela na qual o suporte é à base de sílica modificada, com diâmetro variável de 3,0 a 10µm. A superfície da sílica é hidrolisada geralmente com HCl [43,44], formando os chamados grupos silanóis . Na figura 6 está representada a estrutura desses grupos reativos, presentes na maioria das fases estacionárias.

Figura 6 – Estrutura do grupo silanol

Para o recobrimento dessa superfície, são formados os grupos siloxanos, constituídos de grupos alquila ou alquila substituídos, de forma a proteger essa superfície e não permitir perdas de efetividade e do número de pratos teóricos (N) da coluna [43].

De acordo com o grau de polaridade e o tipo de fase que constitui a coluna, a cromatografia também pode ser classificada como de fase normal ou de fase reversa. Geralmente, a mais utilizada é a coluna de fase reversa em que

a fase estacionária é não polar, possibilitando o uso de fases móveis relativamente polares, como água e a modificação da fase aquosa com ácidos; além de metanol e acetonitrila, por exemplo. Assim, o componente mais polar é o que será eluído primeiro da coluna e o composto menos polar será o último a ser eluído – ou seja, aumentando-se a polaridade, aumenta-se o tempo de retenção das substâncias que compõem o analito.

A partição do analito ocorre tanto na fase móvel quanto na fase estacionária, sendo que, de acordo com a polaridade do analito, desenvolve-se o método analítico de forma a aumentar a seletividade e boa separação e detecção do mesmo. Geralmente em fase reversa, há a necessidade da avaliação de diversos parâmetros necessários à seletividade e conseqüente separação das substâncias, como por exemplo, a seleção da fase móvel de acordo com o seu índice de polaridade e tipo de solvente [44], avaliação da coluna quanto ao número de pratos teóricos (N) e o tipo de coluna, além da temperatura a ser utilizada.

Para a eficiência da separação por exemplo de duas espécies do soluto, ou seja, para que haja uma boa resolução entre essas espécies, é necessário que as velocidades relativas entre as duas espécies sejam diferentes, bem como ocorra diferença na distribuição desses compostos entre a fase móvel e a fase estacionária, conforme esquematização representada na figura 7.

Figura 7 – Esquematização da distribuição de equilíbrio do analito

Dessa forma, obtém-se através de inúmeras transferências das partições do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, a formação de picos simétricos gaussianos (correspondentes às diferentes substâncias do analito), observados nos cromatogramas, de acordo com a intensidade de sinal captado pelo detector, conforme a figura 8.

Figura 8 - Pico gaussiano visualizado no cromatograma

O fator de separação de uma coluna (α) é dado por

$$\alpha = \frac{(t_R)B - t_M}{(t_R)A - t_M}$$

$$\alpha = k_B / k_A$$

Onde, t_M é o tempo morto, $(t_R)_B$ é o tempo de retenção da substância B, $(t_R)_A$ é o tempo de retenção da substância A, k_B e k_A são respectivamente a constante de equilíbrio da substância B e A.

Assim, é fundamental que a coluna tenha uma eficiência tal que permita a separação de forma adequada, sendo necessário o monitoramento do número de pratos teóricos (N), sendo que quanto maior N e menor a altura (H) equivalente a um prato, mais eficiente é a separação. É também necessário o monitoramento da velocidade linear da fase móvel (μ), dos coeficientes de difusão do analito tanto na fase móvel (DM) quanto na fase estacionária (DE), do fator de retenção (k'), do tamanho de partícula e da espessura da camada de líquido que recobre a coluna.

Além disso, pela avaliação dos processos cinéticos envolvidos na separação (como o caminho múltiplo de fluxo, a difusão longitudinal e a transferência de massa para e da fase estacionária e na fase móvel), pode-se evitar durante o desenvolvimento de um método analítico, a ocorrência do alargamento de pico com conseqüente perda de eficiência [43, 44].

No caso de *Passiflora incarnata* L., Quercia et al. [45] analisaram a vitexina e a isovitexina, apresentando um cromatograma com baixa resolução, obtido pela utilização de coluna Zorbax ® ODS (250 x 2,0 mm) e fase móvel composta por gradiente de água e metanol, com detecção a 270 nm.

Qui Min et al. [46], utilizando uma coluna Lichrosorb ® RP18 e gradiente composto por metanol e água acidificada com 5% de ácido fórmico e detecção a 350 nm, identificaram através do espectro de massas: schaftosídeo, isoschaftosídeo, isovitexina-2-*O*-glicopiranosídeo e isoorientina -2''-*O*-glicopiranosídeo em folhas de *P. incarnata*. Todas as substâncias foram

detectadas no cromatograma com co-eluição, principalmente entre o isoschaftosídeo, isovitexina-2-*O*-glicopiranosídeo e o schaftosídeo.

Através de HPLC-MS, Rafaelli et al. [47] identificaram 2-vicenina, schaftosídeo, isoschaftosídeo, isoorientina, isovitexina, swertizina, orientina e vitexina na espécie *P. incarnata*, utilizando coluna Lichrosphere® e fase móvel composta por uma mistura de ácido fórmico a 0,07% em água, tetrahydrofurano, isopropanol e acetonitrila. As substâncias foram detectadas no comprimento de onda de 340 nm e foram bem separadas, com pequena co-eluição entre a isoorientina e a vitexina.

Abourashed identificou tanto os alcalóides [48] quanto os flavonóides [18] em folhas de *P. incarnata* através da preparação da amostra com 80% de metanol em água, extraídas com temperatura a 40° C e pressão de 1000 psi por 10 minutos, conseguindo através desse tipo de extração (uso de Dionex®), alta eficiência e baixa demanda de tempo no preparo de várias amostras de *P. incarnata*, oriundas de diferentes locais. Para tanto, utilizou um gradiente de ácido fosfórico a 0,01% em água e uma mistura de tetrahydrofurano, metanol e isopropanol com detecção a 280 nm. Entre os flavonóides, identificou a presença de schaftosídeo, isoschaftosídeo, orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina [18] – todos bem separados. Para os alcalóides, foram identificados o harmalol, harmana, harmalina, harmol e harmina [48].

Outro método utilizado foi a eletroforese capilar (CE) para as folhas de *P. incarnata*, nas quais Marchart [36] identificou com razoável resolução, os flavonóides swertisina, isoscoparina-2'' – *O*-β-glicopiranosídeo; 2-vicenina; isovitexina – 2 – *O* – β-*D*-glicopiranosídeo; schaftosídeo; 2-lucenina; isoorientina-2''-*O*-β-glicopiranosídeo; isoschaftosídeo; isovitexina;

isoorientina; vitexina; orientina e apigenina-6-*C*-glicosil-8- β -*D*-ribofuranosídeo. Para obter essa separação, a temperatura do capilar foi mantida a 35° C, com voltagem de 30 kV e utilização de tampão composto por 25mM de tetraborato de sódio contendo 20% de metanol (pH 9,5) e detecção a 275 nm [36].

Pereira [16] analisou os flavonóides vitexina, rutina, isoorientina, apigenina, luteolina e crisina nas folhas de *P. incarnata* e de outras espécies de *Passiflora*. O método foi devidamente validado, com a preparação das amostras por fase sólida (SepPak®) , fase estacionária composta por coluna Supelco® C18 (250 x 4,6mm) e utilização de fase móvel composta por um gradiente contendo ácido fórmico a 2% em água e acetonitrila, detecção a 337 nm e fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ , com temperatura de forno a 35° C .

Pereira et al. [24] analisaram por HPTLC diferentes espécies de *Passiflora* (*P. alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. coerulea*), comparando-se com o método por HPLC [16], sendo que foram encontrados resultados diferenciados para cada espécie quanto ao conteúdo de vitexina, orientina, rutina e isoorientina , especialmente para *P. incarnata*.

Muller et al. [49] avaliaram também a qualidade das folhas e extratos fluidos de *P. alata* por UV (método da Farmacopéia Helvética) e HPLC, comparando as folhas de *P. alata* e *P. incarnata* e encontraram apenas traços de isovitexina nas folhas de *P. alata* , com ausência de orientina e swertizina , diferentemente do encontrado em *P. incarnata*.

1.6 Análise quimiométrica

O objetivo de estudo da quimiometria é o de aliar a matemática à química, para se avaliar estatisticamente o grau de informação química obtida a partir de um dado analítico instrumental.

É muito importante como instrumento de qualidade e no planejamento analítico experimental, na aquisição, no tratamento e na interpretação dos dados analíticos. Assim, há a conseqüente correlação entre as diversas variáveis apresentadas pela análise química obtida por métodos, como por exemplo, a espectrometria e a cromatografia, com o intuito de se extrair o máximo de informação química relevante, para a obtenção de conclusões mais eficientes quanto a determinado experimento [50].

A base da ciência é constituída pela observação e pelo experimento, que são fatores primordiais também para a Química Analítica, onde é fundamental que as seguintes etapas sejam definidas :

- Representatividade das amostras, as quais devem ser obtidas através do preparo e tratamento corretos.
- Preparação da amostra para análise qualitativa ou quantitativa incluindo a extração dessa amostra, além de operações de separação e procedimento de definição quanto à substância química
- Monitoramento constante quanto ao sinal analítico, incluindo a sua magnitude.
- Volume, temperatura e reagentes devem ser monitorados adequadamente.

Assim, tanto as medidas de sinal quanto os cálculos, serão organizados para minimizar os erros inerentes a qualquer experimento químico: erros aleatórios, instrumentais, metodológicos, teóricos e de tratamento de dados [50].

Para evitar a propagação dos erros sistemáticos, na quimiometria há a necessidade de se promover o pré-processamento das variáveis, ou seja, o ruído instrumental decorrente da probabilidade dos erros sistemáticos deve ser corrigido. Assim, os dados podem ser centrados na média, ou serem escalonados pela variância, ou autoescalados (adimensionais) ou escalonados pela razão de variação (range) [51].

Há também os modos de correção para as amostras, para a formação da chamada linha de base do método instrumental, a qual pode ser feita através da equação da primeira ou segunda derivada, ou através do alisamento ou pela normalização dos dados [51].

Pelo alisamento, podemos centrar as amostras pela média (para se evitar informação redundante) ou para não perder a informação importante e melhorar a razão sinal/ruído, a mediana (ou média móvel). O alisamento também pode ser efetuado através dos filtros de Fourier, com o domínio das frequências e conseqüentemente transformação para um dado identificável (eliminação do ruído e aumento da relação sinal/ruído) [51].

Em relação à normalização, as amostras permanecem na mesma escala com o objetivo de remoção da variação sistemática em relação ao tamanho da amostra. A desvantagem dessa correção relaciona-se com o aumento do ruído, o que pode se confundir com o próprio analito, com inferência em erro.

Em HPLC, geralmente o escalonamento é efetuado através do uso do $\log K$ (fator de capacidade), para que os erros proporcionais de K sejam linearizados pelo logaritmo, facilitando-se, assim, a análise [52].

Com os dados pré-processados, inicia-se a análise exploratória desses dados, com o intuito de se obter o máximo de informação da tabela de dados e a relação entre as amostras e as variáveis.

A análise exploratória, com conseqüente transformação dos dados complexos em informações relevantes, pode ser efetuada através da análise de componentes principais (PCA) ou pela análise hierárquica de agrupamentos (HCA).

Pela PCA, os dados podem ser comprimidos em duas ou até três dimensões visíveis, correspondendo ao máximo de informação importante – as demais dimensões relacionam-se a ruídos ou informações irrelevantes.

Matematicamente, num espaço de dimensão M e cada amostra correspondente a um vetor X , após a transformação de matrizes quadradas em matrizes ortogonais, forma-se novos eixos ortogonais entre si, o que passa a ser as coordenadas (T =scores) e as colunas (L =loadings) :

$$X = T \cdot L^T$$

Os eixos originais através do PCA são transformados, assim, em novos eixos, sempre ortogonais entre si, o que possibilita “enxergar” de maneira eficiente as correlações entre scores e loadings, conforme o esquematizado na figura 9.

Figura 9 – Esquemática dos eixos em PCA – transformação da informação linear em eixos ortogonais entre si

Para a análise multivariada é necessária a operação com matrizes , através de rotações ortogonais para que sejam formados novos eixos para as variáveis (loadings , em que se avalia a direção) e para as amostras (scores, em que se avalia as novas coordenadas formadas) , verificando-se as variações e conseqüentemente, as inter-relações entre as variáveis e amostras dos dados comprimidos.

Pela análise do HCA, temos o dendograma que indica visualmente através do cálculo da distância entre as amostras, a separação das mesmas pela determinação dos dados químicos específicos por determinada amostragem.

Finalmente, para calibração dos dados, na quimiometria são geralmente utilizados os métodos de regressão multivariada como o CLS (quadrados mínimos clássico, geralmente o melhor método para as substâncias conhecidas) ou MLR (regressão linear múltipla – para substâncias não conhecidas e com poucas variáveis) – em qualquer escolha, de acordo com a amostragem e o tipo de informação química requerida, é necessária a validação do modelo com menor erro de previsão . Tanto mais simples o modelo, mais estável ele será.

Para as substâncias não conhecidas, os métodos utilizados para seleção de variáveis são o PCR (regressão por componentes principais, com remoção do ruído e compressão de dados) ou o PLS (quadrados mínimos parciais, com maximização da variância e construção de uma única equação).

Por exemplo, para a seleção de variáveis para correlação entre estrutura química e a atividade biológica (QSAR), Ferreira [52] utilizou PCA e CLS para avaliação de variáveis correlatas, que podem ser utilizados normalmente, já que, como os eixos obtidos na análise são ortogonais entre si , a correlação entre as variáveis não limita a aplicabilidade do PCA e CLS para esse tipo de

relação (QSAR) . Já pelo uso do MLR, como as variáveis são altamente correlacionadas, geralmente se apresenta colinearidade [52].

Primeiramente se aplica o PCA para a estrutura e a visualização das correlações, para finalmente providenciar a modelagem através do PLS, onde a matriz de dados X é decomposta em T (scores = relação entre as amostras) e L (loadings, ou pesos = relação entre as variáveis) [52].

A quimiometria também faz parte da avaliação da metabolômica – termo criado em 1998 para descrever os complementos metabólicos dos seres vivos e que estuda o desenho global do que ocorre com a organização dos organismos multicelulares [35]. Segundo Hall [35], necessita-se para tal fim, alta capacidade analítica além de uma estatística adequada (bioinformática) para que os sistemas dos seres vivos possam ser caracterizados quanto à composição bioquímica e o metabolismo seja avaliado , para identificação das mudanças metabólicas . O metabolismo dos seres vivos é altamente controlado apesar de flexível; assim a quimiometria é muito importante para avaliar se as mudanças metabólicas são oriundas das respostas ao meio ou se são fatores de estresse abiótico [35]. Calcula-se haver entre 100.000 a 200.000 metabólitos secundários, sendo que há o desconhecimento da maior parte dessas rotas bioquímicas.

Nas plantas, o teor de metabólito secundário geralmente é o indicador da qualidade da planta, determinando também a sua atividade – isso pode impactar inclusive nos preços praticados no mercado por determinada planta .Por exemplo para os flavonóides em *P. incarnata* , tanto maior a procura pelas folhas que possuam maior quantidade de flavonóides, o que pode aumentar o seu preço.

Assim, o uso da quimiometria é utilizado para desenhar o experimento, em conjunto com técnicas necessárias para se extrair, separar e detectar as biomoléculas (LC-MS, GC-MS, CE-MS, NMR, entre outras) [35]. Através de um trabalho de pré-processamento de dados e avaliação [53] da PCA, HCA, PLS, há a possibilidade de se avaliar o genótipo e o fenótipo, bem como a caracterização de uma população e processos biológicos, através das diferenças de biomarcadores e bioatividade [35,53]. Na prática, por exemplo, pode-se identificar as diferenças existentes entre os flavonóides antioxidantes presentes na espécie do chá, *Thea sinensis*, que, conforme o preparo da planta, tem-se o chá verde (folhas estabilizadas e secas) ou o chá preto (folhas fermentadas e secas). Apesar de serem da mesma espécie, o chá verde e o chá preto possuem atividades biológicas e flavonóides diferentes em sua composição [53].

Terpenos em *Asteraceae* [54] foram também avaliados através da quimiometria de acordo com dados obtidos na literatura (4351 ocorrências), correlacionando-se as espécies a determinados terpenos e diterpenos como método de classificação em subtribos, tribos e subfamílias, de acordo com essas substâncias químicas.

O uso de modelo multivariado por De Coen [55] também correlacionou as medidas de determinados biomarcadores em um nível de população de *Daphnia magna*, com exposição de 8 modelos toxicantes (metais pesados e pesticidas), por 48 a 96 horas. Através do uso de PLS, obteve um modelo de dois componentes principais (R^2 de 0,68 e Q^2 de 0,60) com a formação de um modelo adequado para a predição de efeitos de longa duração dos agentes toxicantes na organização biológica desses organismos.

O desenvolvimento de “fingerprints”, ou seja perfil químico da Angélica chinesa, *Angelica sinensis* Oliv., através da técnica de APCI-MS e espectro no UV, foi avaliado por Guang-Há [56], através do estudo quimiotaxonômico de 53 amostras, com o uso de HPLC-DAD e combinação matemática para correlação das características cromatográficas das diferentes espécies e regiões de ocorrência de Angélica (encontrada também no Japão). Além da identificação macroscópica e microscópica, é fundamental a determinação do perfil fitoquímico (ou “fingerprint”) : o autor [56] avaliou que, apesar da identificação dos fitomarcadores para a *Angelica sinensis* serem descritos na literatura como o ácido ferúlico e lignustilídeo, há a presença desses compostos em outras espécies de *Angelica*, não sendo determinantes para a identificação da espécie *Angelica sinensis*. Para tanto, através do uso da análise do “fingerprint” aliado à análise de PCA, obteve-se um coeficiente de correlação entre cada característica das diferentes espécies, demonstrando a similaridade entre as amostras chinesas e as diferenças no “fingerprint” para as amostras de outras espécies, apesar de pertencerem ao mesmo gênero [56].

Finalmente, em relação à *Passiflora*, Segura et al. [57] mapearam através de dados coletados de 383 acessos, o potencial de 5 espécies de *Passiflora* em países andinos – Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. As espécies avaliadas foram : *P. cumbalensis* Harms, *P. mixta* L., *P. tripartita* var. *mollissima* Holm , *P. pinnastipula* Cav e *P. manicata* Juss. Utilizaram três variáveis climáticas (precipitação pluviométrica , média da temperatura mensal e variação diurna de temperatura mensal) para predizer regiões do globo aonde essas espécies poderia ser encontradas. Os resultados se mostraram muito interessantes para a determinação dos fatores principais, como a variação da

temperatura diurna, principalmente na segunda metade do ano e a quantidade de chuva no verão [57]. A determinação de dois ecotipos (dois diferentes “clusters”: Peru/Bolívia e Colômbia/Equador) também mostrou que o modelo tem boa predição para determinação da ocorrência das espécies num raio de 3500 km para *P. tripartita*, e a espécie que se mostrou mais adaptável foi a *P. mixta* (raio de 4000 Km de predição). Devido às variáveis pluviométricas, a *P. pinnastipula* foi a mais diferenciada, não se mantendo entre os dois ecotipos segundo o estudo de Segura et al. [57].

1.7 Objetivos deste trabalho.

A correlação das variáveis de alguns elementos do solo e do ambiente e teores dos flavonóides em *Passiflora incarnata* para avaliação da adaptação da espécie e sazonalidade, além da observação da compatibilização da agricultura orgânica na região de cultivo da planta na cidade de Botucatu (São Paulo) é o principal objetivo da presente dissertação.

A espécie *Passiflora incarnata* possui maior quantidade de estudos científicos de interesse farmacológico e entre os seus diversos constituintes, os flavonóides são encontrados em maior abundância e são os mais estudados. Como *P. incarnata* é cultivada principalmente no hemisfério norte (EUA e Europa), há um grande interesse no estudo do cultivo dessa planta no Brasil, mais precisamente na região de Botucatu, no interior de São Paulo. Assim, este trabalho tem como objetivo analisar os flavonóides juntamente com outras

variáveis do ambiente, para confirmação (ou não) de diversos fatores externos que possam desencadear o aumento ou a diminuição do conteúdo dos flavonóides nas folhas de *P. incarnata*.

Para o presente estudo de *P. incarnata*, as variáveis de campo/ cultivo foram avaliadas para determinação da correlação (ou não) do teor dos flavonóides totais no decorrer de um determinado período de tempo, com amostras coletadas em diferentes fases do dia.

CAPÍTULO 2 - EXPERIMENTAL

2.1 Cultivo de *Passiflora incarnata*

Para o cultivo, foram utilizados :

- sementes procedentes dos EUA , fornecedor Johnny´s Selected® Seeds.
- Área de 295,68 m², totalizando 33 áreas dispostas ao acaso, cada uma com 8,92 m². Experimento realizado em triplicata (ou seja, 11 áreas com 8,92 m²) conforme croqui apresentado na figura 10 .
- Início de plantio : janeiro/ 2003. Início da brotação efetiva: setembro/outubro 2003.
- Utilização de preceitos orgânicos para o cultivo da espécie de *P. incarnata* L. , inclusive com a manutenção de áreas com árvores, para que o ambiente mantivesse suas condições ecologicamente saudáveis – sem utilização de agroquímicos ou fertilizantes de quaisquer espécies.
- Depósito de exsicata e confirmação da espécie junto ao Instituto Botânico de São Paulo, sob o voucher número RG SP374018.

7	10	2	5
11	5	1	3
4	6	8	9
2	Árvore s	7	6
Árvores	9	4	3
11	3	Árvores	8
6	1	10	2
5	8	11	7
10	9	4	1

Figura 10 – Croqui esquematizado da área de cultivo experimental de *P. incarnata*. A numeração de 1 a 11 corresponde aos canteiros preparados para recebimento das sementes e para análise do solo , com números dispostos ao acaso, realizado em triplicata . Árvores também foram mantidas, para manutenção do ecossistema local.

2.2. Coleta do Material Vegetal

As amostras foram coletadas no ano de 2004, compreendendo em sua maioria, três horários distintos : manhã (M), tarde até 14:00 horas (T) , mais tarde após 16:30/17:00horas (TT) , por 20 semanas. Foram colhidas apenas as folhas; o ambiente externo foi monitorado quanto à percentagem de umidade relativa e temperatura ambiente. As folhas de *P. incarnata* foram monitoradas quanto à umidade e granulometria após a secagem, sendo que foram imediatamente secas e estabilizadas em estufa a 35°-40°C, sendo posteriormente moídas e tamizadas de forma homogênea (0,5 – 1,0 mm), conforme o descrito por Pereira [16]. A observação fenotípica das folhas e dos aspectos morfológicos no decorrer do cultivo experimental de *P. incarnata* também foram devidamente avaliados. As informações relativas ao período, data de amostragem e coleta de amostras estão na tabela 1.

Tabela 1 – Informações de período , data de amostragem e locais coletados de folhas de *P. incarnata*

SEMANA	DATA	LOCAIS COLETADOS
		CONFORME A FIGURA 10
S1	06/fev	9,1,7
S2	13/fev	3,6,10
S3	20/fev	11,2,7
S4	27/fev	2,7,10
S5	06/mar	3,5,8
S6	12/mar	4,6,8
S7	19/mar	9,6,5
S8	02/abr	4,8,10
S9	06/mai	9,10,4
S10	14/mai	10,9,4
S11	15/out	1,4,9
S12	22/out	10,5,9
S13	29/out	8,3,6
S14	06/nov	9,4,3
S15	12/nov	10,9,4
S16	19/nov	10,9,4
S17	04/dez	10,9,4
S18	10/dez	10,9,4
S19	20/dez	10,9,4
S20	30/dez	10,9,4

2. 3. Parte analítica – Materiais e Reagentes

- Balões volumétricos de 10 mL de capacidade
- Erlenmeyers de 20 mL de capacidade
- Agitadores magnéticos de teflon
- Agitadores contínuos, com controle de temperatura
- Metanol grau HPLC (Omnisolv- Merck®)
- Acetonitrila grau HPLC (Omnisolv- Merck®)
- Etanol absoluto PA (Merck®)
- Ácido fórmico 98% de pureza (Merck®)
- Água ultrapura (18,2 MΩ)
- Água destilada (Dinâmica®)
- Cartuchos SepPak – 400 mg – Waters® , para extração em fase sólida.
- Padrões de flavonóides (Chromadex®): orientina, homoorientina (isovitexina), vitexina, isovitexina, luteolina
- Padrão de rutina (Sigma®)
- Papéis de filtro
- Analisador de umidade por infravermelho – Gehaka® modelo IV2000.
- Rotaevaporador Tecnal ®, temperatura 60° C.

2.4 Extração do material vegetal

O material vegetal foi previamente estabilizado através da secagem em estufa a 35-40° C, apresentando umidade inferior a 15% nas folhas de *P. incarnata*, conforme determinado através da medição por infravermelho. Após a secagem, o material foi moído e tamizado de forma a possuir homogeneidade entre 0,5 a 1,0 mm de tamanho, sendo acondicionado e lacrado antes e após a moagem, para manutenção de sua integridade.

Ainda seguindo o método desenvolvido por Pereira [16], o material vegetal foi extraído segundo a Farmacopéia Brasileira [26], pela extração das folhas com dez vezes o seu peso (em volume) com uma solução 2:1 (etanol : água), por 24 horas, à temperatura ambiente e com agitação constante.

Após a extração, as amostras foram filtradas por papel de filtro comum, o volume completado para 10 mL com solução 2:1 (etanol: água) e a solução resultante foi levada ao rotaevaporador para concentração da amostra para aproximadamente 2 mL, à temperatura de 60° C. A amostra concentrada oriunda da fase anterior foi submetida a extração em fase sólida, utilizando cartucho SepPak® C18, 400 mg / Waters®, previamente condicionado com 5 mL de metanol e posteriormente, 5 mL de água destilada. O material de interesse (fração flavonoídica), foi eluído com metanol a 60% em água (V/V) e o volume ajustado para 10 mL em balão volumétrico. A partir dessa solução foi efetuada a análise dos flavonóides por HPLC-DAD.

O cartucho foi posteriormente lavado com metanol a 80% em água (V/V) e depois 10 mL de metanol, para recomposição das condições originais do cartucho SepPak®.

2.5 Análise por HPLC – UV/DAD

O equipamento HPLC utilizado para as análises dos teores de flavonóides, apresenta as seguintes características: bomba quaternária com controlador de fluxo gradiente (modelo Waters ® W600), detector de arranjo de diodos (UV/PDA Waters®), sistema de coleta de dados Empower®/Waters®; injetor do tipo Rheodyne®/ Waters®.

Em relação às condições analíticas, as mesmas foram obtidas através do trabalho de Pereira [16] com exceção do forno usado nesse trabalho à temperatura de 35° C. A coluna utilizada foi Supelcosil® C18, 5 µm (250 x 4,6 mm de diâmetro) com gradiente composto por fase móvel “A” : 2% de ácido fórmico em água e fase móvel “B” , acetonitrila; com programação de gradiente em função do tempo, informado na tabela 2.

Tabela 2 – gradiente utilizado para análise por HPLC onde “A” é composto por ácido fórmico a 2% em água e “B”, acetonitrila

Tempo	% “A”	% “B”
0	85	15
10	70	30
40	70	30
50	85	15

A vazão foi de 0,8 mL.min⁻¹, com detecção em 337 nm e monitoramento da variação da absorbância no detector de arranjo de diodos (DAD) de 240 a 400 nm, com a análise sendo realizada à temperatura ambiente (23 -25° C).

Foram utilizados os padrões de orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, rutina e luteolina. Os padrões foram preparados em metanol, em concentrações entre 25 a 250 mg/L e detecção para quantificação, em 337 nm.

2.6 Tratamento de dados por quimiometria

Houve a perda de 32 amostras no decorrer do trabalho, principalmente devido à secagem da matéria-prima vegetal, onde a estabilização é de fator fundamental para a posterior extração. Estas amostras, não estão na matriz geral de dados, utilizados para avaliação quimiométrica.

Os resultados para quantificação dos flavonóides através de HPLC-DAD e a correlação das variáveis relacionadas ao cultivo, foram avaliados através de programa computacional da Infometrix®, Pirouette®, com os arquivos dos cromatogramas organizados na forma de planilha do Excell e depois no formato .PIR e realização da análise exploratória de dados (HCA) e de componentes principais (PCA) [58], através de matriz obtida a partir das 147 amostras analisadas.

A concentração em mg/L de cada flavonóide identificado, foi calculado através do software Empower® / Waters®, acoplado ao próprio sistema cromatográfico, através da análise prévia da mistura dos padrões com concentração conhecida. Os resultados quantitativos foram transferidos para a matriz de dados, com a qual se avaliou as correlações existentes entre as variáveis observadas no decorrer do cultivo.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do solo

A análise de 11 amostras do solo, correspondentes aos 33 locais de coletas (análise realizada em triplicata), foi efetuada no Laboratório de Fertilidade do Solo, na Unesp/Botucatu, em agosto de 2004.

As amostras de solo foram coletadas de forma representativa e submetidas

às análises de: pH, matéria orgânica (M.O.), fósforo, alumínio, hidrogênio e alumínio, potássio, cálcio, magnésio, soma de bases K^{+1} , Ca^{+2} e Mg^{+2} (SB), capacidade de troca catiônica (CTC), V% (soma de SB/CTC x 100), além de boro, cobre, ferro, manganês e zinco, conforme os resultados apresentados na tabela 3. A metodologia utilizada foi descrita por Raij et al. [59]. Os métodos utilizados foram: a espectrometria de absorção atômica (B, Cu, Fe, Mn, Zn), espectrometria UV/Vis para $H^{+}+Al^{3+}$, fotometria de chama para K^{+1} , Ca^{+2} e Mg^{+2} e os demais elementos, por resina trocadora de íons.

Tabela 3- Resultados das análises do solo

AMOSTRA	pH	M.O.(g/dm ³)	P(mg/dm ³)	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	B	Cu	Fe	Mn	Zinco
1	4,3	16	4	0	33	0,9	5	3	9	42	21	0,15	1,2	91	0,7	0,7
2	5,0	27	15	0	28	1,4	25	12	39	67	59	0,21	1,0	133	2,5	2,2
3	5,3	22	11	0	24	2,2	21	11	34	57	59	0,15	0,9	102	1,6	2,1
4	4,2	19	4	0	38	1,0	5	3	9	47	19	0,17	1,0	123	0,7	0,4
5	4,2	17	3	0	36	1,2	4	4	9	45	19	0,18	0,9	118	0,7	0,3
6	5,2	23	12	0	24	1,3	21	13	35	59	60	0,16	1,0	89	1,7	2,5
7	5,2	27	16	0	25	1,1	25	13	40	65	61	0,16	0,9	121	2,8	2,9
8	5,2	19	11	0	25	2,1	22	12	36	61	59	0,18	0,9	87	1,4	1,8
9	4,8	13	5	0	26	1,1	11	9	21	48	45	0,14	0,9	86	0,9	0,5
10	5,0	18	5	0	26	1,3	13	10	25	51	49	0,13	0,8	79	0,8	0,6
11	5,3	24	8	0	21	1,3	23	15	39	61	65	0,15	0,8	112	2,3	2,0

Resultados K^{+} , $H^{+}+Al^{3+}$, Ca^{+2} , Mg^{+2} , SB, CTC e V% em mmolc/dm³

Resultados M.O., P², B, Cu, Fe, Mn, Zn em mg/dm³

Segundo Raij et al [59], para a qualidade do solo, há parâmetros a serem considerados, que são indicativos da qualidade desse solo: se o mesmo é pobre ou rico em elementos necessários ao desenvolvimento das plantas, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros indicativos da qualidade do solo segundo Raij [59]

CLASSE TEORES	*P ² Florestal	*P ² Perene	*P ² Anual	*P ² Hortaliça	Al / KCl	S/SO ₄ ²⁻	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	pH	V%
Muito Baixo	0-2	0-5	0-6	0-10			0,0-0,7			até 4,3	0-25
Baixo	3-5	6-12	7-15	10-25	<5	0-4	0,8-1,5	0-3	0-4	4,4-5,0	26-50
Médio	6-10	13-30	16-40	25-60		5-10	1,6-3,0	4-7	5-8	5,1-5,5	51-70
Alto	10-20	31-60	41-80	61-120	>5	>10	3,1-6,0	>7	>8	5,6-6,0	71-90
Muito Alto	>20	>60	>80	>120			>6,0			>6,0	>90

CLASSE TEORES	B	Cu	Fe	Zn	Mn
Baixo	0,0 - 0,2	0,0-0,2	0-4	0,0-0,5	0,0-1,2
Médio	0,21-0,60	0,3-0,8	5-12	0,6-1,2	1,3-5,0
Alto	>0,60	>0,8	>12	>1,2	>5,0

* P² → Teores de fósforo característicos de diferentes tipos de terreno, para plantas que se desenvolvem em meio florestal, perene, anual ou para o cultivo de hortaliças

Pelas análises apresentadas na tabela 3 , os 11 canteiros apresentaram: pH entre 4,2 a 5,3; P² entre 3 a 16 mg/dm³ ; K⁺ entre 0,9 a 2,2mmolc/dm³ ; Ca⁺² entre 4 a 25 mmolc/dm³; Mg⁺² entre 3 a 15 mmolc/dm³; V% entre 19 a 65; B⁰ entre 0,13 a 0,21 mg/dm³ ; Cu⁰ entre 0,8 a 1,2 mg/dm³ ; Fe⁰ entre 79 a 133 mg/dm³; Mn⁰ entre 0,7 a 2,8 mg/dm³ e Zn⁰ entre 0,3 a 2,9 mg/dm³; portanto, a composição do solo apresentou teores indicativos ao nível de classificação desde baixo (solo pobre) até muito alto (solo rico), para determinados elementos - caso do ferro, por exemplo - mesmo numa pequena área de 295,68 m².

3.2 Aspectos fenotípicos e morfológicos

Foram avaliados as características fenotípicas das folhas e aspectos morfológicos no decorrer do cultivo experimental de *P. incarnata*, e algumas fotografias das plantas no decorrer do período são apresentadas na figura 11.

a

b

Figura 11- Fotografias de *P. incarnata*, observação fenotípica, onde *a* corresponde aos canteiros 9,10 e 11(esquerda para a direita) e *b* o canteiro 9 com algumas flores, planta mais desenvolvida.

Quanto aos aspectos fenotípicos e de condições de tempo por ocasião das coletas, na tabela 5 estão descritas as observações efetuadas no decorrer do cultivo.

Tabela 5 – Condições morfológicas observadas durante as 20 semanas de coleta de amostras de *Passiflora incarnata*

Nº	M(manhã) ° C/%UR*	T(tarde) ° C/%UR*	TT(Mais tarde) ° C/%UR*	TEMPO	PLANTAS FENÓTIPO
S1	22,4/89	30,9/64	24,8/81	Nublado e chuvoso	desenvolvidas e rasteiras 7 mais amarelado
S2	16,9/99	33/50	22,8/82	Nublado	desenvolvidas e 10, com flores 11 rasteira/ 7 pouco desenvolvida / 2 trepadeira
S3	21,2/94	39,8/48	24,9/81	Nublado	broto novo
S4	26,5/62	-	-	Chuva	broto novo
S5	22,4/84	34,3/63	23,9/85	Sol	broto novo
S6	22,3/80	29,3/63	25,4/73	Sol	6 e 4 um pouco amareladas/ 8 irregulares
S7	24,3/80	23,3/65	23,4/80	Chuva	5 desenvolvida/6 pouco des
S8	23,3/71	-	23,5/65	Sol	plantas em fase degenerativa
S9	20,3/84	-	-	Chuva	folhas caídas
S10	18,6/88	25,4/65	21,5/73	Chuva	folhas enegrecidas desenvolvido e com flores em alguns pontos isolados
S11	21,3/83	24/83	21,8/92	Nublado	desenvolvido e com gavinhas horizontais
S12	24,5/61	38/35	27,9/62	Nublado	desenvolvido e mais rasteiras
S13	21,5/64	-	23,5/72	Sol	desenvolvidas
S14	24,2/74	33/56	26,9/61	Nublado	desenvolvidas
S15	21,7/64	32/61,4	-	Sol	desenvolvidas com mais flores
S16	22,1/83	28,8/67	27,4/66	Nublado	desenvolvidas, folhas maiores
S17	23/82	33,5/56	38,1/39	Sol	Desenvolvidas
S18	20/92	-	24,5/71	Sol	desenvolvidas, folhas maiores
S19	24,5/79	29,6/65	29,5/65	Nublado	desenvolvidas, algumas folhas amarelas/ esparsas
S20	24,8/67	36,1/34	-	Sol	

*: ° C : temperatura ambiente medida em graus Celsius

% UR : umidade relativa do ambiente

Assim, durante o ano de 2004, *P. incarnata* apresentou as seguintes características no decorrer do período: brotação e formação de novas folhas no período da primavera (as flores apareceram rapidamente em alguns casos isolados, principalmente nos canteiros 9 e 1) , início da queda das folhas e amarelamento das mesmas a partir do período de outono, desaparecimento da planta durante o inverno e nova rebrota durante a primavera. Os frutos apareceram no auge do verão, porém em pouca quantidade.

3.3 – Análise por HPLC

Nas análises iniciais por HPLC, sem o uso do forno a 35° C, foi verificado que os tempos de retenção dos analitos (no caso, a mistura de padrões) não permaneciam constantes, sendo a diferença apresentada entre esses tempos de retenção de até 2,5 minutos. Foram utilizadas colunas de outras marcas e diferenciadas quanto ao comprimento e diâmetro interno, porém com o mesmo tamanho de partícula (5µm) e tipo de fase estacionária (Novapak® C18- 250 mm x 4,6 mm ; Alhabond®C18 - 300 x 3,9 mm); porém, os melhores resultados foram obtidos com a Supelcosil® C18.

Os padrões foram injetados em concentrações variáveis entre 25 a 250 mg/L, apresentando as equações de reta especificadas na tabela 6.

A rotina, como preconizado no trabalho de Pereira [16], foi considerada arbitrariamente como possuindo o fator de resposta 1,0. Para os demais fatores de resposta, os mesmos foram calculados baseando-se na concentração de 25 mg/L de cada flavonóide, dividindo-se a área do pico (mAbs) pela concentração obtida.

Tabela 6 – Equações de reta para os padrões de flavonóides

Padrão	Equação da curva (y=ax+b)	r²	Fator de resposta	Intervalo de aplicação mg/L
Rutina	$y = 1,53.10^4x - 6,79.10^4$	0,9866	1,00	25-250
Orientina	$y = 2,31.10^4x - 1,37.10^5$	0,9992	1,29	25-250
Isoorientin a	$y = 3,38.10^4x - 5,41.10^5$	0,9861	1,70	25-250
Vitexina	$y = 2,96.10^4x - 2,95.10^5$	0,9987	1,55	25-250
Isovitexina	$y = 3,02.10^4x - 2,93.10^5$	0,9993	1,66	25-250
Luteolina	$y = 4,64.10^4x - 7,14.10^5$	0,9985	2,39	25-250

Comparando-se a curva de calibração e o fator de resposta da rotina determinados por Pereira [16], os valores encontrados são maiores quanto à resposta de vitexina, isoorientina e orientina, provavelmente devido à diferença de resposta dos equipamentos utilizados, principalmente o detector. Quanto aos espectros de absorção no UV de cada padrão, os mesmos são apresentados na figura 12.

Figura 12 – Espectros UV/DAD dos padrões de flavonóides

Após a escolha da coluna Supelcosil® , foi observado que os tempos de retenção dos padrões continuavam a variar de forma significativa – quanto menor a concentração do padrão, inclusive, maior era o desvio nos tempos de retenção, notadamente para a isovitexina, conforme o apresentado na tabela 7.

Tabela 7 – Área dos picos e tempo de retenção de orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, luteolina e rutina em diferentes concentrações .

PADRÃO	CONCENTRAÇÃO mg/L	Área1 mAbs	Área 2 mAbs	Área 3 mAbs	Tempo Retenção- variação minutos(min)
Orientina	25	565133	521553	525660	9,75-11,85
	50	1078814	1066978	1053859	9,37-10,20
	105	2350589	2374759	2316315	9,52-11,65
	175	3846820	3973045	3924722	9,71-10,31
	250	5595775	5794174	(-)*	9,40-9,42
Isoorientina	25	713857	705641	707612	11,13-13,19
	50	1472658	1466188	1430088	10,73-11,70
	105	3207456	3256901	3162980	10,96-12,85
	175	5322546	5436509	5408193	10,77-11,82
	250	8388188	8602841	(-)*	10,74-10,76
Vitexina	25	649101	640093	643161	15,88-18,48
	50	1323566	1309073	1290054	15,40-17,07
	105	2890440	2884685	2844325	15,89-17,24
	175	4815553	4801161	4853008	15,47-17,14
	250	7124485	7349096	(-)*	15,40-15,41
Isovitexina	25	694895	687925	687754	16,96-19,79
	50	1436351	1413692	1376303	16,45-18,35
	105	3095236	3072432	3039040	17,05-18,55
	175	5137493	5184729	5194750	16,53-18,44
	250	7448253	7633131	(-)*	16,46-16,49
Luteolina	25	990308	985202	1016139	41,19-42,08
	50	2151148	2118337	2110035	41,14-42,08
	105	4894081	4863184	4798400	41,12-42,07
	175	8317756	8349996	8383091	41,01-41,89
	250	12072423	12454198	(-)*	40,83-40,98
Rutina	25	418313	416525	413403	15,38-16,84
	50	810540	802549	805081	17,12-18,15
	105	1599109	1589168	1604937	17,31-17,97
	175	2477772	2455666	2408363	16,72-17,47
	250	4149695	3994622	4097036	16,85-18,26

**(-) indicativo de análises perdidas*

Para que os tempos de retenção não variassem durante a aquisição de dados, a coluna foi mantida em estabilização a baixa vazão (0,5 mL/min) por 1 h, 2 h e 12 horas. Porém, sempre após a segunda injeção, as variações permaneciam constantes quanto ao tempo de retenção, com possível indicação de baixa estabilidade da coluna. Segundo Snyder [44], é necessário o equilíbrio

da coluna para que ocorra a reprodutibilidade da separação e do tempo de retenção, a fim de se evitar interferências pós-eluição do analito, entre uma aplicação e outra. Para o equilíbrio, geralmente se requer o condicionamento prévio de 2 a 5 vezes o volume da coluna, podendo chegar até mesmo a 30 vezes o volume da coluna, de acordo com a fase móvel e o tipo de amostra [44]. No caso da coluna utilizada neste trabalho, o volume requerido seria de 14 a 180 mL numa vazão de 0,5 mL/min, demandando de 28 a 360 minutos de condicionamento da coluna.

Modificou-se o preparo da fase móvel para utilizar-se uma solução de ácido fórmico a 2% (massa/massa). Este procedimento, porém, não foi suficiente para manter constante os tempos de retenção.

Então, previamente às análises, foi injetado 10 µL de metanol, resultando em melhor reprodutibilidade no tempo de retenção do solvente (correspondente ao tempo morto da coluna), bem como um melhor condicionamento da coluna nas análises subsequentes.

Segundo Niessen et al. [60], a sílica gel, quando modificada na superfície, forma a cadeia siloxano que, depois da adição de grupos octadecila (C18) não apresenta, geralmente, a reação completa, pois o percentual de modificação dos grupos silanóis é de 60% aproximadamente. Conseqüentemente, há a presença de resíduos de grupos silanóis, podendo ocorrer adsorção nesses resíduos, prejudicando o condicionamento da coluna. Assim, justifica-se a importância do condicionamento adequado, bem como o cuidado com o pH da fase móvel, que deve estar entre 2,5 a 8,0, para não desestabilizar a fase ligada.

As fases quimicamente ligadas são mais estáveis [60] e necessitam de menor tempo de estabilização entre uma análise e outra. Segundo Scott [61], após a reação dos grupos hidroxila com os clorosilanos ou os reagentes alcóxissilanos, a melhor fase ligada será aquela que possuir o menor número de grupos $-OH$ sem reagir. Como as interações moleculares entre as cadeias de hidrocarboneto e o solvente e o soluto são de natureza fraca, ocorre a interação entre as moléculas através de forças de diversas naturezas (do tipo iônicas, polares ou dispersas). Scott [61] verificou que as interações em fase reversa entre solventes aquosos com os solventes menos polares são diferenciadas, mesmo com uma concentração baixíssima de solvente, como o metanol, por exemplo. No caso de fase reversa C18 de um determinado fabricante, por exemplo, concluiu-se que quanto maior a concentração de metanol, menor o volume de retenção do analito devido às interações das cadeias livres entre si; ou seja, a interação com o solvente aquoso ocorre apenas após as interações entre as cadeias livres terem sido completadas.

Quando essas cadeias interagem entre si, entram em colapso na superfície da sílica. Quanto maior a concentração de metanol (Scott menciona a 3%), o solvente se torna mais dispersivo e as cadeias de hidrocarboneto podem interagir com o solvente, não mais colapsando na superfície.

Outra hipótese relaciona-se ao coeficiente de distribuição efetiva do solvente entre a fase estacionária e a solução do solvente na água a uma determinada concentração. Se uma amostra do solvente é injetada diretamente na coluna como um soluto, o seu volume de retenção será determinado pelo seu coeficiente de distribuição efetivo. Além disso, o metanol na concentração de até 40%, por exemplo, pode modificar a superfície da fase reversa (acima dessa

concentração, a fase reversa se manterá constante, não sendo mais modificada) [61].

Como o metanol possui fraca capacidade de adsorção e o volume morto da coluna Supelcosil ®C18 não foi devidamente determinado, ao se injetar 10 µL de metanol previamente, ocorre a estabilização da fase estacionária e as variações no tempo de retenção quanto ao tempo morto da coluna não são mais observadas.

Além disso, o fato do uso da coluna à temperatura ambiente e sem utilização de temperatura estabelecida no método de Pereira [16] , pode ter sido a causa da variação observada nos tempos de retenção, já que a temperatura pode controlar o fator de retenção (k) da amostra, ou a seletividade. A temperatura, porém, é mais efetiva para amostras iônicas e substituintes polares múltiplos [44]. Outras hipóteses quanto à variação do tempo de retenção das amostras, podem se relacionar às diferenças de tempo morto da coluna, ou o equipamento controlador de gradiente possuir pouca acuracidade, apesar de que todo o equipamento foi devidamente validado para todas as operações.

Com o método devidamente ajustado, deu-se prosseguimento às análises que foram concluídas em abril/2006, totalizando 294 análises realizadas em duplicata, correspondentes a 147 amostras (32 amostras foram perdidas devido à secagem inadequada ou perda de material).

O teor de flavonóides totais, expresso em rutina, foi obtido através da soma de todas as áreas correspondentes aos picos identificados como flavonóides pelo detector UV-Vis/DAD, seguindo a caracterização dos máximos de absorção, aproximadamente entre 254 e 337 nm.

Um cromatograma representativo obtido de *P. incarnata*, bem como os respectivos tempos de retenção e seus espectros de absorção, estão respectivamente apresentados nas figuras 13 e 14 . Na tabela 8 estão descritos os tempos de retenção para cada pico assinalado.

Figura 13 – Cromatograma representativo da fração flavonoídica de *P. incarnata*

Tabela 8 – Tempos de retenção dos picos assinalados no cromatograma da figura 13

Pico nº	tR (min)
1	6,65
2	8,23
3 (Orientina)	9,60
4	11,65
5	13,60
6 (Isovitexina)	16,78
7	18,21
8	21,08
9	24,70
10	27,66
11 (Luteolina)	41,65

Figura 14 – Espectros de absorção dos picos assinalados no cromatograma da figura

13.

Na tabela 9 são descritos os resultados encontrados por semana de coleta, nos períodos M, T e TT, para *P. incarnata*.

Tabela 9 – Resultados das análises de flavonóides totais em *P. incarnata* (expressos como rutina) , por semana de coleta e período.

Semana	TEOR DE FLAVONÓIDES EXPRESSOS COMO RUTINA $y = 1,53.10^4 x - 6,79.10^4 /$ $r^2 = 0,9866/$		
	Período M	Período T	Período TT
1	1,94 ± 0,60 ^a	2,11 ± 0,40 ^a	2,88 ± 1,71 ^a
2	2,45 ± 0,77 ^a	2,75 ± 0,32 ^a	1,79 ± 0,68 ^a
3	2,92 ± 0,53 ^a	2,53 ± 1,14 ^a	1,73 ± 1,1 ^a
4	-	2,96 ± 2,48 ^a	3,73 ± 2,69 ^a
5	3,78 ± 1,75 ^a	2,83 ± 1,89 ^a	2,96 ± 2,03 ^a
6	2,64 ± 1,25 ^a	2,79 ± 1,84 ^a	2,74 ± 0,55 ^a
7	1,53 ± 1,13 ^a	1,85 ± 1,07 ^a	2,13 ± 0,98 ^a
8	2,62 ± 0,54 ^a	-	2,39 ± 0,66 ^a
9	2,83 ± 0,54 ^a	-	-
10	2,63 ± 0,89 ^a	2,56 ± 0,42 ^a	2,37 ± 1,20 ^a
11	3,06 ± 1,10 ^a	2,74 ± 2,19 ^a	3,96 ± 0,16 ^a
12	2,23 ± 0,95 ^a	2,27 ± 0,72 ^a	2,13 ± 0,17 ^a
13	2,57 ± 1,08 ^a	2,81 ± 1,41 ^a	3,18 ± 1,41 ^a
14	2,75 ± 0,63 ^a	2,51 ± 0,21 ^a	2,45 ± 0,85 ^a
15	2,93 ± 1,42 ^a	2,08 ± 0,1 ^a	-
16	3,02 ± 1,34 ^a	3,03 ± 1,68 ^a	3,07 ± 1,42 ^a
17	2,34 ± 0,75 ^a	2,10 ± 0,68 ^a	3,35 ± 1,27 ^a
18	3,25 ± 1,01 ^a	-	3,61 ± 1,97 ^a
19	1,55 ± 0,86 ^a	3,15 ± 1,62 ^a	3,19 ± 2,04 ^a
20	2,24 ± 0,2 ^a	1,10 ± 1,06 ^a	-

*Valores médios obtidos. ^a desvio padrão

Pelo cromatograma da figura 13, verifica-se que a sequência de eluição dos flavonóides C-glicosilados decorre do resultado da polaridade de cada um dos flavonóides , além da posição em que o açúcar está ligado, no caso C-6 ou C-8. Segundo Harborne [32] , a retenção na coluna é diferenciada nas substâncias em que o açúcar está ligado na posição C-6, apresentando um tempo de retenção maior, caso da homoorientina e isovitexina, enquanto que os substituídos na posição C-8, o tempo de retenção é menor, eluindo mais

rapidamente da coluna quando comparado aos seus pares, caso da orientina e vitexina.

A rutina, por ser um flavonóide diglicosilado, teoricamente seria mais solúvel do que os demais flavonóides glicosilados, pois quanto maior a quantidade de açúcares ligados, maior a solubilidade em solventes aquosos. No entanto, a rutina apresentou tempo de retenção maior (próximo à isovitexina), devido ao seu peso molecular e à sua menor solubilidade na fase móvel que os demais flavonóides glicosilados. Por fim, a luteolina, por ser uma aglicona, elui por último, com tempo de retenção maior.

Pelos resultados obtidos por Pereira [16], uma amostra de *P. incarnata* procedente de Campinas apresentou aproximadamente 2,7% de flavonóides totais (expressos como rutina) e uma amostra procedente da Itália, 1,59% de flavonóides totais (expressos como rutina). Esta última foi analisada novamente neste trabalho, apresentando 1,58% de flavonóides totais, enquanto que a média geral das amostras do cultivo experimental de Botucatu foi de 2,59 % de flavonóides totais. Assim, confirmou-se, que a planta cultivada no Brasil, provavelmente devido às condições climáticas, apresenta maiores teores de flavonóides.

Quanto à robustez do método (que mede a sensibilidade que o método apresenta face a pequenas variações), segundo Ribani et al. [62] é um dos itens importantes no processo de validação completa (que envolve estudo interlaboratorial), foi modificado um dos parâmetros neste trabalho, no caso, a supressão do forno com uso da coluna à temperatura ambiente. O que se verificou é que, mesmo com a variação dos instrumentos, reagentes e solventes, os resultados foram equivalentes, demonstrando a robustez intrínseca do

método, já que manteve os resultados equivalentes, mesmo frente a pequenas modificações, conforme se pode avaliar pela tabela 10 .

Tabela 10 – Resultados obtidos em amostra de *P. incarnata* oriunda da Itália e *P. incarnata* cultivada no Brasil, conforme os resultados de Pereira [16].

Amostra	Flavonóides totais como rutina * resultados obtidos por Pereira em mg flavonóide/ g de planta seca	Flavonóides totais como rutina * em mg flavonóide/ g de planta seca média de resultados
<i>P. incarnata</i>		
amostra Itália	15,94 ± 2,16 ^a	15,75 ± 0,12 ^a
<i>P. incarnata</i>		
cultivada	27,41 ± 0,43 ^a	26,10 ± 1,08 ^a
no Brasil		

*Valores médios obtidos ^a desvio padrão

3.4 – Análise quimiométrica

Para a análise multivariada, a matriz de dados foi primeiramente organizada numa planilha no Excell e depois no formato .PIR , sendo necessário o ajuste de escala e manutenção da informação representativa e relevante de todas as variáveis que compunham os dados. Os dados foram então validados (avaliação se haviam dados faltantes ou variáveis e resultados redundantes, além de dados suspeitos ou inválidos). Feito isso, a matriz final

apresentou 22 variáveis: teor de flavonóides totais, de vitexina, isovitexina, orientina, homoorientina, luteolina , temperatura do ambiente, umidade do ambiente e os resultados correspondentes ao solo (K^+ , $H^+ + Al^{3+}$, Ca^{+2} , Mg^{+2} , SB, CTC , V%, M.O, P^{-2} , B, Cu, Fe, Mn , Zn) .

Para realização da análise exploratória de dados, foram avaliadas outras variáveis representando classes diferentes : uma classe representando o período (período 1 : M , período 2 : T e período 3 : TT) , outra classe representando as condições meteorológicas por ocasião da coleta (1: nublado ; 2 : sol e 3: chuva) e finalmente, uma classe relativa aos trimestres de coleta (janeiro a março: 1 ; abril a junho : 2 e outubro a dezembro : 3) . Em relação às amostras, 147 amostras (em duplicata, total de 294) corresponderam às 20 semanas de coleta de folhas de *P. incarnata*.

Os dados foram processados pelo pacote computacional Pirouette 2.1 ® [58], onde foram configuradas as análises dos algoritmos PCA (análise de componentes principais) e HCA (análise de agrupamentos por técnicas hierárquicas), obtendo-se resultados e tabelas de acordo com os parâmetros requeridos durante a avaliação dos dados.

O pré-processamento escolhido para que as variáveis mantivessem a mesma escala e, portanto, o mesmo grau de importância, foi o autoescalamento e como transformação , a normalização para permitir que desvios quanto às diferenças de tomada de ensaio fossem irrelevantes, além de reduzir prováveis distorções na distribuição dos dados [50] . O autoescalamento é efetuado após a combinação da coluna centrada e padronizada, através de transformação *t* de Student (variáveis de Student), usando como cálculos a média estimada e o desvio padrão.

Assim, a matriz de dados para iniciar a análise multivariada é uma matrix X ($I \times M$), onde I = linhas, correspondentes a 294 objetos (amostras) e M , correspondentes às colunas (22 variáveis). Considerando que cada variável é um vetor, ou variável (matriz com I linhas x 1 coluna), cada vetor linha é uma matriz com 1 linha e M colunas (ou seja, a característica da amostra), uma matriz escalar é um número ordinário da variável (1×1), temos as seguintes correlações matemáticas, a partir das relações entre matrizes quadradas e diagonais, além de matrizes inversas [50]; onde l - linha, c - coluna.

➤ Matriz inversa L_{LL} é a matriz que satisfaz a relação

$$L_{LL}^{-1} = L'_{LL}$$

➤ A matriz quadrada é chamada de ortogonal quando

$$L_{ll}^{-1} = L'_{ll} \text{ ou}$$

$$L'_{ll} \cdot L_{ll} = I_{ll}$$

$$I_{ll} = 1$$

$$\sum_{il=1}^c l^2 \rightarrow (C=L)$$

$$i_{lc} = 0$$

$$r \neq c \rightarrow \sum_{i=1}^c l_{il} \cdot l_{ic} = 0$$

Um ponto que as coordenadas $X'M$ no sistema original tem no sistema rotacionado de coordenadas descritas pela matriz ortogonal L_{MM} , é dados pelas coordenadas :

$$Y'_M = X'_M \cdot L_{MM}$$

$$\text{Matriz } Z_{MM} = X'_{MI} \cdot X_{IM}$$

$$V_{MM} (\text{matriz de variância/co-variância na origem}) = 1/(I-1) Z_{MM}$$

Z é uma matriz geralmente não diagonal, mas que pela rotação ortogonal, um novo sistema coordenado pode ser obtido correspondente à matriz diagonal de “Eigenvalues” da matriz de desvios (Λ) :

$$S_{IM} = X_{IM} \cdot L_{MM}$$

$$\Lambda = S'_{MI} \cdot S_{IM}$$

Assim, tem-se o processo conhecido como rotação de Eigenvetor (procedimento utilizado para se obter a matriz ortogonal L e a matriz S de coordenadas no sistema rotacionado) [50], sendo que os novos eixos são conhecidos como eigenvetores e os resultados, como eigenvalues, e temos:

- Direção dos cossenos : são os loadings, para as variáveis.
- Novas coordenadas: são os scores para os objetos (amostras).

As variações a partir da origem é dada pela soma (variância total na origem):

$$\Lambda = \sum_{m=1}^M \lambda_{mm} = \sum_{m=1}^M \sum_{i=1}^I S_{im}^2 = \sum_{m=1}^M \sum_{i=1}^I x_{im}^2$$

$$V_{II}^R = 1/(M-1) Z_{II}^R$$

A rotação Eigenvetor produz uma matriz de loadings , R_{II} e produz uma matriz de scores, F_{MI} , no modo R:

- $F_{mi} = X_{IM} \cdot R_{II}$
- $F_{MM} = X'_{MI} \cdot R_{IM}$
- Quando $M > I$, $\lambda_{mm} = 0$, então $m > I$, temos :
- $S_{IE} = R_{IE} \Lambda^{1/2}_{EE}$
- $L_{ME} = F_{ME} \Lambda^{1/2}_{EE}$

Onde S_{IE} e L_{ME} são as relações entre scores e loadings.

Em relação aos dados originais , os mesmos podem ser visualizados na figura 15 , tanto os loadings (relacionados às variáveis) , quanto os scores (relacionados às amostras) .

Figura 15 – Dados brutos : variáveis (a) e scores (b)

Em relação aos dados brutos, procurou-se avaliar inicialmente se haveria correlação entre as variáveis quanto ao teor de flavonóides totais, porém, não se obteve informação relevante quanto a orientina, homoorientina (exemplo da figura 16) , vitexina, isovitexina , luteolina e entre alguns elementos do solo e do ambiente (M.O., temperatura , % UR, V%, CTC) . Porém foi observada alguma relação entre flavonóides totais e elementos do solo tais como potássio, cobre, boro , cálcio, manganês e ferro.

Figura 16 – Relação amostras: flavonóides totais versus homoorientina

Após essa avaliação preliminar, foram avaliados cada classe respectivamente em relação ao teor de flavonóides totais e todas as classes se mostraram semelhantes quanto à correlação aos flavonóides totais . Cada uma foi avaliada de forma individual, mas não mostrou especificidade quanto aos teores de flavonóides totais. Porém, a formação de 5 agrupamentos (figura 17) foi visível, porém sem confirmar nenhuma tendência específica quanto à classificação das amostras .

Figura 17 –Relação entre flavonóides totais e classes (condições climáticas versus trimestres)

Então, preliminarmente foram retirados 29 “outliers” ou amostras anômalas, nas quais o resultado no teor de flavonóides totais era inferior a 1,3 % (portanto, abaixo do valor mínimo preconizado pelas farmacopéias) e os dados foram transformados e pré-processados, possibilitando iniciar a análise de PCA e HCA. A análise de PCA mostrou que são necessários dez fatores para descrever 96,86% da informação original dos dados, sendo que a primeira e a segunda componentes principais descrevem sozinhas 68 % desta informação, conforme o apresentado na tabela 11.

Tabela 11 – Avaliação de componentes principais

Componentes principais	Variância	Percentual	Acumulado
PC1	2950.35303	48.77423	48.77423
PC2	1165.29382	19.26424	68.03847
PC3	527.92938	8.72755	76.76601
PC4	260.52246	4.30687	81.07288
PC5	222.52928	3.67878	84.75166
PC6	203.75201	3.36836	88.12003
PC7	173.02254	2.86035	90.98038
PC8	159.29453	2.63340	93.61378
PC9	104.63822	1.72984	95.34362
PC10	91.82037	1.51794	96.86156

Quanto aos scores (valores das amostras resultantes da combinação e compressão dos dados), temos na figura 18 a representação gráfica em relação ao quanto da variação total nos dados é resultante de cada adição de componente principal (PC1+ PC2) , onde pode-se verificar que as amostras não foram separadas de acordo com a classe das amostras; há , porém, uma tendência de separação frente à primeira e segunda componentes principais.

Figura 18 - a e b : Scores

O mesmo se aplica para os loadings, ou os dados das variáveis obtidos após a análise multivariada PCA, cuja relação é mostrada graficamente através da figura 19, onde se verifica que na PC1, encontramos tendência para o ferro , o boro e o cobre, além da matéria orgânica, a temperatura, a umidade relativa e a relação hidrogênio/alumínio, enquanto que no eixo da PC2, tendência para os flavonóides totais .

Figura 19 – Loadings

Então realizou-se a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) , onde se procurou similaridade entre as amostras . Foram obtidos 5 clusters ou 5 categorias de amostras , conforme o dendograma (forma gráfica o qual representa a distância euclidiana entre as amostras, quanto mais próximas, mais semelhantes) mostrado na figura 20.

Figura 20 – Dendrograma obtido após análise de HCA para a avaliar o agrupamento das amostras analisadas de *P. incarnata*

Pelo agrupamento das amostras, verifica-se que a tendência das amostras da esquerda para a direita, ou da categoria 1 à categoria 5, diz respeito aos teores de flavonóides totais, que estão em maior concentração em 1 (> 2,5%), em 2 estão com teores altos, superior a 1,75%, em 3, valores superiores a 1,65%; em 4, teores até 2,4% e em 5, valores entre 1,3 e 1,78%. Avaliando-se os elementos boro, ferro e cobre, também apresentaram como características, por exemplo, em 2, valores entre 91 e 123 mg/dm³, em 3, entre 79 e 123 mg/dm³; em 4, entre 79 e 121 mg/dm³ e em 5, entre 91 e 123 mg/dm³. Para cobre, em 2, 0,9 a 1,2 mg/dm³; em 3, entre 0,8 a 1,2 mg/dm³; em 4, entre 0,8 a 1,0 mg/dm³ e em 5, entre 0,9 e 1,2 mg/dm³. Para boro, os valores foram: em 1, entre 0,15 a 0,18 mg/dm³; em 2, entre 0,13 a 0,18 mg/dm³; em 3, entre 0,13 a 0,21 mg/dm³; em 5 entre 0,15 e 0,18 mg/dm³. O cluster ou categoria 5, nitidamente possui amostras que apresentaram baixos teores de flavonóides e é essa característica que o diferencia dos demais clusters.

Pelo dendograma observado na figura 21, relacionado às variáveis, pode-se verificar que os elementos que compõem as componentes principais e com um grau de diferenciação razoável para mostrar os diferentes agrupamentos, seria o teor de flavonóides totais (portanto, uma variável independente, em azul), o ferro (variável do solo, em vermelho), sendo que as demais variáveis apresentam características semelhantes, num grau de similaridade de diferenciação de 0,598.

Figura 21 – Dendograma das variáveis

Para averiguar a influência (em separado) apenas dos elementos do solo com o teor de flavonóides, foi efetuada a análise de PCA e HCA tendo como variáveis apenas: flavonóides totais, Ca, Fe, Cu, Zn, P, K, Mg, Mn e B. Foi possível obter a análise de PCA, onde 3 fatores descrevem em torno de 92% da informação original dos dados, sendo que a primeira e segunda componentes principais descrevem 88% dessa informação, como exemplificado na tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação de componentes principais entre flavonóides totais e elementos do solo

Componentes Principais	Variância	Percentual	Acumulado
PC1	2007.44495	68.74812	68.74812
PC2	562.77972	19.27328	88.02139
PC3	138.64297	4.74805	92.76944

Pelo gráfico de loadings, avalia-se que para as duas componentes principais, temos principalmente para PC1 (componente principal 1), boro, ferro, cobre e potássio, enquanto que para PC2 (componente principal 2) , os flavonóides totais , conforme o apresentado na figura 22.

Figura 22 – Loadings (flavonóides totais versus elementos do solo)

Avaliando apenas B, Cu , Fe e os flavonóides totais, foi possível confirmar as mesmas observações que nas outras análises, onde todos os outros elementos de caracterização do solo e do ambiente, não demonstraram confirmar tendências e relações de correlação. Já para esses quatro elementos (B, Cu, Fe e os flavonóides totais) é possível “enxergar” algumas relações importantes , o que é melhor visualizado através da tabela 13 , onde observa-se

flavonóides :mais concentrado, faixa preta, com valores superiores a 2,5% ;
faixa vermelha correspondente a amostras com teores entre 1,5 e 3,0% e a faixa azul, correspondendo às amostras com teores inferiores a 1,5%, conforme o esquematizado na figura 24.

Figura 24 – Dendrograma com apresentação de três clusters ou categorias, a partir de flavonóides totais e minerais do solo

Assim, verifica-se que o teor de flavonóides totais é uma variável independente, porém que pode sofrer alterações frente a alguns elementos do solo, como Fe , B e Cu , aparentemente relacionados ao menor teor de flavonóides totais . Já o Ca , Mg, Mn, Zn e P, aparentemente estão relacionados ao maior teor de flavonóides totais em *P. incarnata* .

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÃO

Através da avaliação do método por HPLC determinado por Pereira [16] na quantificação dos flavonóides totais (expressos como vitexina) , confirmou-se que o método é robusto, pois mantém a resposta em ensaios interlaboratoriais frente a modificações (no caso, variação na temperatura da coluna) . As folhas de *P. incarnata* apresentaram teores em média de 2,6% ,no ano de 2004 , apresentando teores maiores e de acordo com o preconizado pela farmacopéia européia, por exemplo, mínimo de 1,5% de flavonóides totais nas folhas . Também se confirmou que os teores são maiores na planta cultivada no Brasil quando comparado ao teor de uma amostra procedente da Europa.

O cultivo orgânico se mostrou viável e pela análise quimiométrica pôde ser identificado que os teores de flavonóides totais se correlacionam não apenas aos elementos do solo e do ambiente , mas se relacionam a questões genotípicas, já que não ocorreu uma distribuição sistemática dos flavonóides no decorrer do ano, em diferentes períodos , ou em condições climáticas disponíveis. O que se confirmou também é que elementos do solo como o ferro, o boro e o cobre , influenciam negativamente no teor de flavonóides , enquanto que o cálcio, o fósforo, manganês, zinco e magnésio , podem influenciar de maneira positiva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A . A anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 165-170, 2001.
- [2] MC GUIRE, C. Field Performance and Phenotypic Variation of *Passiflora incarnata* L. in New York State. **Hortscience**, v. 33 , n. 2, p. 240-241, 1998.
- [3] **PASSION flower** Bibliographical notes. Disponível em :< www.aboca.us>. Acesso em
- [4] **PLANTS for a future**. *Passiflora incarnata*. Disponível em < www.raintree.com> . Acesso em
- [5] DHAWAN, K.; KUMAR, S. ; SHARMA, A. Evaluation of Central Nervous System Effects of *Passiflora incarnata* in Experimental Animals. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 2, p. 87-91, 2003.
- [6] LONG, S. F. Preventing and Treating Insomnia. **Trends in Pharmacy and Pharmaceutical Care**. Disponível em < www.rxed.org>. Acesso em
- [7] MARJAMA-LYONS, J. M. , KOLLER , W. C. . Parkinson´s Disease: Update in diagnosis and symptom management. **Geriatrics**, v. 56, n. 8, p. 2001.
- [8] DHAWAN, Kamaldeep; KUMAR, Suresh ; SHARMA, A. A Comparative Biological Activity Study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. **Fitoterapia** , n. 72, p. 698-702, 2001.
- [9] ALONSO, J. R.. **Tratado de Fitomedicina** : bases clínicas y Farmacológicas. Local : Buenos Aires. Editora, Isis Ediciones SRL , 1998.
- [10] DHAWAN, K.; KUMAR, S. ; SHARMA, A. Reversal of Morphine Tolerance and Dependence by *Passiflora incarnata* : a Traditional Medicine to Combat Morphine Addiction. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 8, p. 576-580, 2002.
- [11] DHAWAN, K.; KUMAR, S. ; SHARMA, A. Aphrodisiac Activity of Methanol Extract of Leaves of *Passiflora incarnata* Linn. in Mice . **Phytoterapy Research**, v.17, p. 401-403, 2003 .
- [12] DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a Review Update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. n. 94. p. 1-23, 2004.

- [13] DHAWAN, K. ; KUMAR, S. ; SHARMA, A. Anxiolytic Activity of Aerial and Underground Parts of *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. **Fitoterapia**, v. n. 72, p. 698-702. 2001.
- [14] FISHER, A. A ; PURCELL, P. ; LE COUTEUR, D. G. Toxicity of *Passiflora incarnata* L. **Clinical Toxicology**, v.38, n.1, p. 63-66, 2000.
- [15] FUGH-BERMAN, A. ; COTT, J. M.. Dietary Supplements and Natural Products as Psychotherapeutic Agents. **Psychosomatic Medicine** , v. 61 . p. 712-728 , 1999.
- [16] PEREIRA, Cíntia Alessandra Matiucci. **Estudo cromatográfico (HPLC, HPTLC , LC-MS) e análise microscópica das folhas de espécies de *Passiflora* L.** 2002. f. 272.Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- [17] SOUZA, J. L. S. **Manual de Horticultura Orgânica** . Minas Gerais: Editora Viçosa, 2003.
- [18] ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J. R.; KHAN, I. A. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprint of Medicinal Plants. **Pharmaceutical Biology**, v.40, p.81-91. 2002.
- [19] **EUROPEAN Pharmacopoeia**, 5. ed. Local : , Editora: Council of Europe, 2004.
- [20] **FARMACOPÉIA** Portuguesa. 6. ed.: Lisboa, 6^a. edição. Editora : v.6 supl., 2000.
- [21] **PHARMACOPÉE** Française. 10. ed. Paris: Adrappharm, 1980. 1v.
- [22] **THE COMPLETE german commission E**, Monographs : Therapeutic Guide to Herbal Medicines . Mark Blumenthal : American Botanical Council, EUA, 1998.
- [23] **ANVISA RDC 48** . Disponível < www.anvisa.gov.br/e-legis/>
- [24] PEREIRA, C. A. M. . A HPTLC Densitometric Determination of Flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and Comparison with HPLC Method. **Phytochemical Analysis**, v, n. 15, p.241-248, 2004.
- [25] SÉTIMA SEMANA INTERNACIONAL DE FRUTICULTURA E AGROINDÚSTRIA, 7 , Fortaleza , 2000. **Técnicas de Cultivo do Maracujá. Instituto de Desenvolvimento da Fruticultura e Agroindústria (FRUTAL)**. Editado por Ronaldo de Oliveira Sales, 29p, 2000.
- [26] **FARMACOPÉIA** Brasileira . 3 .ed. São Paulo : Atheneu Editora, 1977.

[27] BRUCKNER, C. H. ; PICANÇO , M. C. **Maracujá** : Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria , mercado. São Paulo : Editora Cinco Continentes, 2001.

[28] FIALLO, V. et. Al. Instructivo Técnico del Cultivo de *Passiflora incarnata* L. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais** www.infomed.sld.cu.2000

[29] **A CULTURA** do maracujazeiro em São Paulo. Informações Técnicas. Disponível < www.iac.sp.gov.br. > Acesso em 1999

[30] **DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS EUA** www.mas.usda.gov/nop/index IE.htm

[31] **IBD – Instituto Biodinâmico** – www.ibd.com.br

[32] HARBORNE, J. B. **The Flavonoids**: advances in research since 1986: Ed. Chapman & Hall. 1994.

[33] AMIC, D. et. al. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. **Croatica Chemica Acta**, v. 76, n. 1, p. 55-61, 2003.

[34] COSTA, A. F. **Farmacognosia Experimental**. Vol.3. 3. ed. Fundação Calouste Gulberkian. Lisboa, 2000.

[35] HALL, R.D. Plant Metabolomics : from Holistic Hope, to Hype, to Hot Topic. **New Phytologist**, v.169, p.453-468, 2006.

[36] MARCHART, E.; KRENN, L.; KOPP, B.. Quantification of the Flavonoid Glycosides in *Passiflora incarnata* by Capillary Electrophoresis. **Planta Medica**, n.69, p.452-456, 2003.

[37] SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTMANN, K. **Journal of Chromatography**, v.389, p.450 (1987)

[38] COLOMBO , R. et al.On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography-UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1082, p.51-59, 2005.

[39] SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Rio de Janeiro :Ed. Roberto Pinzón S. Convênio Cyted., 2000.

[40] HE, G. et al. Optmization of Conditions for Supercritical Fluid Extraction of Flavonoids from Hops (*Humulus lupulus* L.) . **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6B, n. 10, p. 999-1004, 2005.

- [41] STAPLETON, A. E. ; WALBOT, V. Flavonoids can Protect Maize DNA from the Induction of Ultraviolet Radiation Damage. **Planta Physiology**, v. 105. p. 881-889, 1994.
- [42] WROLSTAD, R.E . et al. Tracking Color and Pigment Changes in Anthocyanin Products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 423-428, 2005.
- [43] SKOOG – HOLLER, N. **Princípios de Análise Instrumental** . 5. ed. Bookman, 1992.
- [44] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York : John Willey & Sons, 1997.
- [45] QUERCIA, V. et al. Identification and Determination of Vitexin and Isovitexin in *Passiflora incarnata* Extracts. **Journal of Chromatography**, v.161. p. 396-402 , 1978.
- [46] QUI MIN, Li.. Mass Spectral Characterisation of C-glycosidic Flavonoids Isolated from a Medicinal Plant (*Passiflora incarnata*) . **Journal of Chromatography**, v.562, p. 435-446, 1991.
- [47] RAFFAELLI , A. et al. Mass Spectrometric Characterisation of Flavonoids in Extracts from *Passiflora incarnata*. **Journal of Chromatography A**, v.777, p. 223-231 , 1997.
- [48] ABOURASHED, E. A . , VANDERPLANK, J. ; KHAN, I. A. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprint of Medicinal Plants – II. Application to Harman Alkaloids of Genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 2, p. 100-106, 2003.
- [49] MULLER, S. D. et al. LC and UV Determination of Flavonoids from *Passiflora alata* Medicinal Extracts and Leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** , v. 37, n.2, p. 399-403, 2005.
- [50] MELOUN, M.; MILITKÝ, J. ; FORINA, M. **Chemometrics for Analytical Chemistry** :PC, aided Statistical Data Analysis .England: Ellis Horwood. LT , 1992, v.1.
- [51] NAES, T. ; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIS, T. **Multivariate Calibration and Classification**. NIR Publications, 6. England, 2002.
- [52] FERREIRA, M. M. C.; MONTANARI, C. A. ; GAUDIO, A. C. Seleção de Variáveis em QSAR . **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 439-448, 2002.
- [53] HARRIGAN, G. G.; BRACKETT , D. J. ; BOROS , L. G. Medicinal Chemistry, Metabolic Profiling and Drug Target Discovery : A Role for Metabolic Profiling in Reverse Pharmacology and Chemical Genetics. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 13-20, 2005.

- [54] ALVARENGA, S. A. V. et al. A General Survey and Some Taxonomic Implications of Diterpenes in the *Asteraceae*. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 147, p. 291-308, 2005.
- [55] DE COEN, W. M., JANSSEN, C. R. A Multivariate biomarker-Based Model Predicting Population-Level Responses of *Daphnia Magna*. **Journal Environmental Toxicology and Chemistry**, v.22, p. 2195-2201, .
- [56] GUANG-HUA, L. et al. Development of High-Performance Liquid Chromatographic Fingerprints for Distinguishing Chinese Angelica from Related *Umbeliferae* Herbs. **Journal of Chromatography A.**, v.1073, p. 383-392, 2005.
- [57] SEGURA, S. D et al. Mapping the Potential Distribution of Five Species of *Passiflora* in Andean Countries. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p.555-566, 2003.
- [58] **INFOMETRIX** / Pirouette® . Disponible < www.infometrix.com>
- [59] **RAIJ**, B. van. **Avaliação de Fertilidade de Solos Tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285p.
- [60] NIESSEM, W.; GREEF, J. van. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry** : principles and applications .: Ed. Marcel Dekker, 1992.
- [61] SCOTT, Raymond P.W. **Silica Gel and Bonded Phases** : their production, properties and use in LC . New Cork : John Wiley, 1993.
- [62] RIBANI et. al . Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p.770-781, 2004.