



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

WAGNER EZEQUIEL RISSO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANÁLISE  
EXPLORATÓRIA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS  
EXTRATOS DAS FOLHAS DE *VERNONIA CONDENSATA*  
BAKER**

---

Londrina  
2006

WAGNER EZEQUIEL RISSO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANÁLISE  
EXPLORATÓRIA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS  
EXTRATOS DAS FOLHAS DE *VERNONIA CONDENSATA*  
BAKER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química dos Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio  
Co-orientação: Profa. Dra. Estefânia Gastaldello  
Moreira

Londrina  
2006

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

#### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R596e Risso, Wagner Ezequiel.  
Estudo da atividade antinociceptiva e análise exploratória da composição química dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker / Wagner Ezequiel Risso. – Londrina, 2008.  
97f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.  
Co-orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.  
Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais, 2008.  
Inclui bibliografia.

1. Quimiometria – Teses. 2. Química analítica – Teses. 3. Extração por solventes – Teses. 4. Plantas – Análise – Teses. 5. Vernonia – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Moreira, Estefânia Gastaldello. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais. IV. Título.

CDU 543

WAGNER EZEQUIEL RISSO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANÁLISE  
EXPLORATÓRIA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS  
EXTRATOS DAS FOLHAS DE *VERNONIA CONDENSATA*  
BAKER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química dos Recursos Naturais.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio (Orientadora)

---

Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel

---

Prof. Dr. Noboru Hioka

Londrina, 06 de Outubro de 2006.

**A Deus, a minha família, a Fernanda e aos  
meus amigos...companheiros de todas as horas...**

## AGRADECIMENTOS

- A Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio pela ótima orientação e principalmente pela amizade e dedicação na realização de todas as etapas do trabalho.
- A Professora Dra. Estefânia Gastaldello Moreira pela inestimável colaboração na realização deste trabalho, principalmente na realização dos testes farmacológicos.
- A minha namorada Fernanda Delarosa, pelo seu carinho, paciência, motivação e companheirismo durante toda esta jornada.
- As professoras Dra. Claudete Faiad Name e Dra. Juliana pela colaboração neste trabalho.
- A minha família pela confiança e eterna motivação.
- Aos colegas de laboratório: Fábio, Gabriela, Lina, Aline, Raquel e Sabrina.
- Aos amigos e colegas do mestrado: Lilyan, Adriana, Rosa, Patrícia, Alfredo e Priscila.
- A todos do Laboratório de Produção de Medicamentos da UEL pelo auxílio e por ter gentilmente permitido a utilização do FTIR.
- A todos os professores do Programa de Mestrado em Química dos Recursos Naturais.
- A todo Departamento de Química, professores e técnicos.
- A todo Departamento de Ciências Fisiológicas, professores e técnicos.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

RISSO, Wagner Ezequiel. **Estudo da atividade antinociceptiva e análise exploratória da composição química dos extratos das folhas de *vernonia condensata baker***. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

## RESUMO

Métodos quimiométricos de planejamento experimental e de análise multivariada foram associados a dados espectroscópicos para discriminar diferentes extratos das folhas da espécie *Vernonia condensata* Baker. No processo de extração foram usados os solventes etanol, acetato de etila, diclorometano e acetona puros e em misturas binárias, ternárias e quaternárias. Investigou-se a influência dos diferentes solventes no meio extrator por planejamento de misturas com quatro componentes na preparação dos extratos. Modelos de análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica (AH), aplicados aos dados fornecidos pela espectroscopia de absorção no infravermelho e ultravioleta-visível, mostraram-se ferramentas úteis na investigação da composição química dos extratos. Além da análise química, neste estudo também avaliamos em camundongos, a atividade antinociceptiva dos diferentes extratos através do modelo de contorções abdominais, bem como a dose letal média, DL50, de cada extrato, ou seja, a dose que causa a morte de metade dos animais teste. Os extratos que mostraram atividade antinociceptiva em todas as doses utilizadas foram: aquoso, etanol puro, misturas binárias de etanol-acetato de etila e diclorometano-acetona e misturas ternárias de etanol-acetato de etila-diclorometano e etanol-diclorometano-acetona. A aplicação de modelos de superfícies de resposta com quatro componentes mostraram que extratos preparados em misturas binárias de diclorometano-acetona são recomendados para uma melhor resposta antinociceptiva. Para confirmar a validade dos modelos, foi preparada uma nova mistura binária de acetona-diclorometano na proporção 3:2 (v/v) e, após a obtenção do extrato, realizou-se a avaliação da atividade antinociceptiva que comprovou a validade dos modelos para as doses de 80 e 160 mg/kg.

**Palavras-chave:** Quimioterapia. Química analítica. Extração por solventes. *Vernonia*. Plantas. Análise.

RISSO, Wagner Ezequiel. **Estudo da atividade antinociceptiva e análise exploratória da composição química dos extratos das folhas de *vernonia condensata baker***. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

### ABSTRACT

Chemometric methods of experimental design associated with multivariate analysis were applied to spectroscopic data to discriminate different extracts from the leaves of the species *Vernonia condensata* Baker. For the extraction, four solvents (ethanol, ethyl acetate, dichloromethane and acetone) and their binary, ternary and quaternary mixtures were used. This approach allowed to determine the influence of the solvent extractor in the preparation of the extracts. Models of principal component analysis (PCA) and hierarchical analysis (AH), applied to data from the absorption spectroscopy in the infrared and ultraviolet-visible have proved to be useful tools in the investigation of the chemical composition of extracts. Besides the chemical investigation, we also evaluated in mice the antinociceptive activity of the different extracts through the abdominal constriction model as well as the lethal dose 50%, LD50, i.e., the dose that causes the death of half of the tested animals. The extracts that presented antinociceptive activity at all doses used were: Aqueous, ethanol pure, ethanol-ethyl acetate and dichloromethane-acetone binary mixtures and ethanol-ethyl acetate-dichloromethane and ethanol-dichloromethane-acetone ternary mixtures. The application of models for areas of response with four components revealed that the extract obtained through the dichloromethane-acetone binary mixture showed the highest antinociceptive effect. In order to confirm the validity of the model, a new binary mixture of acetone- dichloromethane was prepared in the proportion 3:2 (v/v) and its antinociceptive activity was assessed. The results proved the validity of the model for the doses of 80 and 160 mg/kg.

**Keywords:** Analytical chemistry. Solvent extraction. Plants. Analysis. Petroleum waste. Vernonia.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Espaço experimental para processos com quatro fatores independentes que inclui todos os pontos dentro do tetraedro .....	20
<b>Figura 2</b> – Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).....	24
<b>Figura 3</b> – Esquema da decomposição da matriz <b>X</b> no produto de duas matrizes.....	27
<b>Figura 4</b> – Procedimento experimental para a obtenção de dados espectroscópicos e avaliação da DL <sub>50</sub> e atividade antinociceptiva das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker .....	30
<b>Figura 5</b> – Foto da espécie <i>Vernonia condensata</i> Baker e da exsicata depositada no herbário FUEL.....	31
<b>Figura 6</b> – Triângulo de solvente seletividade de Snyder .....	34
<b>Figura 7</b> – Triângulo de seletividade baseado nos dados solvatocrômicos da Tabela 2 .....	36
<b>Figura 8</b> – Planejamento experimental do tipo Centroides simplex com 4 componentes .....	38
<b>Figura 9</b> – Seqüência do procedimento para o preparo dos extratos para a escolha do solvente extrator .....	40
<b>Figura 10</b> – Esquema utilizado para o fracionamento dos extratos .....	41
<b>Figura 11</b> – Procedimento para a avaliação da DL <sub>50</sub> com dose inicial de 2000 mg/kg .....	45
<b>Figura 12</b> – Gráfico dos rendimentos obtidos usando planejamento de misturas de quatro componentes.....	46
<b>Figura 13</b> – Curvas de nível para o rendimento do extrato das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker usando o modelo cúbico especial de misturas de quatro componentes.....	48
<b>Figura 14</b> – Resíduos deixados pelo modelo cúbico especial no estudo do rendimento do extrato das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker.....	48
<b>Figura 15</b> – Respostas previstas pelo modelo cúbico especial .....	49
<b>Figura 16</b> – Espectro no ultravioleta-visível dos 16 extratos obtidos das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker.....	49
<b>Figura 17</b> – Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos extratos no ultravioleta visível, que explicam 19,05 % da variância total.....	50

<b>Figura 18</b> – Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 dos extratos no ultravioleta-visível ...	51
<b>Figura 19</b> – Dendrograma obtido pela análise hierárquica dos 16 extratos de <i>Vernonia condensata</i> Baker.....	52
<b>Figura 20</b> – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e dos loadings do fator 2.....	53
<b>Figura 21</b> – Espectro no ultravioleta-visível dos 16 extratos obtidos das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker, com destaque aos espectros dos extratos 1, 3, 6, 11 e aquoso .....	54
<b>Figura 22</b> – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e dos loadings do fator 3.....	55
<b>Figura 23</b> – Espectro no ultravioleta visível dos 16 extratos obtidos das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker, com destaque aos espectros dos extratos 2, 8 e 9 .....	56
<b>Figura 24</b> – Espectro no ultravioleta visível dos 16 extratos obtidos das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker, com destaque aos espectros dos extratos 1, 7, 12, 14 e aquoso .....	57
<b>Figura 25</b> – Espectros no infravermelho das 16 extratos obtidos das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker .....	58
<b>Figura 26</b> – Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos dados espectrais dos 16 extratos das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker .....	58
<b>Figura 27</b> – Dendrograma obtido baseado nos dados dos espectros FTIR dos extratos....	59
<b>Figura 28</b> – Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 16 amostras no infravermelho .....	60
<b>Figura 29</b> – Gráfico dos rendimentos em massa das frações obtidas dos extratos das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker .....	62
<b>Figura 30</b> – Espectros no infravermelho da fração intermediária de cada extrato obtido das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker .....	63
<b>Figura 31</b> – Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos dados espectrais obtidos das 15 amostras da fração intermediária.....	64
<b>Figura 32</b> – Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 15 amostras da fração intermediária.....	65
<b>Figura 33</b> – Espectros no infravermelho da fração polar de cada extrato obtido das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker .....	67

<b>Figura 34</b> – Gráfico dos escores dos fatores 3 e 4 dos dados espectrais obtidos das 15 amostras da fração polar .....	68
<b>Figura 35</b> – Gráfico dos loadings dos fatores 3 e 4 para as 16 amostras da fração polar ..	70
<b>Figura 36</b> – Espectros no infravermelho da fração neutra de cada extrato obtido das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker. ....	71
<b>Figura 37</b> – Gráfico dos escores dos fatores 1 e 3 dos dados espectrais obtidos das 15 amostras da fração neutra .....	72
<b>Figura 38</b> – Gráfico dos loadings dos fatores 1 e 4 para as 15 amostras da fração neutra .....	73
<b>Figura 39</b> – Spot-test para identificação de alcalóides nos extratos da planta utilizando o reagente de Dragendorff .....	75
<b>Figura 40</b> – Teste para identificação de compostos fenólicos .....	75
<b>Figura 41</b> – Teste para identificação de saponinas .....	76
<b>Figura 42</b> – Teste para identificação de flavonóides. O tubo A contém o material vegetal seco em etanol 70% e no tubo B contém o material vegetal seco em etanol 70%, raspas de magnésio e ácido clorídrico concentrado.....	76
<b>Figura 43</b> – Teste para identificação de taninos. No tubo A contém o contém o material vegetal seco puro; no tubo B contém o material vegetal seco com FeCl <sub>3</sub> 1% em metanol .....	77
<b>Figura 44</b> – Avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos (a) 2 (acetato de etila), (b) 4 (acetona), (c) 6 (et-dc), (d) 8 (ae-dc) e (e) 13 (et-dc-ac), sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético. *p < 0,05 em relação ao grupo controle tratado com solução veículo. # p < 0,05 em relação ao grupo controle positivo tratado com o analgésico ibuprofeno (ANOVA complementada com Student-Newman-Keuls) .....	79
<b>Figura 45</b> – Avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos (a) 1 (etanol), (b) aquoso, (c) 5 (et-ae), (d) 10 (dc-ac), (e) 11 (et-ae-dc) e (f) 12 (et-dc-ac) sobre as contorções abdominais induzidos por ácido acético. *p < 0,05 em relação ao grupo controle tratado com solução veículo. # p < 0,05 em relação ao grupo controle positivo tratado com o analgésico ibuprofeno (ANOVA complementada com Student-Newman-Keuls) .....	80

<b>Figura 46</b> – Avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos (a) 3 (diclorometano), (b) 7 (et-ac), (c) 9 (ae-ac) e (d) 14 (ae-dc-ac), sobre as contorções abdominais induzidos por ácido acético. *p < 0,05 em relação ao grupo controle tratado com solução veículo. # p < 0,05 em relação ao grupo controle positivo tratado com o analgésico ibuprofeno. (ANOVA complementada com Student-Newman-Keuls).....	81
<b>Figura 47</b> – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e da porcentagem de inibição nociceptiva pelos extratos na dose de 40 mg/kg .....	84
<b>Figura 48</b> – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e da porcentagem de inibição nociceptiva pelos extratos na dose de 80 mg/kg .....	85
<b>Figura 49</b> – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e da porcentagem de inibição nociceptiva pelos extratos na dose de 160 mg/kg .....	86
<b>Figura 50</b> – Avaliação da atividade do extrato otimizado na proporção 3:2 (v/v), sobre as contorções abdominais induzidos por ácido acético. *p < 0,05 em relação ao grupo controle tratado com solução veículo .....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação dos solventes de acordo com a seletividade normalizada .....	35
<b>Tabela 2</b> – Matriz de planejamento para a escolha do solvente extrator .....	39
<b>Tabela 3</b> – Valores de DL50 para todos os extratos .....	78
<b>Tabela 4</b> – Porcentagem de inibição nociceptiva obtida para cada extrato .....	83
<b>Tabela 5</b> – Porcentagem de inibição nociceptiva obtida para o extrato otimizado .....	87

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**Ac** – Acetona

**ae** – Acetato de etila

**ACP** – Análise de Componentes Principais

**AH** – Análise Hierárquica

**dc** – Diclorometano

**DL<sub>50</sub>** – Dose letal 50%

**et** – Etanol

**FTIR** – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**p** – Variáveis

**P** – Matriz dos escores

**q** – Número de componentes principais

**t** – Transposta da matriz

**T** – Matriz dos loadings

**UV-Vis** – Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta-visível

**X** – Matriz

**$\alpha$**  – Acidez do solvente

**$\beta$**  – Basicidade do solvente

**V<sub>as</sub>** – Vibração de deformação axial assimétrica

**V<sub>s</sub>** – Vibração de deformação axial simétrica

**$\epsilon$**  – Resíduos

**$\delta_{as}$**  – Vibração de deformação angular assimétrica

**$\delta_s$**  – Vibração de deformação angular simétrica

**$\pi^*$**  – Dipolaridade

**®** – Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	15
<b>1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	15
<b>CAPÍTULO II</b> .....	19
<b>2 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS</b> .....	19
2.1 MODELAGEM DE MISTURAS .....	19
2.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS .....	23
2.2.1 Pré-Processamento das Amostras .....	25
2.2.1.1 Normalização .....	25
2.2.1.2 Normalização por Área Unitária .....	25
2.2.1.3 Normalização por Comprimento do Vetor .....	25
2.2.2 Pré-Processamento das Variáveis .....	26
2.2.2.1 Escalamento por Variância .....	26
2.2.2.2 Centrar na Média .....	26
2.2.2.3 Autoescalamento .....	26
2.2.2.4 Normalização Seguida de Autoescalamento .....	27
2.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) .....	27
2.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA (AH) .....	28
<b>CAPÍTULO III</b> .....	30
<b>3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL</b> .....	30
3.1 PLANTA .....	31
3.2 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE <i>VERNONIA CONDENSATA</i> BAKER .....	31
3.3 EQUIPAMENTOS .....	32
3.4 REAGENTES E FÁRMACOS .....	32
3.5 PROCESSO DE EXTRAÇÃO .....	33
3.6 ESCOLHA DOS SOLVENTES .....	33
3.7 PREPARO DO SISTEMA EXTRATOR .....	37
3.8 PREPARO DOS EXTRATOS .....	38
3.9 EXTRATO AQUOSO .....	40
3.10 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS .....	40
3.11 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	41

3.12 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis).....	42
3.13 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NA PLANTA.....	42
3.13.1 Reagente de Dragendorff.....	42
3.13.2 Ensaio de Identificação .....	42
3.13.2.1 Alcalóides .....	42
3.13.2.2 Saponinas.....	43
3.13.2.3 Compostos Fenólicos.....	43
3.13.2.4 Taninos .....	43
3.13.2.5 Flavonóides.....	43
3.14 ANIMAIS .....	44
3.15 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL <sub>50</sub> ) .....	44
3.16 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA .....	45
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>46</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
4.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS .....	46
4.2 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL .....	49
4.3 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	57
4.4 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS .....	61
4.4.1 Rendimento das Frações.....	61
4.4.2 Análise das Frações por Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	62
4.4.2.1 Fração Intermediária.....	62
4.4.2.2 Fração Polar.....	67
4.4.2.3 Fração Neutra .....	71
4.5 TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS: SPOT – TEST .....	74
4.6 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL <sub>50</sub> ) .....	77
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	78
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>89</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>92</b>

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana<sup>1</sup>. As plantas medicinais constituem fonte imediata e viável de medicamentos para enfermidades com poucos recursos terapêuticos<sup>2</sup>. Acredita-se que entre os motivos que explicam a opção pelo uso delas estão: a insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos medicamentos alopáticos, aliados à admiração pelos "produtos naturais"<sup>3</sup>.

A OMS (Organização Mundial de Saúde) define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos". Estas plantas são comercializadas apoiadas em propagandas que prometem "benefícios seguros, já que são naturais". Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validação científica, por não terem suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos ou clínicos<sup>4</sup>.

Poucos destes produtos foram estudados de acordo com protocolos científicos modernos. A maioria não pode, portanto, ser aceita como medicamento ético de prescrição livre porque, em geral, são produtos sem eficácia comprovada na espécie humana, sem estudos da eventual toxicidade e sem controle de qualidade apropriado<sup>3</sup>. Se a espécie vegetal medicinal estudada sofreu apenas investigação fitoquímica, deixando de lado a abordagem farmacológica, são válidos estudos que interliguem áreas multidisciplinares como etnobotânica, química e farmacologia, buscando resultados que possam validar ou não o uso da planta como medicinal<sup>1</sup>. Um dos fatores de extrema importância para a descoberta de princípios ativos naturais consiste, principalmente, na interação entre a química e a farmacologia. Quanto mais estreita for esta colaboração, mais rápidos e consistentes serão os objetivos<sup>5</sup>.

A etnobotânica é citada na literatura como sendo o caminho alternativo que mais evoluiu nos últimos anos para a descoberta de produtos naturais bioativos. Esta área de pesquisa enfoca dois fatores fundamentais: coleta e utilização medicinal da planta<sup>1</sup>. A

etnofarmacologia é definida como "a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem". A etnofarmacologia constitui-se um elemento metodológico fundamental na busca de novas substâncias bioativas<sup>6</sup>. A etnobotânica aplicada ao estudo de plantas medicinais trabalha em estreita relação com a etnofarmacologia<sup>1</sup>.

É inegável a contribuição da medicina popular (caboclos, índios, curandeiros) na busca de novos princípios ativos para o desenvolvimento de novos fármacos. Dificilmente uma planta é escolhida por acaso para desenvolver uma pesquisa<sup>6</sup>. Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso. Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular<sup>7</sup>. Dos 250 medicamentos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente obtidos de plantas medicinais e um número significativo é de fármacos sintéticos obtidos a partir de plantas medicinais<sup>3</sup>.

Várias espécies do gênero *Vernonia* (Asteraceae = Compositae) são usadas na medicina tradicional, principalmente na América do Sul, Central, bem como na África. No Brasil, *Vernonia condensata* Baker é uma das espécies de *Vernonia* mais frequentemente usadas na medicina popular para várias indicações, tais como distúrbios gastrintestinais, dor de cabeça e estimulante do apetite<sup>8</sup>. A espécie *Vernonia condensata* Baker é nativa possivelmente da África e trazida ao Brasil ainda nos tempos coloniais pelos escravos<sup>9</sup>. Os nomes populares mais comuns são 'boldo', 'boldo grande', 'assa-peixe', 'figatil', 'macelão', 'alumã', etc. Muitas pessoas acreditam erroneamente que cultivam o boldo-do-chile (*Peumus boldus*), porém, esta planta é muito rara no Brasil. Outras plantas são também conhecidas como boldo, principalmente as plantas do gênero *Plectranthus* (Lamiaceae), conhecidas popularmente como boldo-da-terra (*Plectranthus barbatus*) e boldo-miúdo (*Plectranthus neochilus*)<sup>10</sup>. Na composição química de *Vernonia condensata* Baker são documentadas as presenças de saponinas, glicosídeos cardiotônicos (vernonina), flavonóides, ácido clorogênico, óleos essenciais e lactonas sesquiterpênicas<sup>8,10</sup>.

Alguns usos tradicionais das folhas de *Vernonia condensata* Baker podem ser justificados por dados fornecidos por estudos farmacológicos. Recentemente, demonstrou-se que extratos aquosos de suas folhas possuem propriedades analgésicas e inibem dose-dependentemente as contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos<sup>11</sup>. O extrato aquoso mostrou também ação protetora da mucosa gástrica dos efeitos ulcerogênicos provocados pelos antiinflamatórios não-esteroidais indometacina e

ácido acetilsalisílico. O pré-tratamento com extrato aquoso também foi capaz de inibir o edema da pata e a hiperalgesia, induzidos por carragenina em ratos, assim como a peritonite induzida por caulim em camundongos<sup>11</sup>.

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificadas<sup>7</sup>. A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas<sup>12</sup>.

A identificação dos compostos orgânicos pode ser feita através da espectroscopia na região do infravermelho, que é interpretado em termos de presença ou ausência de grupos funcionais, e da espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), que define a presença de compostos que possuem ligações insaturadas em conjugação<sup>1</sup>. A aplicação destes métodos aos extratos de plantas possibilitaria discriminá-los e correlacioná-los com suas respectivas atividades farmacológicas.

A atividade antinociceptiva feita através do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos foi desenvolvida por Koster et al (1957) e modificado por vários pesquisadores ao longo dos anos<sup>13</sup>. A dose letal 50%, DL<sub>50</sub>, ou seja, a dose que causa a morte de metade do número de animais teste, foi realizada de acordo com o guia editado pela Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômicas<sup>14</sup>.

A extração de informações dos resultados de um experimento químico envolve a análise de um grande número de variáveis. Muitas vezes, um pequeno número dessas variáveis contém as informações químicas mais relevantes, enquanto que a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados em termos químicos. A decisão sobre quais variáveis são importantes, é feita, geralmente, com base na intuição química ou na experiência, ou seja, é baseada em critérios mais subjetivos do que objetivos<sup>15</sup>.

A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento, sendo univariada quando somente uma variável é medida sistematicamente por várias amostras. Há muito tempo a estatística univariada vem sendo aplicada a problemas químicos, mas sua utilização tornou-se limitada. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, ganhando rapidamente popularidade e dando origem a uma nova disciplina, batizada de Quimiometria. O modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo extrair maior quantidade de informações dos dados que estão sendo analisados<sup>16</sup>.

De uma maneira geral, um conjunto de dados químicos consiste de vários objetos, descritos por um determinado número de variáveis. Os objetos químicos típicos são amostras analíticas ou compostos químicos. As variáveis são, muitas vezes, derivadas das quantidades de constituintes químicos nos objetos, por exemplo, concentrações de elementos mais importantes, altura de picos em perfis cromatográficos, comprimentos de onda em perfis espectroscópicos. As variáveis medidas devem ser as mesmas para todos os objetos<sup>15</sup>.

O objetivo da análise exploratória é extrair informações dos dados, estabelecendo relações entre objetos e variáveis. A análise exploratória não estabelece modelos *à priori*, mas permite que, a partir das relações observadas nos dados, sejam levantadas hipóteses e propostos modelos<sup>15</sup>. Dois métodos de análise exploratória foram usados neste trabalho, a análise de componentes principais e análise hierárquica.

A análise por componentes principais reduz as variáveis através de critérios objetivos permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística. Este método tem por finalidade básica a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais, com o objetivo de reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, detectar amostras anômalas, selecionar variáveis e fazer modelagens de classificação, enquanto simultaneamente retém a informação contida nos dados<sup>15</sup>.

A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma no qual as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. A suposição básica de sua interpretação é que, quanto menor for a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras<sup>17</sup>.

O objetivo geral deste trabalho foi utilizar métodos quimiométricos de planejamento experimental e de análise multivariada associados a dados espectroscópicos para discriminar diferentes extratos das folhas da espécie *Vernonia condensata* Baker e avaliar a atividade antinociceptiva e a DL<sub>50</sub>. Os objetivos específicos foram:

- ❖ Investigar a influência de diferentes solventes no meio extrator por planejamento de misturas com quatro componentes na preparação dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker;
- ❖ Aplicar métodos quimiométricos de análise multivariada associados a dados espectroscópicos para comparar a variação composicional dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker;
- ❖ Identificar a DL<sub>50</sub> de todos os extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker;
- ❖ Avaliar a atividade antinociceptiva dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

## CAPÍTULO II

### 2 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

#### 2.1 MODELAGEM DE MISTURAS

Mistura é o ato ou efeito de associar vários ingredientes para formar um produto. O produto resultante de uma mistura tem características que dependem da natureza de seus ingredientes e das proporções relativas dos mesmos, não da quantidade total da mistura. A soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%. Para uma mistura qualquer de  $q$  componentes, pode-se escrever:

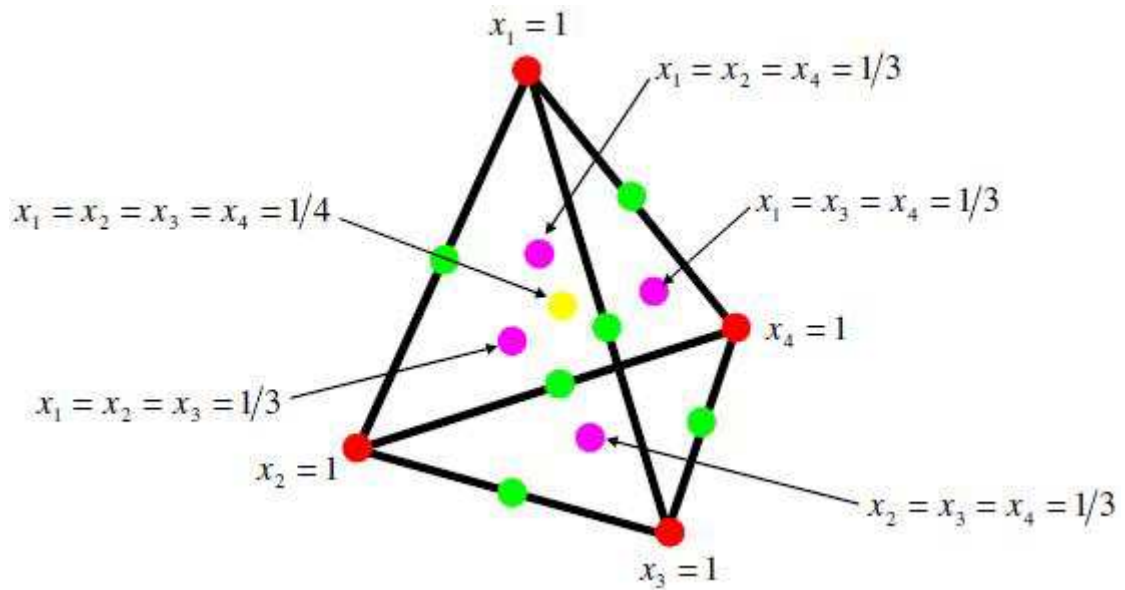
$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1, \quad (1)$$

no qual  $x_i$  representa a proporção do  $i$ -ésimo componente. Esta equação retira um grau de liberdade das proporções. Para especificar a composição da mistura, só precisam fixar as proporções de  $q - 1$  componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100%<sup>18</sup>.

Como resultado da restrição da Equação 1 os valores de  $x_i$  (proporção do  $i$ -ésimo ingrediente), o espaço torna-se uma região simplex. Um simplex é uma configuração espacial determinada por um número de pontos uma a mais do que o número de dimensões do espaço. Cada um dos  $q$  pontos que determinam o simplex representam uma mistura no qual um dos  $q$  componentes assume a proporção 1.

Para sistemas com quatro fatores independentes, pode-se realizar experimentos correspondentes a qualquer ponto dentro do tetraedro da Figura 1.

As composições da mistura quaternária são representadas pelos pontos pertencentes ao tetraedro. Os vértices correspondem aos componentes puros e os lados às misturas binárias, em cada face do tetraedro os pontos representam misturas ternárias e no ponto central do tetraedro temos a mistura quaternária<sup>18</sup>.



**Figura 1** – Espaço experimental para processos com quatro fatores independentes que inclui todos os pontos dentro do tetraedro.

Além da restrição natural mostrada na Equação 1, pode-se também ter restrições dos limites superiores e inferiores dos teores dos componentes na mistura, por motivos tecnológicos ou econômicos, entre outros. Obviamente a soma de todos esses limites tem de ser menor que um, senão será impossível de preparar a mistura. Tais restrições para um caso geral de  $q$  componentes são escritas conforme a Equação 2. Estes pontos são chamados os vértices do simplex<sup>18</sup>.

$$0 \leq \alpha_i \leq c_i \quad \text{e} \quad \sum_{i=1}^q \alpha_i < 1, \quad i = 1, 2, \dots, q. \quad (2)$$

no qual  $\alpha_i$  são os limites inferiores não nulos.

O modelo mais simples para uma mistura é o modelo linear ou aditivo, que procura explicar o comportamento de uma propriedade apenas com os resultados obtidos com a utilização de cada componente individualmente, isto é, prever o comportamento de qualquer mistura sem realizar nenhuma mistura:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \varepsilon_i, \quad (3)$$

no qual  $y_i$  é um valor experimental da resposta de interesse,  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3$  e  $\beta_4$  são os parâmetros do modelo e  $e_i$  representa o erro aleatório associado à determinação do valor de  $y_i$ . Ajustando o modelo às observações feitas com essa finalidade, obtém-se a expressão:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4, \quad (4)$$

que permite estimar a resposta média num ponto qualquer de composição ( $x_1 + x_2 + x_3 + x_4$ ). O acento circunflexo é para diferenciar um valor populacional de uma estimativa.

Substituindo o termo  $b_0$  por  $b_0(x_1 + x_2 + x_3 + x_4)$  e agrupando os termos em  $x_i$ , obtém-se:

$$\hat{y} = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 + b_4^*x_4, \quad (5)$$

sendo  $b_i^* = b_0 + b_i$ , para  $i = 1, 2, 3$  e  $4$ .

Caso o modelo linear não se mostre satisfatório, deve-se tentar ajustar um modelo quadrático. Para misturas de quatro componentes, a expressão geral do modelo quadrático contém 15 termos:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{44}x_4^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4, \quad (6)$$

Substituindo as relações  $1Xb_0 = (x_1 + x_2 + x_3 + x_4)Xb_0$  e  $b_{11}x_1^2 = b_{11}x_1(1 - x_2 - x_3 - x_4)$ , além de expressões análogas para  $b_{22}x_2^2, b_{33}x_3^2$  e  $b_{44}x_4^2$  tem-se:

$$\hat{y} = b_0(x_1 + x_2 + x_3 + x_4) + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{11}x_1(1 - x_2 - x_3 - x_4) + b_{22}x_2(1 - x_1 - x_3 - x_4) + b_{33}x_3(1 - x_1 - x_2 - x_4) + b_{44}x_4(1 - x_1 - x_2 - x_3) + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4, \quad (7)$$

Agrupando os termos, obtém-se finalmente:

$$\hat{y} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_4^* x_4 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{14}^* x_1 x_4 + b_{23}^* x_2 x_3 + b_{24}^* x_2 x_4 + b_{34}^* x_3 x_4, \quad (8)$$

no qual  $b_i^* = b_0 + b_i + b_{ii}$  e  $b_{ij}^* = b_{ij} - b_{ii} - b_{jj}$ , com  $i \neq j$ .

Se o modelo quadrático se mostrar insuficiente, precisa acrescentar-lhe termos cúbicos. O modelo cúbico completo para uma mistura de quatro componentes é dado pela Equação 9:

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i<j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j + \sum_{i<j}^q \sum_{j<k}^q \sum_k^q b_{ijk}^* x_i x_j x_k + \dots + b_{12\dots q}^* x_1 x_2 \dots x_q. \quad (9)$$

Usando a identidade  $1 = x_1 + x_2 + x_3 + x_4$  e fazendo as substituições apropriadas, pode-se chegar à expressão:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_4^* x_4 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{14}^* x_1 x_4 + b_{23}^* x_2 x_3 + b_{24}^* x_2 x_4 + b_{34}^* x_3 x_4 \\ & + d_{12} x_1 x_2 (x_1 - x_2) + d_{13} x_1 x_3 (x_1 - x_3) + d_{14} x_1 x_4 (x_1 - x_4) + d_{23} x_2 x_3 (x_2 - x_3) + d_{24} x_2 x_4 (x_2 - x_4) \\ & + d_{34} x_3 x_4 (x_3 - x_4) + b_{123}^* x_1 x_2 x_3 + b_{124}^* x_1 x_2 x_4 + b_{134}^* x_1 x_3 x_4 + b_{234}^* x_2 x_3 x_4 + b_{1234}^* x_1 x_2 x_3 x_4. \end{aligned} \quad (10)$$

Como esta equação tem 21 termos, ter-se-ia de fazer no mínimo 21 ensaios diferentes para determinar os valores de todos os seus coeficientes. Muitas vezes, basta introduzir um único termo cúbico para que o modelo passe a descrever satisfatoriamente toda a região experimental. Eliminando os termos em  $d_{ij}$  na Equação 10, chega-se à expressão do modelo cúbico especial:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_4^* x_4 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{14}^* x_1 x_4 + b_{23}^* x_2 x_3 + b_{24}^* x_2 x_4 + b_{34}^* x_3 x_4 \\ & + b_{123}^* x_1 x_2 x_3 + b_{124}^* x_1 x_2 x_4 + b_{134}^* x_1 x_3 x_4 + b_{234}^* x_2 x_3 x_4 + b_{1234}^* x_1 x_2 x_3 x_4. \end{aligned} \quad (11)$$

O planejamento experimental normalmente empregado para determinar os valores dos coeficientes do modelo cúbico especial é o chamado centroide simplex, que se obtém acrescentando ao simplex em rede um ponto central correspondendo à mistura

quaternária em partes iguais

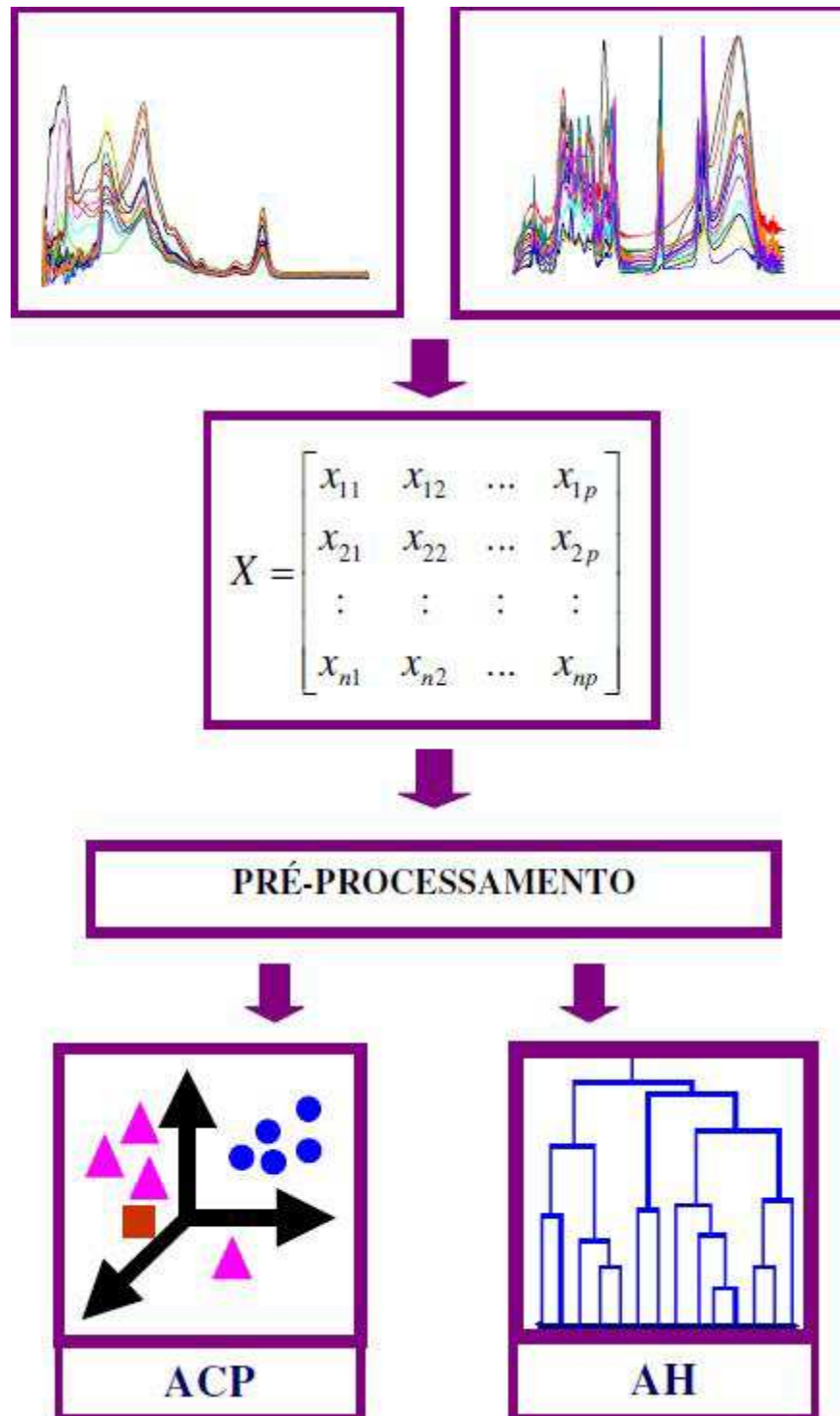
$$(x_1, x_2, x_3, x_4) = \left( \frac{1}{4}, \frac{1}{4}, \frac{1}{4}, \frac{1}{4} \right)$$

## 2.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS

A seqüência básica da análise de dados multivariados de dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 2. Antes de proceder à análise dos dados é feita uma inspeção visual para verificar problemas de variação da linha de base, sobreposição de picos e ruídos. Os dados são convertidos na forma de uma matriz (tabela de dados), no qual será representada por  $X$ . As  $n$  linhas da matriz representam as amostras (ou objetos), no qual cada valor corresponde a uma propriedade medida para uma amostra específica, enquanto que as  $p$  colunas são variáveis que correspondem a uma propriedade medida para cada amostra. Em seguida é realizada uma pré-seleção das variáveis quando necessário para definir a região do espectro ou cromatograma que contém a informação que será utilizada no cálculo.

O pré-processamento é uma etapa importante da análise, pois os dados de uma forma geral contêm fontes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos ou unidades diferentes. Ele é definido como qualquer manipulação matemática nos dados com o objetivo de remover ou reduzir estas fontes irrelevantes de variação<sup>15</sup>. Pode ser dividido em dois tipos básicos, dependendo se são operados nos valores relacionados às amostras ou às variáveis, e a sua escolha vai depender do conjunto de dados e do objetivo<sup>15</sup>.

A seguir, são apresentados os fundamentos dos dois principais métodos de análise exploratória.



**Figura 2** – Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).

## 2.2.1 Pré-Processamento das Amostras

### 2.2.1.1 Normalização

A normalização nas amostras é feita dividindo cada variável por uma constante. Os dois tipos mais comuns são a normalização por área unitária ou por comprimento do vetor unitário.

### 2.2.1.2 Normalização por área unitária

Esta normalização é feita dividindo cada valor original pela soma de todos os valores absolutos das medidas, Equação 12. Este procedimento para os dados cromatográficos tem a finalidade de corrigir a variação do volume da amostra injetado no cromatógrafo, sem destruir a proporcionalidade das substâncias orgânicas<sup>15</sup>,

$$x'_{ij} = x_{ij} / \sum_{j=1}^p |x_j|, \quad (12)$$

no qual  $x'_{ij}$  refere-se aos dados normalizados, da amostra  $i$  e variável  $j$ .

### 2.2.1.3 Normalização por comprimento do vetor

Esta normalização é feita dividindo cada valor original pela raiz da soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha, Equação 13. A finalidade é remover a variação sistemática, normalmente associada com a quantidade total da amostra<sup>15</sup>.

$$x' = x_{ij} / \sqrt{\sum_{j=1}^p x_{ij}^2}. \quad (13)$$

## 2.2.2 Pré-Processamento das Variáveis

### 2.2.2.1 Escalonamento por variância

Os valores originais da variável  $j$  são divididos pelo desvio padrão da variável, Equação 14.

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij}}{s_j} . \quad (14)$$

### 2.2.2.2 Centrar na média

Corresponde a subtrair o valor de cada elemento da coluna pelo valor médio dos elementos dessa coluna, Equação 15, resultando em uma matriz, no qual todas as colunas passarão a ter média zero. Esta operação corresponde a mover a origem do sistema de coordenadas para o centro dos dados<sup>15</sup>,

$$x'_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_j , \quad (15)$$

no qual  $\bar{x}_j = \frac{\sum x_{1j}}{N} .$

### 2.2.2.3 Autoescalamento

Neste caso os valores originais em cada coluna são subtraídos pelas respectivas médias e divididos pelo desvio padrão, Equação 16. Este procedimento transforma as variáveis originais em novas variáveis com média zero e variância igual a um,

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}, \quad (16)$$

no qual  $s_j$  é o desvio padrão para a variável  $j$ .

#### 2.2.2.4 Normalização seguida de autoescalonamento

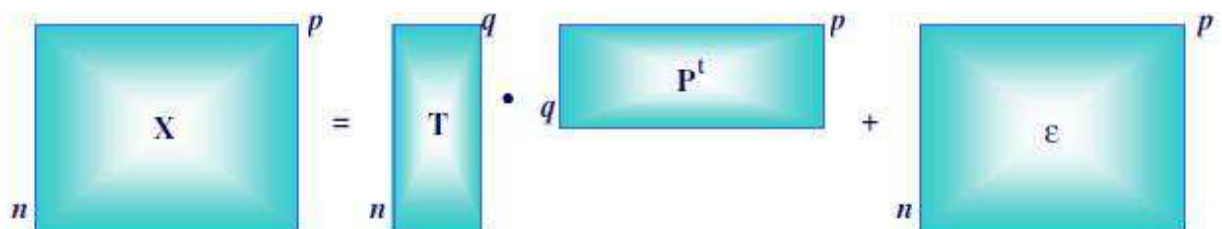
Neste procedimento os dados são primeiro normalizados por área unitária ou por comprimento do vetor. Em seguida, esses valores são subtraídos das respectivas médias (colunas) e divididos pelo desvio padrão.

### 2.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

A ACP é um método que tem por finalidade básica, a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais<sup>15</sup>. Na ACP, a decomposição é calculada através da diagonalização da matriz  $X^tX$  e  $XX^t$ . A matriz  $X$  ( $n \times p$ ), formada por  $n$  objetos e  $p$  variáveis é decomposta no produto de duas matrizes menores:

$$X = T \times P^t + \varepsilon, \quad (17)$$

no qual  $T$  é a matriz dos escores das componentes principais,  $P$  é a matriz "loadings" (pesos) das componentes principais, e  $\varepsilon$  é a matriz dos resíduos. O sobrescrito  $t$  indica a transposta da matriz e  $q$  é um escalar que indica o número de componentes principais que descreve a maior parte da variância dos dados. Este procedimento está representado esquematicamente na Figura 3.



**Figura 3** – Esquema da decomposição da matriz  $X$  no produto de duas matrizes.

Após os cálculos, os resultados são utilizados para interpretar a distribuição das amostras num gráfico bidimensional das componentes principais e posteriormente identificar e julgar a importância das variáveis originais escolhidas, pois as variáveis originais com maiores valores de loadings na combinação linear das componentes principais são as mais importantes no ponto de vista estatístico.

## 2.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA (AH)

A "análise hierárquica de agrupamentos" é um nome coletivo dado a uma grande variedade de técnicas que permitem a separação dos objetos ou variáveis em grupos diferentes. O método mais utilizado é a análise hierárquica de agrupamentos (AH)<sup>19</sup>.

A AH descreve a estrutura dos dados interligando as amostras por suas associações, revelando os agrupamentos naturais existentes no conjunto de dados, com base na informação das variáveis medidas. Graficamente, a hierarquia pode ser representada na forma de um gráfico bidimensional chamado de dendrograma, no qual as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si.

Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos no espaço p-dimensional. A maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos (amostras) que estão mais próximos, usando a distância Euclidiana definida na Equação 18, e substituí-los por um novo ponto, localizado na metade da distância entre eles.

$$d_{ik} = \left[ \sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2}. \quad (18)$$

Nesta equação,  $d_{ik}$  é a distância Euclidiana entre os pontos  $i$  e  $k$ . O procedimento descrito é repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, levando à construção do dendrograma, no qual no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical a distância. Considera-se que quanto menor a distância entre os pontos, maior a similaridade entre as amostras representadas por eles. A similaridade é convenientemente definida pela Equação 19,

$$s_{ik} = \left[ 1 - \frac{d_{ik}}{(d_{ik})_{\max}} \right], \quad (19)$$

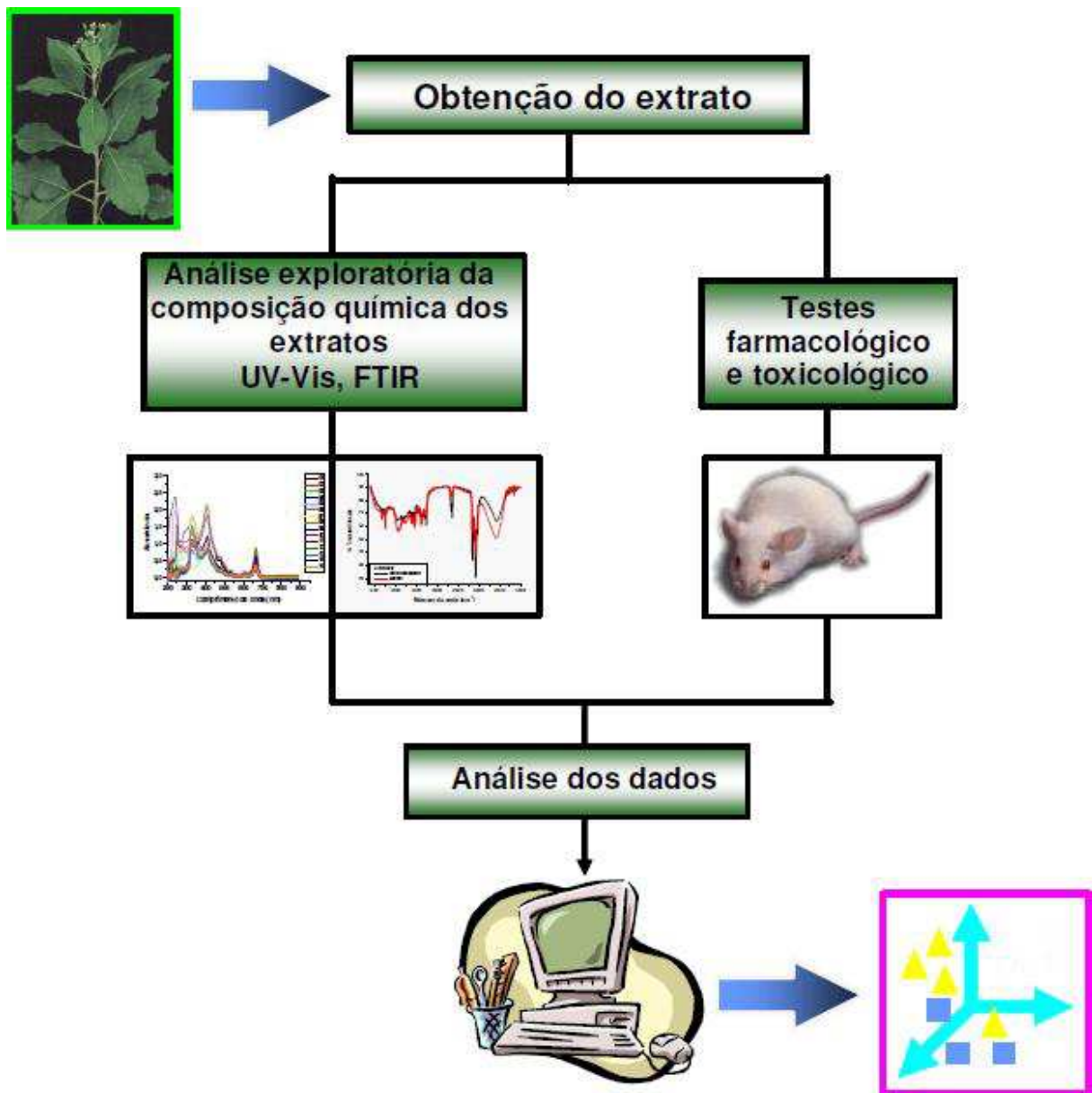
no qual  $s_{ik}$  é a similaridade entre as amostras  $i$  e  $k$  e  $(d_{ik})_{\text{máx}}$  é a distância máxima entre dois pontos de um conjunto de dados no espaço  $p$ -dimensional. Para amostras idênticas,  $s_{ik} = 1$ , enquanto que  $s_{ik} = 0$  corresponde a dois pontos separados pela maior distância constatada no conjunto estudado.

Os valores de similaridade são colocados na forma de uma matriz. Os pontos mais similares são agrupados e o resultado é representado na forma de um dendrograma. Os valores correspondentes a estes pontos são substituídos na matriz na forma de grupos, os quais correspondem aos pares de pontos mais similares. Calcula-se uma nova matriz de similaridade, cuja dimensão é menor que a original. Este processo continua até que todos os pontos estejam contidos em um agrupamento, no qual se pode visualizar as similaridades entre as amostras ou variáveis. A análise de agrupamentos complementa a análise de componentes principais, sendo uma outra forma de visualizar as semelhanças e diferenças na composição das amostras.

## CAPÍTULO III

### 3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

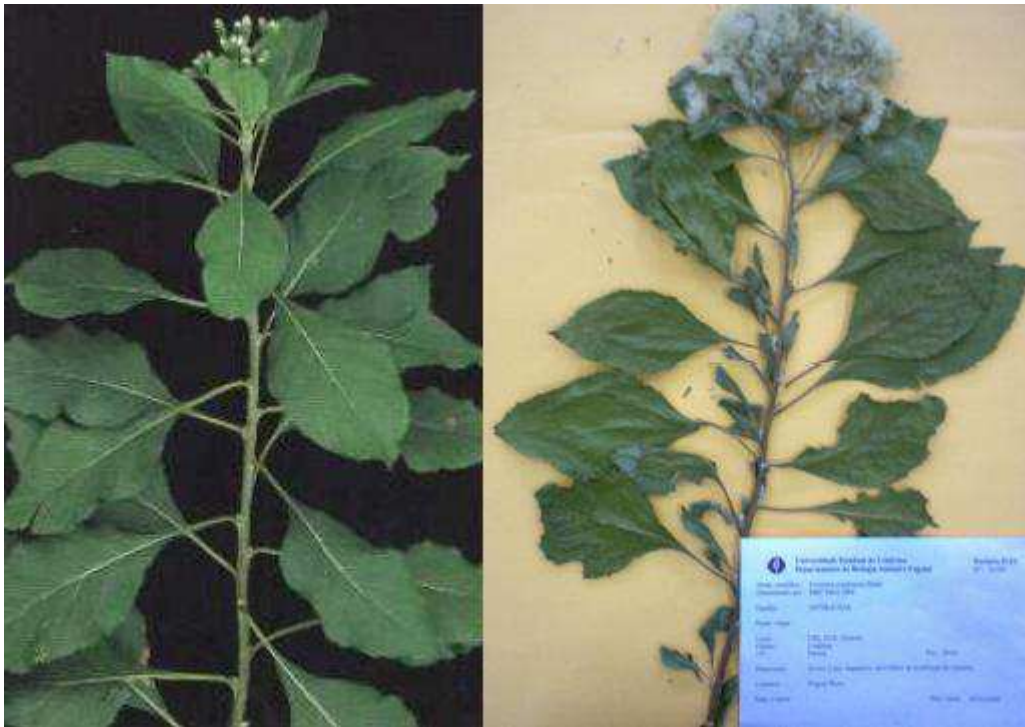
Neste capítulo, serão abordados os aspectos relacionados aos procedimentos experimentais para a obtenção de dados espectroscópicos e avaliação da  $DL_{50}$  e atividade antinociceptiva das folhas de *Vernonia condensata* Baker. Um resumo do procedimento experimental está apresentado na Figura 4.



**Figura 4** – Procedimento experimental para a obtenção de dados espectroscópicos e avaliação da  $DL_{50}$  e atividade antinociceptiva das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

### 3.1 PLANTA

A espécie estudada foi *Vernonia condensata* Baker, classificada pelo taxonomista Manuel R.C. Paiva do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina. A planta foi coletada no jardim experimental do Departamento de Química e a exsicata foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina com o número de registro 38.694. A Figura 5 mostra as fotos da espécie *Vernonia condensata* Baker e da exsicata depositada no herbário FUEL.



**Figura 5** – Foto da espécie *Vernonia condensata* Baker e da exsicata depositada no herbário FUEL.

### 3.2 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE *VERNONIA CONDENSATA* BAKER<sup>9</sup>

- ✓ Nome popular: boldo, alumã, figatil, boldo-goiano, boldo-baiano, heparém, árvore-do-pinguço;
- ✓ Família: Asteraceae (Compositae); S Gênero: *Vernonia*;

- ✓ Características botânicas relevantes: Arbusto grande ou árvoreta, pouco ramificada, de ramos quebradiços de 2-4 metros de altura. Folhas simples, membráceas, glabras, de 5-12 centímetros de comprimento. Flores discretas, de coloração esbranquiçada, reunidas em pequenas panículas terminais e axilares de capítulos alongados;
- ✓ Folhas com sabor amargo seguido de doce quando mastigadas.

### **3.3 EQUIPAMENTOS**

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: balança analítica Adventurer OHAUS; evaporador rotativo FISATOM 802; desumidificador Pyrex 40/35; liquidificador Britânia; sonicador Ultra Cleaner 750; espectrômetro de infravermelho OMNIC Nexus 470 FT-IR Thermo Nicolet; espectrofotômetro OCEAN OPTICS modelo CHEM 2000 UV-Vis.

### **3.4 REAGENTES E FÁRMACOS**

Os reagentes utilizados na extração e análise no UV-Vis foram: álcool etílico absoluto P.A. (99,5%) da marca VETEC; acetato de etila P.A. (99,5%) da marca VETEC; diclorometano P.A. (99,5%) da marca VETEC; acetona P.A. (99,5%) da marca VETEC. Para análise no FTIR foram usados: clorofórmio P.A.-ACS da marca Synth (99,85%) e brometo de potássio P.A.-ACS da marca Synth (99%). Para a identificação de metabólitos secundários foram utilizados: nitrato de bismuto (III) P.A. da marca VETEC; ácido nítrico P.A. da marca Nuclear; iodeto de potássio P.A.-ACS da marca VETEC; cloreto férrico P.A. da marca BIOTEC; ácido clorídrico P.A. da marca VETEC; hidróxido de sódio P.A.-ACS da marca ECIBRA e hidróxido de amônio da marca CHEMCO.

Para a realização dos testes de antinocicepção foram usados: ácido acético glacial P.A. da marca BIOTEC; ibuprofeno (Spidufen<sup>®</sup> 400) 400 mg/envelope, granulado, do laboratório Zambon Switzerland Ltda; óleo de castor (cremophor<sup>®</sup>) da marca Basf.

### 3.5 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

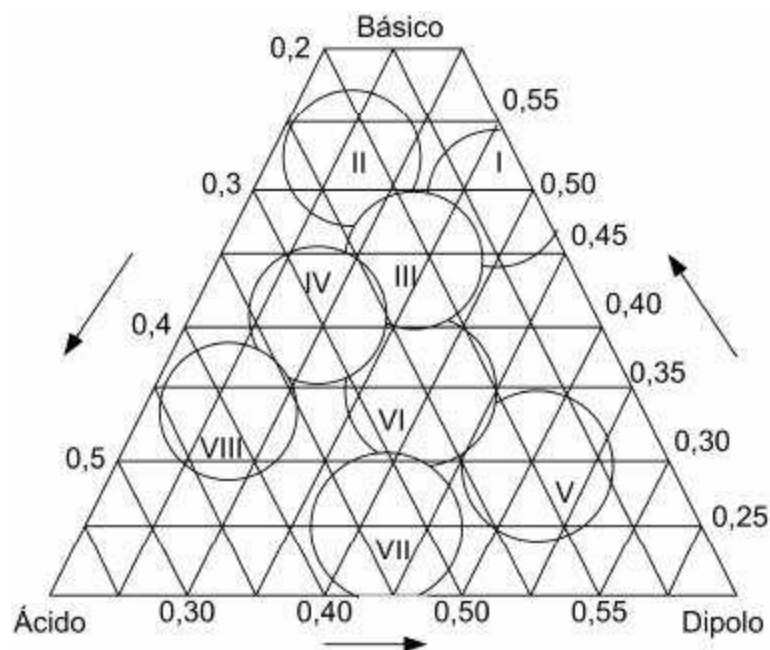
Uma das preocupações no processo de extração é a manutenção das substâncias da planta, portanto deve ser realizada de maneira cuidadosa. Na extração nem sempre se utiliza um único solvente, mas misturas de diferentes solventes com polaridades diferentes. Por outro lado, o meio extrativo depende, sobretudo, da solubilidade das substâncias a extrair e de sua estabilidade, sendo assim a escolha da melhor condição experimental foi feita através de um planejamento experimental centróide simplex<sup>18</sup>.

Os extratos das folhas foram preparados por turbólise com extração exaustiva. A turbolização ou turboextração é um método de extração utilizado para a preparação rápida de extratos vegetais<sup>19</sup>. A técnica baseia-se na redução drástica do tamanho da partícula e a rápida dissolução dos componentes, devido à aplicação de elevadas forças de cisalhamento, geradas no pequeno espaço compreendido entre o extrator e um rotor de alta velocidade à temperatura ambiente. Esta técnica é vantajosa em processamentos de pequena e média escala<sup>19</sup>.

### 3.6 ESCOLHA DOS SOLVENTES

Uma alternativa para a escolha do melhor solvente extrator é a utilização do triângulo de solvente seletividade proposta por Snyder<sup>20</sup> para cromatografia. Esta abordagem conduz a uma descrição dos diferentes solventes em termos de sua acidez, basicidade e dipolaridade. A classificação original do triângulo de solvente seletividade foi feita com base na repartição das diversas interações polares que um solvente é capaz: ácida ( $x_d$ ), básica ( $x_e$ ) e dipolar ( $x_n$ ). Valores de  $x_d$  é a medida das interações do solvente com o dioxano,  $x_e$  é a medida das interações com o etanol e  $x_n$  é a medida das interações com nitrometano.

As interações destes coeficientes  $x_i$ : ( $i = d, a$  ou  $n$ ) estão corretas para interações apolares (dispersivas) e são normalizados para a polaridade total do solvente,  $x_d + x_e + x_n = 1$ . Um gráfico usando coordenadas triangulares para exibir os valores de  $x_i$  para diferentes solventes resultou no triângulo de seletividade mostrado na Figura 6.



**Figura 6** – Triângulo de solvente seletividade de Snyder.

Solventes que estão perto dos vértices do gráfico da Figura 6 possuem essencialmente um tipo de seletividade que pode ser acidez, basicidade ou dipolaridade, enquanto solventes dentro do triângulo são capazes de todas as três interações.

A vantagem do triângulo de Snyder é o agrupamento de solventes de acordo com o tipo de interação com os compostos de interesse. Solventes quimicamente semelhantes que possuem parâmetros de seletividade similares ( $x_e$ ,  $x_d$  e  $x_n$ ) e fazem parte do mesmo grupo, embora possam apresentar diferentes valores de polaridade<sup>20</sup>.

Um conjunto de três parâmetros chamados de solvatocrômicos, semelhantes ao  $x_d$ ,  $x_e$  e  $x_n$ , foi concebido para descrever a acidez ( $a$ ), basicidade ( $P$ ) e dipolaridade ( $n^*$ ). Os valores destes parâmetros para diferentes solventes foram derivados da espectroscopia (daí o nome solvatocrômico) e de outras medidas, que foram especificamente designadas para a medida de uma única interação. Os valores dos parâmetros solvatocrômicos são médias de resultados obtidos com vários solutos investigados para cada parâmetro, em contraste com os parâmetros do triângulo de solvente seletividade no qual se baseou na propriedade termodinâmica de um único soluto<sup>20</sup>.

Estes valores de  $a$ ,  $P$  e  $n^*$  para cada solvente foram primeiro normalizados pela soma dos valores de  $a$ ,  $P$  e  $n^*$  ( $= E$ ) e, em seguida, expressando a acidez, basicidade e dipolaridade de cada solvente como a interação de coeficientes fracionários  $a/E$  (acidez),  $P/E$  (basicidade) e  $n^*/E$  (dipolaridade). A Tabela 1 apresenta a classificação dos

solventes e das misturas de solventes de acordo com os parâmetros de seletividade normalizados.

**Tabela 1** – Classificação dos solventes de acordo com a seletividade normalizada

Solventes e misturas de solventes	Fatores de Seletividade Normalizados		
	$\pi^*/\Sigma$	$\alpha/\Sigma$	$\beta/\Sigma$
1 (etanol)	0,25	0,39	0,36
2 (acetato de etila)	0,55	0,00	0,45
3 (diclorometano)	0,73	0,27	0,00
4 (acetona)	0,56	0,06	0,38
5 (et-ae)	0,4	0,195	0,405
6 (et-dc)	0,49	0,33	0,18
7 (et-ac)	0,405	0,225	0,37
8 (ae-dc)	0,64	0,135	0,225
9 (ae-ac)	0,55	0,03	0,415
10 (dc-ac)	0,645	0,165	0,19
11 (et-ae-dc)	0,51	0,22	0,27
12 (et-ae-ac)	0,45	0,15	0,4
13 (et-dc-ac)	0,51	0,24	0,25
14 (ae-dc-ac)	0,61	0,11	0,28
15 (et-ae-dc-ac)	0,52	0,18	0,3
Água	0,45	0,43	0,18

A Figura 7 mostra o triângulo de seletividade baseado nos dados da Tabela

1.

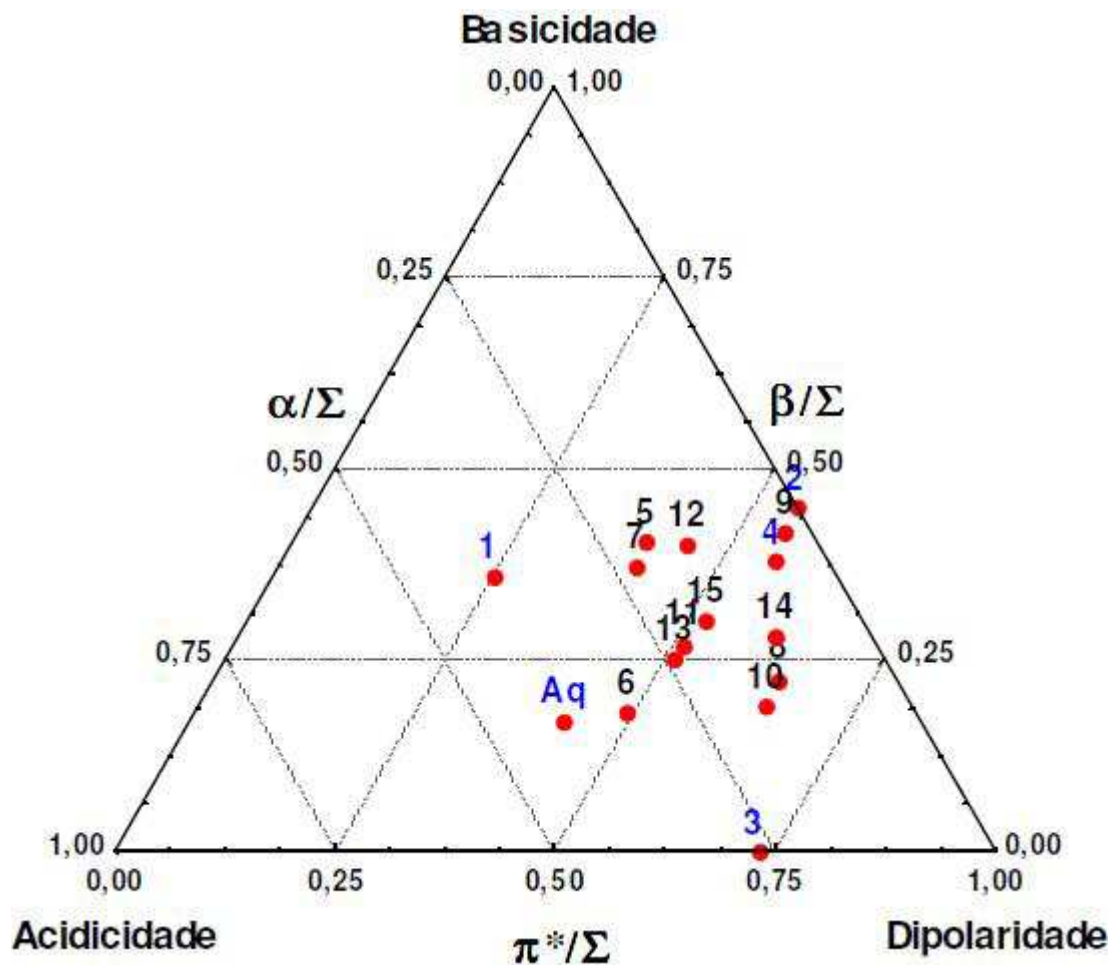


Figura 7 – Triângulo de seletividade baseado nos dados solvatocrômicos da Tabela 1.

O posicionamento dos diferentes tipos de solventes ou misturas de solventes na Figura 7 é esperado. Por exemplo, diclorometano é um forte doador de prótons e um fraco receptor, além de ter um caráter altamente dipolar e por isso está localizado sobre o eixo acididade-dipolaridade. Devido ao alto valor de dipolaridade, o diclorometano extrai preferencialmente compostos que contém moléculas com grupo funcional polar, tais como éteres, ésteres, sulfetos, sulfóxidos, tióis, hidroxilas, halogênios, aldeídos, cetonas, compostos com ligação nitro ( $-\text{NO}_2$ ) e nitrila ( $-\text{CN}$ ), etc.

Acetato de etila, acetona e a mistura binária destes solventes (mistura 9) apresentam um caráter básico e dipolar, sendo fortes receptores de prótons, portanto, estes solventes interagem preferencialmente com compostos que possuem caráter ácido, ou seja, fortes doadores de prótons, como ácidos carboxílicos, álcoois, fenóis, etc.

O etanol apresenta altos valores de acididade ( $\alpha$ ) e basicidade ( $\beta$ ), e um valor dipolaridade ( $\pi^*$ ) um pouco menor ( $\alpha = \beta > \pi$ ), por este motivo ele se encontra próximo

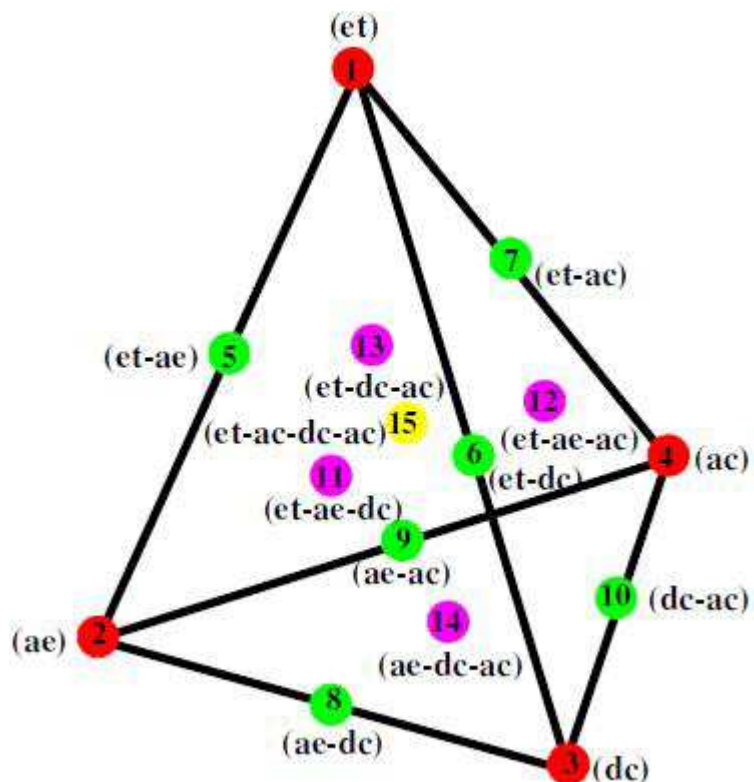
ao centro do triângulo. As misturas binárias do etanol com acetato de etila e acetona, misturas 5 e 7 respectivamente, e a mistura ternária destes três solventes (mistura 12), apresentam um caráter mais básico e dipolar. Isso ocorre porque o acetato de etila e a acetona apresentam valores de  $\alpha = 0$ . Entretanto a mistura binária etanol-diclorometano (mistura 6) apresenta um caráter bastante ácido e dipolar devido ao diclorometano apresentar altos valores de  $\pi^*$  e a e um valor de  $\beta = 0$ . Misturas ternárias do etanol com diclorometano e acetato de etila ou acetona (misturas 11 e 13) apresentam valores de  $a$  e  $P$  bastante próximos ( $\pi^* > \alpha = \beta$ ).

A maior parte das misturas está localizada próxima do eixo de dipolaridade ( $\pi^*$ ) e basicidade ( $\beta$ ), isso ocorre porque o acetato de etila e a acetona apresentam valores de  $a = 0$  e o diclorometano  $\beta = 0$ . Em compensação estes três solventes apresentam altos valores de  $\pi^*$ , fazendo com que as misturas que contêm estes solventes apresentem principalmente interação dipolar e no processo de extração estas misturas extraem preferencialmente compostos com interação dipolo.

Dos solventes puros, somente o etanol e a água são capazes de apresentar as três interações. Mas água por ser um forte doador de prótons, apresenta um caráter ácido e dipolar e extraem preferencialmente compostos de natureza básica como ésteres, cetonas, aminas, etc.

### 3.7 PREPARO DO SISTEMA EXTRATOR

O sistema extrator foi escolhido seguindo um planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex com quatro componentes<sup>18</sup>. Este planejamento é representado por tetraedro, mostrado na Figura 8, no qual os pontos 1, 2, 3 e 4 (vértices) correspondem aos solventes puros: etanol (**et**), acetato de etila (**ae**), diclorometano (**dc**) e acetona (**ac**). Os pontos 5, 6, 7, 8, 9 e 10 (arestas) correspondem às misturas de volumes iguais dos solventes (**et-ae**); (**et-dc**); (**et-ac**); (**ae-dc**); (**ae-ac**) e (**dc-ac**), respectivamente. Os pontos 11, 12, 13 e 14 (centro de cada face) correspondem às misturas de volumes iguais dos solventes (**et-ae-dc**); (**et-ae-ac**); (**et-dc-ac**) e (**ae-dc-ac**), respectivamente, e finalmente o ponto 15 (central) que corresponde à mistura de volumes iguais dos quatro solventes. A Tabela 2 mostra a matriz do planejamento experimental com quatro componentes, totalizando 15 misturas de solventes.



**Figura 8** – Planejamento experimental do tipo Centroide simplex com 4 componentes.

### 3.8 PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos foram preparados de acordo com a seqüência apresentada na Figura 9. Os 15 extratos foram preparados pesando-se 3,0g de folhas previamente desidratadas e trituradas da *Vernonia condensata* Baker e submetidas à extração exaustiva com 60 mL de solvente ou misturas de solventes. Estas misturas ficaram em repouso por 24 horas, em seguida foram filtradas com algodão e submetidas à concentração num evaporador rotativo a uma temperatura inferior a 65°C.

**Tabela 2** – Matriz de planejamento para a escolha do solvente extrator

Extrato	Solventes			
	Etanol	Acetato de etila	Diclorometano	Acetona
1	1	0	0	0
2	0	1	0	0
3	0	0	1	0
4	0	0	0	1
5	1/2	1/2	0	0
6	1/2	0	1/2	0
7	1/2	0	0	1/2
8	0	1/2	1/2	0
9	0	1/2	0	1/2
10	0	0	1/2	1/2
11	1/3	1/3	1/3	0
12	1/3	1/3	0	1/3
13	1/3	0	1/3	1/3
14	0	1/3	1/3	1/3
15	1/4	1/4	1/4	1/4

Ao final do processo de extração, os extratos foram secos em capela à temperatura ambiente com o auxílio de um ventilador para que pudessem ser calculados os rendimentos. Ao final do processo de extração foram obtidos 15 diferentes extratos brutos.



**Figura 9** – Seqüência do procedimento para o preparo dos extratos para a escolha do solvente extrator.

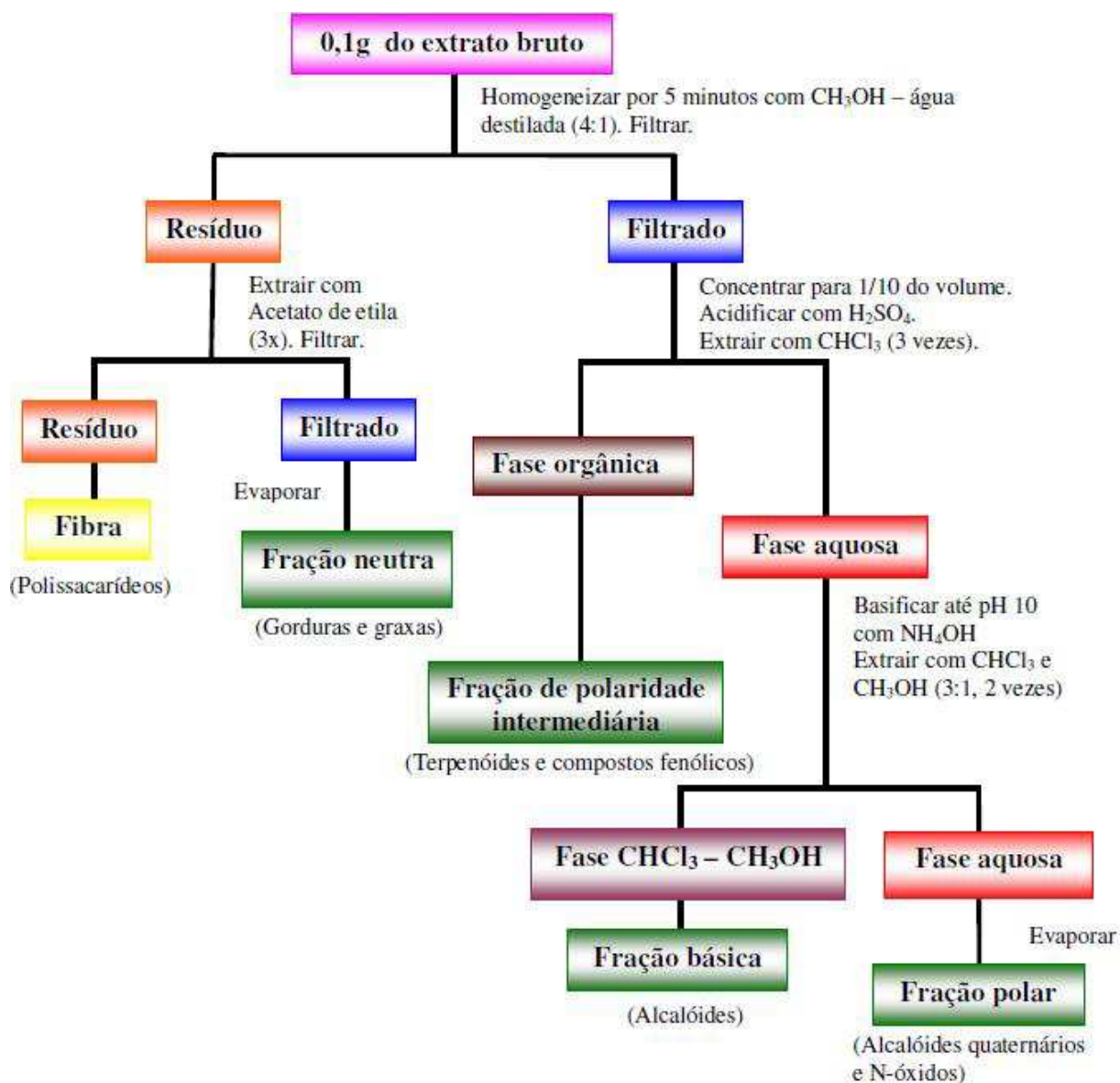
### 3.9 EXTRATO AQUOSO

O extrato aquoso foi preparado pesando-se 30g de folhas previamente desidratadas e trituradas da *Vernonia condensata* Baker e submetidas à extração com 600 mL de água destilada em 60°C por 30 minutos. Esta mistura foi filtrada em algodão, congelada e liofilizada.

### 3.10 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

Para a investigação dos constituintes presentes nos extratos da planta, o extrato foi submetido a um fracionamento químico prévio das principais classes de metabólitos. Neste procedimento, a quantidade e os tipos de componentes separados nas

diferentes frações variam com a planta<sup>5</sup>. O fracionamento dos extratos foi feito de acordo com o esquema da Figura 10.



**Figura 10** – Esquema utilizado para o fracionamento dos extratos brutos

### 3.11 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para a análise, 0,5mg de cada extrato bruto foi misturado uniformemente com 150 mg de KBr e algumas gotas de clorofórmio para ajudar a dissolver o extrato. Os espectros foram registrados na região de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, em resolução de 1,93 cm<sup>-1</sup> e média de 40 leituras.

### 3.12 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis)

Para a análise por espectrofotometria no UV-Vis foram pesados 50 mg do extrato bruto e diluídos em 3 mL do solvente extrator. Após uma hora, estas misturas foram filtradas em filtro de papel. Para a leitura diluiu-se 40  $\mu$ L desta solução em 1960  $\mu$ L do solvente. Os espectros foram registrados no comprimento de onda entre 189-890 nm.

### 3.13 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NA PLANTA

#### 3.13.1 Reagente de Dragendorff

**Solução A:** dissolveram-se 8,0 g de nitrato de bismuto (III) em 20 mL de ácido nítrico diluído 30%.

**Solução B:** dissolveram-se 22,8 g de iodeto de potássio em um volume mínimo de água.

Reagente: a **solução A** foi vertida lentamente sobre a **solução B** e, após repouso de uma hora a solução foi filtrada. Em um balão completou-se o volume para 100 mL e a solução foi guardada ao abrigo de luz.

#### 3.13.2 Ensaio de Identificação

##### 3.13.2.1 Alcalóides

A cada 0,1g de extrato bruto, adicionaram-se 10 mL de seu respectivo solvente extrator. Em uma placa de toque, adicionaram-se cinco gotas da solução do extrato e duas gotas do reagente de Dragendorff. Um precipitado de coloração laranja indica a presença de alcalóides.

### **3.13.2.2 Saponinas**

Pesou-se 0,1g da planta seca (folhas), acrescentaram-se 5 mL de água destilada e ferveu-se durante 5 minutos. Logo após o resfriamento, agitou-se vigorosamente por 15 minutos. Classifica-se a presença de saponinas pela formação de espuma persistente.

### **3.13.2.3 Compostos fenólicos**

Preparou-se uma solução de  $\text{FeCl}_3$  a 10%. Em uma placa de toque adicionaram-se cinco gotas do extrato e de  $\text{FeCl}_3$ . O teste é positivo para compostos fenólicos com o surgimento de coloração verde.

### **3.13.2.4 Taninos**

Pesaram-se 5g de planta seca e adicionaram-se 100 mL de água destilada e ferveu-se durante 15 minutos. Filtrou-se a solução e deixou-se esfriar. Transferiram-se 2 mL desta solução e adicionaram-se de 4 gotas de solução de  $\text{FeCl}_3$  a 1% em metanol. O surgimento de coloração azul indica a possível presença de taninos hidrolisáveis e a coloração verde de taninos condensados.

### **3.13.2.5 Flavonóides**

Pesaram-se 10 g da folha seca e moída e adicionaram-se 90 mL de etanol a 75%. Deixou-se esta solução no banho ultrassônico por 15 minutos e, logo após, filtrou-se em algodão e colocou-se 2mL em uma cápsula de porcelana e deixou-se evaporar em banho-maria a 45°C até a secura (25 a 40 minutos). Lavou-se o resíduo da cápsula com 0,2 mL de clorofórmio para eliminação da clorofila, ainda no banho. Solubilizou-se o resíduo da cápsula

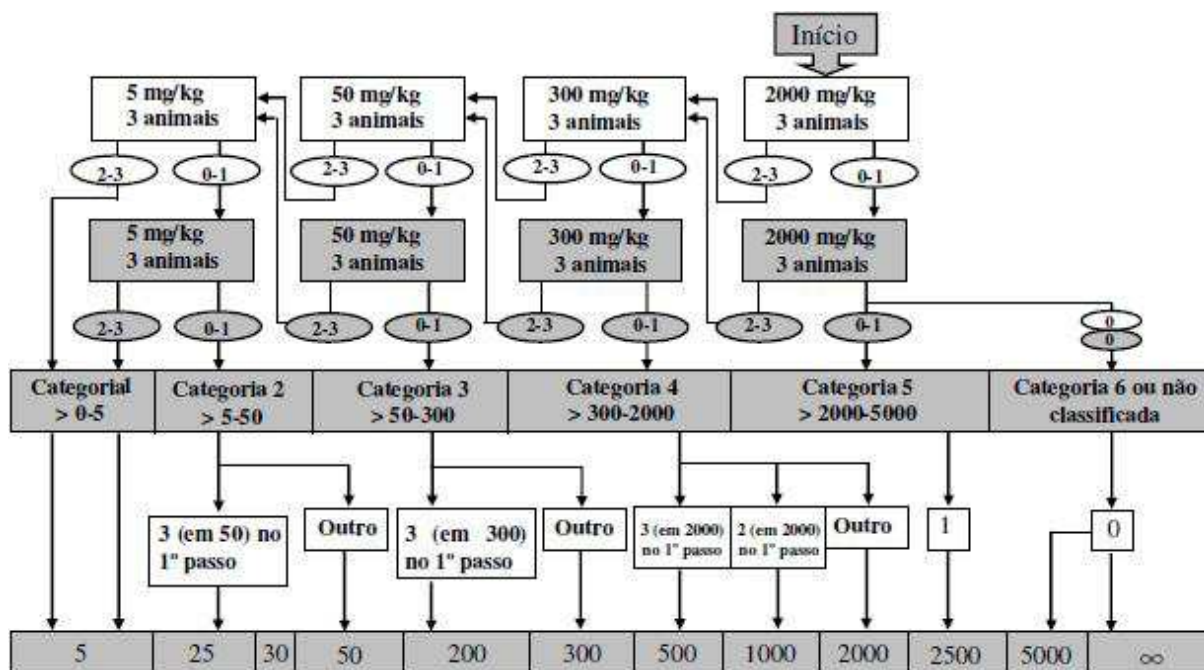
com 1 mL de etanol 70% e transferiu-se para um tubo de ensaio. Em seguida adicionou-se ao tubo de ensaio raspas de magnésio metálico. Verteu-se cuidadosamente, pelas paredes do tubo, aproximadamente 0,3 mL de HCl concentrado. O surgimento de coloração rósea confirma a presença de flavonóides.

### 3.14 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss albinos, machos com idade de 70 dias, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas sob condições controladas de temperatura ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação (ciclo claro-escuro de 12 horas), com livre acesso à água e ração.

### 3.15 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% (DL<sub>50</sub>)

A DL<sub>50</sub> é um teste cujo parâmetro avaliado é a morte do animal. Comitês internacionais têm desenvolvido protocolos que minimizam o número de animais utilizados. A determinação da DL<sub>50</sub> foi realizada de acordo com o guia editado pela Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômicos<sup>14</sup>. Os extratos foram dissolvidos em uma mistura contendo água destilada e óleo de castor (cremophor®) 5% (v/v). Uma dose de cada extrato de *Vernonia condensata* foi administrada por via oral (método de gavagem) a três camundongos previamente mantidos em jejum de três horas com água a vontade. A mortalidade foi monitorada por 14 dias. Finalizado este período, outros três camundongos receberam mais uma dose de cada extrato que foi escolhida dependendo do número de animais mortos na etapa anterior. Se a mortalidade foi igual ou inferior à obtida na etapa anterior, o teste foi finalizado e a DL<sub>50</sub> foi estimada. Caso contrário, outros três animais foram utilizados. O Organograma das etapas encontra-se na Figura 11.



**Figura 11** – Procedimento para a avaliação da DL<sub>50</sub> com dose inicial de 2000mg/kg.

### 3.16 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Para a avaliação do efeito antinociceptivo dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker, foi utilizado o modelo de contorções abdominais, o qual é uma metodologia clássica para tal avaliação<sup>21</sup>. Para o ensaio das contorções abdominais, cada grupo experimental consistiu de oito animais para cada dose. Os extratos foram dissolvidos em uma mistura contendo água destilada e óleo de castor (Cremophor®) 5% (v/v). Esta mistura foi denominada como solução veículo.

Os animais foram mantidos em jejum durante cinco horas antes de receberem, por gavagem, os diferentes extratos da planta nas doses de 40, 80 e 160 mg/kg ou seu veículo. Vinte minutos após, administrou-se, por via intraperitoneal, ácido acético 0,8%, na razão de 0,1 mL/10 g de massa corpórea do animal. Os animais foram observados por 20 minutos e anotou-se o número de contorções abdominais que eles apresentaram. Considerou-se uma contorção abdominal o comportamento do animal de arrastar sua barriga e esticar as patas traseiras.

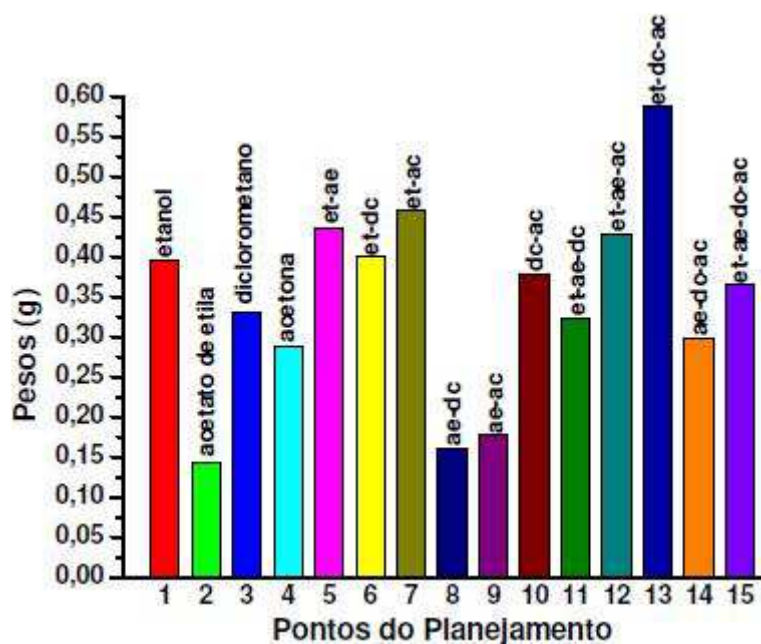
Para monitorar a eficácia da metodologia, foi feito um grupo controle positivo para cada três extratos da planta testados. Os animais deste grupo receberam uma droga de referência, o analgésico ibuprofeno, na dose de 200 mg/kg via intraperitoneal e, 20 minutos após, receberam o ácido acético como descrito anteriormente.

## CAPÍTULO IV

### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS

A primeira etapa do trabalho foi avaliar o rendimento em massa dos extratos no processo de extração das folhas de *Vernonia condensata* Baker. A Figura 12 mostra o gráfico dos valores da massa em gramas para os 15 extratos.



**Figura 12** – Gráfico dos rendimentos obtidos usando planejamento de misturas de quatro componentes.

Observa-se que os maiores rendimentos em massa foram obtidos nas misturas de solventes com a presença do etanol em sua formulação, como nos extratos 13, 7, 5, 6, 12 e 1 respectivamente. Os menores rendimentos em massa foram observados nas misturas de solventes que tinham acetato de etila, como nos extratos 2, 8 e 9 respectivamente.

Mas este tipo de análise é um tanto impreciso, pois se perde informação importante sobre o sistema estudado. Sendo assim estes efeitos foram investigados por modelos de misturas. Estes experimentos multivariados permitem explorar os efeitos de várias variáveis simultaneamente e extrair o máximo de informação do sistema que está sendo investigado, de uma maneira mais eficiente quando comparado com o procedimento univariado, ou seja, uma variável por vez<sup>19</sup>.

Para avaliar o efeito dos solventes no rendimento dos extratos, foram testados diferentes modelos de misturas com quatro componentes que permitem explorar os efeitos dos quatro solventes simultaneamente no processo de extração.

Os dados foram ajustados ao modelo cúbico especial e a equação obtida para este modelo está apresentada na Equação 20:

$$\hat{y} = + \mathbf{0,3951et} + \mathbf{0,1422ae} + \mathbf{0,3308dc} + \mathbf{0,2872ac} + \mathbf{0,6975etae} + \mathbf{0,1776etdc} + \mathbf{0,4900etac} - \mathbf{0,2766aedc} - \mathbf{0,1237aeac} + \mathbf{0,2986dcac} - 1,4850etaedc + \mathbf{0,3941etaeac} + \mathbf{3,2579etdcac} + \mathbf{0,8967aedcac} \quad (20)$$

$(\pm 0,017)$      $(\pm 0,017)$      $(\pm 0,017)$      $(\pm 0,017)$      $(\pm 0,083)$      $(\pm 0,083)$   
 $(\pm 0,083)$      $(\pm 0,083)$      $(\pm 0,083)$      $(\pm 0,083)$      $(\pm 0,552)$      $(\pm 0,552)$   
 $(\pm 0,552)$      $(\pm 0,552)$

$y$  é a resposta prevista pelo modelo, **et** = etanol, **ae** = acetato de etila, **dc** = diclorometano e **ac** = acetona. Os valores entre parênteses são os erros padrão dos parâmetros. A equação apresenta 14 termos dos quais 11 são significativos (termos em negrito). Os valores obtidos mostram que o etanol tem maior poder de extração, seguido pelo diclorometano e acetona. Os valores dos coeficientes **etae** (0,6975) e **etac** (0,4900) sugerem uma interação sinérgica entre as misturas etanol-acetato de etila e etanol-acetona. O valor do coeficiente **etdcac** (3,2579) mostra que a presença simultânea dos três componentes na extração produzirá um maior rendimento.

O modelo foi investigado examinando os gráficos de contorno das superfícies de respostas, Figura 13. Esses contornos mostram que os maiores rendimentos, em torno de 0,55 g, são obtidos perto do ponto central do triângulo (Figura 13c), isto é, quando a mistura de solventes é mais rica em etanol, diclorometano e acetona.

A Figura 14 mostra o gráfico dos resíduos versus resposta de rendimentos prevista pelo modelo, observa-se que a distribuição dos resíduos não revela tendências. O gráfico da Figura 15, dos rendimentos previstos versus rendimentos observados (resposta experimental), confirmam claramente a qualidade do modelo.

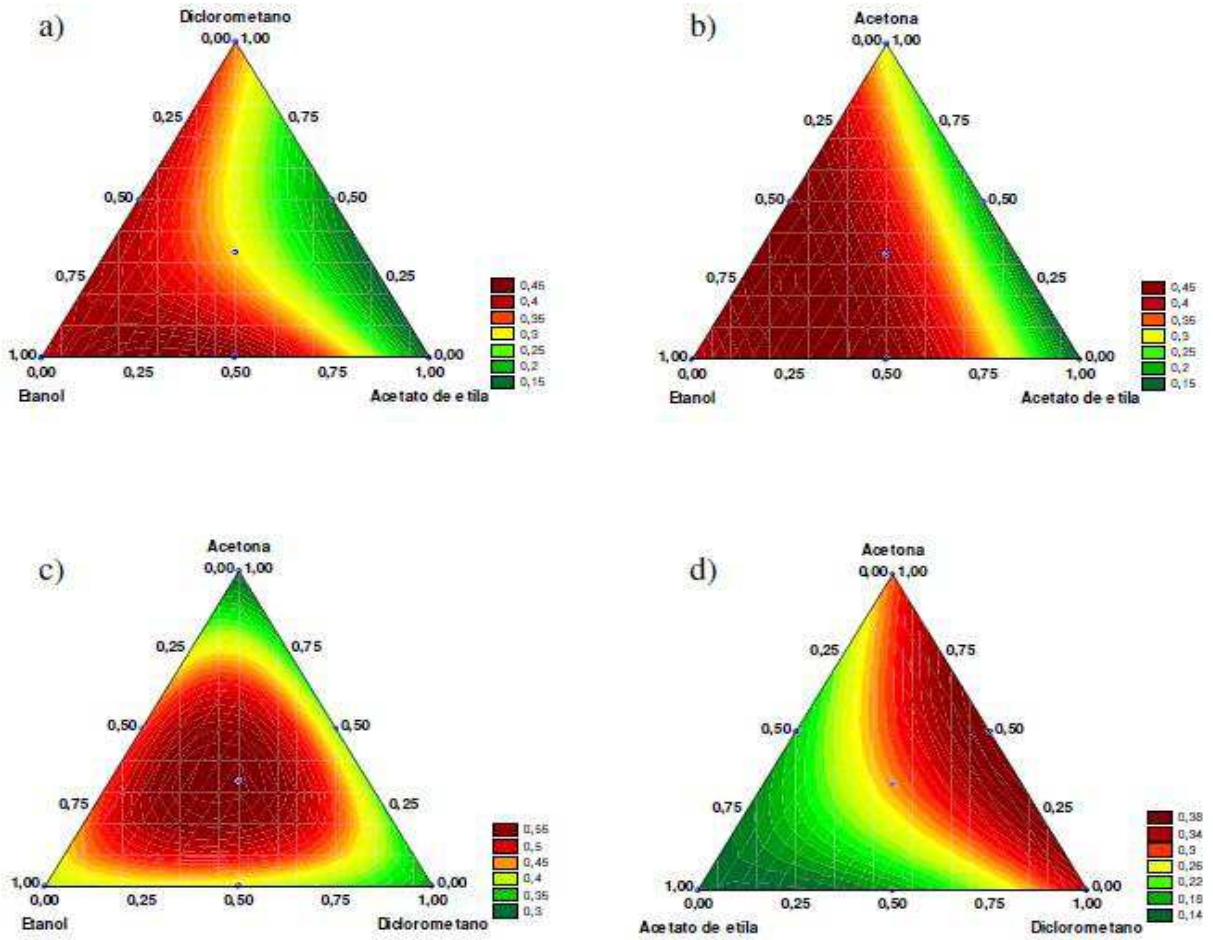


Figura 13 – Curvas de nível para o rendimento dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker usando o modelo cúbico especial de misturas de quatro componentes.

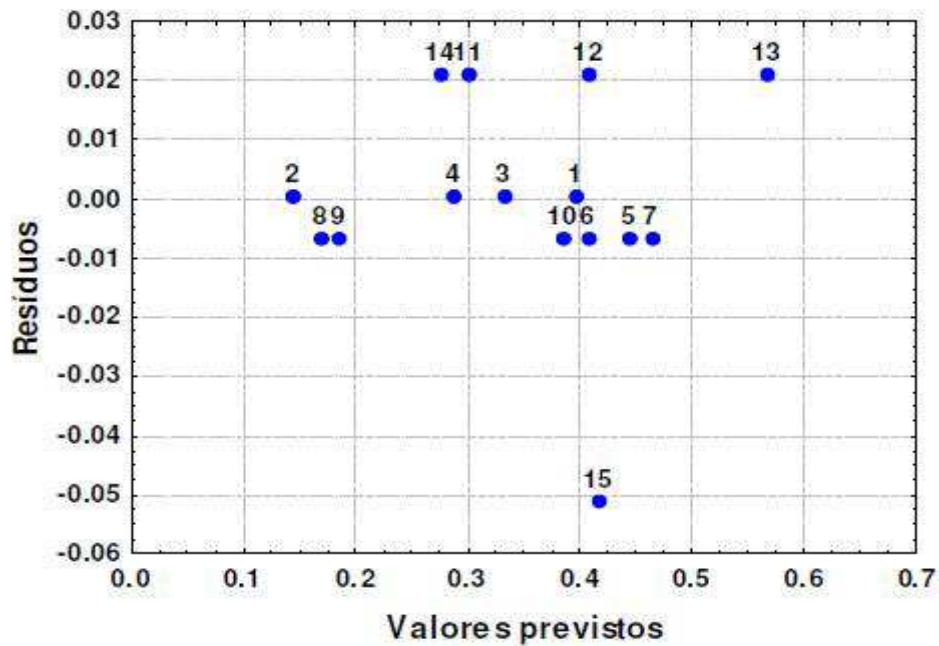


Figura 14 – Resíduos deixados pelo modelo cúbico especial no estudo do rendimento do extrato das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

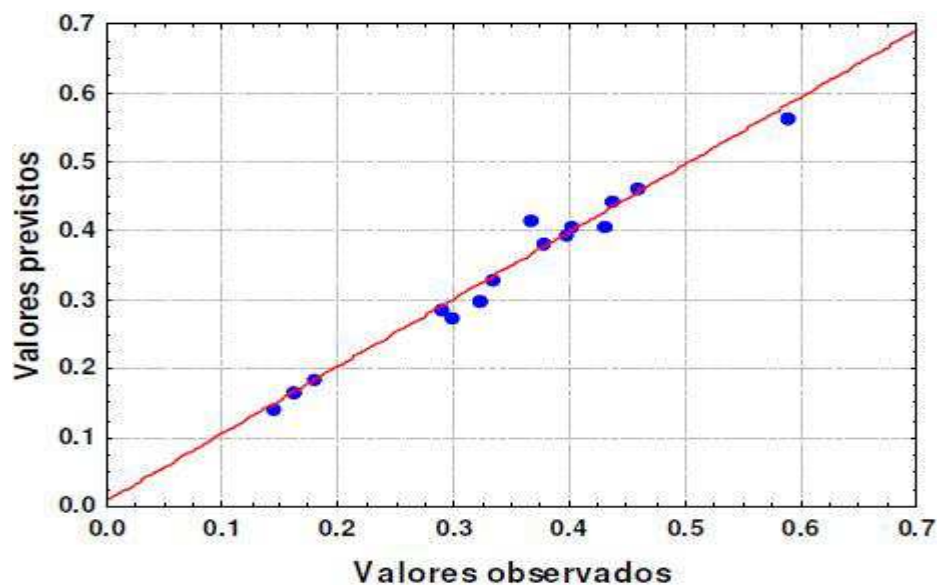


Figura 15 – Respostas previstas pelo modelo cúbico especial.

#### 4.2 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Os 16 extratos obtidos usando o planejamento de misturas com quatro componentes e o extrato aquoso foram analisados por espectrofotometria no UV-Vis. A Figura 16 mostra os espectros de todos os extratos:

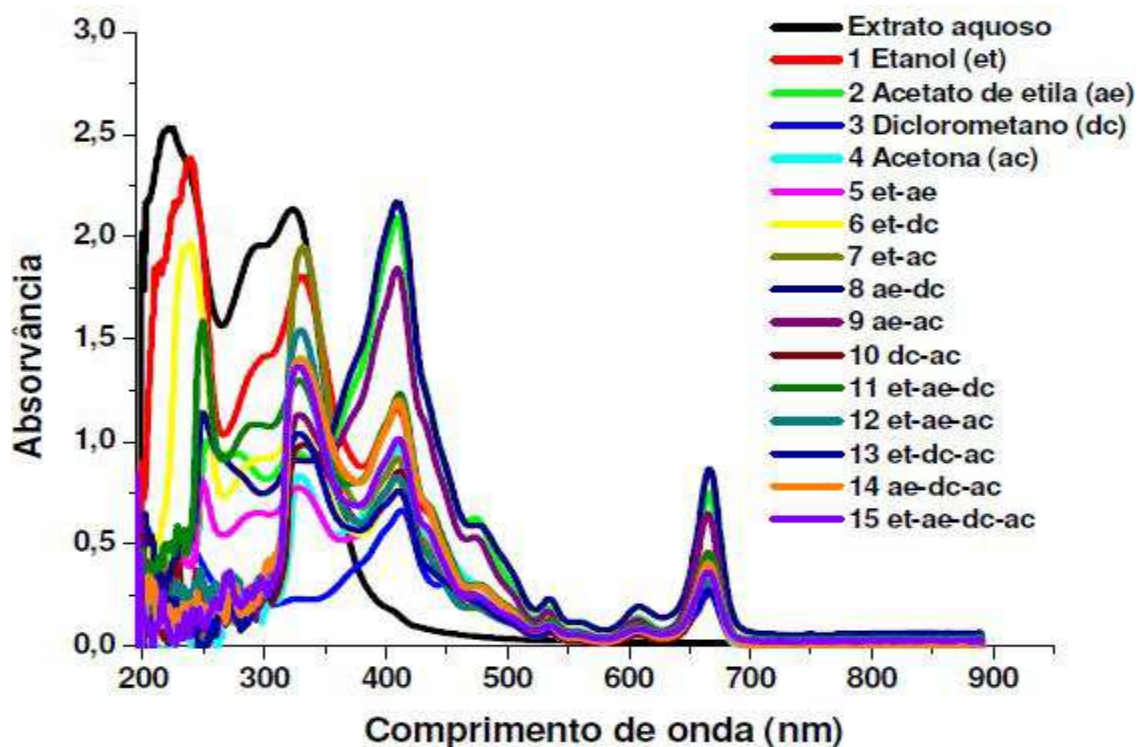
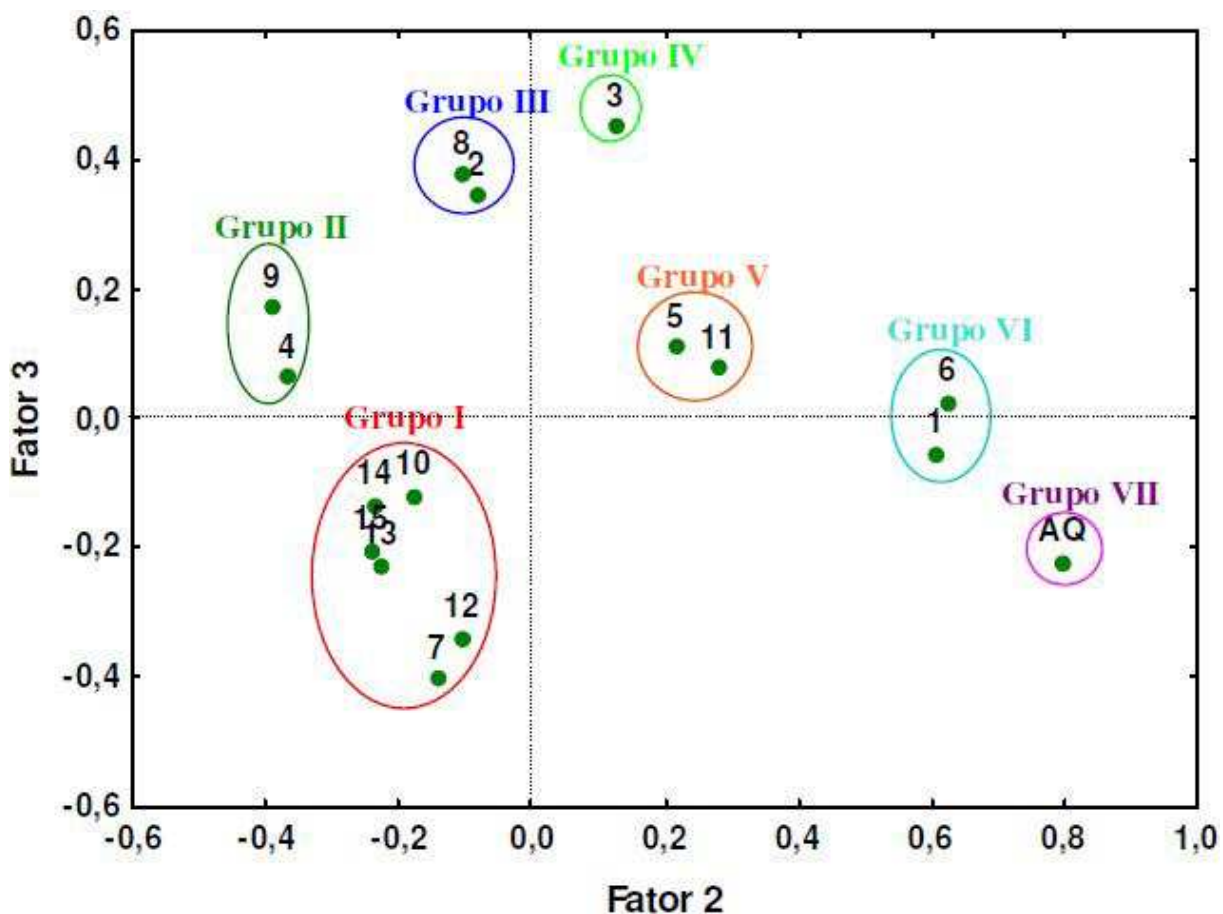


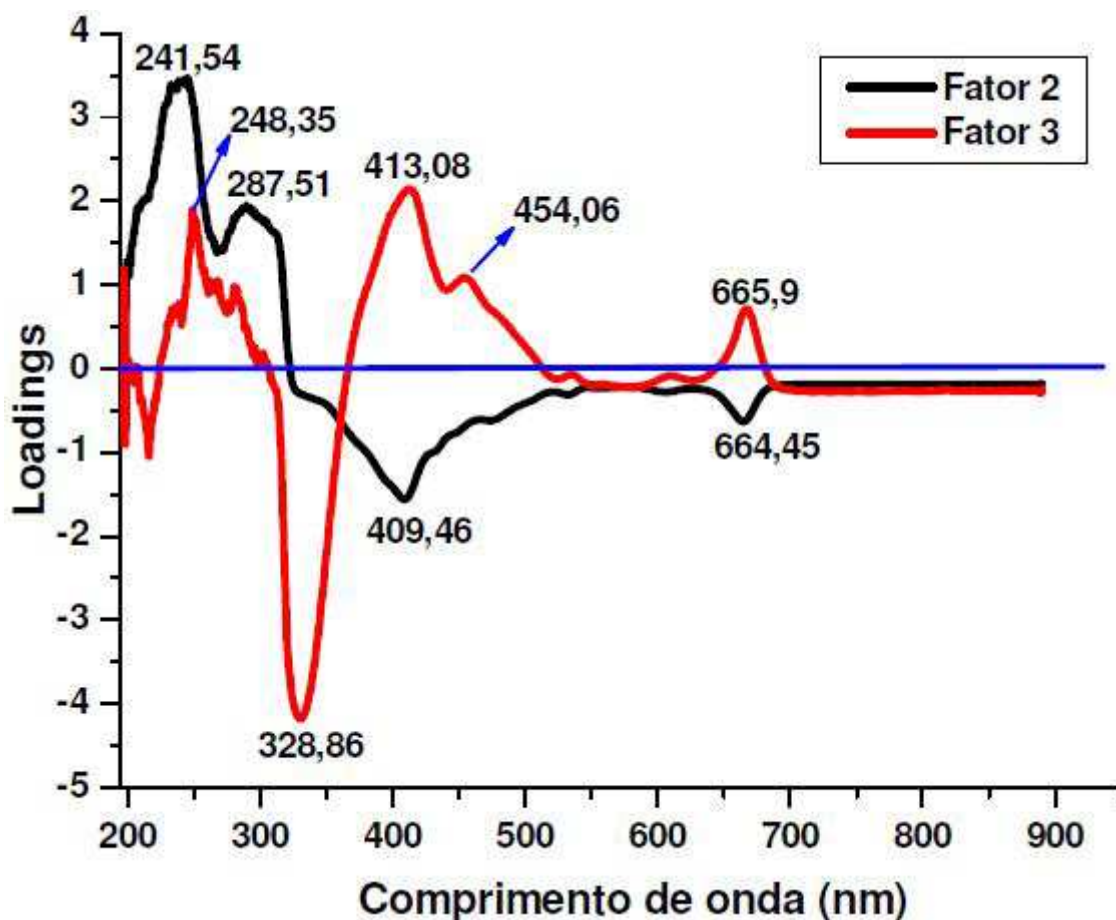
Figura 16 – Espectro no UV-Vis dos 16 extratos obtidos das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

Os dados dos espectros obtidos na região de 188 a 890 nm foram dispostos numa matriz 16 x 2048. Estes dados foram autoescalados e sujeitos a análise de componentes principais e análise hierárquica. Três componentes (fatores) permitem explicar 96,89% da variância dos dados. A Figura 17 mostra a projeção do fator 2 com o fator 3, no qual é possível ver a formação de sete grupos. O fator 2 separa os grupos I, II e III, extraídos em acetona, acetato de etila ou ambos, localizados na parte negativa e os grupos IV, V, VI e VII extraídos em etanol, diclorometano ou ambos e água pura, localizados na parte positiva. Já o fator 3 separa os grupos II, III, IV e V na parte positiva e os grupos I e VII na parte negativa. O grupo VI ficou numa posição intermediária.



**Figura 17** – Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos extratos no ultravioleta-visível, que explicam 19,05 % da variância total.

O gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3, Figura 18, mostra as variáveis com maior influência na discriminação dos extratos.

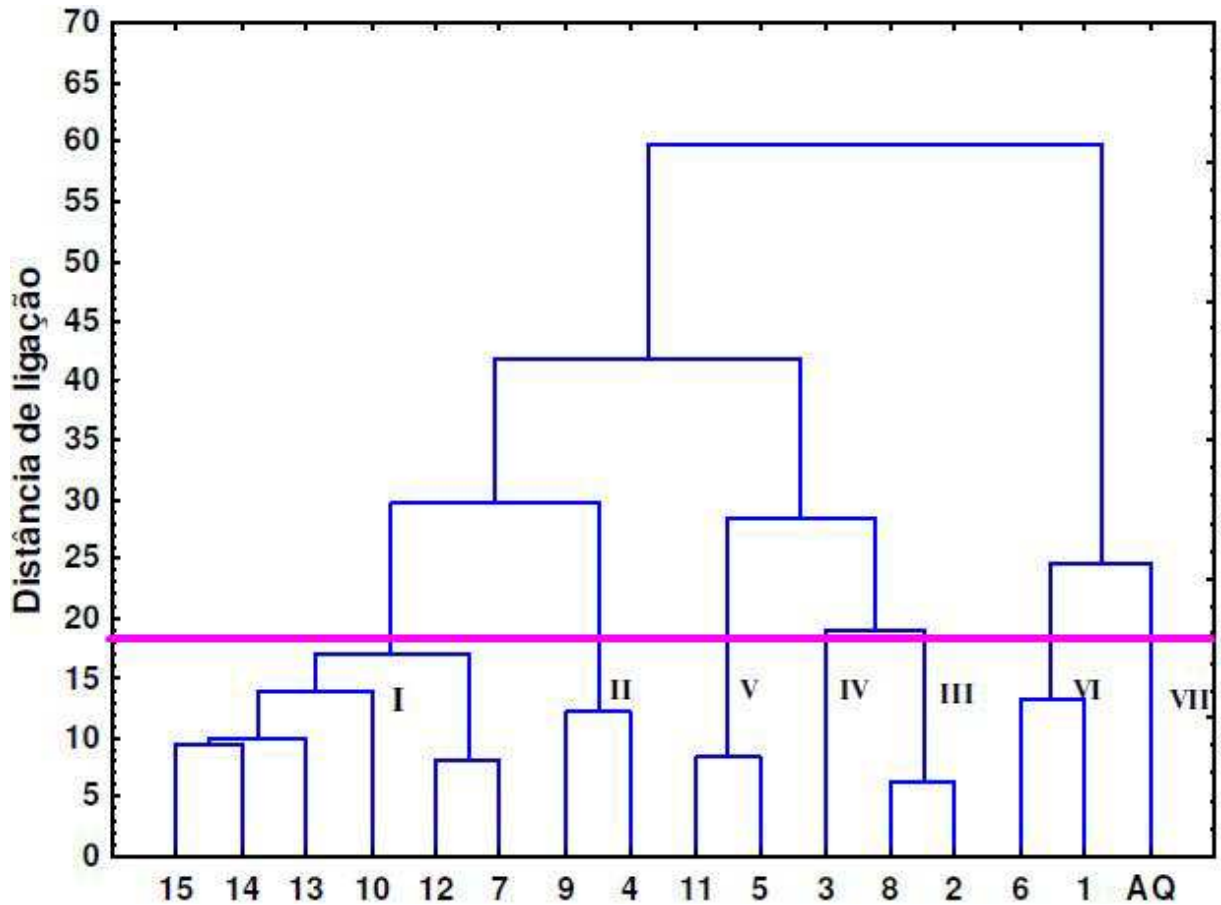


**Figura 18** – Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 dos extratos no UV-Vis.

Os resultados da análise de componentes principais sugerem que existem diferenças nas composições químicas das amostras com relação ao agente extrator. Observa-se que os valores positivos do fator 2 estão localizados no comprimento de onda de 241,54 e 287,51 nm e influencia na separação dos grupos IV, V, VI e VII dos demais grupos. Os grupos I, II e III posicionados na parte negativa do fator 2, são mais influenciados pelas variáveis com comprimento de onda 409,46 nm.

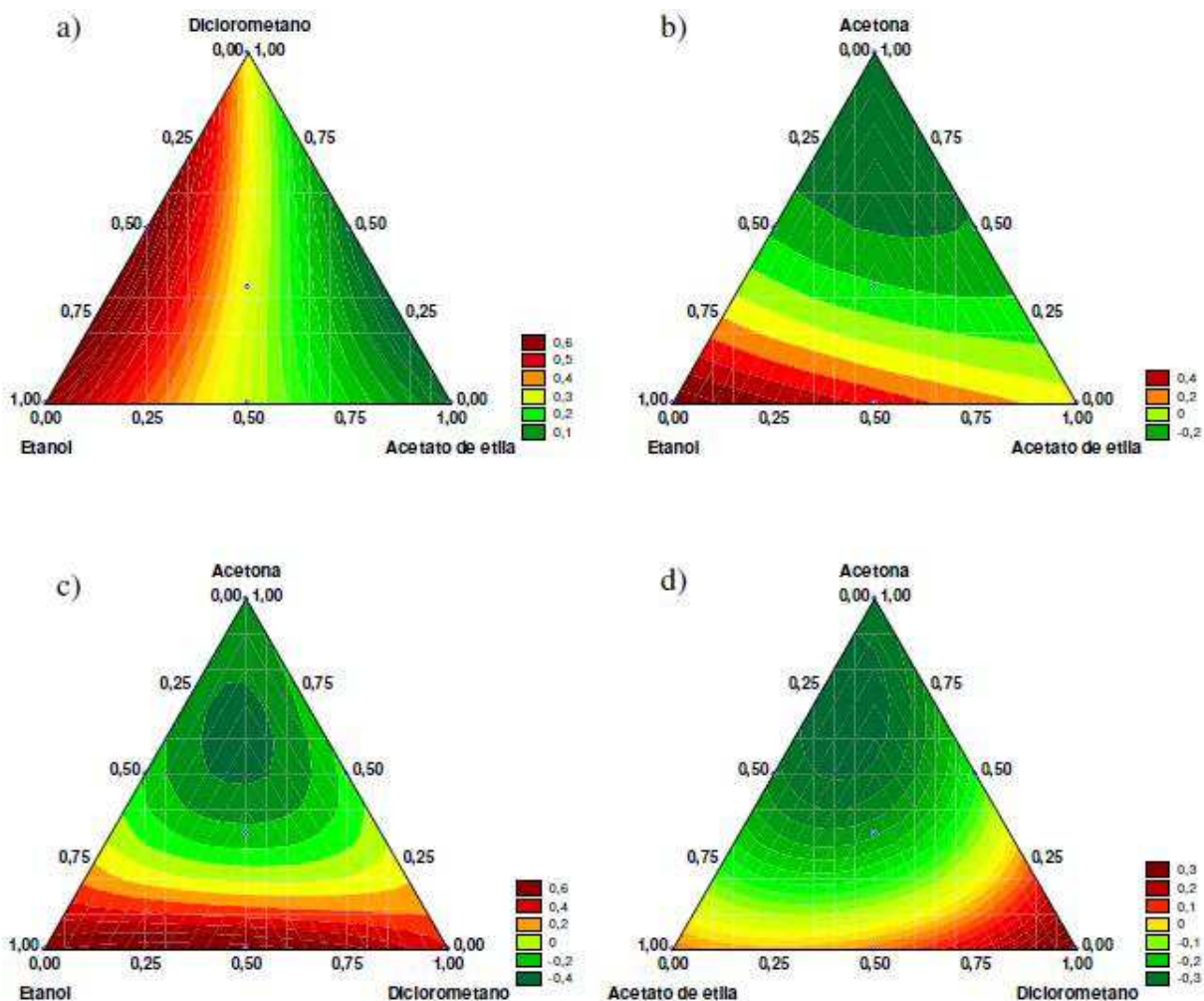
Os valores negativos do fator 3, localizados no comprimento de onda de 328 nm, influencia na separação dos grupos I e VII. Os grupos II, III, IV e V, posicionados na parte positiva do fator 3, são mais influenciados pelas variáveis com comprimento de onda de 248,35, 413,8 e 454,06 nm.

A análise hierárquica foi aplicada aos dados de absorvância no ultravioleta-visível. O resultado da AH concordou com aquele obtido pelo gráfico dos escores mostrado na Figura 17. A Figura 19 apresenta o dendrograma obtido. No valor de 18 é possível observar os sete grupos formados na projeção do fator 2 com o fator 3.



**Figura 19** – Dendrograma obtido pela análise hierárquica dos 16 extratos de *Vernonia condensata* Baker

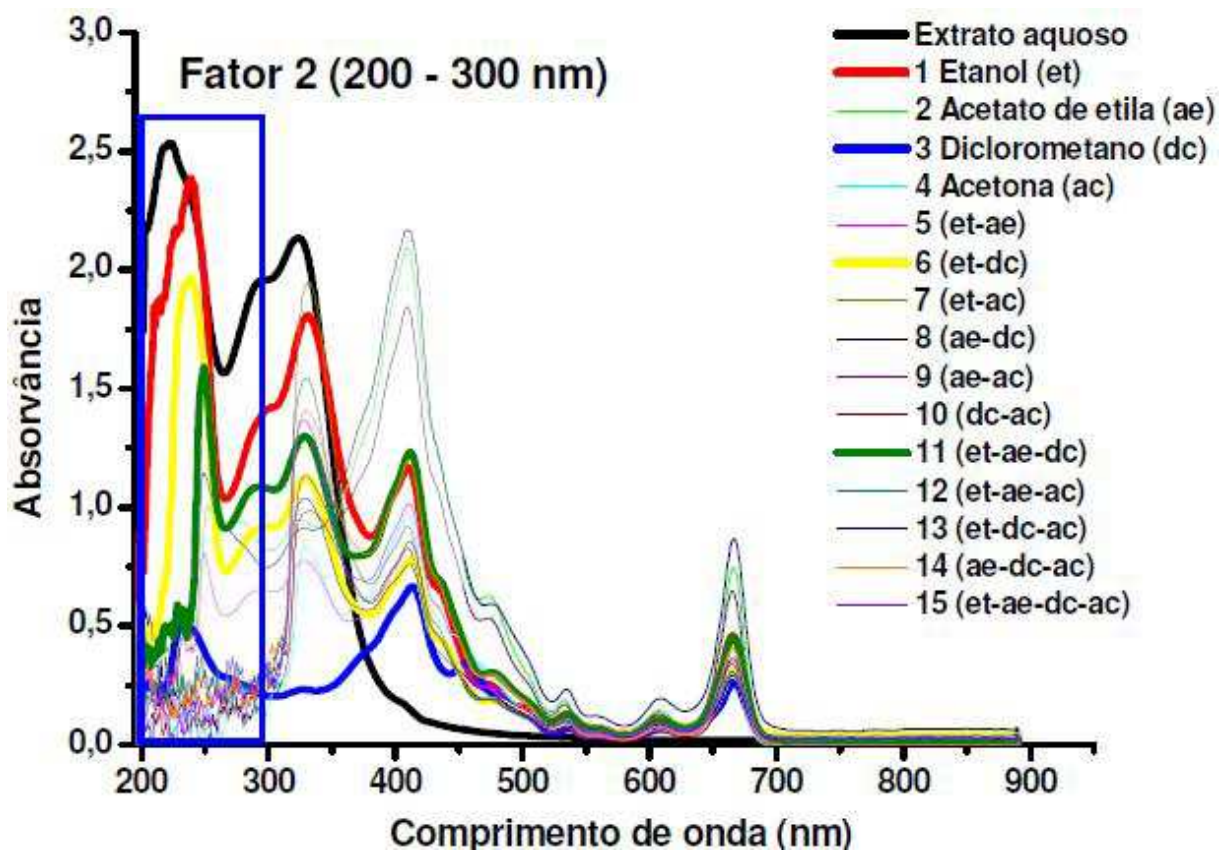
As curvas de nível ajustadas à matriz do planejamento de misturas de solventes (não incluído o extrato aquoso) e aos dados dos loadings do fator 2 utilizando o modelo cúbico especial estão apresentados na Figura 20. Esses contornos mostram que os maiores valores de loadings positivos são obtidos em extratos preparados em etanol, diclorometano e mistura binária etanol-diclorometano, Figuras 20a e 20c.



**Figura 20** – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e dos loadings do fator 2.

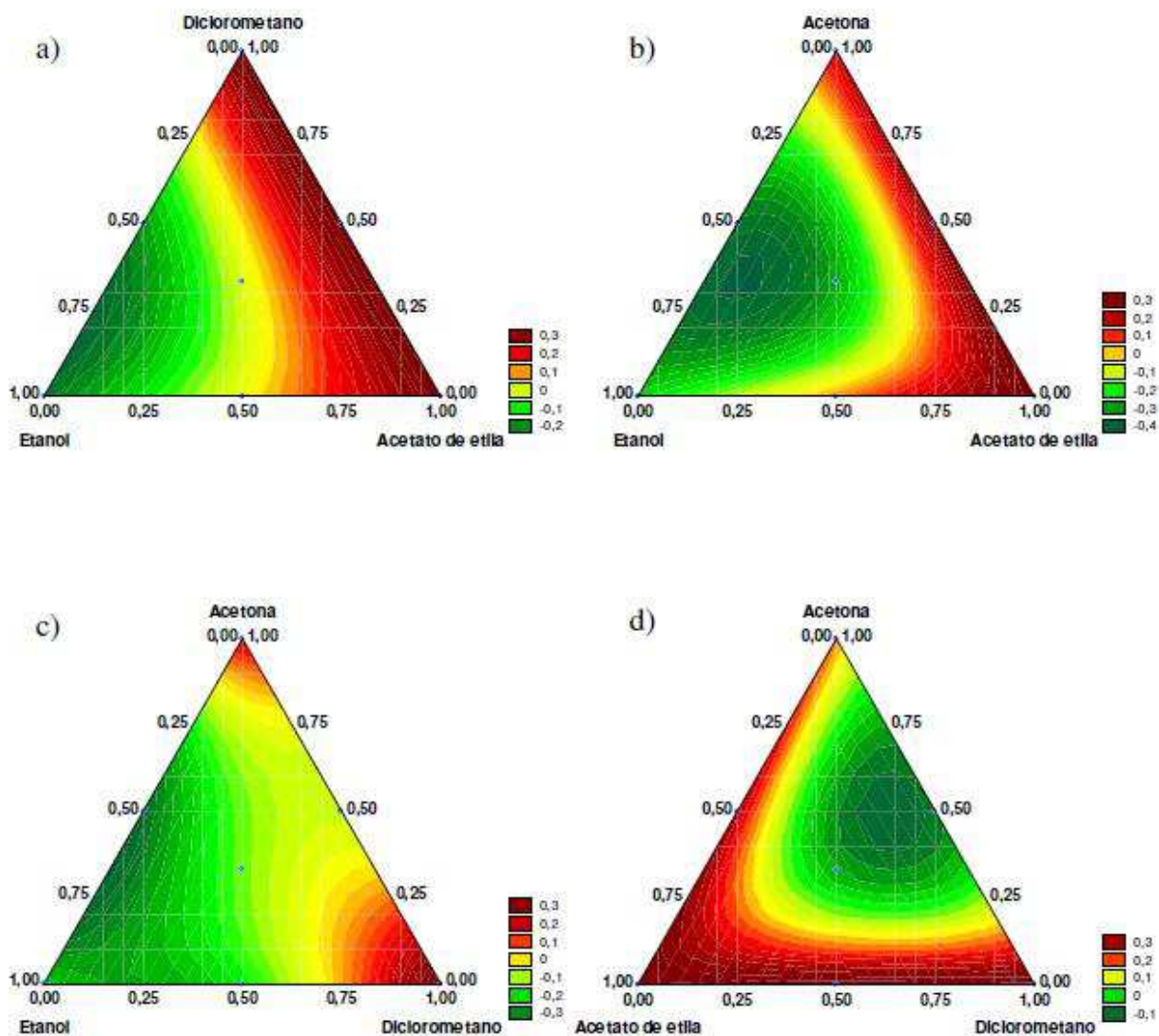
Estas curvas de nível explicam os valores positivos do fator 2 que influenciam na separação dos grupos IV, V, VI e VII. Lembrando que a água não foi incluída no modelo. O grupo IV é formado pelo extrato obtido em diclorometano, Figura 20d. O grupo V é formado por extratos obtidos em misturas etanol-acetato de etila e etanol-acetato de etila-diclorometano, Figura 20a. O grupo VI é formado por extratos obtidos em etanol e mistura de etanol-diclorometano, Figuras 20a e 20c. Observa-se também que os maiores sinais analíticos são obtidos nos extratos preparados em água pura, etanol e a mistura etanol-diclorometano.

Com o auxílio da Figura 17, observa-se que a região do espectro que discrimina os grupos IV, V, VI e VII dos grupos I, II e III está localizada entre 200 e 300 nm, como mostra a Figura 21.



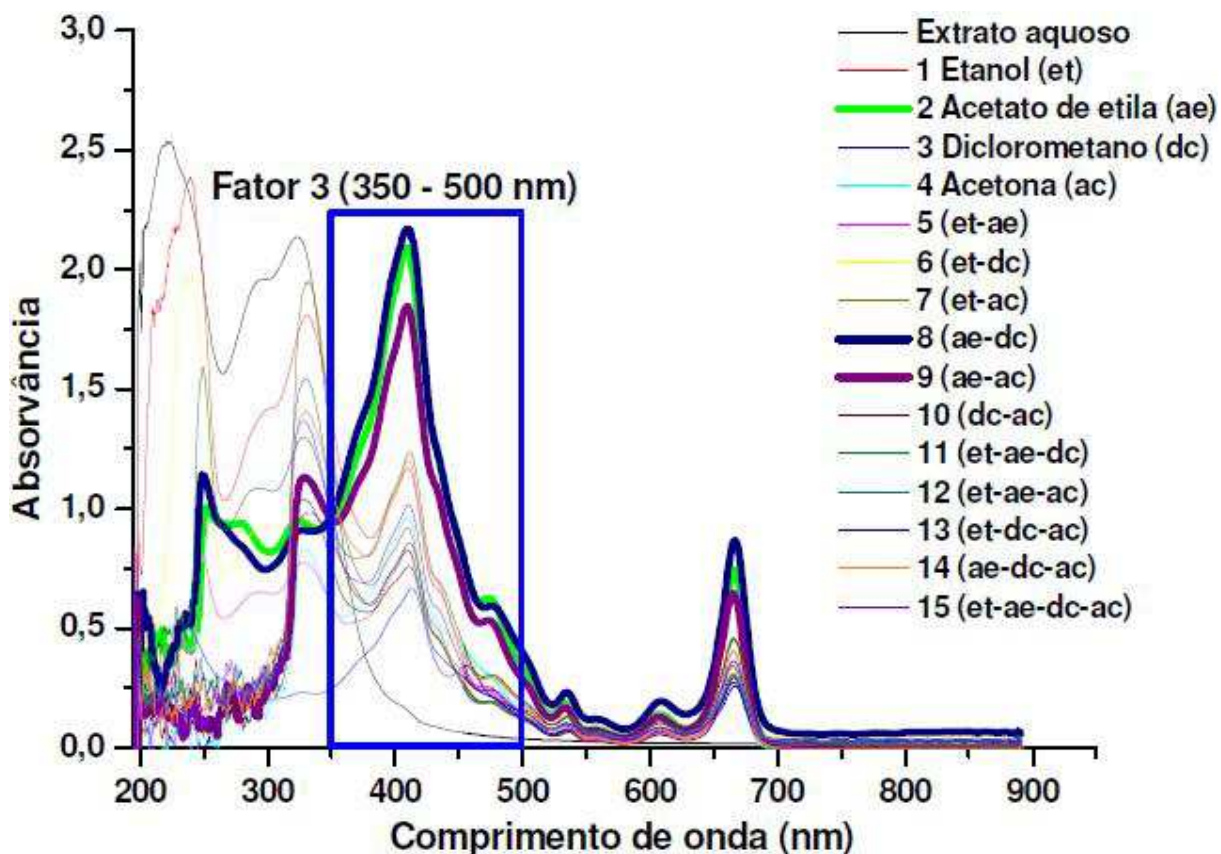
**Figura 21** – Espectro no ultravioleta-visível dos 16 extratos obtidos das folhas de *Vernonia condensata* Baker, com destaque aos espectros dos extratos 1, 3, 6, 11 e aquoso.

Curvas de nível ajustadas à matriz do planejamento de misturas de solventes e aos dados dos loadings do fator 3 usando o modelo cúbico especial estão apresentadas na Figura 22. Os maiores valores de loadings positivos são de extratos obtidos em diclorometano puro, misturas binárias de acetato de etila-diclorometano e de acetato de etila-acetona.



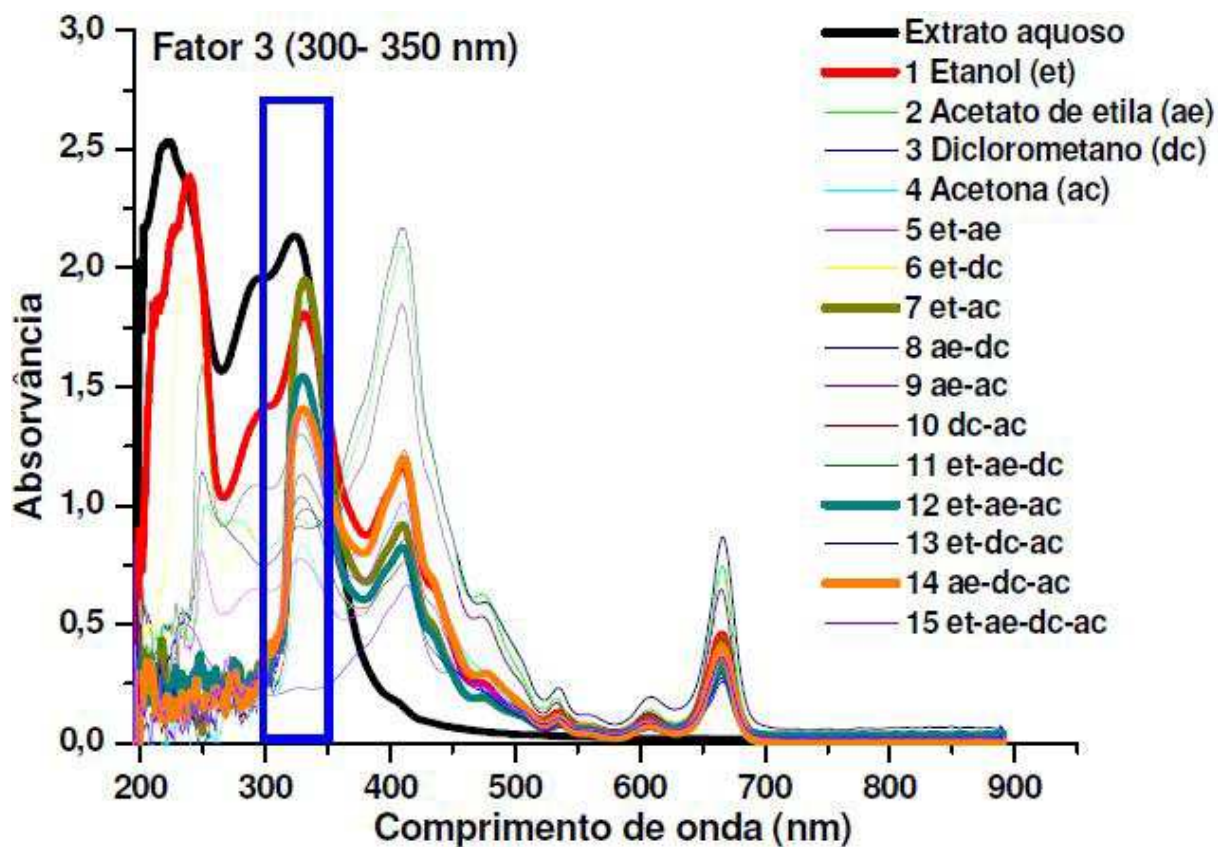
**Figura 22** – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e dos loadings do fator 3.

Os grupos II, III, IV e V, posicionados na parte positiva do fator 3, são mais influenciados pelas variáveis com comprimento de onda de 350 a 500 nm. O grupo VI fica numa posição intermediária. Os grupos III e IV, com valores mais positivos de loadings, são formados por extratos obtidos com misturas ricas em acetato de etila e diclorometano, Figuras 22a e 22d. O grupo II é formado por extratos obtidos com acetona e acetato de etila, Figura 22b. O grupo V é formado por extratos obtidos em etanol, acetato de etila e diclorometano, Figura 22c. A Figura 23 mostra os espectros obtidos no ultravioleta-visível dos 16 extratos destacando as amostras e a região do espectro que sofrem maior influência das variáveis que apresentam valores de loadings mais positivos no fator 3.



**Figura 23** – Espectro no ultravioleta-visível dos 16 extratos obtidos das folhas de *Vernonia condensata* Baker, com destaque aos espectros dos extratos 2, 8 e 9.

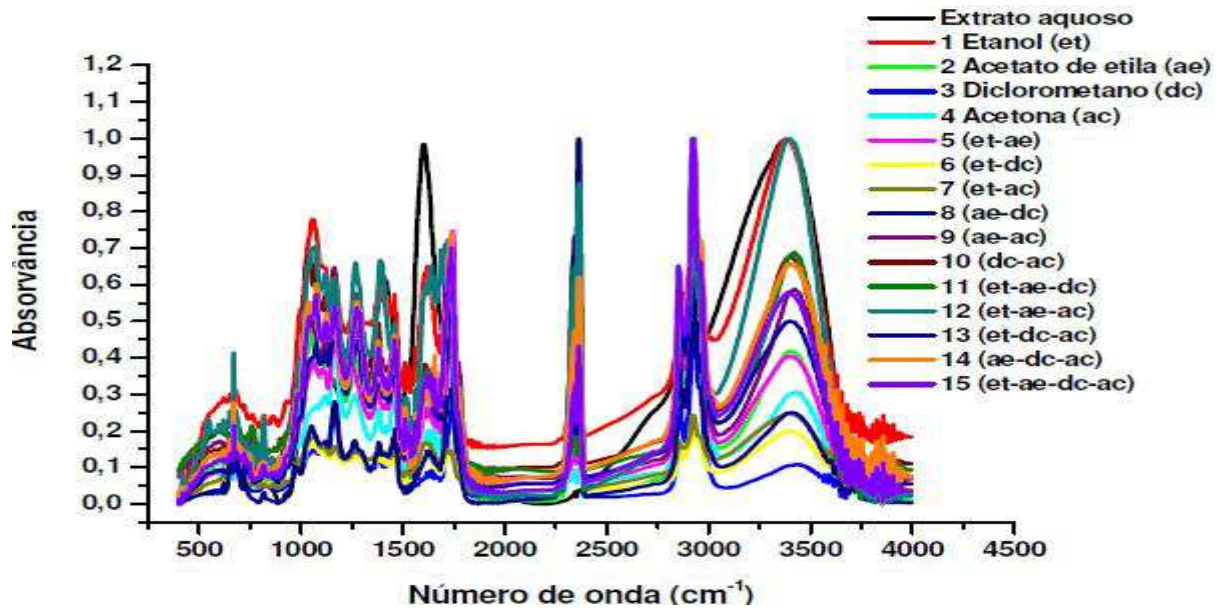
Os valores dos loadings negativos do fator 3, Figura 18, podem ser explicados analisando as curvas de nível da Figura 22. Valores mais negativos dos loadings no fator 3 correspondem a região espectral entre 300 e 350 nm, Figura 22b, que influencia na separação dos grupos I e VII (Figura 17). O grupo I é formado por extratos obtidos em misturas de solventes contendo acetona. A Figura 24 mostra os espectros obtidos no UV-Vis dos 16 extratos destacando as amostras e a região do espectro que sofrem maior influência das variáveis que apresentam valores de loadings mais negativos no fator 3.



**Figura 24** – Espectro no ultravioleta-visível dos 16 extratos obtidos das folhas de *Vernonia condensata* Baker, com destaque aos espectros dos extratos 1, 7, 12, 14 e aquoso.

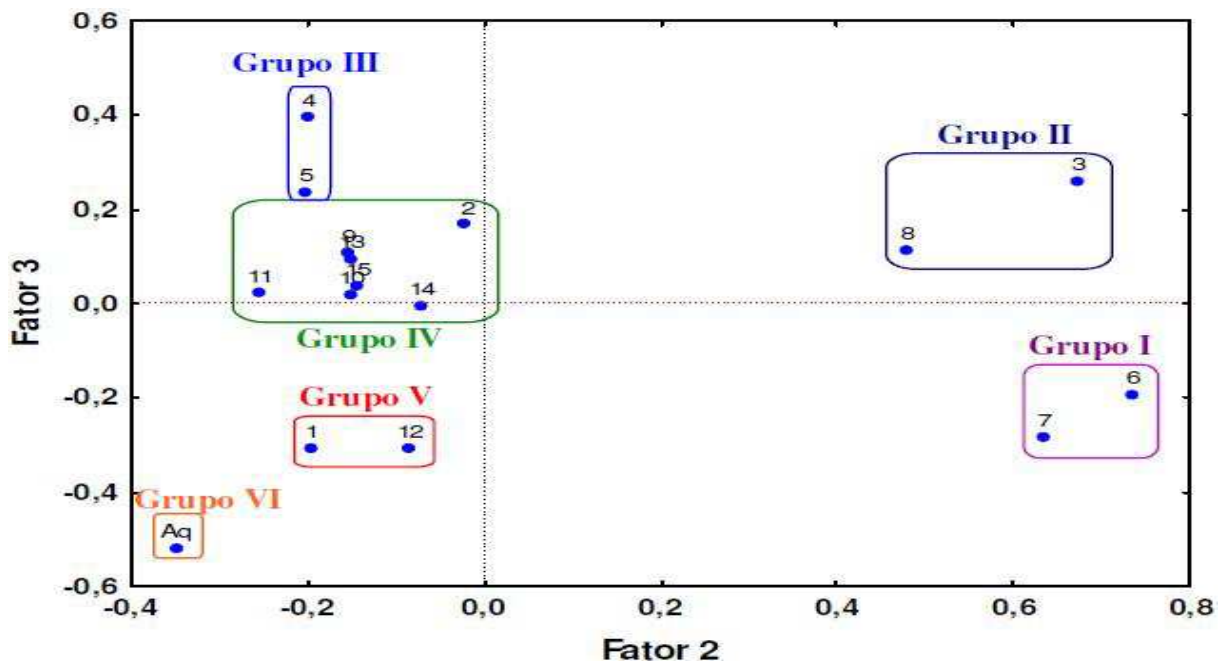
#### 4.3 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os 15 extratos preparados com base no planejamento da Figura 8 e o extrato aquoso foram analisados por FTIR e os dados obtidos foram analisados por métodos quimiométricos. A Figura 25 mostra os espectros dos 16 extratos registrados na região entre  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ .



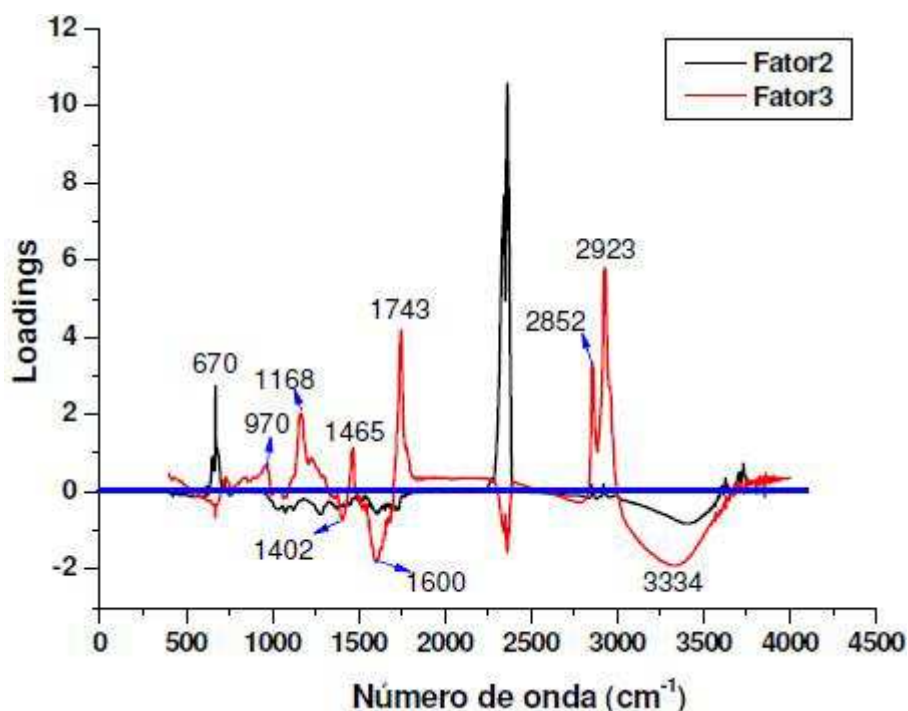
**Figura 25** – Espectros no infravermelho das 16 extratos obtidos das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

Os dados dos espectros obtidos foram colocados numa matriz 16 x 1866 variáveis. Estes dados foram autoescalados e sujeitos a análise de componentes principais, três componentes (fatores) permitem explicar 98% da variância dos dados. O gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 é mostrado na Figura 26. Observa-se neste gráfico a formação de 6 grupos distintos. Este resultado sugere que existe diferença na composição química da amostra com relação ao agente extrator.



**Figura 26** – Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos dados espectrais dos 16 extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker.





**Figura 28** – Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 16 amostras no FTIR.

Os grupos V e VI localizados na parte negativa dos fatores 2 e 3 são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings mais negativos, principalmente no fator 3. As regiões do espectro que caracterizam essas amostras são os números de onda de 3334, 1600 e 1402  $\text{cm}^{-1}$ . Os grupos II e III localizados na parte positiva do fator 3 são influenciados pelas variáveis com loadings mais positivos, sendo que os números de onda mais significativos são 2923, 2852, 1743, 1465, 1168, 970 e 670  $\text{cm}^{-1}$ .

A região em torno 3334  $\text{cm}^{-1}$  é característica de vibrações de deformação axial da ligação O-H ( $\nu$  O-H) de álcoois e fenóis (3650-3100  $\text{cm}^{-1}$ ), podem ter contribuições de absorções provenientes de vibrações de deformação axial da ligação N-H de aminas (3500-3310  $\text{cm}^{-1}$ ) e amidas (3500-3060  $\text{cm}^{-1}$ ). Os picos na região de 2923 e 2852  $\text{cm}^{-1}$  são provenientes das vibrações de deformação axial simétrica e assimétrica de C-H de alcanos (3000-2840  $\text{cm}^{-1}$ ) e de aldeídos (2830-2695  $\text{cm}^{-1}$ ).

A intensa banda de absorção observada na região de 1743 $\text{cm}^{-1}$  é característica de deformação axial de C=O ( $\nu$  C=O) de ésteres (1750-1735 $\text{cm}^{-1}$ ) ou, de acordo com a relação entre a posição da carbonila e o tamanho do anel da lactona, pode ser atribuído a  $\gamma$ -lactonas (1795-1760 $\text{cm}^{-1}$ ) e/ou  $\delta$ -lactonas (1760-1720 $\text{cm}^{-1}$ ). A banda de absorção  $\nu$  C=O das  $\gamma$ -lactamas ocorre entre 1750 e 1700 $\text{cm}^{-1}$  e as da  $\beta$ -lactamas ocorre entre 1760 e 1730 $\text{cm}^{-1}$ .

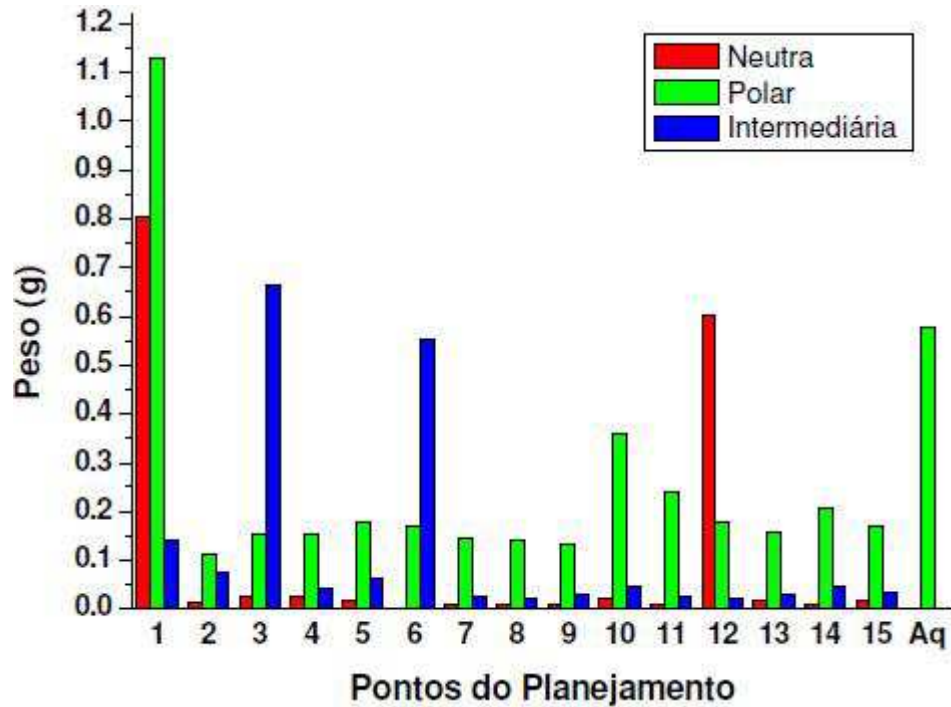
A banda na região de  $1600\text{ cm}^{-1}$  pode ser proveniente de vibrações de deformação axial da ligação C=C de alquenos ( $1670\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) ou de hidrocarbonetos aromáticos mononucleares ( $1600\text{-}1585\text{ cm}^{-1}$ ) ou banda correspondente à deformação angular simétrica no plano de N-H ( $\delta_s\text{ NH}$ ) de aminas primárias e secundárias ( $1650\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ ).

A banda na região em torno de  $1465\text{ cm}^{-1}$  pode ser uma banda de deformação angular de C-H de alcanos, como deformação angular simétrica da ligação  $\text{CH}_2$  ( $1467\text{ cm}^{-1}$ ) ou  $\text{CH}_3$  ( $1380\text{ cm}^{-1}$ ) ou deformação angular assimétrica da ligação  $\text{CH}_3$  ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ). A região de  $1168\text{ cm}^{-1}$  pode indicar vibrações de deformação axial de C-O, que pode ser associada a grupos funcionais como álcoois e fenóis ( $1260\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ), ésteres e lactonas ( $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ) entre outros. Em regiões de baixa frequência de absorção existem muitas possibilidades, por exemplo, vibrações de deformação angular fora do plano da ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos ( $900\text{-}675\text{ cm}^{-1}$ ) e de alquenos ( $1000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ).

#### **4.4 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS**

##### **4.4.1 Rendimento das Frações**

O fracionamento dos extratos foi realizado conforme o procedimento descrito na Figura 10. Para facilitar a discussão dos resultados do fracionamento adotaremos a seguinte nomenclatura da Figura 10: fração neutra (resíduo), fração intermediária (fase orgânica) e fração polar (fase aquosa). O rendimento bruto em massa das frações obtidas está apresentado na Figura 29.

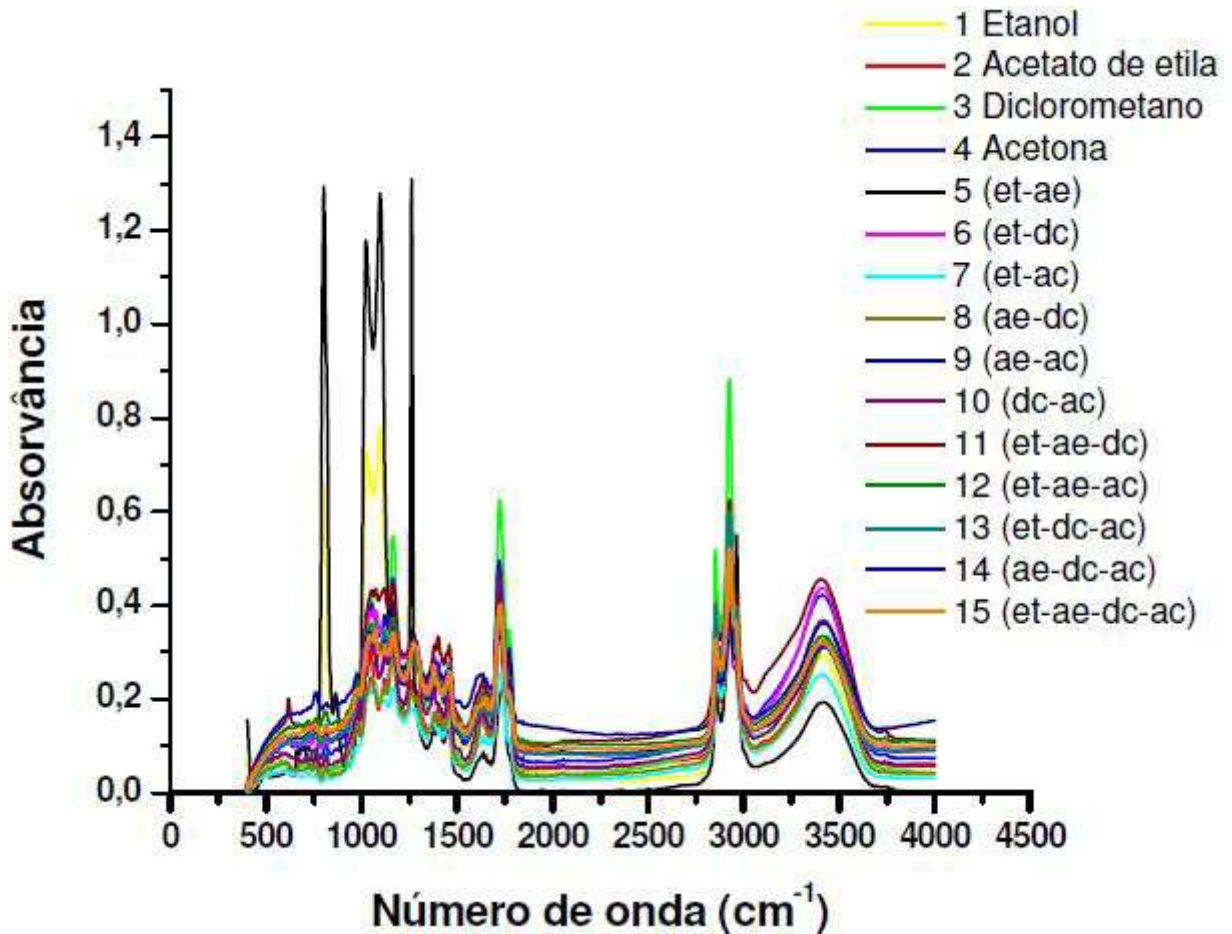


**Figura 29** – Gráfico dos rendimentos em massa das frações obtidas dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

#### 4.4.2 Análise das Frações por Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

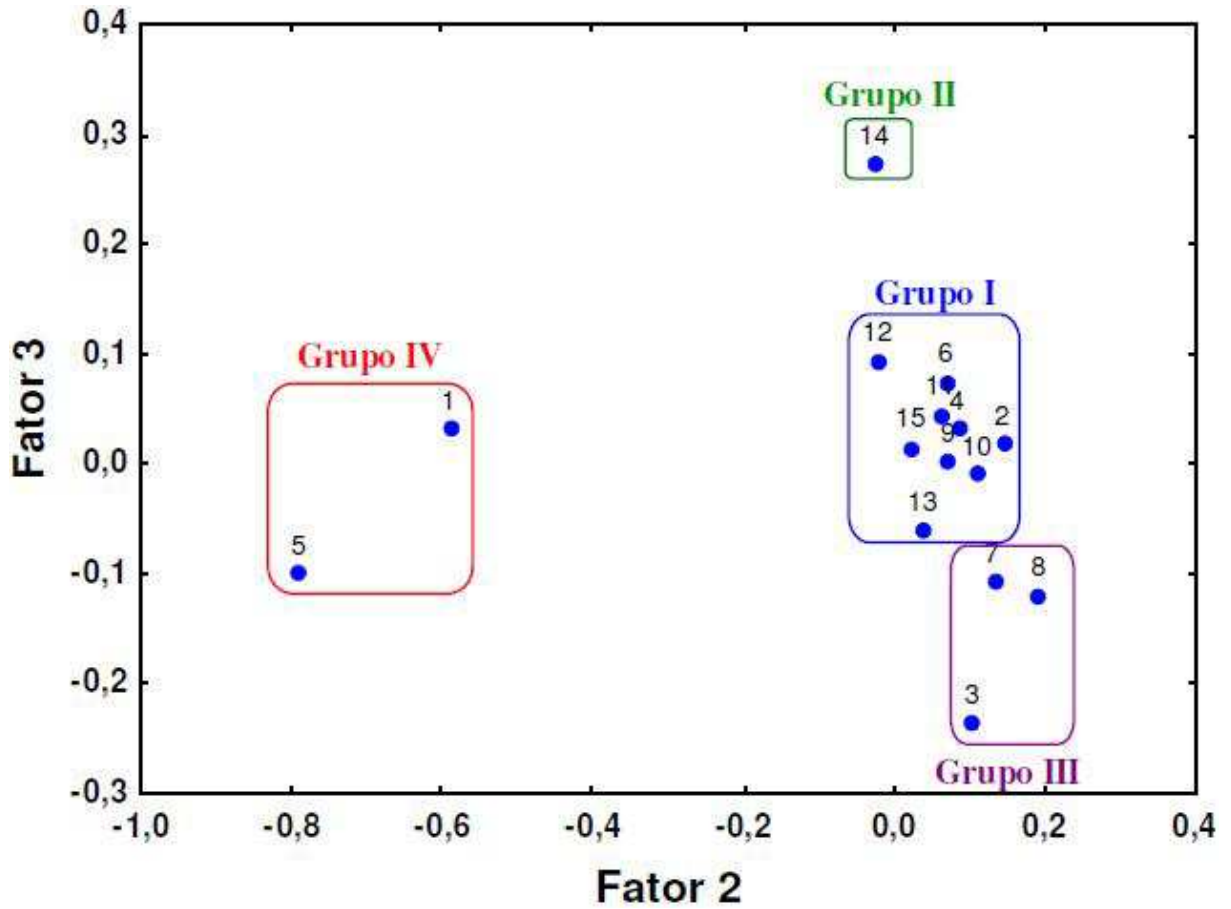
##### 4.4.2.1 Fração intermediária

As frações intermediárias obtidas dos 15 extratos foram analisadas por FTIR. A Figura 30 mostra o espectro da fração intermediária de cada extrato.



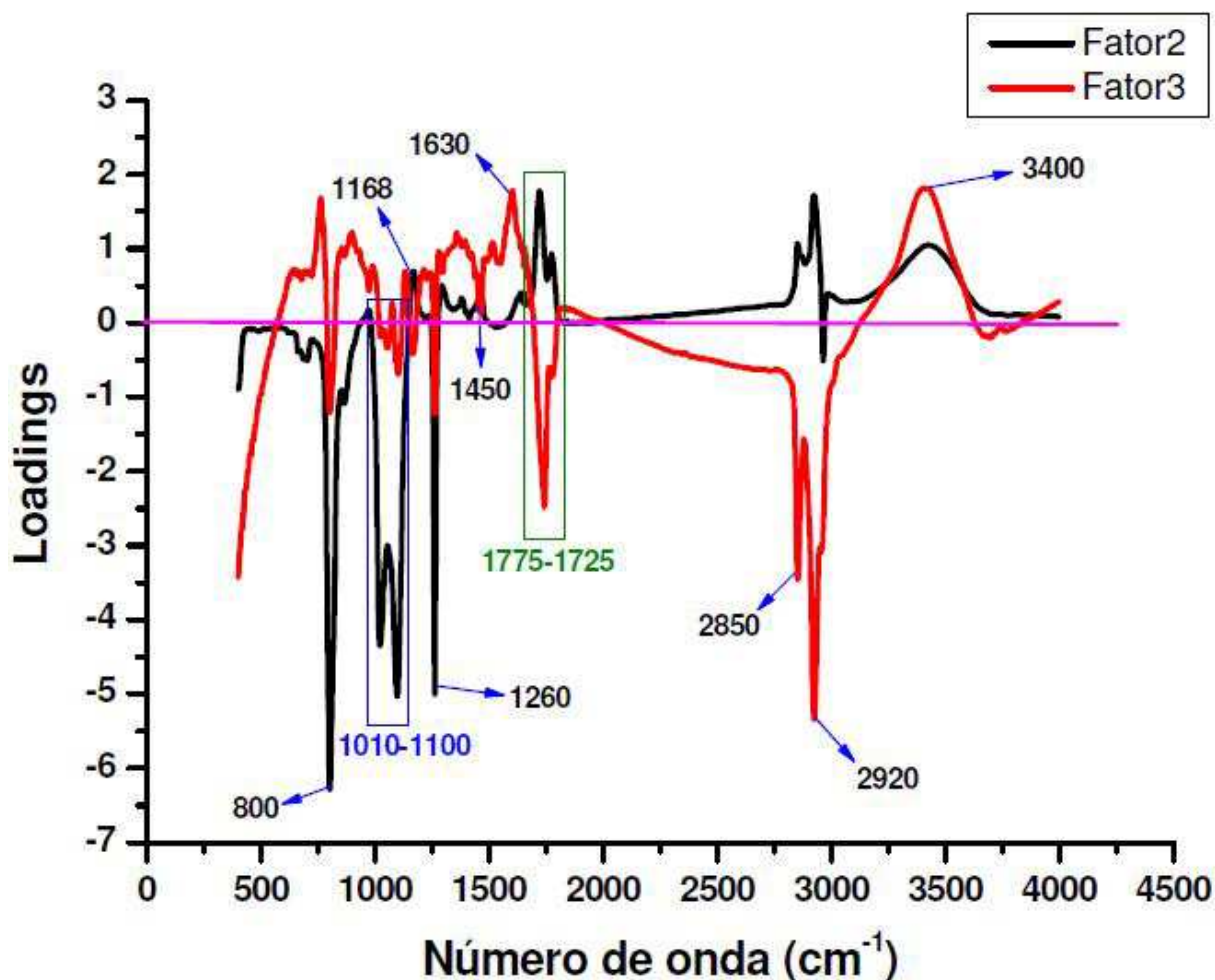
**Figura 30** – Espectros no infravermelho da fração intermediária de cada extrato obtido das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

Os dados dos espectros obtidos na região de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  foram colocados numa matriz 15 x 3700 variáveis. Estes dados foram autoescalados e sujeitos a análise de componentes principais. Três componentes (fatores) permitem explicar 98% da variância dos dados. O gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 é mostrado na Figura 31.



**Figura 31** – Gráfico dos escores dos fatores 2 e 3 dos dados espectrais obtidos das 15 amostras da fração intermediária.

O gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 é apresentado na Figura 32. Este gráfico mostra quais os números de onda que explicam a distinção entre os quatro grupos formados na Figura 31.



**Figura 32** – Gráfico dos loadings dos fatores 2 e 3 para as 15 amostras da fração intermediária.

A região em torno  $3400\text{ cm}^{-1}$  é característica de vibrações de deformação axial de O-H ( $\nu$  O-H) de álcoois e fenóis ( $3650\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ ), podem ter contribuições de absorções provenientes de vibrações  $\nu$  N-H de aminas ( $3500\text{-}3310\text{ cm}^{-1}$ ) e amidas ( $3500\text{-}3060\text{ cm}^{-1}$ ). Os picos nas regiões de  $2920$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  são provenientes das deformações axiais simétricas e assimétricas de C-H de alcanos ( $3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\nu$  C-H de aldeídos ( $2830\text{-}2695\text{ cm}^{-1}$ ).

O pico na região entre  $1775$  e  $1725\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído a uma banda de absorção de carbonila ( $\nu$  C=O) de ésteres ( $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$ ) ou, de acordo com a relação entre a posição da carbonila e o tamanho do anel da lactona, pode ser atribuído a  $\gamma$ -lactonas ( $1795\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ ) e/ou  $\beta$ -lactonas ( $1760\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ). A banda de absorção  $\nu$  C=O das  $\gamma$ -lactamas ocorre entre  $1750$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  e as da  $\beta$ -lactamas ocorre entre  $1760$  e  $1730\text{ cm}^{-1}$ . A banda de absorção na região em torno de  $1630\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibrações de deformação angular ( $\delta$ s N-H) de  $\text{NH}_2$  ou de NH de amidas primárias, secundárias e algumas lactamas que

têm bandas entre 1650 e 1580  $\text{cm}^{-1}$  e pode ser proveniente também de vibrações  $\delta$  N-H de aminas, que pode ser observada entre 1650 e 1580  $\text{cm}^{-1}$ .

A banda de absorção na região de 1446-1370  $\text{cm}^{-1}$  pode ser proveniente de uma vibração de deformação axial de C-N de amidas primárias (1400  $\text{cm}^{-1}$ ) ou vibração de deformação angular C-H de alcanos, com  $\delta$ s  $\text{CH}_3$  que ocorre próximo de 1375  $\text{cm}^{-1}$  ou das  $\text{CH}_3$  próxima de 1450  $\text{cm}^{-1}$ . A região de 1260-1290  $\text{cm}^{-1}$  pode indicar a presença de C-N ( $\nu$  C-N) de aminas aromáticas primárias (1340-1250  $\text{cm}^{-1}$ ), secundárias (1350-1280  $\text{cm}^{-1}$ ) ou terciárias (1360-1310  $\text{cm}^{-1}$ ) ou pode ser proveniente de vibrações de deformação axial de C-O de ésteres que ocorrem entre 1300 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

A banda na região 1160  $\text{cm}^{-1}$  pode ser característica de vibrações de deformação axial de C-O de álcoois e fenóis (1260-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) ou de ésteres de ácidos  $\alpha,\beta$ -insaturados (1300-1160  $\text{cm}^{-1}$ ). As bandas de absorção observadas na região de 1100 e 1010  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a vibrações de deformação axial de C-N de aminas alifáticas primárias, secundárias e terciárias, que ocorrem entre 1250 e 1020  $\text{cm}^{-1}$ .

A banda na região de 800  $\text{cm}^{-1}$  pode ser proveniente de vibrações de deformação angular de N-H de lactamas (800-666  $\text{cm}^{-1}$ ) ou de nitritos, que produzem bandas intensas de deformação axial de N-O que ocorrem entre 850 e 750  $\text{cm}^{-1}$ .

A fração de polaridade intermediária é composta basicamente por terpenóides e compostos fenólicos. A diversa, difundida e numerosa família de produtos naturais construídas a partir do isopreno que compreendem compostos com esqueletos C5, C10, C15, etc, são chamados terpenóides, terpenos ou isoprenóides<sup>22</sup>. Como subgrupo de toda a classe dos terpenóides, temos os hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), e assim por diante. As lactonas sesquiterpênicas são sesquiterpenos que, após o processo biossintético, apresenta um grupo lactona em seu esqueleto carbônico<sup>22</sup>. A forte banda em 1760  $\text{cm}^{-1}$  no espectro corresponde a um estiramento da carbonila de  $\gamma$ -lactona, indica a presença de lactonas sesquiterpênicas no extrato<sup>23</sup>. Lactonas sesquiterpênicas de vários tipos são comuns em plantas da espécie *Vernonia*<sup>24</sup>.

Estudos mostraram que as lactonas sesquiterpênicas podem apresentar uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas. Foram descritos que as lactonas sesquiterpênicas podem apresentar atividades antimicrobiana, antitumoral e antiinflamatória, efeitos nos sistemas nervoso central e cardiovascular, assim como potencial alergênico<sup>25</sup>. Verificou-se que lactonas sesquiterpênicas demonstrou efeito antinociceptivo utilizando-se do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos<sup>26</sup>. Estudos de

estrutura-atividade indicam que os grupos  $\gamma$ -lactona e a carbonila  $\alpha,\beta,\gamma$   $\delta$ -insaturada presentes nestes compostos estão relacionados com sua atividade antiinflamatória<sup>22</sup>.

Vários estudos têm investigado como lactonas sesquiterpênicas apresenta o seu efeito antiinflamatório. Foi apresentado que as lactonas sesquiterpênicas modula muitos processos inflamatórios, por exemplo, a fosforização oxidativa, liberação de histamina e serotonina. Entretanto, apesar destes resultados, o mecanismo molecular pelo qual eles mostram o seu efeito de antiinflamatório ainda não foi suficientemente explicado<sup>25</sup>.

#### 4.4.2.2 Fração polar

A Figura 33 mostra o espectro obtido da fração polar de cada extrato.

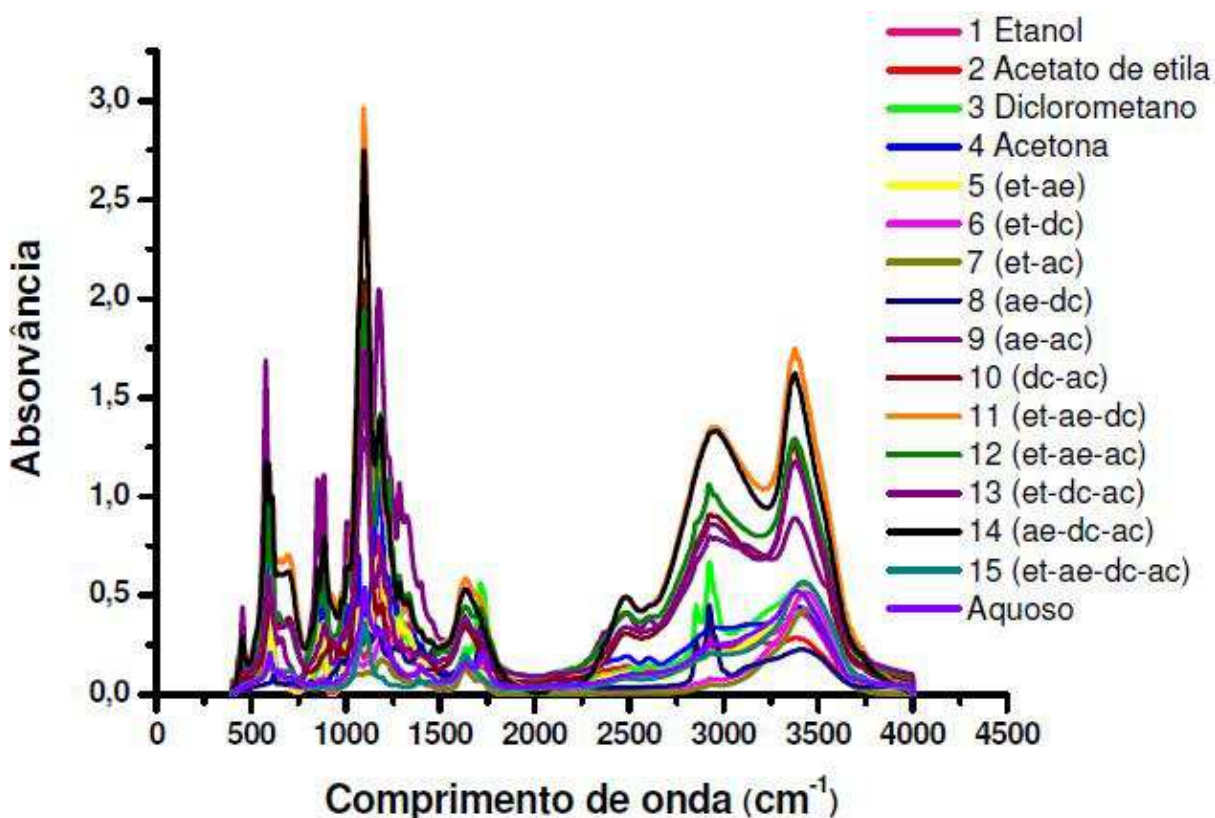
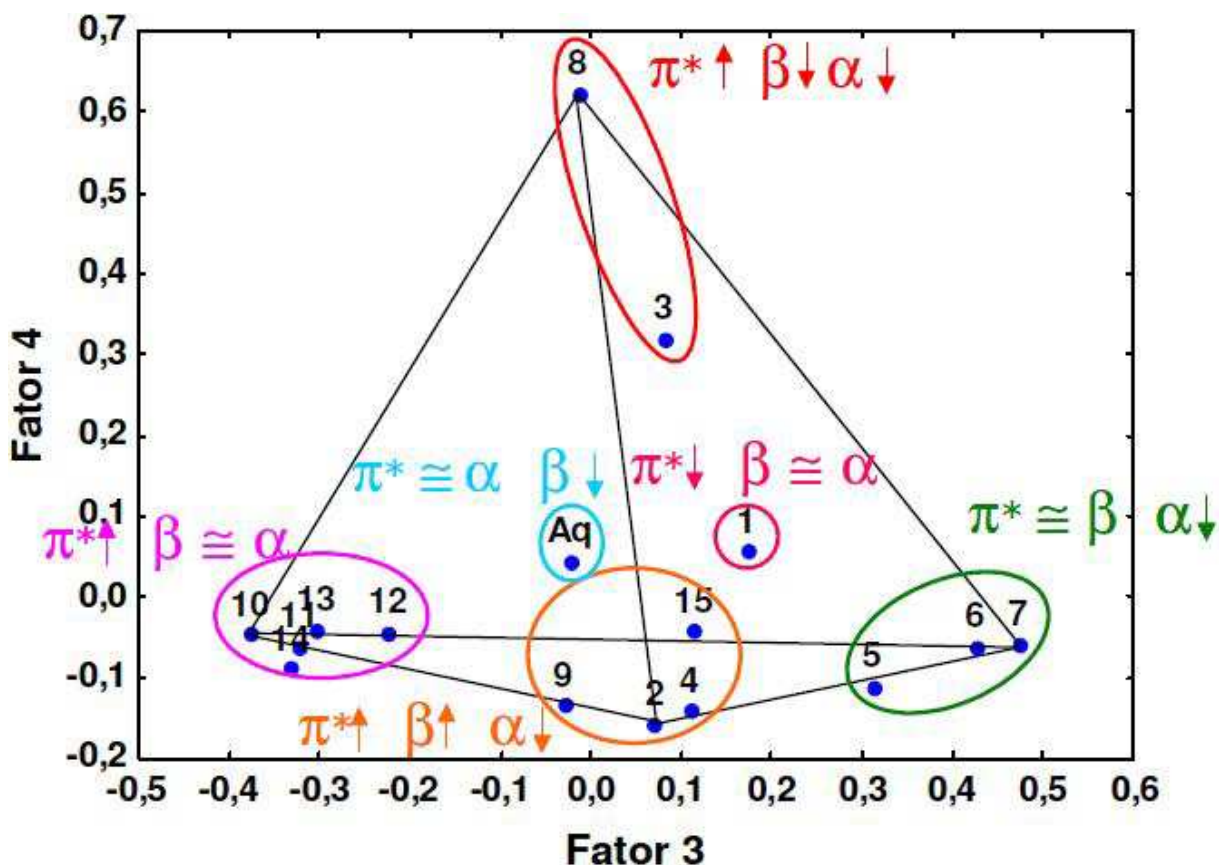


Figura 33 – Espectros no infravermelho da fração polar de cada extrato obtido das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

Os dados dos espectros obtidos na região de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  foram colocados numa matriz 16 x 1869 variáveis. Estes dados foram sujeitos a análise de componentes principais. Três componentes (fatores) permitem explicar 95% da variância dos dados. O gráfico dos escores dos fatores 3 e 4 é mostrado na Figura 34.



**Figura 34** – Gráfico dos escores dos fatores 3 e 4 dos dados espectrais obtidos das 16 amostras da fração polar.

A distribuição dos pontos na Figura 34 pode ser representado na forma de um tetraedro, no qual podemos colocar as frações 2 (ae), 7 (et-ac), 8 (ae-dc) e 10 (dc-ac) nos vértices. Uma maneira de explicar a formação deste tetraedro é utilizando o triângulo de seletividade da Figura 6 e a Tabela 1, discutidos no item 3.6. Nesta abordagem, os solventes são agrupados de acordo com o tipo de interação que é capaz de fazer com compostos de interesse. Os parâmetros de seletividade utilizados são a acidicidade ( $\alpha$ ), basicidade ( $\beta$ ) e dipolaridade ( $\pi^*$ ). Os solventes ou misturas que apresentam parâmetros de seletividade similares são quimicamente semelhantes, embora possam apresentar diferentes valores de polaridade.

As frações dos extratos 3(dc) e 8(ae-dc) foram obtidos de misturas de solventes que apresentam altos valores de dipolaridade( $\pi^*$ ) e valores de basicidade ( $\beta$ ) baixos, portanto estes solventes extraem compostos quimicamente semelhantes, principalmente compostos capazes de interação dipolar, tais como éteres, ésteres, sulfetos, sulfóxidos, tióis, hidroxilas, halogênios, aldeídos, cetonas, compostos com ligação nitro(-NO<sub>2</sub>) e nitrila (-CN), etc.

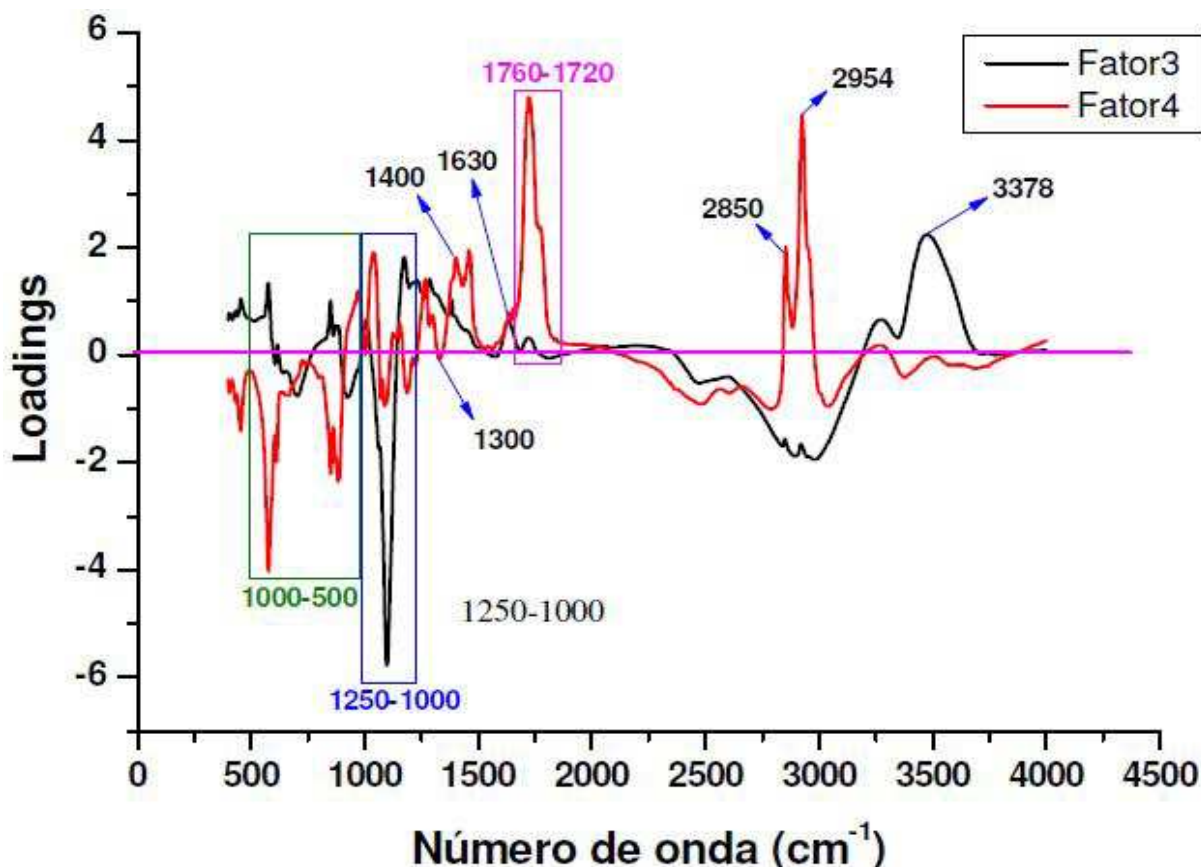
As frações dos extratos 2 (ae), 4 (ac) e 9 (ae-ac) foram obtidos em misturas de solventes que apresentam altos valores de dipolaridade e basicidade, mas apresenta pouca acidez ( $\alpha = 0$ ). Sendo fortes receptores de prótons, estes solventes extraem preferencialmente compostos que são fortes doadores, tais como ácidos carboxílicos, álcoois, fenóis, etc.

As frações dos extratos 10 (dc-ac), 11 (et-ae-dc), 13 (et-dc-ac) e 14 (ae-dc-ac) foram obtidas de misturas binárias e ternárias que apresentam altos valores de dipolaridade e valores de acidez e basicidade relativamente próximos ( $\pi^* > \beta = \alpha$ ), portanto estes solventes extraem preferencialmente compostos capazes de realizar interação dipolo. Entretanto, estes solventes podem extrair, em menor quantidade, compostos com caráter ácido e/ou básico.

As frações dos extratos 5 (et-ae) e 7 (et-ac) apresentam valores de dipolaridade e basicidade próximos e valores de acidez baixos ( $\pi^* = \beta > \alpha$ ), isto faz com que estes solventes extraiam preferencialmente compostos de caráter ácido e capazes de interação dipolo.

As frações dos extratos 1 (et) e Aq (água) foram obtidas de solventes capazes de apresentar os três parâmetros. O etanol apresenta valores de acidez e basicidade próximos e de dipolaridade menor ( $\beta = \alpha > \pi^*$ ). A água, por ser um forte doador de prótons, apresenta um caráter mais ácido e extrai preferencialmente compostos de caráter básico como ésteres, cetonas e aminas.

O gráfico dos loadings dos fatores 3 e 4 está apresentado na Figura 35. Este gráfico mostra quais os números de onda que explicam a distinção entre os seis grupos formados na Figura 34.



**Figura 35** – Gráfico dos loadings dos fatores 3 e 4 para as 16 amostras da fração polar.

A região em torno  $3378\text{ cm}^{-1}$  é característica de vibrações de deformação axial de O-H ( $\nu$  O-H) de álcoois e fenóis ( $3650\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ ), com contribuições de absorções provenientes de vibrações de deformação axial de N-H de amins ( $3500\text{-}3310\text{ cm}^{-1}$ ) ou de amidas ( $3500\text{-}3060\text{ cm}^{-1}$ ). Os picos nas regiões de  $2954$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  são provenientes das deformações axiais simétricas e assimétricas de C-H de alcanos ( $3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ ) ou de aldeídos ( $2830\text{-}2695\text{ cm}^{-1}$ ).

A banda de absorção na região entre  $1760$  e  $1720\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído a vibrações de deformação axial da ligação de C=O de ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados ( $1730\text{-}1715\text{ cm}^{-1}$ ) ou indicar a presença de  $\gamma$ -lactonas ( $1795\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ ),  $\delta$ -lactonas ( $1760\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ),  $\gamma$ -lactamas ( $1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) e  $\beta$ -lactamas ( $1760$  e  $1730\text{ cm}^{-1}$ ). Aldeídos alifáticos ( $1720\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ ) e cetonas alifáticas ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ) também podem apresentar vibrações  $\nu$  C=O nesta região.

A banda observada em  $1630\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibrações de deformação angular da ligação de  $\text{NH}_2$  ou de NH de amidas primárias e secundárias ( $1650\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$ ), de  $\gamma$ -lactamas ( $1630\text{ cm}^{-1}$ ) ou de amins ( $1650\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ ). Pode indicar também vibrações de deformação axial de C=C do anel de hidrocarbonetos aromáticos ( $1600\text{-}1585\text{ cm}^{-1}$ ) ou de alquenos lineares não conjugados ( $1667\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ ).

A banda na região de  $1300\text{ cm}^{-1}$  pode ser proveniente de vibrações de deformação axial de C-O de ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados ( $1300\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$ ) ou de lactonas ( $1250\text{-}1111\text{ cm}^{-1}$ ). Pode indicar também vibrações de deformação axial de C-N de aminas aromáticas ( $1342\text{-}1266\text{ cm}^{-1}$ ). A banda de absorção na região entre  $1250\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibrações de deformação axial  $\nu$  C-O de álcoois e fenóis ( $1260\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ), de ésteres de álcoois primários ou secundários ( $1164\text{-}1031\text{ cm}^{-1}$ ) ou de lactonas ( $1250\text{-}1111\text{ cm}^{-1}$ ). Pode ser atribuído também a vibrações de deformação axial da ligação C-N de aminas alifáticas ( $1250\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ ) e a vibrações de deformação angular da ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos ( $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ).

As bandas na região entre  $1000$  e  $500\text{ cm}^{-1}$  podem ser proveniente de vibrações de deformação angular fora do plano da ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos ( $1000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ) ou de alquenos ( $1000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ). Podem indicar também vibrações de deformação angular simétrica fora do plano das ligações N-H de aminas ( $909\text{-}667\text{ cm}^{-1}$ ), amidas ( $800\text{-}667\text{ cm}^{-1}$ ) e lactamas ( $800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4.4.2.3 Fração neutra

A Figura 36 mostra o espectro obtido da fração neutra de cada extrato.

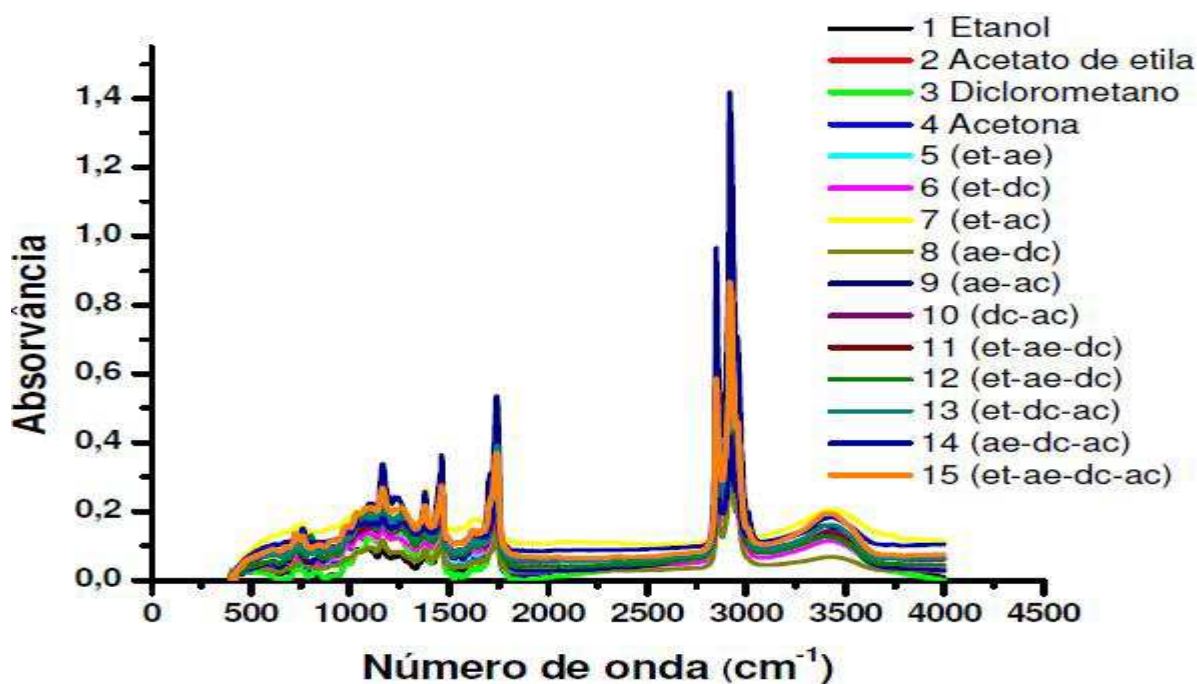
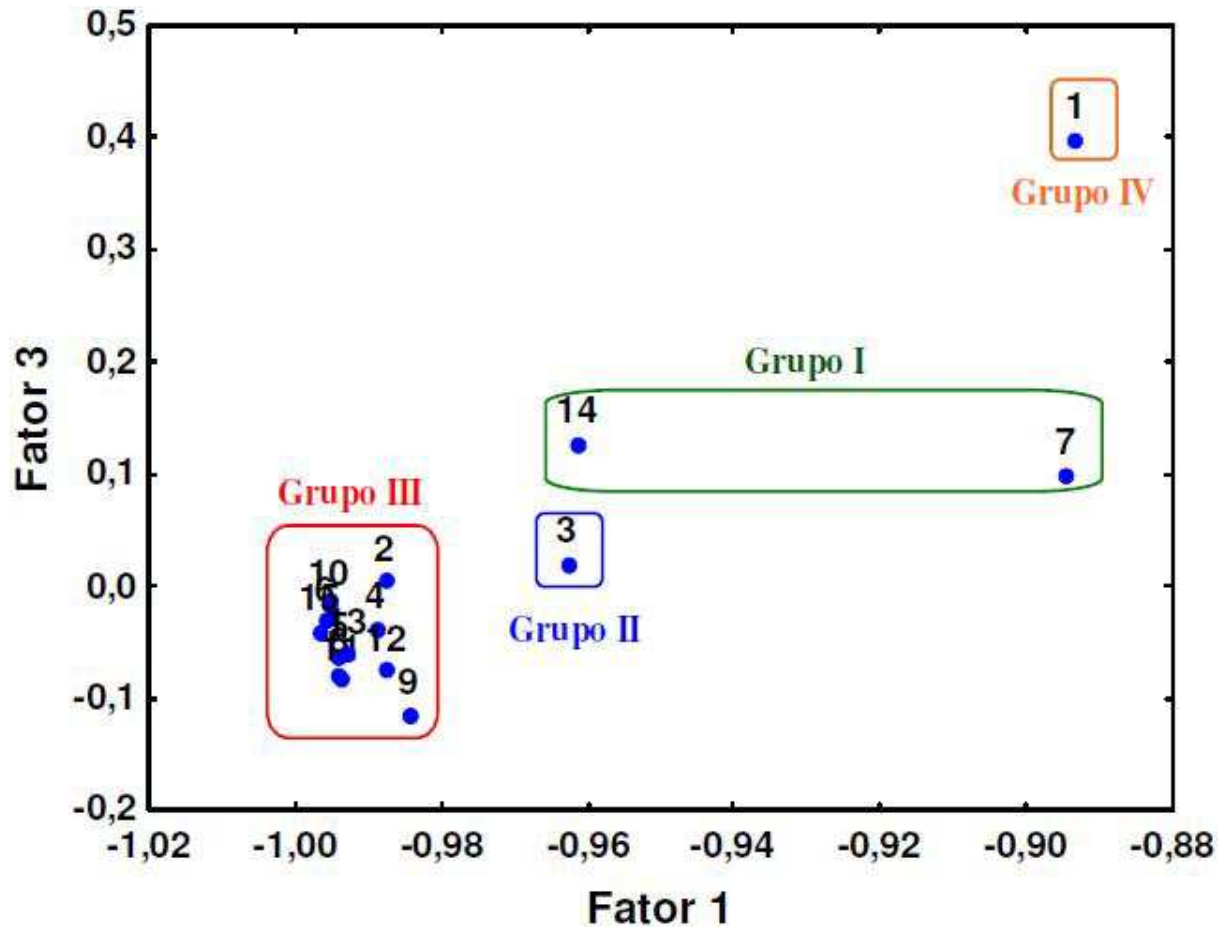


Figura 36 – Espectros no infravermelho da fração neutra de cada extrato obtido das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

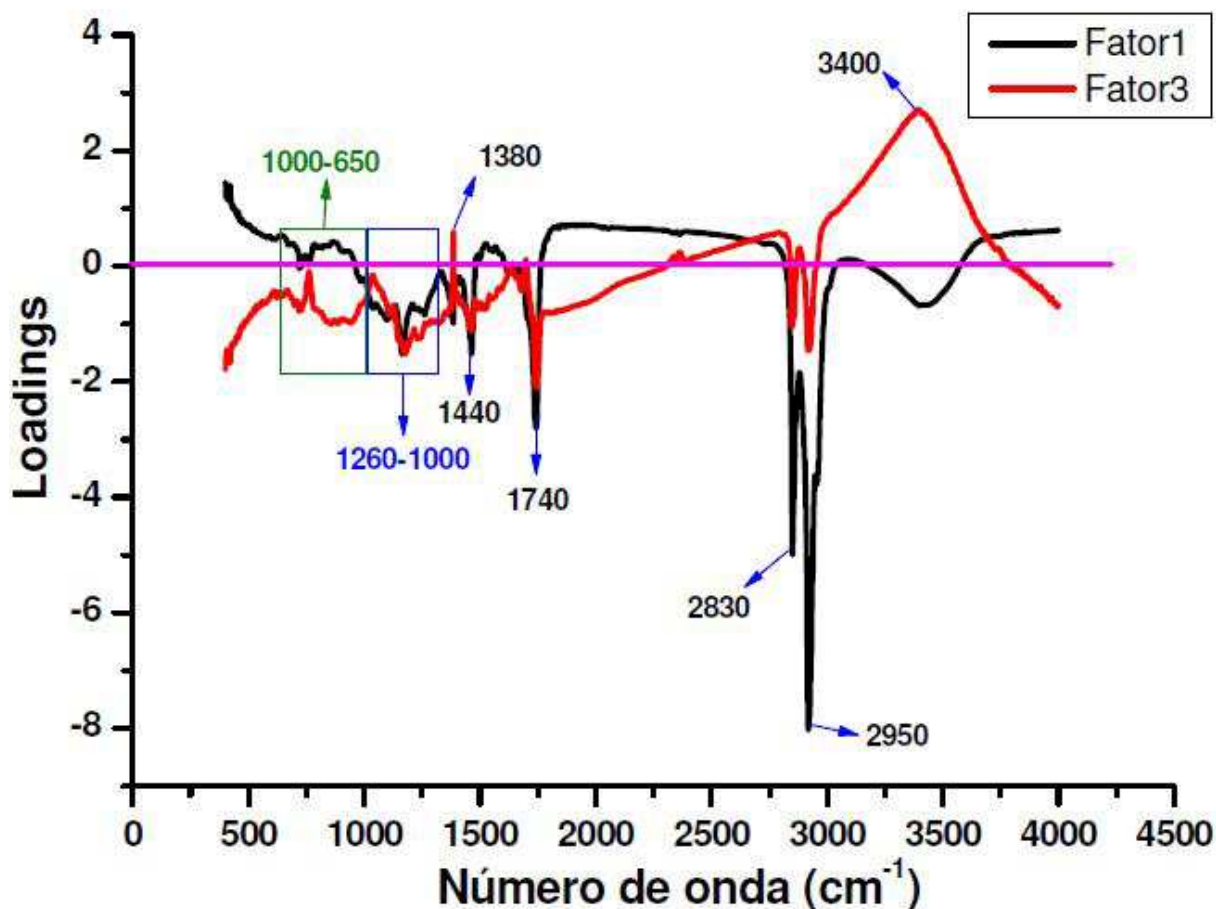
Os dados dos espectros obtidos na região de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  foram colocados numa matriz 15 x 3736 variáveis. Estes dados foram sujeitos a análise de componentes principais.

Três componentes (fatores) permitem explicar 98% da variância dos dados. O gráfico dos escores dos fatores 1 e 3 é mostrado na Figura 37.



**Figura 37** – Gráfico dos escores dos fatores 1 e 3 dos dados espectrais obtidos das 15 amostras da fração neutra.

O gráfico dos loadings dos fatores 1 e 3 está apresentado na Figura 38. Este gráfico mostra quais os números de onda que explicam a distinção entre os quatro grupos formados na Figura 37.



**Figura 38** – Gráfico dos loadings dos fatores 1 e 3 para as 15 amostras da fração neutra.

A região em torno  $3400\text{ cm}^{-1}$  é característica de vibrações de deformação axial de O-H ( $\nu$  O-H) de álcoois e fenóis ( $3650\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ ), com contribuições de absorções provenientes de vibrações de deformação axial de N-H de aminas ( $3500\text{-}3310\text{ cm}^{-1}$ ) ou de amidas ( $3500\text{-}3060\text{ cm}^{-1}$ ). A intensa banda de absorção na região entre  $3000$  e  $2800\text{ cm}^{-1}$  são provenientes das deformações axiais simétricas e assimétricas de C-H de alcanos ( $3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ ) ou de aldeídos ( $2830\text{-}2695\text{ cm}^{-1}$ ).

A banda de absorção na região entre  $1700$  e  $1750\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibrações de deformação axial da ligação de C=O de ésteres alifáticos ( $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$ ), ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados ( $1730\text{-}1715\text{ cm}^{-1}$ ), aldeídos alifáticos ( $1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ) e cetonas alifáticas ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ).

A banda de absorção na região de  $1460\text{-}1420\text{ cm}^{-1}$  pode ser proveniente de vibrações de deformação angulares simétricas e assimétricas da ligação de C-H de alcanos, como  $\delta_s\text{ CH}_2$  que ocorre próximo de  $1465\text{ cm}^{-1}$  ou  $\delta_{as}\text{ CH}_3$  que ocorre próxima de  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Pode ser atribuída também a vibrações de deformação axial de C=C do anel de

hidrocarbonetos aromáticos que ocorre entre 1500 e 1400  $\text{cm}^{-1}$ . A região em torno de 1380  $\text{cm}^{-1}$  pode ser associada a uma banda de deformação angular no plano de O-H de álcoois e fenóis que ocorre geralmente entre 1420 e 1330  $\text{cm}^{-1}$ .

As bandas de absorção na região entre 1300 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a vibrações de deformação axial da ligação C-O de ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados que ocorrem entre 1300 e 1160  $\text{cm}^{-1}$  e vibrações de deformação axial da ligação C-N de aminas aromáticas que ocorrem entre 1342 e 1260  $\text{cm}^{-1}$ , podem ser associadas também a vibrações de deformação axial da ligação C-O de ésteres de álcoois primários (1164-1031  $\text{cm}^{-1}$ ) e secundários (1100  $\text{cm}^{-1}$ ).

Em regiões de baixa frequência de absorção (1000-650  $\text{cm}^{-1}$ ) existem muitas possibilidades, por exemplo, vibrações de deformação angular da ligação C-H fora do plano de hidrocarbonetos aromáticos (900-675  $\text{cm}^{-1}$ ) e de alquenos (1000-650  $\text{cm}^{-1}$ ) ou vibrações de deformação axial de N-O de nitritos (850-750  $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **4.5 TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS: SPOT - TEST**

Para a identificação dos metabólitos secundários, alguns testes foram realizados com o material vegetal (folhas secas) e outros com os extratos obtidos de acordo com o planejamento experimental da Figura 8.

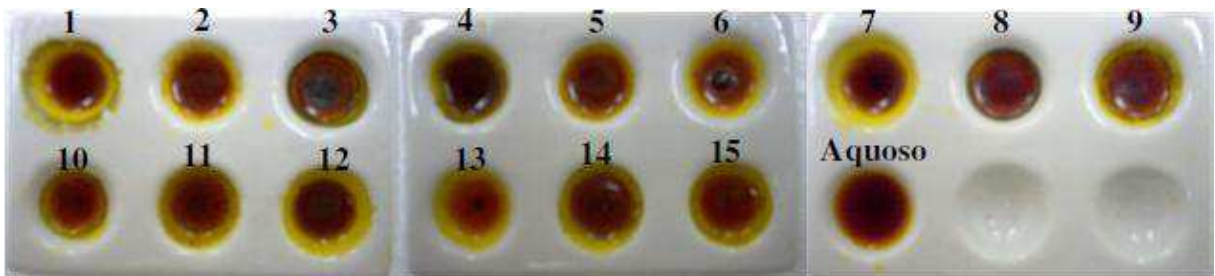
A Figura 39 mostra os resultados dos testes para alcalóides dos 15 extratos obtidos de acordo com o planejamento experimental e do extrato aquoso. O resultado mostra a formação do precipitado alaranjado, confirmando a presença de alcalóides. Pela inspeção visual observou-se que a maior quantidade de alcalóides foram obtidas nos extratos 1, 2, 3, 4, 7, 12 e aquoso. Os precipitados escuros comprovam a presença de taninos. Os extratos 3, 4, 6, 7 e 12 apresentaram maior quantidade de taninos.

A Figura 40 mostra os resultados dos testes específicos para compostos fenólicos nos 15 extratos obtidos de acordo com o planejamento experimental da Figura 8 e do extrato aquoso. O surgimento de coloração verde confirma a presença de compostos fenólicos nos extratos. Visualmente observa-se que os extratos 4, 5, 7, 12, 13, 15 e aquoso apresentaram coloração verde mais forte, portanto pode-se afirmar que estes extratos possuem maior quantidade de compostos fenólicos.

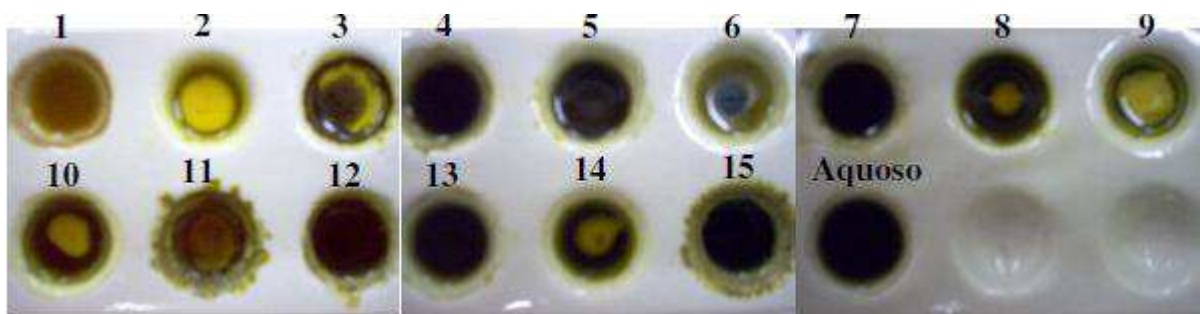
O teste para saponinas foi realizado com as folhas de *Vernonia condensata* secas e moídas. Neste teste a presença de saponinas é caracterizada pela formação de espuma persistente. A Figura 41 mostra o resultado do teste. A marca vermelha no tubo mostra a altura da espuma.

A Figura 42 mostra o resultado do teste específico para flavonóides, realizado com o material vegetal seco. O aparecimento de coloração rósea confirmou a presença de flavonóides nas folhas da planta.

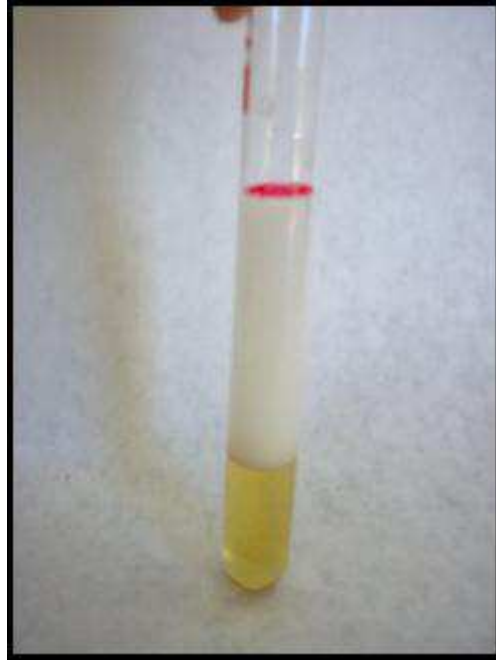
A Figura 43 mostra resultado do teste específico para taninos, realizado com o material vegetal seco. A coloração verde confirma a presença de taninos condensados ou catéquicos.



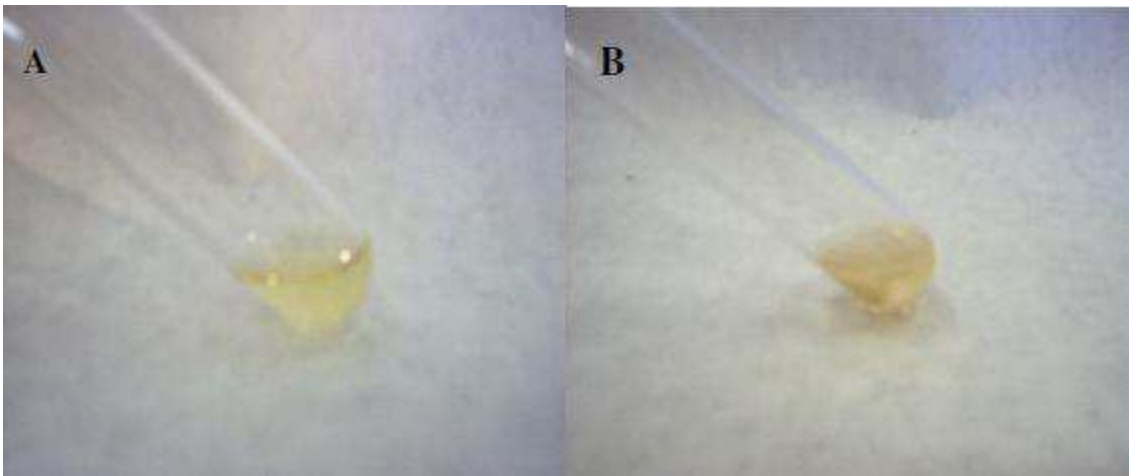
**Figura 39** – Spot-test para identificação de alcalóides nos extratos da planta utilizando o reagente de Dragendorff.



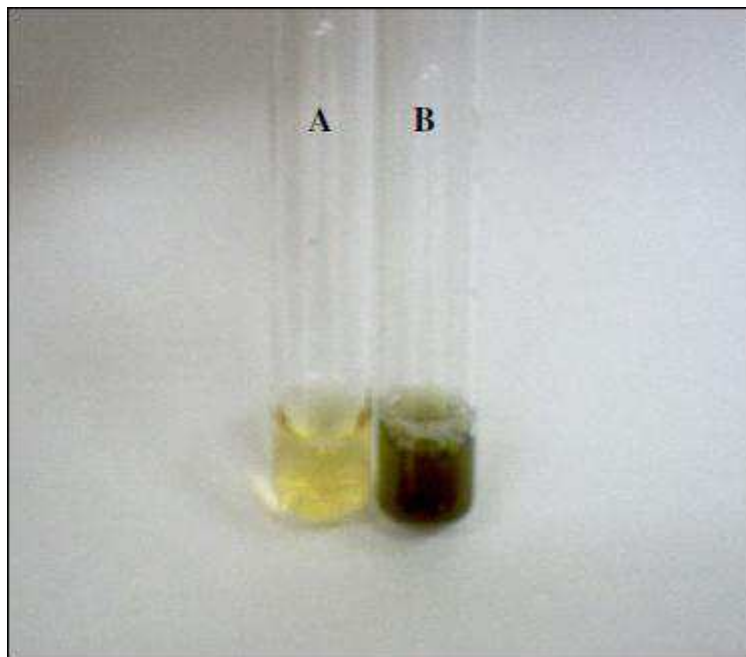
**Figura 40** – Teste para identificação de compostos fenólicos.



**Figura 41** – Teste para identificação de saponinas.



**Figura 42** – Teste para identificação de flavonóides. O tubo A contém o material vegetal seco em etanol 70% e no tubo B contém o material vegetal seco em etanol 70%, raspas de magnésio e ácido clorídrico concentrado.



**Figura 43** – Teste para identificação de taninos. No tubo A contém o material vegetal seco puro e no tubo B contém o material vegetal seco com  $\text{FeCl}_3$  1% em metanol.

#### **4.6 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% ( $\text{DL}_{50}$ )**

Na primeira etapa da avaliação, cada extrato foi administrado na dose de 2000 mg/kg e, após os 14 dias de observação, os extratos que causaram a morte de dois ou três animais, tiveram a dose reduzida para 300 mg/kg.

Para os extratos que apresentaram uma ou nenhuma morte, a dose de 2000 mg/kg foi repetida. Na segunda etapa da avaliação, após os 14 dias de observação, os extratos nos quais a dose de 2000 mg/kg foi repetida e que causaram uma ou nenhuma morte, o teste foi encerrado e a  $\text{DL}_{50}$  foi estimada.

Para os extratos no qual a dose de 2000 mg/kg foi repetida e causou a morte de dois ou três animais, reduziu-se a dose para 300 mg/kg (extratos 5 e 15). Para os extratos que tiveram a dose reduzida para 300 mg/kg e que causaram uma ou nenhuma morte, a dose de 300 mg/kg foi repetida, menos para o extrato 14, que causou a morte de 2 animais e teve a dose reduzida para 50 mg/kg.

Na terceira etapa não foram constatadas mortes e sinais de intoxicação. As doses foram repetidas na quarta etapa e também não foram constatadas mortes. A  $\text{DL}_{50}$  foi

determinada para todos os extratos, seguindo o diagrama mostrado na Figura 11. Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos para cada extrato é apresentado na Tabela 3.

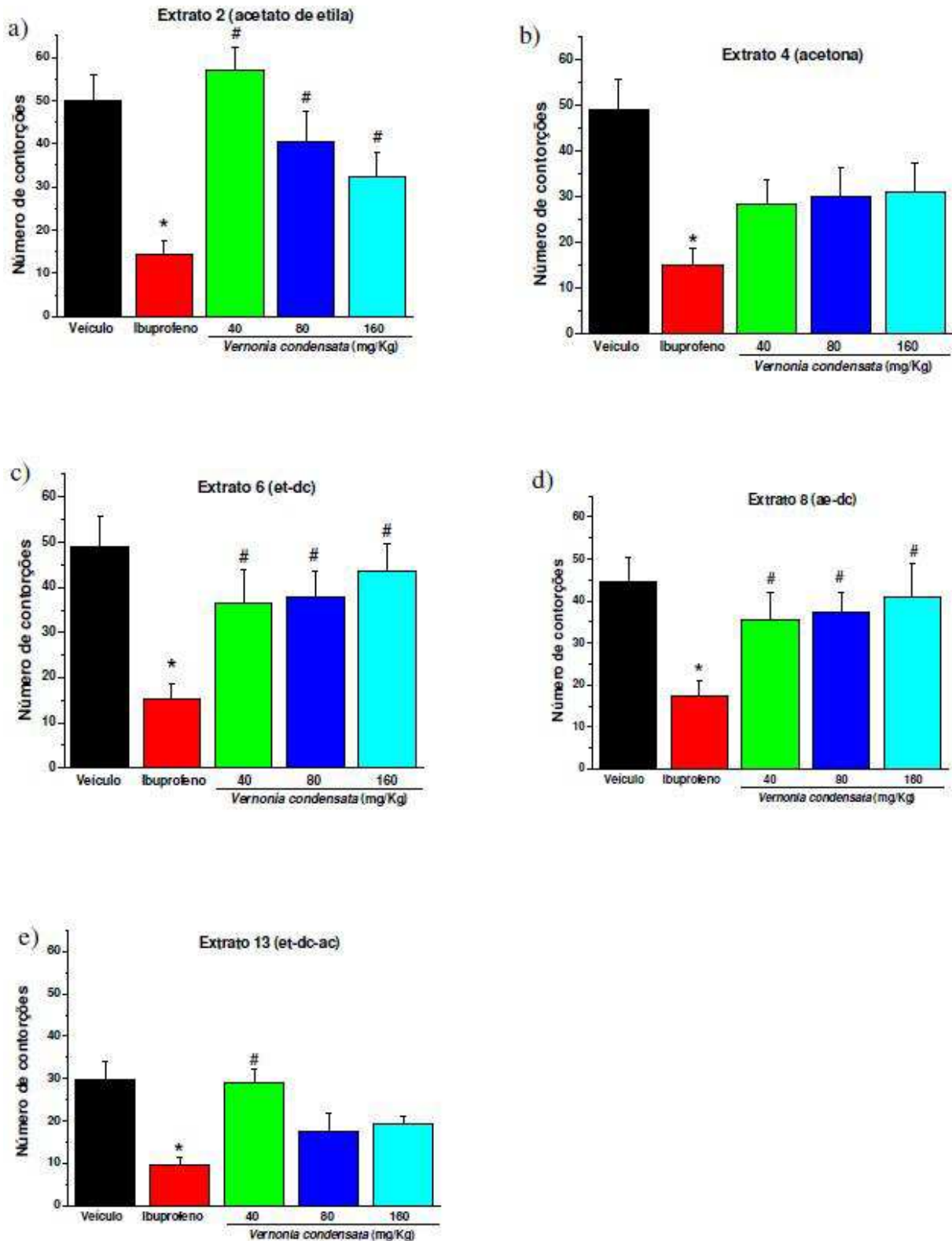
**Tabela 3** – Valores de DL<sub>50</sub> para todos os extratos

DL <sub>50</sub>	> 2000 mg/kg	1000 mg/kg	500 mg/kg	300 mg/kg
Extratos	1 (etanol)	2 (acetato de etila)	3 (diclorometano)	14 (ae-dc-ac)
	6 (et-dc)	4 (acetona)	5 (et-ae)	
	7 (et-ac)	11 (et-ae-dc)	8 (ae-dc)	
	12 (et-ae-ac)	15 (et-ae-dc-ac)	9 (ae-ac)	
	13 (et-dc-ac)		10 (dc-ac)	
	Aquoso			

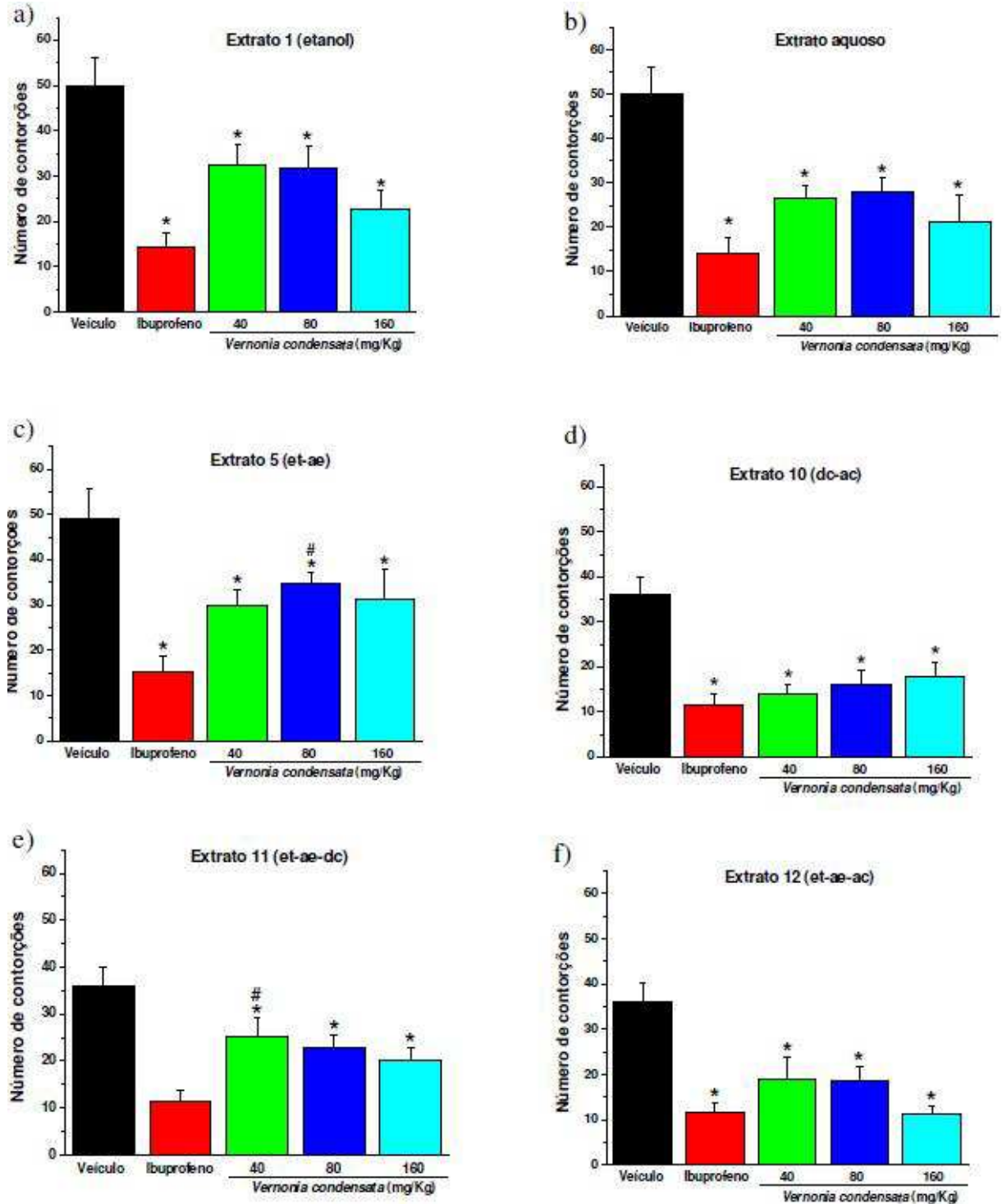
#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

A Figura 44 mostra os resultados obtidos para os extratos que não foram eficazes na redução das contorções abdominais. A Figura 45 mostra os resultados obtidos para os extratos que foram eficazes em reduzir as contorções abdominais em todas as doses utilizadas. A Figura 46 mostra os resultados para os demais extratos, no qual somente uma ou duas doses foram eficazes em diminuir de modo significativo as contorções abdominais quando comparados com os respectivos grupos controles.

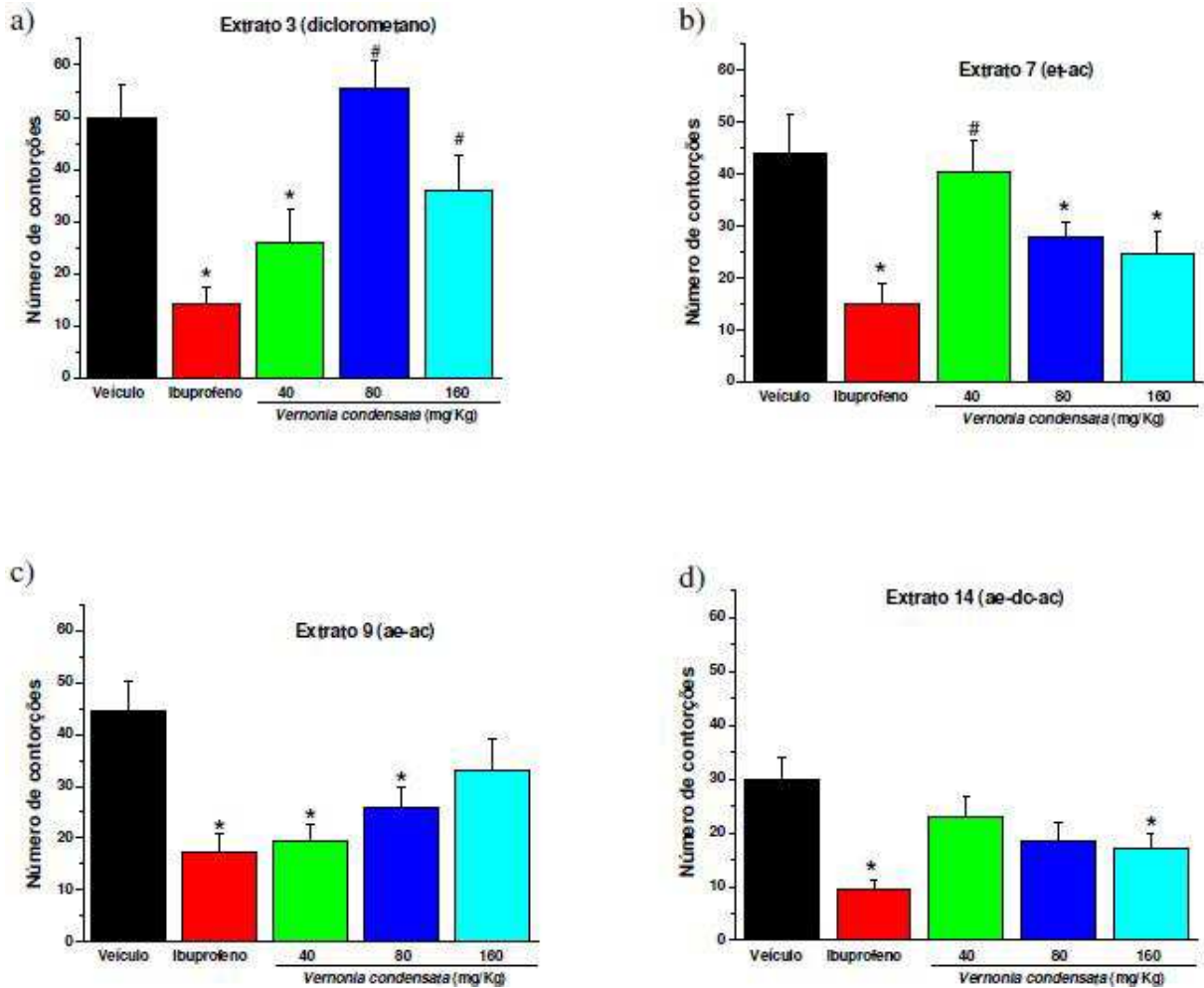
ANOVA complementada com o teste de Student-Newman-Keuls mostrou que o pré-tratamento com todas as doses dos extratos aquoso, 1 (etanol), 5 (et-ae), 10 (dc-ac), 11 (et-ae-dc) e 12 (et-ae-ac) foram eficazes em diminuir o número de contorções abdominais em camundongos em comparação com os respectivos grupos controles tratados previamente com a solução veículo. As doses de 80 e 160 mg/kg do extrato 7 (et-ac), 40 e 80 mg/kg do extrato 9 (ae-dc), 40 mg/kg do extrato 3 e 160 mg/kg do extrato 14 (ae-dc-ac) também foram eficazes em diminuir o número de contorções abdominais nos camundongos em comparação com os respectivos grupos controles tratados previamente com a solução veículo. As doses de 80 mg/kg do extrato 5 (et-ae) e 40 mg/kg do extrato 11 (et-ae-dc) foram menos eficazes em comparação com o controle positivo tratado previamente com o analgésico ibuprofeno na dose de 200 mg/kg.



**Figura 44** – Avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos (a) 2 (acetato de etila), (b) 4 (acetona), (c) 6 (et-dc), (d) 8 (ae-dc) e (e) 13 (et-dc-ac), sobre as contrações abdominais induzidas por ácido acético. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle tratado com solução veículo. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle positivo tratado com o analgésico ibuprofeno (ANOVA complementada com Student-Newman-Keuls).



**Figura 45** – Avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos (a) 1 (etanol), (b) aquoso, (c) 5 (et-ae), (d) 10 (dc-ac), (e) 11 (et-ae-dc) e (f) 12 (et-dc-ac) sobre as contrações abdominais induzidos por ácido acético. \*p < 0,05 em relação ao grupo controle tratado com solução veículo. # p < 0,05 em relação ao grupo controle positivo tratado com o analgésico ibuprofeno (ANOVA complementada com Student-Newman-Keuls).



**Figura 46** – Avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos (a) 3 (diclorometano), (b) 7 (et-ac), (c) 9 (ae-ac) e (d) 14 (ae-dc-ac), sobre as contorções abdominais induzidos por ácido acético. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle tratado com solução veículo. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle positivo tratado com o analgésico ibuprofeno. (ANOVA complementada com Student-Newman-Keuls).

Com base nos dados obtidos na avaliação da atividade antinociceptiva, calculou-se a porcentagem de inibição nociceptiva para todos os extratos e seus respectivos controles. Cada dose do extrato ou do controle ibuprofeno foi comparada com o respectivo controle veículo e a partir desta comparação, calculou-se a porcentagem de inibição nociceptiva.

Para avaliar o efeito dos solventes na atividade antinociceptiva, foram testados diferentes modelos de misturas com quatro componentes. Estes modelos permitem explorar os efeitos dos solventes e estimar a melhor mistura no qual será obtido o extrato que trará uma melhor resposta antinociceptiva. Quanto maior a porcentagem de inibição das

contorções abdominais, melhor a atividade antinociceptiva do extrato. A Tabela 4 apresenta a porcentagem de inibição obtida para cada extrato na sua respectiva dose.

Ajustando os dados aos modelos linear e quadrático, todos apresentaram falta de ajuste, sendo assim o modelo cúbico especial foi ajustado aos dados obtidos para todos os extratos na dose de 40 mg/kg, e a equação para este modelo é dada por:

$$\hat{y} = + \mathbf{35,30} \mathbf{et} + 13,85 \mathbf{ae} + \mathbf{48,16} \mathbf{dc} + \mathbf{41,74} \mathbf{ac} + \mathbf{109,82} \mathbf{etae} - 70,54 \mathbf{etdc} - \mathbf{120,41} \mathbf{etac} \\ + 7,48 \mathbf{aedc} + \mathbf{166,06} \mathbf{aeac} + 64,06 \mathbf{dcac} + \mathbf{141,54} \mathbf{etaedc} + \mathbf{356,87} \mathbf{etaeac} - 566,08 \mathbf{etdcac} \\ - \mathbf{675,29} \mathbf{aedcac} \quad (21)$$

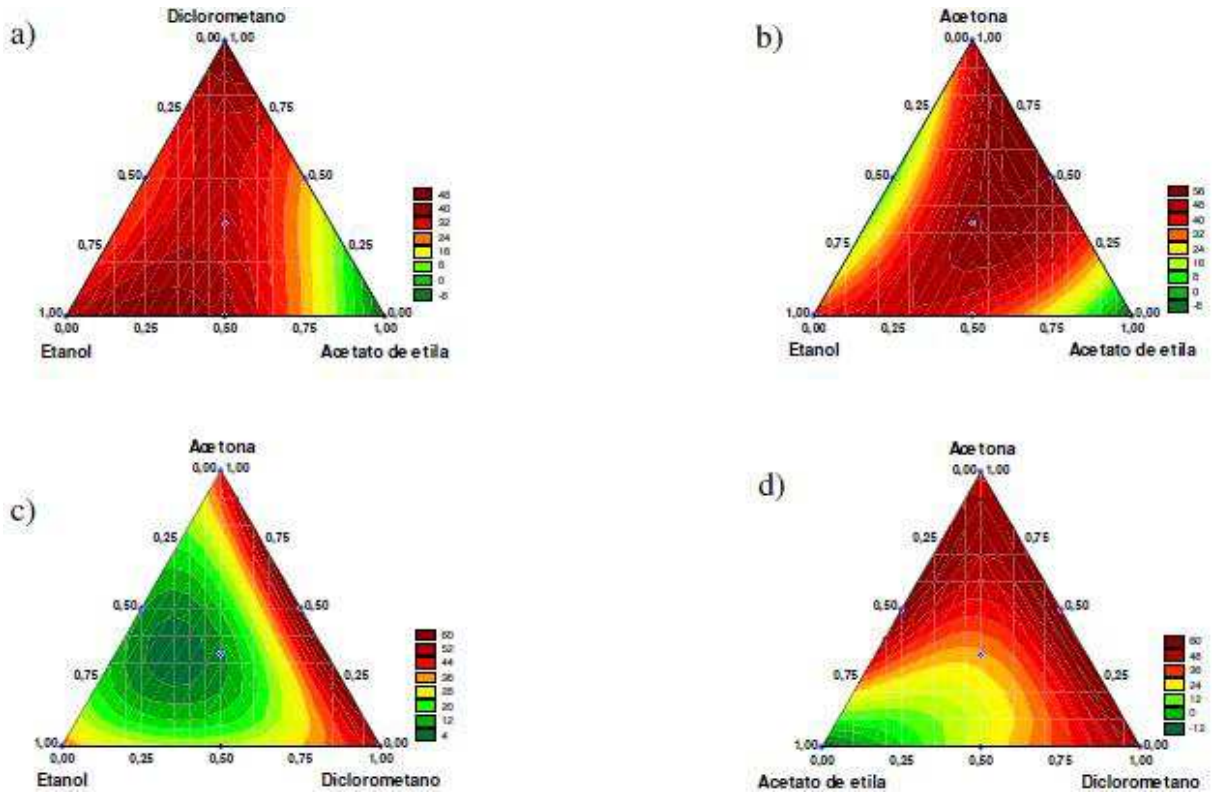
(±11,72)      (±10,96)      (±11,72)      (±10,96)      (±54,15)      (±57,18)      (±54,15)  
(±56,58)      (±53,52)      (±56,52)      (±361,07)      (±367,55)      (±360,99)  
(±360,8)

$y$  é a resposta prevista pelo modelo,  $et$  = etanol,  $ae$  = acetato de etila,  $dc$  = diclorometano e  $ac$  = acetona. Os valores entre parênteses são os erros padrão dos parâmetros. A equação apresenta 14 termos dos quais 6 são significativos (termos em negrito), ou seja, possuem coeficientes com valores mais altos em relação ao erro padrão, são eles o etanol puro, diclorometano puro, acetona pura e as misturas binárias de etanol-acetato de etila, etanol-acetona, acetato de etila-acetona.

**Tabela 4** – Porcentagem de inibição nociceptiva obtida para cada extrato

Extrato	Dose (mg/Kg)	% de inibição
Aquoso	40	47,00
	80	43,71
	160	57,25
1 (etanol)	40	35,14
	80	36,5
	160	54,57
2 (acetato de etila)	40	-14,00
	80	19,00
	160	35,00
3 (diclorometano)	40	48,00
	80	-10,75
	160	28,28
4 (acetona)	40	41,60
	80	38,54
	160	36,46
5 (et-ae)	40	39,31
	80	29,11
	160	36,25
6 (et-dc)	40	25,39
	80	22,99
	160	11,00
7 (et-ac)	40	9,56
	80	37,84
	160	44,96
8 (ae-dc)	40	20,32
	80	16,16
	160	8,16
9 (ae-ac)	40	56,6
	80	41,76
	160	26,08
10 (dc-ac)	40	62,27
	80	54,82
	160	50,30
11 (et-ae-ac)	40	29,80
	80	36,75
	160	44,05
12 (et-ae-ac)	40	47,18
	80	47,87
	160	68,37
13 (et-dc-ac)	40	2,85
	80	41,61
	160	34,67
14 (ae-dc-ac)	40	22,95
	80	38,02
	160	43,05
15 (et-ae-dc-ac)	40	35,09
	80	38,86
	160	-0,97

O modelo também indica uma interação entre o diclorometano e a acetona e um efeito antagônico entre o etanol e a acetona. As curvas de nível para este modelo podem ser vistas na Figura 47.



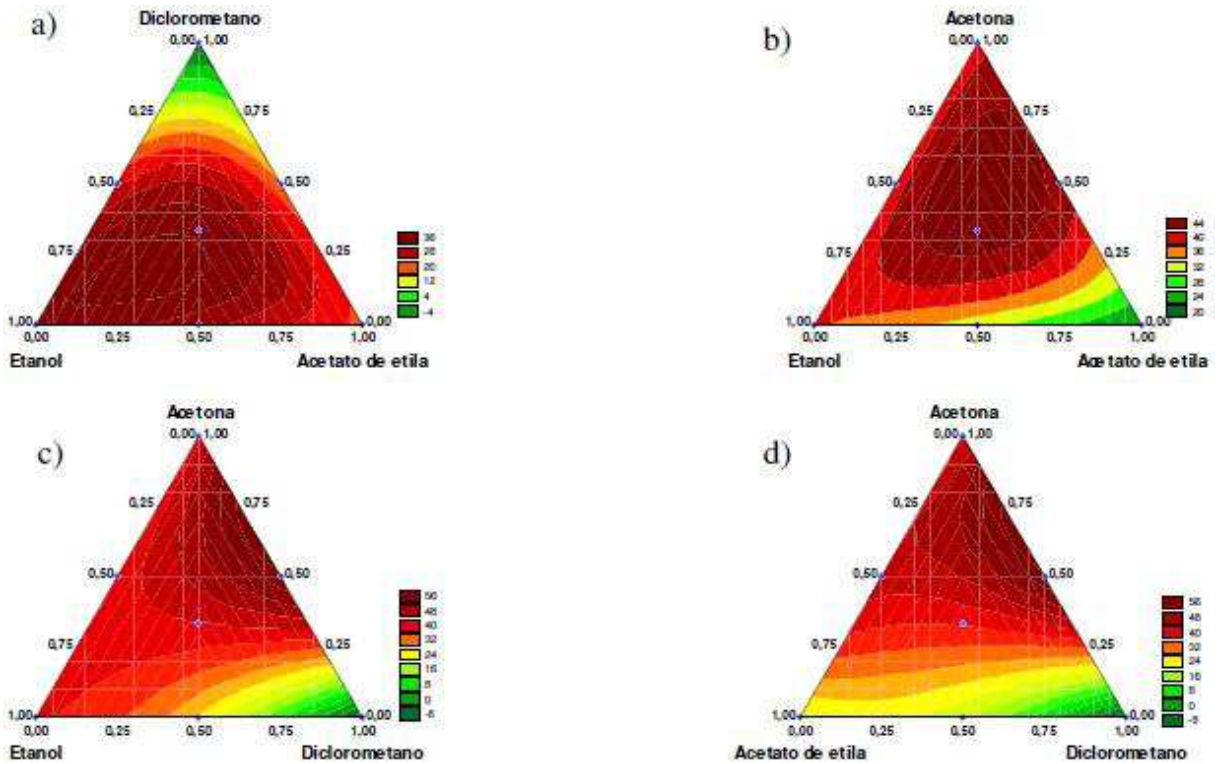
**Figura 47** – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e da porcentagem de inibição nociceptiva pelos extratos na dose de 40 mg/kg.

Estes contornos mostram que a maior porcentagem de inibição nociceptiva, em torno de 60%, pode ser alcançada quando o extrato for obtido em uma mistura binária de acetona-diclorometano.

Para a dose de 80 mg/kg, os dados obtidos para todos os extratos foram ajustados para o modelo linear e quadrático que apresentaram falta de ajuste, sendo assim o modelo cúbico especial foi ajustado aos dados e a equação para este modelo é dada por:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & +36,44et + 18,92ae - 10,80dc + 38,49ac + 7,42etae + 42,4letdc + 3,23etac + 50,37aedc \\ & \pm 10,25 \quad \pm 11,84 \quad \pm 10,25 \quad \pm 10,25 \quad \pm 51,44 \quad \pm 50,06 \quad \pm 50,06 \quad \pm 53,68 \\ & + 53,94aeac + 165,66dcac + 251,46etaedc + 214,10etaeac - 133,54etdcac - 243,43aedcac \\ & \pm 51,44 \quad \pm 50,06 \quad \pm 335,15 \quad \pm 332,46 \quad \pm 343,57 \quad \pm 335,08 \end{aligned} \quad (22)$$

A equação apresenta 14 termos dos quais três são significativos, são eles o etanol puro, acetona pura e a mistura binária diclorometano-acetona. As curvas de nível para este modelo podem ser vistas na Figura 48.



**Figura 48** – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e da porcentagem de inibição nociceptiva pelos extratos na dose de 80mg/kg.

Estes contornos mostram que a maior porcentagem de inibição nociceptiva, em torno de 56%, Figuras 48c e 48d, pode ser alcançada quando o extrato é obtido em mistura binária de acetona-diclorometano, concordando com o modelo obtido para a dose de 40mg/kg.

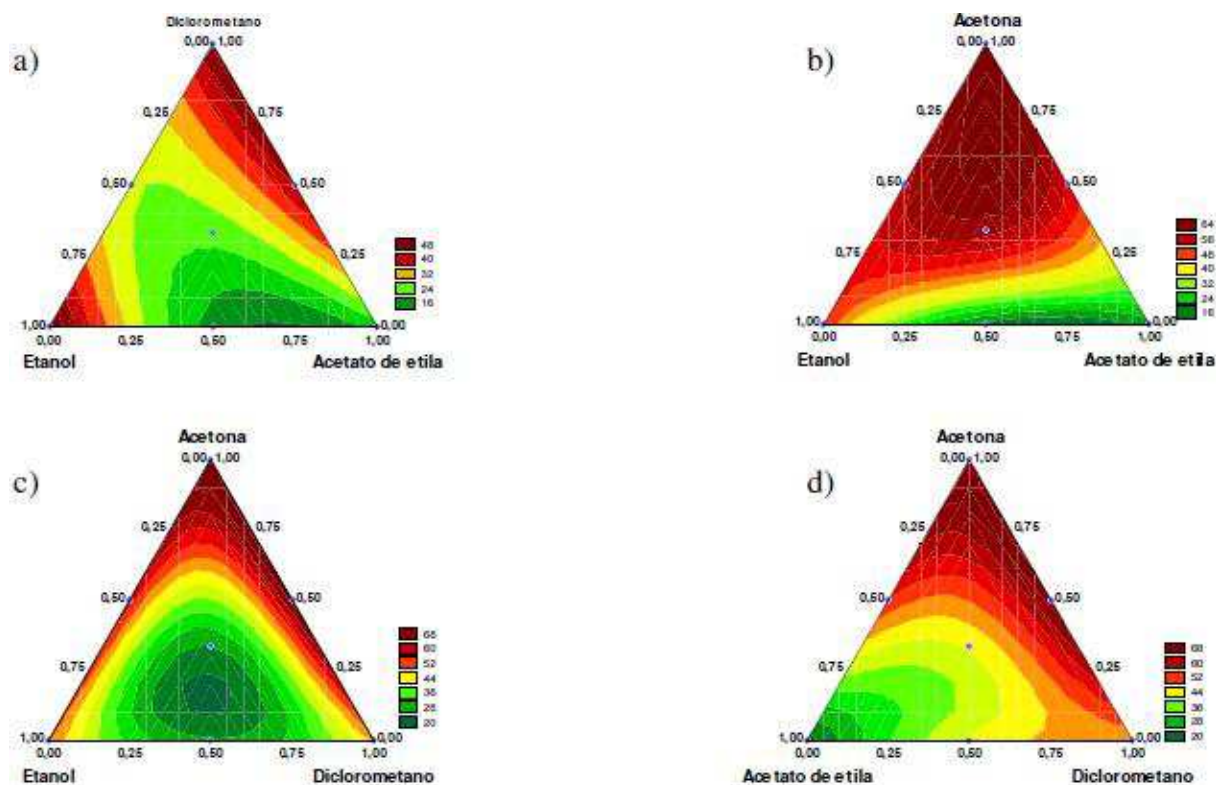
Para a dose de 160 mg/kg, os dados obtidos para todos os extratos foram ajustados para o modelo cúbico especial e a equação para este modelo é dada por:

$$\hat{y} = +48,10et + 18,10ae + 44,50dc + 67,48ac - 75,56etae - 87,53etdc - 12,73etac + 36,27aedc + 35,07aeac + 40,91dcac - 37,43etaedc + 510,16etaeac - 623,37etdcac - 415,63aedcac \quad (23)$$

$(\pm 10,48)$     $(\pm 10,48)$     $(\pm 10,48)$     $(\pm 10,48)$     $(\pm 10,48)$     $(\pm 51,19)$     $(\pm 51,19)$     $(\pm 51,19)$     $(\pm 51,19)$     $(\pm 51,19)$     $(\pm 51,19)$     $(\pm 339,20)$     $(\pm 339,16)$     $(\pm 339,14)$     $(\pm 339,14)$

A equação apresenta 14 termos dos quais três são significativos, são eles o etanol puro, diclorometano puro e acetona pura. As curvas de nível para este modelo podem

ser vistas na Figura 49. A maior porcentagem de inibição nociceptiva de acordo com o modelo foi de 68%, Figuras 49c e 49d, que pode ser alcançada quando o extrato for obtido em mistura binária de acetona-diclorometano, concordando novamente com os modelos obtidos para as doses de 40 e 80 mg/kg.



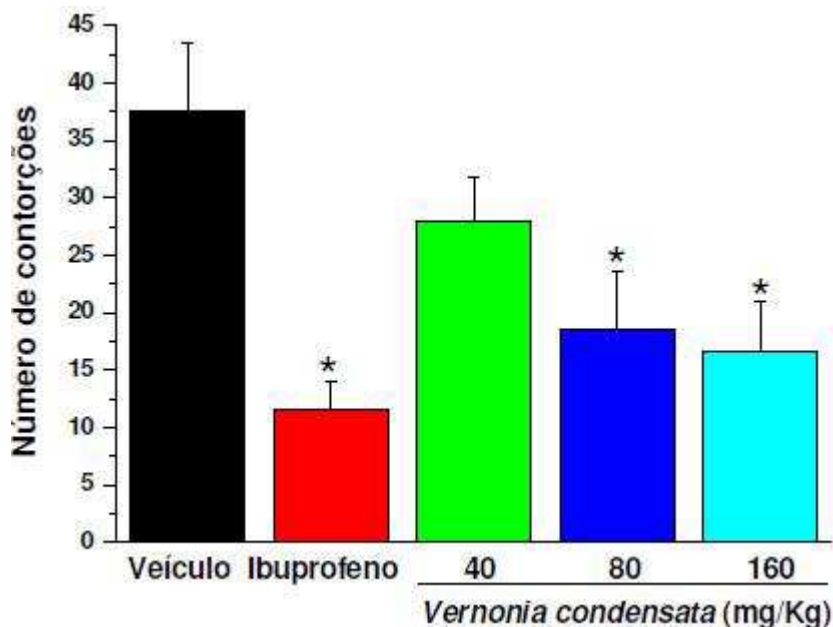
**Figura 49** – Curvas de nível do modelo cúbico especial em função do planejamento de misturas de solventes e da porcentagem de inibição nociceptiva pelos extratos na dose de 160mg/kg

Os modelos apresentados nos dizem que a presença simultânea da acetona e do diclorometano na mistura produzirá um extrato que trará uma maior porcentagem de inibição nociceptiva, ou seja, para obtermos extratos com maior atividade antinociceptiva, devemos usar misturas de solventes extratores contendo acetona e diclorometano.

Para confirmar a validade dos modelos, foi preparada uma mistura binária de acetona e diclorometano na proporção 3:2 (v/v) e realizou-se o processo de extração conforme descrito no esquema da Figura 9. Após a obtenção do extrato, que foi denominado como extrato otimizado, realizou-se a avaliação da  $DL_{50}$ , conforme procedimento descrito no item 3.15 sendo o valor estimado de 300 mg/kg.

A avaliação da atividade antinociceptiva do extrato otimizado foi feita conforme os procedimentos descritos no item 3.16. A Figura 50 apresenta os resultados

obtidos para a avaliação da atividade antinociceptiva do extrato otimizado e seus respectivos controles veículo e ibuprofeno.



**Figura 50** – Avaliação da atividade do extrato otimizado sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle tratado com solução veículo. (ANOVA complementada com Student-Newman-Keuls).

Utilizando as Equações 21, 22 e 23, excluindo os termos não significativos e os que não contém os coeficientes **ac** e **dc**, calculou-se a porcentagem de inibição nociceptiva para cada dose, considerando as proporções de 60% de acetona e 40% de diclorometano. A tabela 5 apresenta a porcentagem de inibição obtida para o extrato otimizado e os resultados previstos pelas equações dos modelos.

**Tabela 5** – Porcentagem de inibição nociceptiva obtida para o extrato otimizado e resultados previstos pelas equações dos modelos.

Extrato	Dose (mg/kg)	% de inibição	Resultado previsto (%)
Otimizado	40	25,43	44,3
	80	50,73	58,52
	160	55,8	58,28

Estes resultados mostram que a porcentagem de inibição ficou um pouco abaixo do previsto pelos modelos para as doses de 80 mg/kg (58,52%) e 160 mg/kg (58,28%) e muito abaixo para a dose de 40 mg/kg (44,3%). Entretanto, o resultado obtido para o extrato otimizado ficou muito próximo do atingido pelo extrato 10, que compreende da mistura binária de diclorometano-acetona (Tabela 4), com exceção da dose 40 mg/kg, no qual o extrato otimizado obteve um valor bem baixo quando comparado com o extrato 10.

Uma explicação para a diferença entre os resultados previstos pelos modelos e os obtidos experimentalmente pode ser a alta variabilidade do teste aplicado. O número de contorções é sujeito a muita variação<sup>21</sup>. Fatores como estresse dos animais, condições do ambiente, tolerância do animal à dor e comportamento anormal do animal em resposta ao estímulo, podem influenciar na contagem do número de contorções e dificultar a interpretação dos dados<sup>21</sup>.

## CAPÍTULO V

### 5 CONCLUSÃO

Na avaliação dos efeitos dos solventes extratores no rendimento da extração das folhas de *Vernonia condensata* Baker, concluiu-se que:

- O maior rendimento em massa foi obtido com uma mistura ternária de etanol, diclorometano e acetona.
- O modelo cúbico especial prevê um rendimento máximo de extrato em torno de 0,55 g de extrato bruto.

A aplicação dos métodos quimiométricos associados à análise por UV-Vis foi possível:

- Determinar três regiões discriminatórias para distinguir a composição química dos diferentes extratos.
- Identificar qualitativamente sete grupos de composição química diferente.

A aplicação dos métodos quimiométricos associados à análise por infravermelho foi possível:

- Traçar o perfil dos diferentes extratos identificando qualitativamente seis grupos de composição química diferentes.
- Determinar as regiões discriminatórias de grupos funcionais para discriminar a composição química dos diferentes extratos.

A aplicação dos métodos quimiométricos associados à análise por infravermelho do fracionamento químico foi possível:

- Traçar o perfil das diferentes frações e identificar qualitativamente os grupos de composição química diferentes presentes nos extratos da planta.
- Determinar as regiões discriminatórias de grupos funcionais para discriminar a composição química das diferentes frações.

➤ A forte banda de absorção em  $1760\text{ cm}^{-1}$ , presente nos espectros da fração polar, corresponde a um estiramento da carbonila de  $\gamma$ -lactona, indicando a presença de lactonas sesquiterpênicas no extrato, que podem apresentar atividade antinociceptiva.

Na escolha do solvente extrator, de acordo com a sua seletividade, foi possível concluir que:

➤ Os solventes ou misturas que apresentam parâmetros de seletividade similares são quimicamente semelhantes, embora possam apresentar diferentes valores de polaridade.

Nos testes para identificação de metabólitos secundários (Spot-test), foi possível determinar:

➤ A presença de alcalóides, compostos fenólicos, saponinas, flavonóides e taninos nos extratos da planta.

➤ Pela inspeção visual observou-se que a maior quantidade de alcalóides foram obtidas nos extratos 1, 2, 3, 4, 7, 12 e aquoso.

➤ Pela inspeção visual observou-se que a maior quantidade de compostos fenólicos foram obtidas nos os extratos 4, 5, 7, 12, 13, 15 e aquoso.

➤ Visualmente os extratos 3, 4, 6, 7 e 12 apresentaram maior quantidade de taninos.

Na avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos, concluiu-se que:

➤ Todas as doses dos extratos 1 (etanol), aquoso, 5 (et-ae), 10 (dc-ac), 11 (et-ae-dc) e 12 (et-dc-ac) foram eficazes em diminuir o número de contorções abdominais em camundongos em comparação com os respectivos grupos controles tratados previamente com a solução veículo.

➤ As doses de 80 e 160 mg/kg do extrato 7 (et-ac), 40 e 80 mg/kg do extrato 9 (ae-dc), 40 mg/kg do extrato 3 e 160 mg/ kg do extrato 14 (ae-dc-ac) foram eficazes em diminuir o número de contorções abdominais nos camundongos em comparação com os respectivos grupos controles tratados previamente com a solução veículo.

➤ As doses de 80 mg/kg do extrato 5 (et-ae) e 40 mg/kg do extrato 11 (et-ae-dc) foram menos eficazes em comparação com o controle positivo tratado previamente com o analgésico ibuprofeno na dose de 200 mg/kg.

A aplicação dos métodos quimiométricos aos dados obtidos na avaliação da atividade antinociceptiva, concluiu-se que:

➤ O modelo cúbico especial prevê uma porcentagem de inibição nociceptiva em torno de 60% para a dose de 40 mg/kg, 56% para a dose de 80 mg/kg e 68% para a dose de 160mg/kg.

➤ A maior porcentagem de inibição nociceptiva é atingida quando o extrato utilizado for obtido em misturas binárias de acetona-diclorometano.

➤ O extrato otimizado, preparado em uma mistura binária de acetona-diclorometano na proporção 3:2 (v/v), apresentou resultado próximo do previsto pelos modelos para as doses de 80 e 160 mg/kg. A dose de 40 mg/kg apresentou um resultado abaixo do previsto.

## REFERÊNCIAS

- 1 MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- 2 SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4<sup>o</sup> ed, Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC, 1999.
- 3 BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL-FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** Itajaí: Univali, 2003.
- 4 PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F. **Plantas medicinais: cura segura?.** Química Nova, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.
- 5 YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001.
- 6 SANDES, A.R.R.S.; DI BLASI, G. **Biodiversidade e diversidade química e genética.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. Disponível em: <[www.biotecnologia.com.br/materias](http://www.biotecnologia.com.br/materias)>. Acesso em 06/08/2007 às 10h:26m.
- 7 CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. **Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade.** Química Nova, v. 21, n. 1, 99-105, 1998.
- 8 MONTEIRO, M.H.D.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSZWALB, I. CHAHOUD, I.; PAUMGARTEN, F.J.R. **Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*.** Journal of Ethnopharmacology, v.74, 149-157, 2001.
- 9 LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- 10 IGANCI, J.R.V.; BRODOWSKI, V.L.; HEIDEN, G.; STEIN, V.C.; ROCHA, B.H.G. **Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L.** Arquivos do Instituto Biológico, v.73, n.1, p. 7982, 2006.

11 FRUTUOSO, V.S.; GURJÃO M.R.R.; CORDEIRO R.S.B.; MARTINS M.A. **Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata***. *Planta Medica*, v. 60, 1994.

12 LOPES, W.A.; FASCIO, M. **Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do Infravermelho**. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

13 DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.

14 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **Guideline for Testing of Chemicals: Acute oral toxicity - Acute Toxic Class Method**. Paris: OEDC, Guideline 423, 2001.

15 LONNI, A. A. S. G. **Caracterização e identificação química de carquejas do gênero *Baccharis* por métodos quimiométricos**. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

16 SENA, M.M.; POPPI, R.J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. **Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos**. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 547-556, 2000.

17 NETO, J. M. M.; MOITA, G. C. **Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados**. *Química Nova*, v.21, n.4, p. 467-469, 1998.

18 NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2<sup>a</sup> ed., Campinas: Editora da UNICAMP, p.313-319, 2001.

19 SILVA, L.M.C.; **Estudo exploratório de extratos de carquejas por FTIR, CLAE e métodos quimiométricos**. Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

20 SNYDER, L.R.; CARR, P.W.; RUTAN, S.C. **Solvatochromically based solvent-selectivity triangle**. *Journal of Chromatography A*, v.656, n.1-2, p.537-547, 1993.

21 LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. **Animal models of nociception**. *Pharmacological Reviews*, v. 53, n. 4, 597-652, 2001.

22 NETO, A.C. **Estudos conformacionais de lactonas sesquiterpênicas e compostos relacionados.** 2002. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

23 LIU, H.; SUN, S.; LV, G.; LIANG, X. **Discrimination of extracted lipophilic constituents of Angelica with multi-steps infrared macro-fingerprint method.** *Vibrational Spectroscopy*, v.40, n.2, p. 202-208, 2006.

24 BAZON, J.N.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; DIAS, D.A.; NAGAMITI, K.; CUNHA, W.R.; HERZ, W. **Cadinanolides and other constituents from *Vernonia fruticosa* and *Vernonanthura discolor*.** *Phytochemistry*, v.44, n.8, p.1535-1536, 1997.

25 RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H.L.; MELFORT, M.; SCHMIDT, J. T. **Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.7, n.11, p. 2343-2352, 1999.

26 VALÉRIO, D.A.R.; CUNHA, T.M.; ARAKAWA, N.S.; LEMOS, H.P.; COSTA, F.B. da.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI JR, W.A. **Antiinflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism.** *European Journal of Pharmacology*, v.562, n.1-2, p.155-163, 2007.