



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LIVIA MARIA ZAMBROZI GARCIA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE NA
ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS
DE *Mikania laevigata* Sch. Bip. POR MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS**

Londrina
2009

LIVIA MARIA ZAMBROZI GARCIA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE NA
ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS
DE *Mikania laevigata* Sch. Bip. POR MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS**

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.

Orientação: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2009

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G216a Garcia, Livia Maria Zambrozi.

Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Mikania laevigata* Sch. Bip. por métodos quimiométricos / Livia Maria Zambrozi Garcia. – Londrina, 2009. 100 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Análise cromatográfica – Teses. 3. Extração por solventes – Teses. 4. Mikania – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química dos Recursos Naturais. III. Título.

CDU 543.4

LIVIA MARIA ZAMBROZI GARCIA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE NA
ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS
DE *Mikania laevigata* Sch. Bip. POR MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS**

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)

Prof. Dr. Roy Edward Bruns (UNICAMP)

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Faria (UEL)

Londrina, 20 de fevereiro de 2009.

**A Deus pelo dom da vida e por me
iluminar a cada instante...**

AGRADECIMENTOS

- Em especial à Professora Dra. Ieda Spacino Scarmínio pela excelente orientação, incentivo, amizade e principalmente pelo exemplo de profissionalismo e pessoa, que contribuíram para minha formação científica e pessoal.
- Ao professor Dr. Roy E. Bruns pela colaboração neste trabalho.
- Ao professor Dr. Fernando César de Macedo Júnior pelo incentivo e ajuda na interpretação dos espectros de infravermelho.
- À professora Dr. Ana Odete Vieira pela classificação botânica da planta *Mikania laevigata* Sch. Bip.
- À amiga Patrícia Kaori Soares pela intensa colaboração e amizade durante o desenvolvimento desse trabalho.
- À minha família: Pai, Mãe, Cylene, Guilherme e vô Lea por todo amor e carinho, que me proporcionaram força e razão para continuar.
- Ao Gustavo meu grande amor e incentivador.
- A todos meus familiares, especialmente meu primo Fernando pela estadia e ajuda em Campinas.
- A amiga Talita pela amizade e parceria, indispensáveis para a realização de todo trabalho.
- À Alessandra, amiga de todas as horas.
- As amigas de laboratório: Dani, Raquel e Sabrina.
- À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Departamento de Química, que possibilitou esta oportunidade de amadurecimento intelectual e pessoal.
- A todos os professores do Programa de Pós Graduação de Química dos Recursos Naturais.

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP)
pela bolsa concedida.
- A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

GARCIA, Livia Maria Zambrozi. **Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Mikania laevigata* Sch. Bip. por métodos quimiométricos.** 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Planejamento estatístico de misturas com cinco componentes, etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio, foi utilizado para investigar o efeito do solvente extrator no rendimento e diversidade de metabólitos secundários das folhas da *Mikania laevigata* Sch. Bip. Os extratos brutos foram fracionados por extração líquido-líquido, resultando em fibras e mais quatro diferentes frações, fração neutra (gorduras e graxas), fração orgânica (terpenóides e compostos fenólicos), fração básica (alcalóides) e fração polar (alcalóides quaternários e n-óxidos). O maior rendimento para o extrato bruto foi obtido na mistura binária etanol:diclorometano (1/2:1/2 v/v). O maior rendimento para a fração das fibras foi obtido com a mistura binária acetona:clorofórmio (1/2:1/2 v/v). Para a fração orgânica o maior rendimento foi obtido com a mistura etanol:acetato de etila (1/2:1/2 v/v), e a mistura ternária etanol:acetato de etila:clorofórmio (1/3:1/3:1/3 v/v/v). A mistura de acetato de etila:diclorometano:clorofórmio (1/3:1/3:1/3 v/v/v) foi mais eficiente na extração da fração básica, enquanto que para a fração neutra foi a mistura etanol:diclorometano:clorofórmio (1/3:1/3:1/3 v/v/v). Para a análise cromatográfica foram testadas três fases móveis de forças cromatográficas distintas 1,0, 1,5 e 2,0, sendo utilizado como modificadores orgânicos metanol e acetonitrila. Os extratos das frações orgânica e básica foram analisados por HPLC para testar a eficiência na extração dos metabólitos. O aumento da força cromatográfica (2,0) diminui o número de picos no cromatograma e estes não estão relacionados com o rendimento das frações. Os extratos brutos, as frações orgânicas e as frações gorduras e graxas foram analisados por FTIR. Os extratos brutos, as frações básicas e as frações gorduras e graxas foram analisados por UV-VIS. O efeito do solvente na composição química dos extratos foi comparado por meio das análises cromatográficas, UV-VIS e FTIR e métodos quimiométricos de análise de componentes principais e análise hierárquica.

Palavras-chave: Química analítica. Análise cromatográfica. Extração por solventes.

GARCIA, Livia Maria Zambrozi. **Análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Mikania laevigata* Sch. Bip. por métodos quimiométricos.** 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

The influence of different solvents on the yield and diversity of secondary metabolites of the crude and fractionated extracts of the *Mikania laevigata* Sch. Bip. leaves was investigated by simplex centroid design of ethanol, ethyl acetate, dichloromethane, acetone and chloroform mixtures. Three mobile phases, each with a different chromatographic strength, were used to evaluate the extraction efficiency of the organic and basic fractions. The number of peaks was used to evaluate the extraction efficiency. A mixture of acetonitrile:methanol:water(17,5:17,5:65 %v/v/v) was chosen as the mobile phase. The results show that the dependence of the peak number on the solvent composition decreases with the chromatographic strength. The largest crude extract yield was obtained using a binary mixture of ethanol:dichloromethane (1/2:1/2 v/v). The largest fiber fraction yield was obtained using a binary acetone:chloroform (1/2:1/2 v/v) mixture, whereas the smallest yield was obtained using a binary ethanol:acetone (1/2:1/2 v/v) mixture. The largest yields of the organic fraction was obtained for the binary mixture of ethanol:ethyl acetate (1/2:1/2 v/v), and the ternary mixture of ethanol:ethyl acetate:chloroform (1/3:1/3:1/3 v/v/v). Ethyl acetate:dichloromethane:chloroform (1/3:1/3:1/3 v/v/v) was more efficient at extracting the basic fractions. The largest yield of the neutral fraction occurs for the ethanol:dichloromethane:chloroform (1/3:1/3:1/3 v/v/v). Principal component analysis and hierarchical cluster analysis models were applied to the chromatographic and the middle infrared (FTIR) spectral data of the different extracts to discriminate the chemical compositions as mixture composition changes.

Keywords: Analytical chemistry. Chromatographic analysis. Solvent extraction.

FIGURAS

- Figura 1** – Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica)..... 26
- Figura 2** – Procedimento experimental empregado na análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Mikania laevigata* Sch. Bip 31
- Figura 3** – Foto da exsicata da planta *Mikania laevigata* Sch. Bip. classificada no herbário da Universidade Estadual de Londrina..... 32
- Figura 4** – Planejamento de misturas do tipo Centróide-Simplex com cinco componentes 34
- Figura 5** – Seqüência do procedimento experimental para o preparo dos 33 extratos brutos de acordo com o planejamento de misturas..... 37
- Figura 6** – Procedimento experimental para o fracionamento químico das diferentes classes de metabólitos..... 38
- Figura 7** – Seqüência do procedimento experimental para o preparo das amostras para as análises cromatográficas das frações orgânicas 40
- Figura 8** – Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para os rendimentos do extrato bruto..... 46
- Figura 9** – Superfície de resposta para os componentes etanol, diclorometano e clorofórmio aplicada aos rendimentos do extrato bruto 46
- Figura 10** – Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para o rendimento das frações neutras 48
- Figura 11** – Superfície de resposta para os componentes; etanol, diclorometano e clorofórmio aplicada aos rendimentos das frações neutras obtidas no fracionamento dos extratos brutos..... 49
- Figura 12** – Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para o rendimento das frações orgânicas..... 51
- Figura 13** – Superfície de resposta para os componentes etanol, acetato de etila e clorofórmio aplicada aos rendimentos da fração orgânica 51

Figura 14 –Planejamento de misturas Centróide-Simplex com os valores dos rendimentos das frações básicas obtidas com fracionamento dos extratos brutos	52
Figura 15 –Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para o rendimento das fibras	54
Figura 16 –Superfície de resposta para os componentes; diclorometano, acetona e clorofórmio, aplicada aos rendimentos das fibras	54
Figura 17 –Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para os resíduos	56
Figura 18 –Superfície de resposta para os componentes etanol, acetato de etila e clorofórmio aplicada aos resíduos	57
Figura 19 –Planejamento experimental Centróide-Simplex com os valores dos números de picos obtidos nas análises cromatográficas das frações orgânicas com as fases móveis A, B e C	58
Figura 20 –Planejamento experimental Centróide-Simplex com os valores dos números de picos obtidos nas análises cromatográficas das frações básicas com as fases móveis A, B e C	59
Figura 21 –Cromatogramas das 33 frações básicas da planta <i>Mikania laevigata</i> obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.....	61
Figura 22 –Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 33 frações básicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	62
Figura 23 –Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 33 frações básicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	63
Figura 24 –Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados cromatográficos das 33 frações básicas da <i>Mikania laevigata</i>	64
Figura 25 –Dendrograma baseado nos dados cromatográficos das 33 frações básicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	65
Figura 26 –Cromatogramas com tempo de retenção no intervalo de 0 á 17 mim, das 33 frações orgânicas da planta <i>Mikania laevigata</i> obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.....	65
Figura 27 –Gráfico dos loadings das CP1 e CP3 para os dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da <i>Mikania laevigata</i>	66

Figura 28 –Cromatogramas com tempo de retenção no intervalo 1,5 á 14 mim, das 33 frações orgânicas da planta <i>Mikania laevigata</i> obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.....	67
Figura 29 –Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	68
Figura 30 –Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	68
Figura 31 –Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da <i>Mikania laevigata</i>	69
Figura 32 –Dendrograma baseado nos dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	70
Figura 33 –Espectros de infravermelho dos 31 extratos brutos preparados de acordo com o planejamento experimental.....	71
Figura 34 –Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos dos 31 extratos brutos da planta <i>Mikania laevigata</i>	72
Figura 35 –Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos dos 31 extratos brutos da planta <i>Mikania laevigata</i>	73
Figura 36 –Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectroscópicos dos 31 extratos brutos	74
Figura 37 –Dendrograma baseado nos dados espectroscópicos dos 31 extratos brutos de <i>Mikania laevigata</i>	75
Figura 38 –Espectros de infravermelho das 33 frações gorduras e graxas obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.....	76
Figura 39 –Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos das 33 frações gorduras e graxas	77
Figura 40 –Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos das 33 frações gorduras e graxas	77
Figura 41 –Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectroscópicos das 33 frações gorduras e graxas	78
Figura 42 –Dendrograma baseado nos dados espectroscópicos das 33 frações gordura e graxas.....	79
Figura 43 –Espectros de infravermelho das 33 frações orgânicas obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.....	80

Figura 44 –Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos das 33 frações orgânicas	80
Figura 45 –Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos dos 33 frações orgânicas	81
Figura 46 –Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectroscópicos das 33 frações orgânicas	82
Figura 47 –Dendrograma baseado nos dados espectroscópicos das 33 frações orgânicas.....	83
Figura 48 –Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectrofotométricos dos 33 extratos brutos da planta <i>Mikania laevigata</i>	84
Figura 49 –Gráfico dos escores das CP1 e CP2 para os dados espectrofotométricos dos 33 extratos brutos da planta <i>Mikania laevigata</i>	85
Figura 50 –Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectrofotométricos dos 33 extratos brutos da planta <i>Mikania laevigata</i>	86
Figura 51 –Espectros de absorção no ultravioleta/visível dos 33 extratos brutos que compõem os grupos I e II	86
Figura 52 –Dendrograma baseado nos dados espectrofotométricos dos 33 extratos brutos da planta <i>Mikania laevigata</i>	87
Figura 53 –Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectrofotométricos das 33 frações básicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	88
Figura 54 –Gráfico dos escores das CP2 e CP3 para os dados espectrofotométricos das 33 frações básicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	89
Figura 55 –Espectros de absorção no ultravioleta/visível das 33 frações básicas que compõem os grupos I e II	89
Figura 56 –Gráfico dos loadings da CP2 para os dados espectrofotométricos das 33 frações básicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	90
Figura 57 –Dendrograma baseado nos dados espectrofotométricos das 33 frações básicas da planta <i>Mikania laevigata</i>	91
Figura 58 –Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 para dados espectrofotométricos das 33 frações gorduras e graxas da planta <i>Mikania laevigata</i>	92
Figura 59 –Gráfico dos escores das CP2 e CP3 para dados espectrofotométricos das 33 frações gorduras e graxas da planta <i>Mikania laevigata</i>	93

Figura 60 –Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para dados espectrofotométricos das 33 frações gorduras e graxas da planta <i>Mikania laevigata</i>	94
Figura 61 –Espectros de absorção no ultravioleta/visível das frações gorduras e graxas que compõem os grupos I e II.....	94
Figura 62 –Espectros de absorção no ultravioleta/visível das frações básicas 1, 3 e 18 ...	95
Figura 63 –Dendrograma baseado nos dados espectrofotométricos das 33 frações gorduras e graxas da planta <i>Mikania laevigata</i>	95

TABELAS

Tabela 1 – Membros dos grupos determinados por Snyder	20
Tabela 2 – Composição do sistema extrator.....	35
Tabela 3 – Composição do sistema extrator em volume (mL), rendimento (g) dos extratos brutos, fibras, frações neutra, orgânica, básica e resíduos.....	43
Tabela 4 – Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos dos extratos brutos da <i>Mikania laevigata</i> Sch. Bip	44
Tabela 5 – Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos das frações neutras obtidas após o fracionamento dos extratos brutos	47
Tabela 6 – Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos das frações orgânicas obtidas com o fracionamento dos extratos brutos	50
Tabela 7 – Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático aos rendimentos das fibras obtidas com o fracionamento dos extratos brutos da <i>Mikania laevigata</i> Sch. Bip	53
Tabela 8 – Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos dos resíduos obtidos através do cálculo da diferença da massa do extrato bruto com a soma de todas as massas das outras frações	55
Tabela 9 – Composição e força das fases móveis testadas nas análises cromatográficas das frações orgânica e básica.....	97

SIGLAS

a – Acetona

A – Fase móvel 65% água; 17,5% metanol; 17,5% acetonitrila

A – Acetato de Etila

ACP – Análise de Componentes Principais

AH – Análise Hierárquica

ANOVA – Análise de Variância

B – Fase móvel 47% água; 27% metanol; 26% acetonitrila

C – Fase móvel 30% água; 35% metanol; 35% acetonitrila

c – Clorofórmio

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CP1 – Componente Principal 1

CP2 – Componente Principal 2

CP3 – Componente Principal 3

d – Diclorometano

DABC – Drug Administration Bureau of China

e – Etanol

E – Matriz dos resíduos

EMEA – European Agency for the Evaluation of Medicinal Products

FDA – Food and Drug Administration

FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

HPLC – High-performance liquid chromatography

IV – Infravermelho

LQCN – Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais

n – Objetos

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – Variáveis

P – Matriz dos loadings

X – Matriz

q – Número de componentes na mistura

q – Número de componentes principais

S – Força do solvente

T – Matriz dos escores

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

ε – Erro experimental

ϕ_i – Fração de volume do solvente puro

\hat{y} – Resposta prevista pelo modelo

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	18
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	19
CAPÍTULO II	23
2 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	24
2.1 MODELAGEM DE MISTURAS	24
2.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS	25
2.3 PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS	27
2.3.1 Normalização por Comprimento de Vetor	27
2.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP).....	28
2.5 ANÁLISE HIERÁRQUICA (AH).....	29
CAPÍTULO III	30
3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL	31
3.1 REAGENTES	33
3.2 EQUIPAMENTOS	33
3.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	33
3.4 FRACIONAMENTO QUÍMICO DOS EXTRATOS BRUTOS	37
3.5 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	38
3.6 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA NO ULTRAVIOLETA–VISÍVEL (UV-VIS)	39
3.7 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	39
3.8 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS	41
CAPÍTULO IV	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 EFEITO DOS SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	43
4.2 RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	57
4.3 RESULTADOS DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	70
4.4 RESULTADOS DA ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA NO ULTRAVIOLETA– VISÍVEL	84

CAPÍTULO V	96
5 CONCLUSÃO	97
CAPÍTULO VI	101
REFERÊNCIAS	102



Capítulo I

Introdução e Objetivos

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Plantas produzem e acumulam uma grande variedade de compostos químicos que podem ser específicos para determinadas espécies, ou seja, não possuem uma distribuição universal, pois, não são necessários para todas as plantas¹. Esses compostos, também chamados de metabólitos secundários, geralmente ocorrem em baixas concentrações e seu aparecimento na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, com funções de defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores e animais dispersores de sementes^{2,3}.

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Esses compostos químicos apresentam grande importância econômica nas áreas da fitomedicina, nutracêutica e as aplicações industriais diversas, pois são utilizados na produção de drogas, antioxidantes, sabores, fragâncias, corantes, inseticidas e hormônios^{4,5}.

No estudo dos metabólitos secundários um dos passos mais importante é avaliar o efeito do solvente no processo de extração, a fim de obter o maior número possível de substâncias químicas dos tecidos das plantas. Dada a heterogeneidade dos seus componentes e a diferença na polaridade, o sucesso da extração vai depender do solvente extrator^{6,7}.

Uma alternativa para a escolha do solvente extrator é usar o triângulo de seletividade primeiramente proposto por Snyder, que estabelece a classificação da propriedade do solvente em termos de polaridade e interações químicas⁸ de basicidade (β), acidez (α) e momento dipolar (π). A vantagem de usar este parâmetro 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 (π , α e β) fazem parte do mesmo grupo, embora possam apresentar diferentes valores de polaridade. A tabela 1 mostra a discriminação desses grupos⁹ colocando entre parênteses o solvente mais usado.

Tabela 1 – Membros dos grupos determinados por Snyder.

Grupos	Membros
I	Éteres alifáticos (Éter dietílico)
II	Álcoois alifáticos (Metanol, Etanol, Octanol, 1-Propanol)
III	Derivados de piridina, (tetraidrofurano), sulfóxidos
IV	Glicóis, ácido acético
V	Diclorometano
VI	Ésteres alifáticos, cetonas, nitrilas, dioxano (Acetonitrila)
VII	Hidrocarbonetos aromáticos, compostos aromáticos halogenados, éteres aromáticos, compostos nitro (Tolueno)
VIII	Água

De acordo com a literatura³, praticamente todos os constituintes de interesse para a análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80%, de tal modo que estas costumam ser empregadas com frequência. Por outro lado, um grande número de alcalóides é extraído com hidrocarbonetos ou solventes apolares, enquanto que os flavonóides e terpenos podem ser seletivamente extraídos em pH neutro com acetato de etila ou cetonas alifáticas.

O uso de solventes puros como extratores pode não ser suficiente para extrair o máximo de substâncias químicas da planta. A maneira mais eficiente para a determinação do solvente extrator é através de planejamentos estatísticos¹⁰.

Poucos trabalhos na literatura empregam o planejamento estatístico de misturas¹¹ no desenvolvimento de método para selecionar o melhor solvente extrator capaz de extrair a maior variedade de compostos, ou seja, diferentes classes de metabólitos possíveis^{12,13}. Estes planejamentos são utilizados para minimizar o número de experimentos e para identificar efeitos de interações sinérgicos e antagônicos entre os solventes que podem ser relevantes para a otimização do processo de extração¹⁴. Esses efeitos não podem ser preditos por modelos aditivos obtidos de experimentos utilizando apenas solventes puros. Os experimentos são executados usando uma mistura de solventes previamente escolhidos através de critérios estatísticos para minimizar o erro da modelagem, bem como determinar o número de experimentos que deverão ser executados¹⁵.

Tão importante quanto o processo de extração é o processo de identificação e separação dos compostos químicos extraídos. Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada para essa finalidade, pois pode ser facilmente

adaptada à quantificação individual dos componentes com base em seus metabólitos secundários, além de gerar a impressão digital para definir a identidade ou a qualidade de uma dada espécie^{16,17}.

Algumas classes de compostos tais como: alcalóides, álcoois, antibióticos, aromáticos, barbitúricos, agrotóxicos clorados e vitaminas são facilmente separadas por CLAE em fase reversa¹⁸.

A análise de impressão digital foi introduzida e aceita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como estratégia para a avaliação de ervas naturais, exigido pelo Drug Administration Bureau of China (DABC)¹⁹⁻²⁰ para a padronização das ervas medicinais chinesas e suas matéria primas, e ainda é recomendado por outras entidades como a Food and Drug Administration (FDA) e a European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA)¹⁹⁻²¹.

A impressão digital cromatográfica de uma planta medicinal para o controle de qualidade é um cromatograma complexo usado para comparação de perfis²². Outra definição mais geral é que a impressão digital é um tipo de método que mostra a informação química de plantas medicinais e produtos acabados com espectrogramas, cromatogramas e outros gráficos obtidos por técnicas analíticas²³. Esta técnica ainda pode ser utilizada para averiguar a diversidade dos componentes químicos entre plantas da mesma espécie, avaliar a origem geográfica, estação de coleta, métodos de secagem, processo de estocagem, avaliar extratos e misturas de plantas, entre outros²⁴⁻²⁶.

Na busca da impressão digital de plantas existem duas etapas importantes. Primeiro encontrar o melhor solvente extrator capaz de extrair o maior número possível de substâncias químicas (metabólitos) dos tecidos das plantas. Depois disso, na análise da impressão digital cromatográfica por cromatografia líquida de fase reversa, a fase móvel também deve ser escolhida com o objetivo de maximizar o número de picos eluídos, para fornecer a quantidade máxima de informação sobre as substâncias extraídas.

Dentro deste contexto, as plantas do gênero *Mikania*, pertencente à família Asteraceae, é uma das espécies de guaco largamente utilizada em nosso país, e vem ganhando atenção dos pesquisadores, principalmente no estudo de seus metabólitos secundários²⁷. Estas plantas são muito utilizadas na medicina alternativa na fabricação de xarope e chás com finalidades terapêuticas, devido as suas propriedades broncodilatadoras, anti-sépticas, expectorante, anti-asmáticas, febrífuga, sudorífica, cicatrizante, entre outras²⁸⁻³⁰.

Estudos fitoquímicos com essa espécie levaram ao isolamento de compostos químicos como: cumarina, lupeol, ácidos diterpênicos, caurenol, entre outros³¹. Dentre esses,

a cumarina, ocorre em abundância nas folhas de guaco, sendo considerada um de seus marcadores químicos. Sua presença caracteriza o odor fragrante e aromático desta planta medicinal³² e o doseamento desta substância é muito utilizado no controle de qualidade de preparações extrativas contendo guaco^{33,34}.

Desta forma este trabalho teve como objetivo geral fazer uma análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Mikania laevigata* Sch. Bip. por métodos quimiométricos.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a influência de diferentes solventes no meio extrator no rendimento dos extratos brutos, fibras, resíduos, frações básica, orgânica e gorduras e graxas.
- Investigar a influência da força cromatográfica da fase móvel e do solvente extrator na qualidade da impressão digital cromatográfica dos metabólitos secundários da planta do gênero *Mikania*.
- Comparar a composição química dos extratos e das frações por HPLC, IV e UV-VIS por métodos quimiométricos de análise exploratória multivariada.



Capítulo II

Métodos

Quimiométricos

2 QUIMIOMETRIA

A quimiometria pode ser definida como uma área da química que usa métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para planejar ou selecionar procedimentos ótimos de medidas e experimentos, bem como, extrair o máximo da informação química relevante com a análise dos dados³⁵. Ela é aplicada em algumas áreas principais, muito pesquisadas atualmente como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimentos de padrões e classificação de dados, calibração multivariada, monitoramento e modelagem de processos multivariados e métodos de inteligência artificial³⁶.

A partir da década de setenta, com o avanço da instrumentação e automação dentro dos laboratórios foi possível obter grande quantidade de informações de forma rápida e com boa qualidade. A utilização de um tratamento adequado pode ser fator limitante na eficiência e efetividade da operação das análises para a identificação, classificação e interpretação desses dados.

2.1 MODELAGEM DE MISTURAS

Uma mistura é um sistema multicomponente, no qual a soma de todos os componentes permanece constante para cada amostra, ou seja, a soma das proporções dos componentes da mistura deve ser 100%. A resposta medida para uma mistura é determinada pela proporção dos seus componentes e não por valores absolutos¹⁰. Para uma mistura qualquer de q componente, temos:

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

onde x_i representa a proporção do i -ésimo componente da mistura.

Num planejamento centróide- simplex com z componentes, o número de pontos distintos é $2^z - 1$. Esses pontos correspondem a z permutações de $(1,0,0,\dots,0)$, permutações do tipo $(z/2)$ ou misturas binárias, do tipo $(z/3)$ ou misturas ternárias e assim por diante até o ponto central $(1/z, 1/z,\dots, 1/z)$ ou z -ésima mistura. Em outras palavras, o

planejamento consiste apenas de misturas onde os componentes encontram-se em proporções iguais.

Após a realização dos experimentos, os dados ou respostas do planejamento são coletados e um polinômio com o mesmo número de termos (ou parâmetros a estimar) é ajustado. Em geral o polinômio é definido pela expressão:

$$y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i<j}^q \sum_j^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j}^q \sum_{j<k}^q \sum_k^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \dots + \beta_{12\dots 4} x_1 x_2 \dots x_4 + \varepsilon \quad (2)$$

onde ε é o erro experimental, o parâmetro β_i representa a resposta esperada para o componente puro i e é chamado de coeficiente linear do componente i , β_{ij} é o coeficiente de interação entre os componentes i e j e os parâmetros β_{ijk} e $\beta_{12\dots 4}$ são definidos similarmente.

2.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS

O objetivo da análise exploratória é extrair informações dos dados, estabelecendo relações entre objetos/ amostras 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.

A seqüência básica da análise de dados multivariados de dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 1.

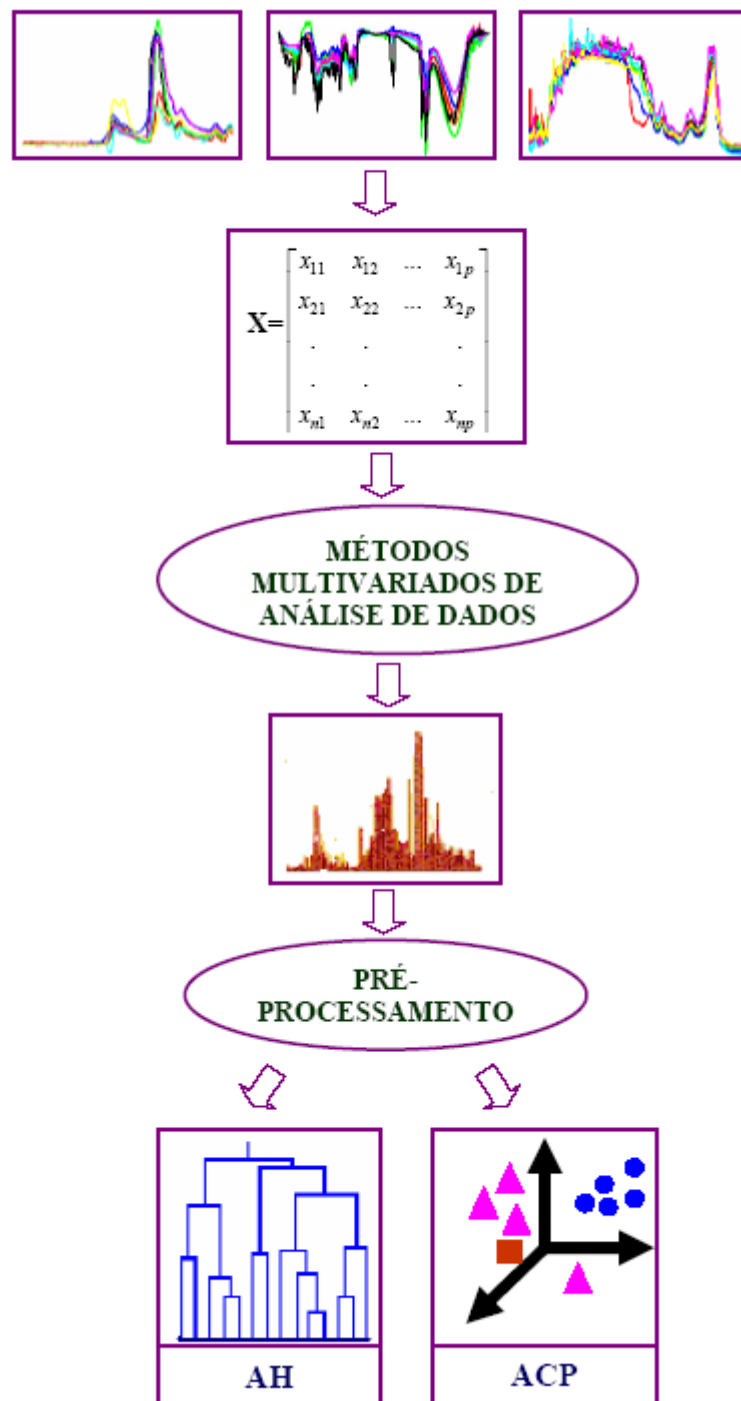


Figura 1 – Esquema da seqüência usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Análise Hierárquica).

Primeiramente, os dados são convertidos na forma de uma matriz, chamada matriz de dados, a qual será representada por X . As n linhas da matriz representam as amostras (ou objetos), onde 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.

Uma adequada organização e avaliação dos dados são essenciais para que a análise multivariada seja feita de forma correta. Deve-se investigar a forma como os dados foram gerados, os métodos de medidas utilizados e a confiabilidade destes dados. Outro fator importante é a representatividade do grupo de amostras disponíveis que se deseja analisar. De nada adianta um conjunto extenso de dados com informações interessantes se o grupo de amostras não for representativo o suficiente para fornecer as informações adequadas ao tratamento que se propõe fazer³⁷.

Em seguida é realizada a etapa de pré-processamento dos dados, pois muitas vezes os dados são expressos em grandezas diferentes, ou apresentam muitos ruídos, e dependendo do tipo de informação que se deseja extrair, isto poderá ou não comprometer a análise.

2.3 PRÉ-PROCESSAMENTO DOS DADOS

Existem dois tipos básicos de pré-processamento, por linhas, que opera sobre as amostras e por colunas, que opera sobre as variáveis. Dentre os tipos de pré-processamento por linhas está a normalização³⁸.

A normalização de um perfil analítico é um passo importante no pré-processamento de dados de perfil metabolômico³⁹. Dentre os critérios de normalização mais usados para as amostras está a normalização por comprimento de vetor³⁸.

2.3.1 Normalização por Comprimento do vetor^{22,38}

Esta normalização é feita dividindo cada valor original pela soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha, Equação 3. A finalidade é

remover a variação sistemática, normalmente associada com a quantidade total da amostra.

$$x' = x_{ij} / \sqrt{\sum_{j=1}^p x_{ij}^2} \quad (3)$$

2.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

A ACP consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para análise de dados. Esse 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 dados²². Em outras palavras, reduz o número de variáveis originais a poucas variáveis latentes chamadas componentes principais (CP) sem perder a informação dos dados originais. A primeira CP é escolhida em direção de maior variância dos dados. A segunda CP é definida de tal maneira que seja ortogonal a primeira e representa a variância máxima que não foi explicada pela primeira CP, ou seja, as componentes principais são obtidas em ordem decrescente de máxima variância⁴⁰⁻⁴².

Matematicamente, cada CP pode ser descrita como uma combinação linear das variáveis originais onde a importância de cada uma dessas variáveis é dada pelos loadings. Esta combinação linear fornece ainda para cada objeto, valores chamados escores.

A ACP, pode ser definida tanto no espaço das amostras como das variáveis, e a decomposição é calculada através da diagonalização da matriz de associação ($\mathbf{X}\mathbf{X}^t$) ou da matriz ($\mathbf{X}^t\mathbf{X}$), respectivamente⁴³. A matriz \mathbf{X} ($n \times p$), formada por n objetos e p variáveis é decomposta no produto de duas matrizes menores:

$$\mathbf{X} (n \times p) = \mathbf{T} (n \times q) \times \mathbf{P}^t (q \times p) + \mathbf{E} (n \times p) \quad (4)$$

onde \mathbf{P} é a matriz dos “loadings” (pesos) das componentes principais, \mathbf{T} é a matriz dos escores das componentes principais, \mathbf{E} 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.

Após os cálculos, dois tipos de gráficos são obtidos, o gráfico dos escores⁴⁴, que fornece informações sobre os objetos, e o gráfico dos loadings, que representa a importância e a correlação das variáveis.

2.5 ANÁLISE HIERÁRQUICA (AH)²²

A “análise de agrupamentos” é um nome coletivo dado a uma grande variedade de técnicas que permitem a separação dos objetos ou variáveis em grupos diferentes.

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 onde 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, Equação 5, e substituí-los por um novo ponto, localizado na metade da distância entre eles.

$$d_{ik} = \left[\sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{kj})^2 \right]^{1/2} \quad (5)$$

onde 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, onde no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical a distância.

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

Descrição
Experimental

3 DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão abordados os aspectos relacionados ao procedimento experimental empregado na análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Mikania laevigata* Sch. Bip. Um resumo do procedimento experimental está representado na Figura 2.

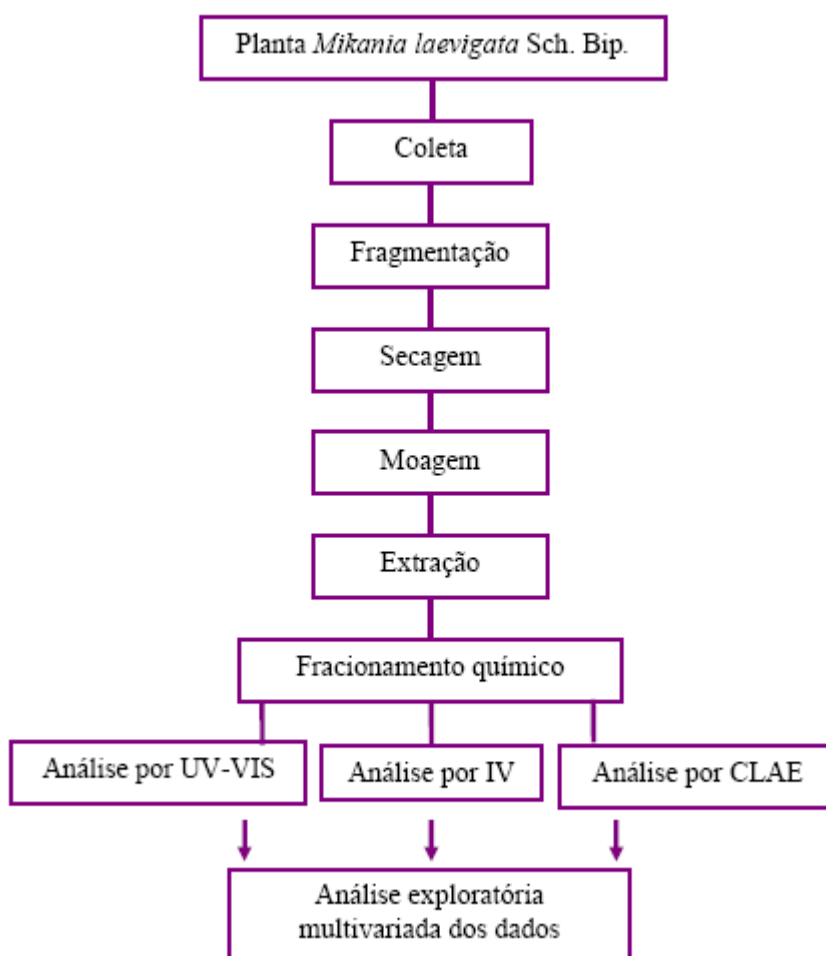


Figura 2 – Procedimento experimental empregado na análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Mikania laevigata* Sch. Bip.

Para este estudo foram utilizadas as folhas secas da planta medicinal *Mikania laevigata* Sch. Bip. A exsicata desta planta está depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina e foi classificada pela professora Dra. Ana Odete Vieira

3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram: acetona P.A (99%), acetato de etila P.A (99%), diclorometano P.A (99,5%), clorofórmio P.A (99%), metanol UV/HPLC espectroscópico (99,8%), acetonitrila UV/HPLC espectroscópico (99,8%), todos procedentes da VETEC, álcool etílico hidratado produzido pela Montenegro (92,8%), KBr P.A – acs Synth (99%), água destilada, água Milli-Q, ácido sulfúrico P.A produzido pela VETEC e hidróxido de amônio produzido pela CHEMCO.

3.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica Shimadzu AC200, evaporador rotativo FISATOM 802, ultra-som Unique modelo Ultracleaner 1400, liquidificador, cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu HPLC-LC-6AD com detector por arranjo de diodo SPD-M 10A Shimadzu, coluna Gemini C18 ODS PN0380 Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), espectrômetro de Infravermelho Shimadzu FTIR-8300, espectrofotômetro OCEAN OPTICS modelo CHEM 2000 UV-VIS e Equipamento Milli-Q.

3.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos foram preparados de acordo com o planejamento de misturas do tipo Centróide-Simplex¹⁵ com cinco componentes, x_1 etanol, x_2 acetato de etila, x_3 diclorometano, x_4 acetona e x_5 clorofórmio, Figura 4, totalizando 31 diferentes composições de solventes extratores que podem ser vistos na Tabela 2.

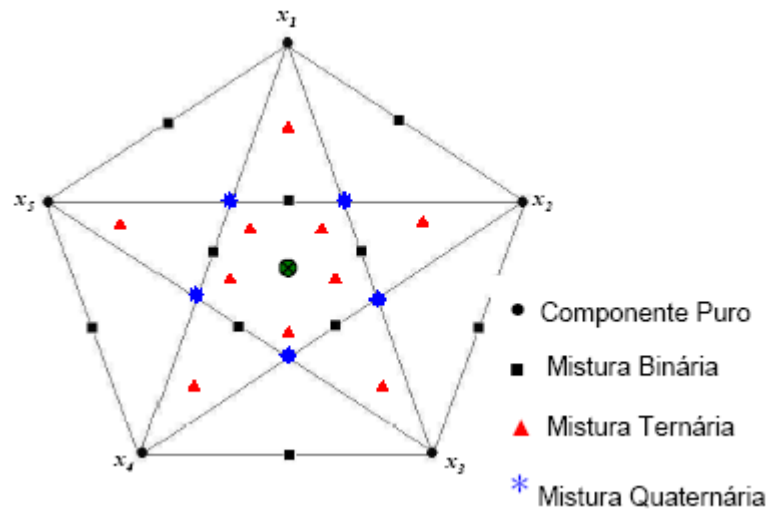


Figura 4 – Planejamento de misturas do tipo Centróide-Simplex com cinco componentes.

A extração foi feita por maceração e remaceração³. A maceração é a operação na qual a extração da matéria prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado, sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Com a finalidade de aumentar a eficiência da extração recorre-se ao método de remaceração, ou seja, a operação é repetida várias vezes utilizando o mesmo material, renovando-se apenas o líquido extrator.

Tabela 2 – Composição do sistema extrator

Extrato	Solventes				
	Etanol	Acetato de etila	Diclorometano	Acetona	Clorofórmio
01	1	0	0	0	0
02	0	1	0	0	0
03	0	0	1	0	0
04	0	0	0	1	0
05	0	0	0	0	1
06	1/2	1/2	0	0	0
07	1/2	0	1/2	0	0
08	1/2	0	0	1/2	0
09	1/2	0	0	0	1/2
10	0	1/2	1/2	0	0
11	0	1/2	0	1/2	0
12	0	1/2	0	0	1/2
13	0	0	1/2	1/2	0
14	0	0	0	1/2	1/2
15	0	0	1/2	0	1/2
16	1/3	1/3	1/3	0	0
17	1/3	0	0	1/3	1/3
18	1/3	1/3	0	0	1/3
19	1/3	0	1/3	0	1/3
20	1/3	1/3	0	1/3	0
21	0	0	1/3	1/3	1/3
22	0	1/3	0	1/3	1/3
23	0	1/3	1/3	0	1/3
24	0	1/3	1/3	1/3	0
25	1/3	0	1/3	1/3	0
26	1/4	1/4	1/4	1/4	0
27	0	1/4	1/4	1/4	1/4
28	1/4	0	1/4	1/4	1/4
29	1/4	1/4	0	1/4	1/4
30	1/4	1/4	1/4	0	1/4
31	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
32	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
33	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5

Ao todo foram preparados aleatoriamente 31 extratos mais duplicatas no ponto central, totalizando 33 extratos brutos, pesando-se 20,0000 g de folhas secas, moídas e submetidas á extração por maceração com 90,00 mL do solvente extrator, de acordo com as composições previstas pelo planejamento de misturas, Tabela 2. Estas misturas ficaram por 30 minutos em banho ultra-som, sendo que a troca da água do banho se deu a cada 10 minutos para manter a temperatura⁴⁵. Em seguida, os extratos foram filtrados em papel de filtro comum e as folhas submetidas à remaceração por mais duas vezes consecutivas, mantendo-se as mesmas condições, a fim de conseguir extrair a maior quantidade possível de compostos

químicos presentes nos tecidos da planta.

Os extratos obtidos foram concentrados em um evaporador rotativo a uma temperatura de 60 °C ($\pm 3^\circ\text{C}$) e mantidos á sombra sob ventilação forçada durante alguns dias para a evaporação dos solventes, em seguida foram liofilizados.

Após atingir peso constante, os extratos foram fracionados por extração líquido- líquido⁴⁶, que é um método de fracionamento por partição, realizado em um funil de separação.

O fracionamento de um extrato vegetal pode ser feito através da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente ou da partição ácido-base. A partição implica uma dissolução seletiva e distribuição entre as fases de dois solventes imiscíveis. Esse fenômeno pode ser aplicado com vistas à separação de componentes de uma mistura. A concentração de cada um dos componentes em cada fase está relacionada com o coeficiente de partição ou distribuição apresentado por cada substância.

A Figura 5 representa a seqüência do procedimento experimental para a preparação dos 33 extratos brutos de acordo com o planejamento de misturas.

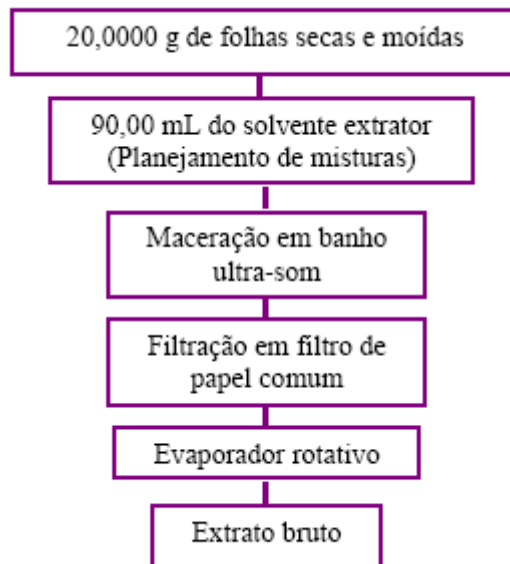


Figura 5 – Seqüência do procedimento experimental para o preparo dos 33 extratos brutos de acordo com o planejamento de misturas.

3.4 FRACIONAMENTO QUÍMICO DOS EXTRATOS BRUTOS

O fracionamento químico foi realizado re-dissolvendo os extratos brutos em aproximadamente 10,00 mL dos respectivos solventes extratores (Tabela 2). A mistura resultante foi homogeneizada com 24,00 mL de metanol e 6,00 mL de água (4:1 v/v) por 10 minutos em banho ultra-som e em seguida a solução foi filtrada em papel de filtro.

O filtrado foi transferido para um funil de separação e acidificado com algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Após, foram adicionados aproximadamente 15,00 mL (em triplicatas) de clorofórmio, resultando no aparecimento de duas fases, uma mais densa (fase orgânica) e outra menos densa (fase aquosa/metanólica). A fase orgânica foi transferida para um balão de fundo redondo e submetida à concentração em um evaporador rotativo a uma temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, resultando em uma fração de polaridade intermediária que apresenta maiores quantidades de terpenóides e compostos fenólicos. A fase aquosa, foi basificada com hidróxido de amônio até atingir pH 10 e submetida a extração com 15,00 mL (em duplicatas) de uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção 3:1 (v/v). Isso novamente resultou no aparecimento de duas fases imiscíveis. A fase orgânica foi separada da fase menos densa, a aquosa, e novamente a fase orgânica foi submetida a mais uma extração com 15,00 mL de clorofórmio. Em seguida, em um balão de fundo redondo reuniu-se a fase orgânica e esta foi submetida à concentração em um evaporador rotativo a uma temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, resultando em uma fração básica rica em alcalóides. A fase aquosa que permaneceu no funil de separação também foi concentrada em um evaporador rotativo mantendo-se as mesmas condições. Esta fase resultou em uma fração polar cujos principais componentes presentes são alcalóides quaternários e n-óxidos.

Têm-se então após o fracionamento químico fibras e quatro diferentes frações, sendo elas: fração neutra (gorduras e graxas), fração orgânica de polaridade intermediária (terpenóides e compostos fenólicos), fração básica (alcalóides) e fração polar (alcalóides quaternários e n-óxidos).

O procedimento experimental para o fracionamento químico das diferentes classes de metabólitos está representado na Figura 6.

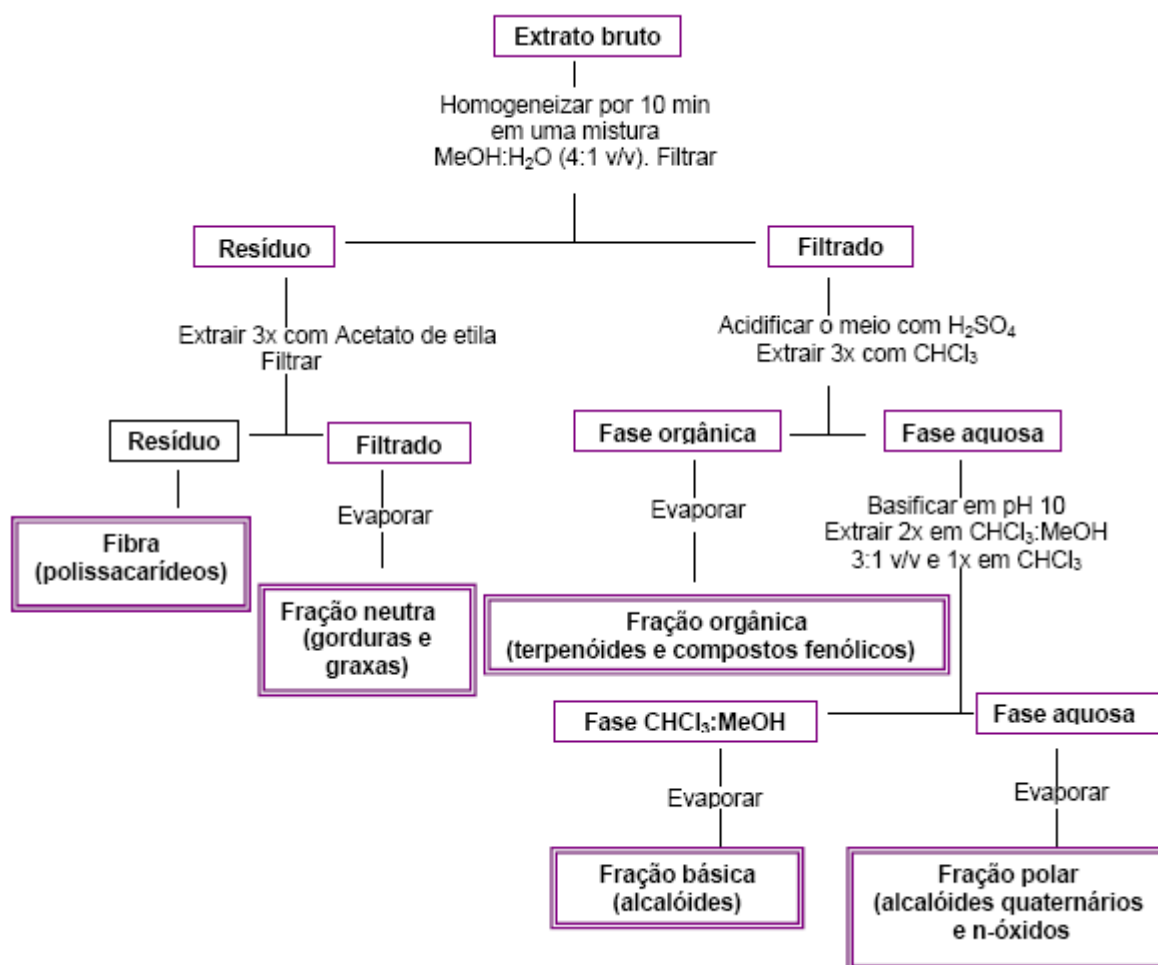


Figura 6 – Procedimento experimental para o fracionamento químico das diferentes classes de metabólitos.

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

Os extratos brutos, as frações orgânicas e gorduras e graxas obtidas no fracionamento químico foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho por ser uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa.

Para preparar as pastilhas foram pesados 0,0007 g de cada extrato ou fração e em seguida homogeneizados uniformemente com 0,1500 g de KBr e algumas gotas de clorofórmio.

Os espectros no infravermelho foram registrados na região de 400–4000 cm^{-1} , em resolução de 1,93 cm^{-1} e média de 80 leituras.

3.6 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA NO ULTRAVIOLETA–VISÍVEL (UV-VIS)

Foram analisados todos os extratos brutos, as frações básicas e gorduras e graxas. Os espectros foram registrados nos comprimentos de ondas entre 189–890 nm.

Para a análise dos extratos brutos 20,0000 mg de cada extrato foram re-dissolvidos em 6,00 mL do solvente extrator de acordo com o planejamento de misturas, Tabela 2.

Para a análise das frações básicas e gorduras e graxas 10,0000 mg de cada fração foram re-dissolvidas em 5,00 mL de metanol.

3.7 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Foram submetidas às análises cromatográficas as frações orgânica e básica obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.

As amostras provenientes das frações orgânicas foram preparadas re-dissolvendo toda a massa obtida no fracionamento químico em 10,00 mL de metanol. Após uma hora, cada solução foi filtrada em filtro comum. Deste filtrado foram tomadas alíquotas de 25 μ L e diluídas com 475 μ L (1:20 v/v) da fase móvel. As amostras diluídas foram filtradas em filtro Millipore Millex com 0,22 μ m de tamanho de poro, colocadas em *eppendorf* e armazenadas em *freezer* até as análises.

O esquema na Figura 7 representa as etapas percorridas para preparar as amostras para as análises cromatográficas das frações orgânicas.

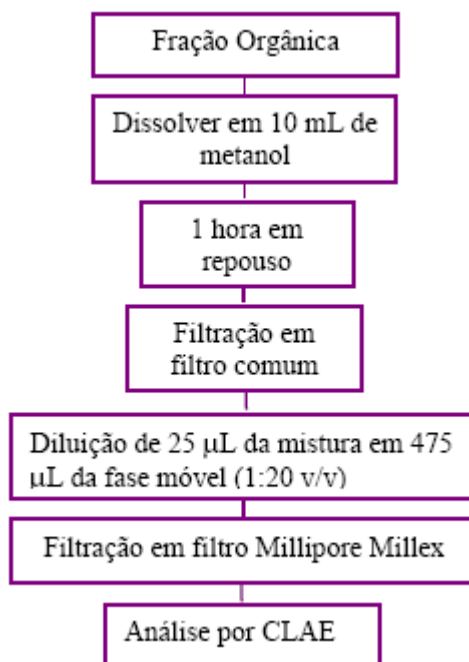


Figura 7 – Seqüência do procedimento experimental para o preparo das amostras para as análises cromatográficas das frações orgânicas.

As amostras das frações básicas foram preparadas seguindo o mesmo procedimento experimental das frações orgânicas, com a única diferença de não ter sido necessário realizar a etapa da diluição.

As condições cromatográficas foram: coluna Gemini C₁₈ ODS PN0380 Phenomenex (250 mm x 4,6 mm), com tamanho de partícula de 5 µm, temperatura do forno de 50 °C, volume de injeção de 20 µL, vazão da fase móvel de 1 mL/min, eluição monitorada nos comprimentos de ondas 210, 240, 272 e 305 nm.

A escolha dos comprimentos de ondas foi feita após fazer uma varredura no espectro, a fim de verificar quais picos apareciam com maiores frequências durante as análises. O comprimento de onda em 210 nm foi o escolhido para ser utilizado na análise exploratória multivariada dos dados cromatográficos por ser o que apresentou maiores informações químicas, ou seja, o maior número de picos cromatográficos na impressão digital dos metabólicos secundários.

3.8 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

O programa computacional de análise de fatores do tipo Q e as rotações desenvolvidos pela professora Dra. Ieda Spacino Scarminio, do laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais (LQCN) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina foram utilizados para os cálculos de classificação.

Para calcular os efeitos bem como para a modelagem das superfícies de resposta o programa STATISTICA 6.0 foi utilizado.



Capítulo IV

Resultados

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DOS SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.

Na primeira etapa deste trabalho a metodologia de superfície de resposta foi aplicada aos rendimentos obtidos das fibras, extratos brutos, frações orgânica, neutra, básica e também aos resíduos do fracionamento, que foram obtidos através do cálculo da diferença da massa do extrato bruto com a soma de todas as massas das outras frações. Os erros padrão foi estimado pelo erro experimental determinado pelas três replicatas no ponto central. Os rendimentos em gramas, a média e o desvio padrão podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição do sistema extrator em volume (mL), rendimento (g) dos extratos brutos, fibras, frações neutra, orgânica, básica e resíduos.

Extrato	Solventes					Rendimento					
	Etanol	Acetato	Diclor.	Acetona	Clorof.	Bruto	Neutra	Orgânica	Básica	Fibra	Resíduos
1	90	0	0	0	0	1,1093	0,2620	0,5858	0,0068	0,0165	0,2382
2	0	90	0	0	0	0,6646	0,2911	0,2989	0,0090	0,0294	0,0362
3	0	0	90	0	0	1,1128	0,8461	0,1644	0,0077	0,0168	0,0778
4	0	0	0	90	0	0,9193	0,3155	0,5627	0,0064	0,0456	-0,0109
5	0	0	0	0	90	1,1615	0,8701	0,2345	0,0107	0,0347	0,0115
6	45	45	0	0	0	1,2679	0,4306	0,6928	0,0045	0,0231	0,1169
7	45	0	45	0	0	1,6657	0,6308	0,5063	0,0036	0,0521	0,4729
8	45	0	0	45	0	1,2112	0,4535	0,5666	0,0024	0,0123	0,1764
9	45	0	0	0	45	1,5276	0,7144	0,5587	0,0020	0,0294	0,2231
10	0	45	45	0	0	1,2014	0,7868	0,3546	0,0038	0,0245	0,0317
11	0	45	0	45	0	0,9257	0,4455	0,4149	0,0102	0,0389	0,0162
12	0	45	0	0	45	1,0960	0,5634	0,3208	0,0112	0,0295	0,1711
13	0	0	45	45	0	1,2775	0,6066	0,5646	0,0078	0,0543	0,0442
14	0	0	0	45	45	1,2028	0,3273	0,3768	0,0091	0,0584	0,4312
15	0	0	45	0	45	1,1458	0,7557	0,2861	0,0071	0,022	0,0749
16	30	30	30	0	0	1,1453	0,6828	0,3138	0,0061	0,0289	0,1137
17	30	0	0	30	30	1,3256	0,6234	0,5497	0,0065	0,0321	0,1139
18	30	30	0	0	30	1,4594	0,7361	0,5650	0,0032	0,0492	0,1059
19	30	0	30	0	30	1,5193	0,9460	0,3786	0,0023	0,0182	0,1742
20	30	30	0	30	0	1,2252	0,8928	0,1832	0,0042	0,0125	0,1325
21	0	0	30	30	30	1,2204	0,7396	0,3806	0,0071	0,0365	0,0566
22	0	30	0	30	30	1,0769	0,5582	0,4703	0,0011	0,0485	-0,0111
23	0	30	30	0	30	1,1898	0,9898	0,1763	0,0146	0,0176	-0,0085
24	0	30	30	30	0	1,2140	0,5405	0,5414	0,0084	0,0172	0,1065
25	30	0	30	30	0	1,3059	0,7556	0,3846	0,0071	0,0307	0,1279
26	22,5	22,5	22,5	22,5	0	1,2089	0,7604	0,3394	0,0094	0,0169	0,0828
27	0	22,5	22,5	22,5	22,5	1,1510	0,5916	0,4093	0,0058	0,0214	0,1229
28	22,5	0	22,5	22,5	22,5	1,5251	0,9022	0,3566	0,0036	0,0516	0,2111
29	22,5	22,5	0	22,5	22,5	1,3163	0,6304	0,5540	0,0063	0,0182	0,1074
30	22,5	22,5	22,5	0	22,5	1,4623	0,6751	0,5670	0,0035	0,0386	0,1781
31	18	18	18	18	18	1,3587	0,8153	0,4345	0,0072	0,0229	0,0788
32	18	18	18	18	18	1,3334	0,7820	0,3836	0,0061	0,0274	0,1343
33	18	18	18	18	18	1,3841	0,9317	0,3014	0,0048	0,0298	0,1164
Média						1,2397	0,6622	0,4175	0,0097	0,0304	0,1229
Desvio padrão						0,1966	0,1988	0,1359	0,0182	0,0131	0,1078

Aos rendimentos dos extratos brutos foi aplicado primeiramente o modelo linear. Como este modelo apesar de significativo apresentou falta de ajuste no nível de 95% de confiança, os modelos quadrático e cúbico especial foram ajustados aos dados. Estes foram significativos e não apresentaram falta de ajuste no nível de 95% de confiança, porém o modelo cúbico especial foi o escolhido por apresentar um termo cúbico significativo. A equação para este modelo é apresentada abaixo:

$$\hat{y} = 1,1130e + 0,6660A + 1,1160d + 0,9212a + 1,1645c + 1,4620eA + 2,0956ed + 1,4512ec + 1,2058Ad + 0,9839da - 8,4281eAd$$

$(\pm 0,0682)$ $(\pm 0,0682)$ $(\pm 0,0682)$ $(\pm 0,0682)$ $(\pm 0,0682)$ $(\pm 0,3303)$ $(\pm 0,3303)$
 $(\pm 0,3303)$ $(\pm 0,3303)$ $(\pm 0,3303)$ $(\pm 2,0447)$

onde, \hat{y} = resposta prevista pelo modelo, e = etanol, A = acetato de etila, d = diclorometano, a = acetona, c = clorofórmio e os valores entre parênteses representam os erros padrão dos parâmetros. No restante do trabalho todas as outras equações apresentadas seguirão essa mesma notação para os coeficientes.

Os termos que não apresentaram significância no nível de 95% de confiança foram omitidos da equação. Dessa forma a equação apresenta onze termos significativos.

A análise de variância (ANOVA) para esta regressão é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 – Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos dos extratos brutos da *Mikania laevigata* Sch. Bip.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F
Modelo	1,200421	24	0,050018	10,72127
Resíduos	0,037322	8	0,004665	
Falta de ajuste	0,036037	6	0,006006	9,34629
Erro puro	0,001285	2	0,000643	
Total	1,237743	32	0,038679	

O valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} é 9,34, enquanto o valor da distribuição F com 6 e 2 graus de liberdade é de 19,33 no nível de 95% de confiança. Como o valor de F tabelado no nível de 95% de confiança é maior que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} , não há indicação de

falta de ajuste para o modelo cúbico especial. Além disso, o valor da razão $MQR/MQ_r = 10,72$, é maior se comparada ao valor da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade (24 e 8) que é 3,12 no nível de 95% de confiança, indicando que o modelo é significativo.

O coeficiente de determinação R^2 para este ajuste é calculado pela razão SQR/SQT que é igual a 0,969 e o valor máximo que R^2 poderia explicar é dado por $(SQT - SQ_{ep})/SQT$ que corresponde a 0,998.

Nem sempre, porém, uma regressão dada como significativa pelo teste F é útil para realizar previsões quantitativas. Pode acontecer que a faixa de variação coberta pelos fatores estudados seja pequena demais, fazendo com que o efeito sobre a resposta fique mascarado pela extensão do erro experimental. Uma regra prática empregada é considerar a regressão útil para fins de previsão se o valor de MQR/MQ_r for de pelo menos, cerca de dez vezes o valor do ponto da distribuição F com o número apropriado de graus de liberdade, no nível de confiança escolhido⁴⁷. Neste trabalho todos os valores de MQR/MQ_r calculados não satisfazem essa condição, porém, foi possível fazer um estudo qualitativo e interpretar a equação para determinar o solvente ou misturas de solventes que permite obter o maior rendimento, considerando que o número de graus de liberdade não é suficiente para testar o modelo com cinco componentes por completo.

Analisando os coeficientes da equação verifica-se que nos termos de interação binária há um efeito sinérgico maior entre os solventes etanol e diclorometano, quando comparado aos outros. A equação mostra também que a presença de acetato de etila no solvente extrator deve ser evitada, pois um alto coeficiente de interação cúbica de efeito antagônico entre os solventes etanol, acetato de etila e diclorometano é observado.

A Figura 8a mostra o gráfico dos resíduos versus as respostas dos rendimentos previstas pelo modelo cúbico especial, juntamente com o gráfico das respostas previstas pelas observadas, ou seja, a qualidade do ajuste, Figura 8b. A distribuição é aleatória, não revelando tendências. Na Figura 8b é possível ver claramente que o maior rendimento (1,6657g) é obtido com o solvente de mistura binária de etanol e diclorometano, extrato 7, enquanto que o menor rendimento (0,6646g) é observado para o solvente puro acetato de etila, extrato 2.

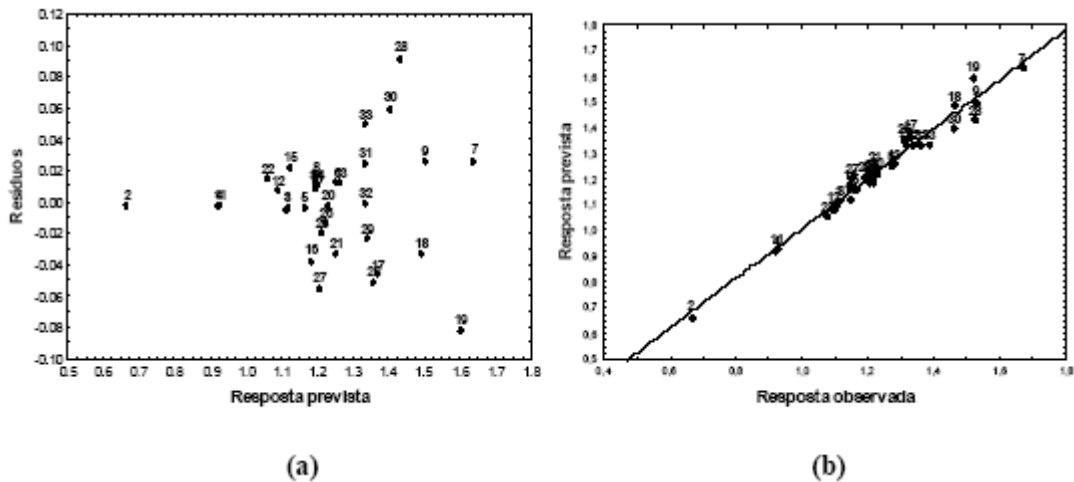


Figura 8 – Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para os rendimentos do extrato bruto.

As curvas de nível para o modelo cúbico especial aplicado aos rendimentos do extrato bruto podem ser vistas na Figura 9, onde os componentes acetato de etila e acetona foram igualados a zero para simplificar e representar em apenas duas dimensões a superfície de resposta.

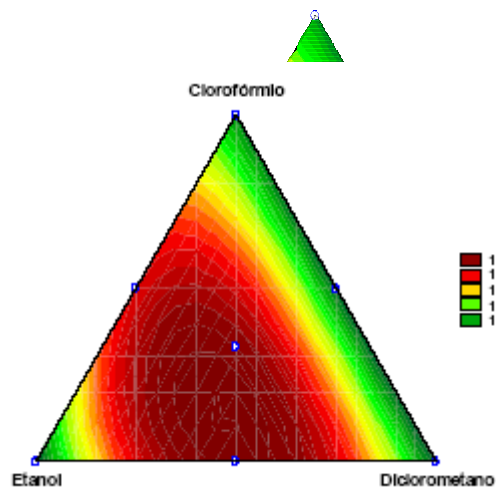


Figura 9 – Superfície de resposta para os componentes etanol, diclorometano e clorofórmio aplicada aos rendimentos do extrato bruto.

Pela inspeção da superfície de resposta pode-se observar que a região de maior rendimento encontra-se localizada no vértice entre etanol e diclorometano na proporção 1:1 ou na mistura ternária entre os três componentes, prevendo um rendimento máximo de 1,600g de extrato.

Aos rendimentos obtidos das frações neutras foram aplicados os modelos linear, quadrático e cúbico especial. Todos os modelos foram significativos e não apresentaram falta de ajuste no nível de 95% de confiança, porém, o modelo cúbico especial foi o escolhido e ajustado aos dados por apresentar um termo cúbico significativo. A equação para este modelo é apresentada abaixo:

$$\hat{y} = 0,2597e + 0,2867A + 0,8439d + 0,3140a + 0,8663c + 9,1807eAa$$

$$(\pm 0,1086) \quad (\pm 0,1086) \quad (\pm 0,1086) \quad (\pm 0,1086) \quad (\pm 0,1086) \quad (\pm 3,2529)$$

A análise de variância (ANOVA) para esta regressão é mostrada na Tabela 5.

O valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} é 2,21, enquanto o valor da distribuição F com 6 e 2 graus de liberdade é de 19,33 no nível de 95% de confiança. Como o valor de F tabelado no nível de 95% de confiança é maior que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} , não há indicação de falta de ajuste para o modelo cúbico especial. Além disso, o valor da razão $MQ_R/MQ_r = 4,13$, é maior se comparada ao valor da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade (24 e 8) que é 3,12 no nível de 95% de confiança, indicando que o modelo é significativo.

Tabela 5 – Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos das frações neutras obtidas após o fracionamento dos extratos brutos.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F
Modelo	1,170400	24	0,048767	4,130138
Resíduos	0,094460	8	0,011808	
Falta de ajuste	0,082104	6	0,013684	2,214963
Erro puro	0,012356	2	0,006178	
Total	1,264860	32	0,039527	

O coeficiente de determinação R^2 para este ajuste é calculado pela razão SQ_R/SQ_T que é igual a 0,925 e o valor máximo que R^2 poderia explicar é dado por $(SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$ que corresponde a 0,99.

A equação mostra a existência de seis termos significativos, ou seja, que possuem coeficientes com valores mais altos em relação ao erro padrão. A composição do solvente extrator deve conter maior quantidade de uma mistura ternária entre os componentes etanol, acetato de etila e acetona devido a presença de uma forte sinergia. Analisando os

coeficientes lineares verifica-se que os solventes puros diclorometano e clorofórmio apresentam valores maiores quando comparado aos outros.

A Figura 10a mostra que os resíduos deixados pelo ajuste estão distribuídos aleatoriamente, garantindo que não possui nenhuma tendência nos resultados. Na figura 10b observa-se que o extrato de número 19, obtido com a mistura ternária entre os solventes etanol, diclorometano e clorofórmio, está entre as maiores respostas previstas.

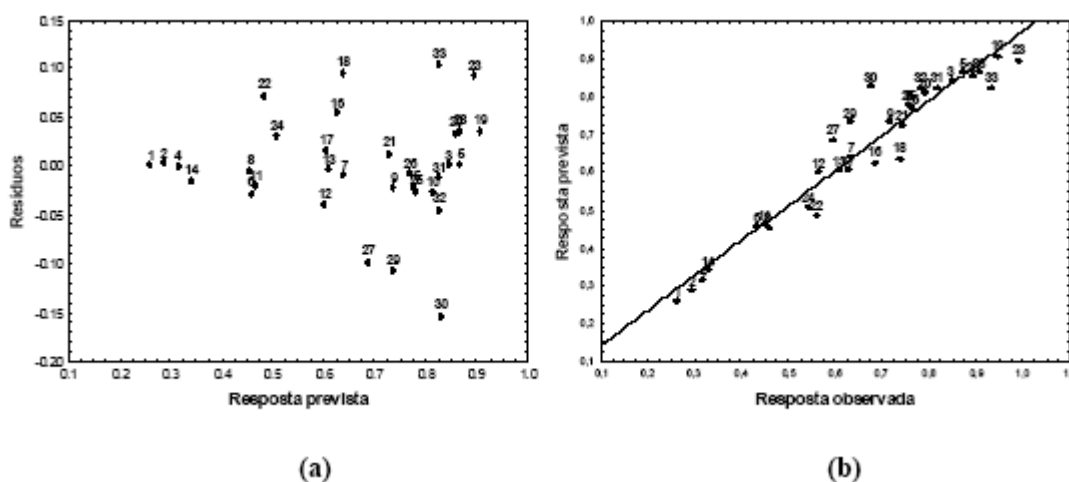


Figura 10 – Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para o rendimento das frações neutras.

As curvas de nível para o modelo cúbico especial aplicado aos rendimentos da fração neutra pode ser vista na Figura 11, onde os componentes acetato de etila e acetona foram igualados zero para simplificar e representar em apenas duas dimensões a superfície de resposta. O valor máximo para o rendimento da fração neutra é obtido com uma mistura ternária entre os solventes etanol, diclorometano e clorofórmio, extrato 19.

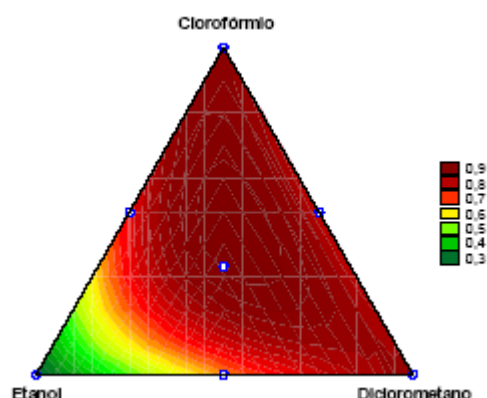


Figura 11 – Superfície de resposta para os componentes; etanol, diclorometano e clorofórmio aplicada aos rendimentos das frações neutras obtidas no fracionamento dos extratos brutos.

Aos rendimentos obtidos das frações orgânicas foram aplicados os modelos linear, quadrático e cúbico especial. O modelo linear foi significativo e não apresentou falta de ajuste no nível de 95% de confiança, enquanto que para o modelo cúbico especial isso foi verificado apenas no nível de 90%. A presença de um termo cúbico significativo fez com que o modelo cúbico especial fosse escolhido e ajustado aos dados. A equação para este modelo é apresentada abaixo:

$$\hat{y} = 0,5886e + 0,3022A + \mathbf{0,1659d} + 0,5629a + 0,2365c - 9,1529eAa$$

$$(\pm 0,0910) (\pm 0,0910) (\pm 0,0910) (\pm 0,0910) (\pm 0,0910) (\pm 2,7266)$$

onde, o termo em negrito para o solvente diclorometano apesar de não ser significativo é mostrado na equação, no restante do trabalho será apresentado todos os termos lineares, sendo eles significativos ou não.

A análise de variância (ANOVA) para esta regressão é mostrada na Tabela

6.

Tabela 6 – Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos das frações orgânicas obtidas com o fracionamento dos extratos brutos.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F
Modelo	0,525309	24	0,021888	2,638498
Resíduos	0,066365	8	0,008296	
Falta de ajuste	0,057344	6	0,009557	2,118872
Erro puro	0,009021	2	0,004511	
Total	0,591674	32	0,018490	

O valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} é 2,11, enquanto o valor da distribuição F com 6 e 2 graus de liberdade é de 9,33 no nível de 90% de confiança. Como o valor de F tabelado no nível de 90% de confiança é maior que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} , não há indicação de falta de ajuste para o modelo cúbico especial. Além disso, o valor da razão $MQ_R/MQ_r = 2,63$ é maior se comparada ao valor da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade (24 e 8) que é 2,40 no nível de 90% de confiança, indicando que o modelo é significativo.

O coeficiente de determinação R^2 para este ajuste é calculado pela razão SQ_R/SQ_T que é igual a 0,887 e o valor máximo que R^2 poderia explicar é dado por $(SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$ que corresponde a 0,984.

A equação mostra a existência de cinco termos significativos. Os termos lineares correspondentes aos solventes etanol e acetona são maiores quando comparado em relação aos outros. Um alto coeficiente de interação antagônica de mistura ternária entre os solventes etanol, acetato de etila e acetona é observado.

A Figura 12a mostra os resíduos deixados pelo ajuste versus as respostas previstas pelo modelo cúbico especial, juntamente com o gráfico das respostas previstas pelas observadas, Figura 12b. A distribuição dos resíduos não revela tendências. Pela Figura 12b é possível observar que o extrato de número 20 encontra-se entre as posições de menores respostas observadas e previstas. A maior resposta prevista é observada para os extratos de número 6 e 18, que apresentou um rendimento de 0,6928g e 0,5650g respectivamente, conforme observado na Tabela 3.

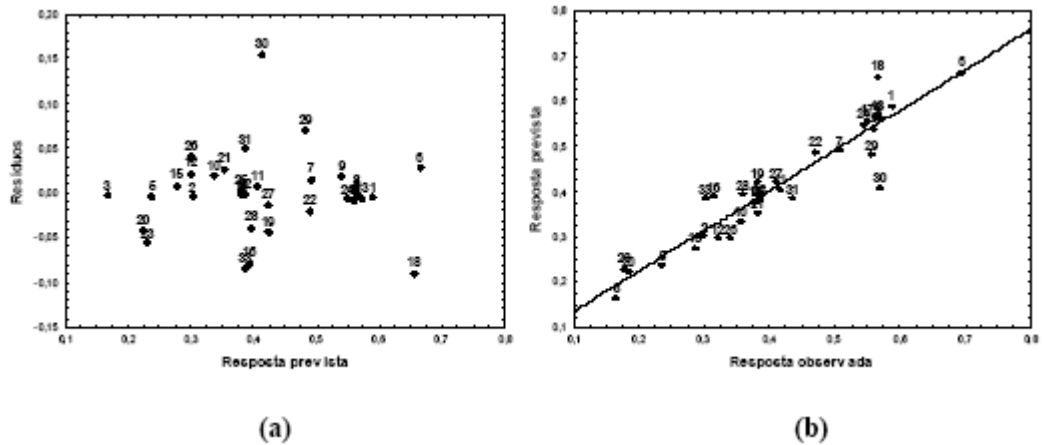


Figura 12 – Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para o rendimento das frações orgânicas.

As curvas de nível para o modelo cúbico especial aplicado aos rendimentos das fração orgânica pode ser vista na Figura 13, onde os componentes da mistura diclorometano e acetona foram igualados a zero para simplificar e representar em apenas duas dimensões a superfície de resposta.

Pela inspeção da superfície de resposta observa-se que o maior rendimento previsto para a fração orgânica (0,7000g) está localizado na região da mistura ternária 70% etanol, 20% acetato de etila e 10% clorofórmio.

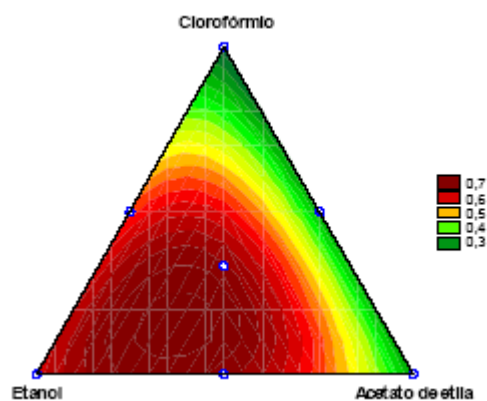


Figura 13 – Superfície de resposta para os componentes etanol, acetato de etila e clorofórmio aplicada aos rendimentos da fração orgânica.

Aos rendimentos obtidos das frações básicas foram aplicados os modelos linear, quadrático e cúbico especial. Todos foram significativos nos níveis de 90% e 95% de confiança, porém todos apresentaram falta de ajuste.

Uma forma escolhida para interpretar os resultados foi montar a figura do planejamento de misturas substituindo os valores experimentais em seus respectivos lugares, como pode ser visto na Figura 14.

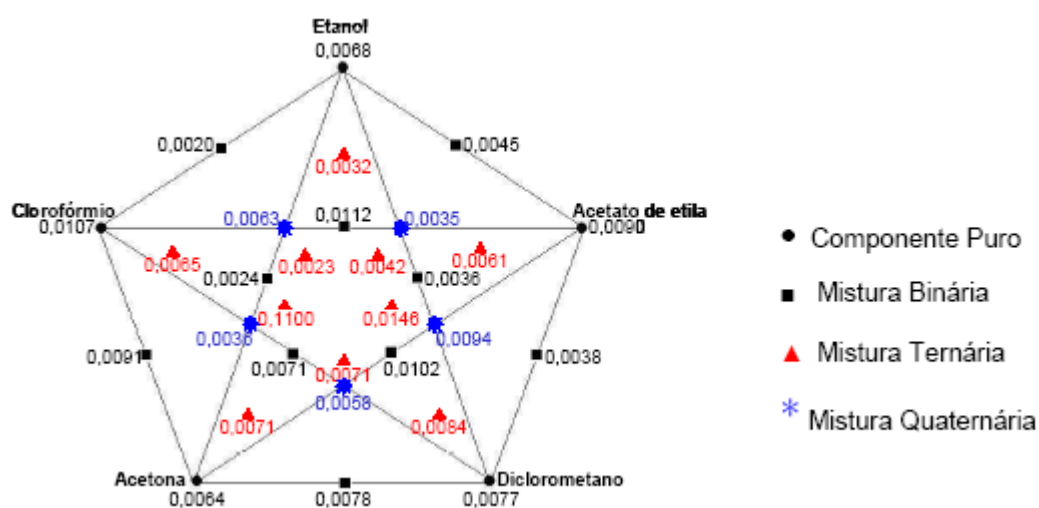


Figura 14 – Planejamento de misturas Centróide-Simplex com os valores dos rendimentos das frações básicas obtidas com fracionamento dos extratos brutos.

É possível observar que dos cinco solventes puros o clorofórmio é o extrator que permitiu o maior rendimento da fração básica, além de apresentar um efeito de interação sinérgico com o solvente acetato de etila. Há também dois efeitos de interações sinérgicos significativos, um na mistura ternária, composta pelos solventes clorofórmio, acetato de etila e acetona (0,0011g) e outro na mistura binária, composta por acetato de etila e acetona (0,0102g).

Aos rendimentos das fibras foi aplicado o modelo linear, mas como este não foi significativo no nível de 95% de confiança os modelos quadrático e cúbico especial foram testados aos dados. O modelo quadrático foi o escolhido por ser o único significativo no nível de 95% de confiança. A equação para este modelo é apresentada abaixo:

$$\hat{y} = 0,0175e + 0,0321A + 0,0210d + 0,0498a + 0,0348c + 0,1068ed - 0,1060ea$$

$(\pm 0,0102)$ $(\pm 0,0102)$ $(\pm 0,0102)$ $(\pm 0,0102)$ $(\pm 0,0102)$ $(\pm 0,0412)$ $(\pm 0,0412)$

onde, os termos em negrito representam os valores não significativos.

A análise de variância (ANOVA) para esta regressão é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7 – Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático aos rendimentos das fibras obtidas com o fracionamento dos extratos brutos da *Mikania laevigata* Sch. Bip.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F
Modelo	0,003551	14	0,000254	2,29558
Resíduos	0,001989	18	0,000110	
Falta de ajuste	0,001964	16	0,000123	10,00619
Erro puro	0,000025	2	0,000012	
Total	0,005540	32	0,000173	

O valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} é 10,00, enquanto o valor da distribuição F com 16 e 2 graus de liberdade é de 19,43 no nível de 95% de confiança. Como o valor de F tabelado no nível de 95% de confiança é maior que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} , não há indicação de falta de ajuste para o modelo cúbico especial. Além disso, o valor da razão $MQR/MQ_r = 2,29$, é igual se comparada ao valor da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade (14 e 18) que é 2,29 no nível de 95% de confiança, indicando que o modelo é significativo.

O coeficiente de determinação R^2 para este ajuste é calculado pela razão SQR/SQT que é igual a 0,640 e o valor máximo que R^2 poderia explicar é dado por $(SQT - SQ_{ep})/SQT$ que corresponde a 0,99.

A equação mostra que os coeficientes lineares apresentam valores próximos um dos outros. Há também entre os coeficientes de interação binária um de efeito sinérgico com os solventes etanol e diclorometano, e outro de efeito antagonico com os solventes etanol e acetona. Pela Tabela 3, pode-se verificar que o extrato de número 8 preparado com os solventes etanol e acetona na proporção 1:1 apresentou o menor rendimento (0,0123g).

A Figura 15a mostra os resíduos deixados pelo ajuste versus as respostas previstas pelo modelo quadrático, juntamente com o gráfico das respostas previstas pelas

observadas

Figura 15b. A distribuição dos resíduos não revela tendências. Através da Figura 15b é possível observar que o maior rendimento (0,584g) é dado pelo extrato 14, preparado com uma mistura binária de acetona e clorofórmio. O extrato 8 apresentou tanto a menor resposta prevista quanto a observada.

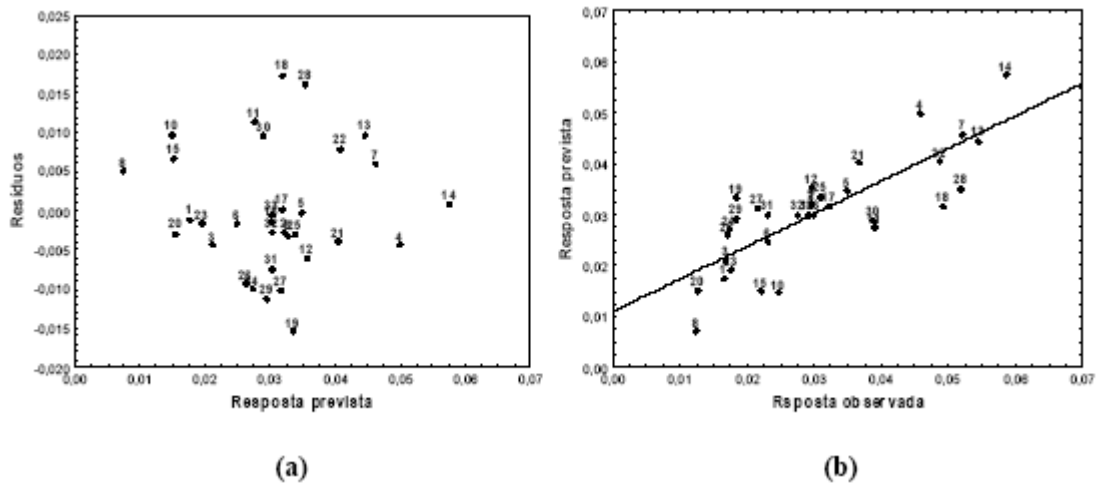


Figura 15 – Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo quadrático e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para o rendimento das fibras.

As curvas de nível para o modelo quadrático aplicado aos rendimentos das fibras pode ser vista na Figura 16, onde os componentes acetato de etila e etanol foram igualados a zero para simplificar e representar em apenas duas dimensões a superfície de resposta.

Pela análise da superfície de resposta observa-se que o maior rendimento para as fibras encontra-se localizado no vértice entre os solventes acetona e clorofórmio.

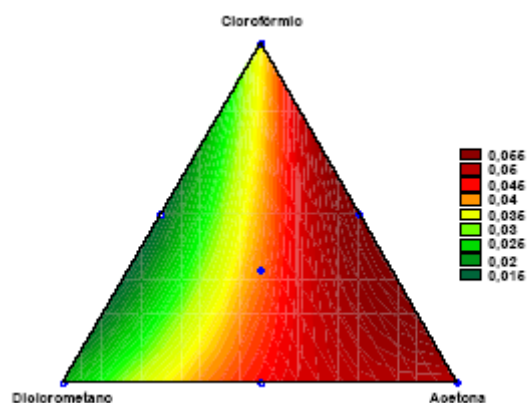


Figura 16 – Superfície de resposta para os componentes; diclorometano, acetona e clorofórmio, aplicada aos rendimentos das fibras.

Aos resíduos, ou seja, a parte não solúvel do fracionamento, foram aplicados os modelos linear, quadrático e cúbico especial. Todos os modelos foram significativos e não apresentaram falta de ajuste no nível de 95% de confiança, porém, devido à presença de um termo de interação cúbico significativo no modelo cúbico especial, este foi o escolhido e ajustado aos dados. A equação para este modelo é apresentada abaixo:

$$\hat{y} = 0,2411e + \mathbf{0,0389A} + \mathbf{0,0813d} - \mathbf{0,0078a} + \mathbf{0,0162c} \\ (\pm 0,0737) (\pm 0,0737) (\pm 0,0737) (\pm 0,0737) (\pm 0,0737) \\ + 1,1783ed + 1,5988ac - 5,5433Adc \\ (\pm 0,3568) (\pm 0,3568) (\pm 2,2086)$$

onde, os termos em negrito representam os valores não significativos.

A análise de variância (ANOVA) para esta regressão é mostrada na Tabela 8. O valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} é 8,71, enquanto o valor da distribuição F com 6 e 2 graus de liberdade é de 9,33 no nível de 90% de confiança. Como o valor de F tabelado no nível de 90% de confiança é maior que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} , não há indicação de falta de ajuste para o modelo cúbico especial. Além disso, o valor da razão $MQ_R/MQ_r = 2,51$ é maior se comparada ao valor da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade (24 e 8) que é 2,40 no nível de 90% de confiança, indicando que o modelo é significativo.

O coeficiente de determinação R_2 para este ajuste é calculado pela razão SQ_R/SQ_T que é igual a 0,88 e o valor máximo que R_2 poderia explicar é dado por $(SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$ que corresponde a 0,995.

Tabela 8 – Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aos rendimentos dos resíduos obtidos através do cálculo da diferença da massa do extrato bruto com a soma de todas as massas das outras frações.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F
Modelo	0,328503	24	0,013688	2,514559
Resíduos	0,043547	8	0,005443	
Falta de ajuste	0,041942	6	0,006990	8,711736
Erro puro	0,001605	2	0,000802	
Total	0,372049	32	0,011627	

A equação mostra que entre os termos lineares apenas o coeficiente do solvente etanol é significativo no nível de 95% de confiança. Há dois termos de interação binária de efeito sinérgico, um entre o etanol e diclorometano e o outro entre acetona e clorofórmio. Pela Tabela 3 verifica-se que os maiores valores de resíduos são para estas duas misturas binárias, extratos 7 e 14 respectivamente. A equação mostra também um termo de interação antagônico entre os solventes acetato de etila, diclorometano e clorofórmio, representado pelo extrato 23.

A Figura 17a mostra os resíduos deixados pelo ajuste versus as respostas previstas pelo modelo cúbico especial, juntamente com o gráfico das respostas previstas pelas observadas, Figura 17b. A distribuição dos resíduos não revela tendências. Na Figura 17b é possível observar que os extratos 7 e 14 encontram-se na posição de maior resposta prevista e observada, confirmando os termos da equação.

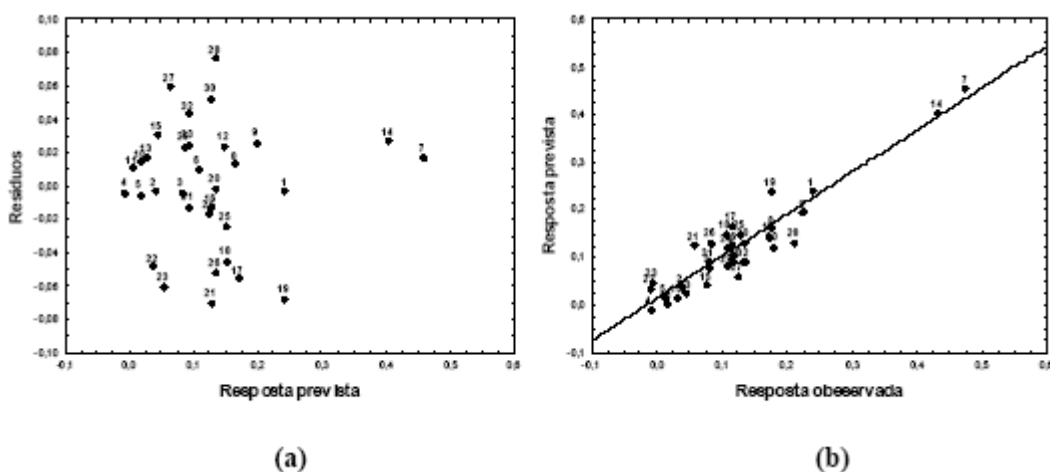


Figura 17 – Gráficos (a) dos resíduos deixados pelo ajuste do modelo cúbico especial e (b) das respostas previstas pelas respostas observadas para os resíduos.

As curvas de nível para o modelo cúbico especial aplicado aos dados pode ser vista na Figura 18. Nesta, observa-se que a maior quantidade de resíduo é encontrada para a mistura dos solventes etanol e diclorometano.

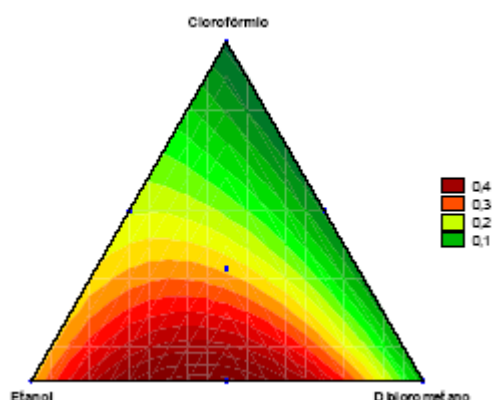


Figura 18 – Superfície de resposta para os componentes etanol, acetato de etila e clorofórmio aplicada aos resíduos.

4.2 RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A segunda etapa do trabalho teve como objetivo comparar a influência da composição do meio extrator bem como da fase móvel na qualidade da impressão digital cromatográfica dos metabólitos secundários da planta *Mikania laevigata*. Sendo assim, a fim de obter um perfil cromatográfico bem informativo (maior número de picos) e investigar possíveis discriminações na composição química, as frações orgânica e básica obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos foram submetidas às análises cromatográficas.

Foram testadas três fases móveis de forças cromatográficas distintas, Tabela 9, selecionadas de acordo com o triângulo proposto por Snyder²³.

Tabela 9 – Composição e força das fases móveis testadas nas análises cromatográficas das frações orgânica e básica.

Fase	Composição	Força
Fase A	65% água; 17,5% metanol; 17,5% acetonitrila	1,00
Fase B	47% água; 27% metanol; 26% acetonitrila	1,50
Fase C	30% água; 35% metanol; 35% acetonitrila	2,00

A técnica empregada foi a cromatografia em fase reversa, sendo utilizado como eluente em todas as fases móveis a água. Como modificadores orgânicos utilizou-se o metanol e acetonitrila, que com base nos dados apresentados na literatura, foi possível

calcular a força do solvente (S) das fases testadas, por meio da seguinte equação:

$$S = \sum S_i \phi_i$$

onde, $\sum S_i$ representa a somatória do produto da força do solvente puro, água ($S_i = 0$), metanol ($S_i = 2,6$), acetonitrila ($S_i = 3,1$) e ϕ_i = fração de volume.

A Figura 19 mostra o número de picos obtidos para as 33 frações orgânicas analisadas nas fases móveis A, B e C.

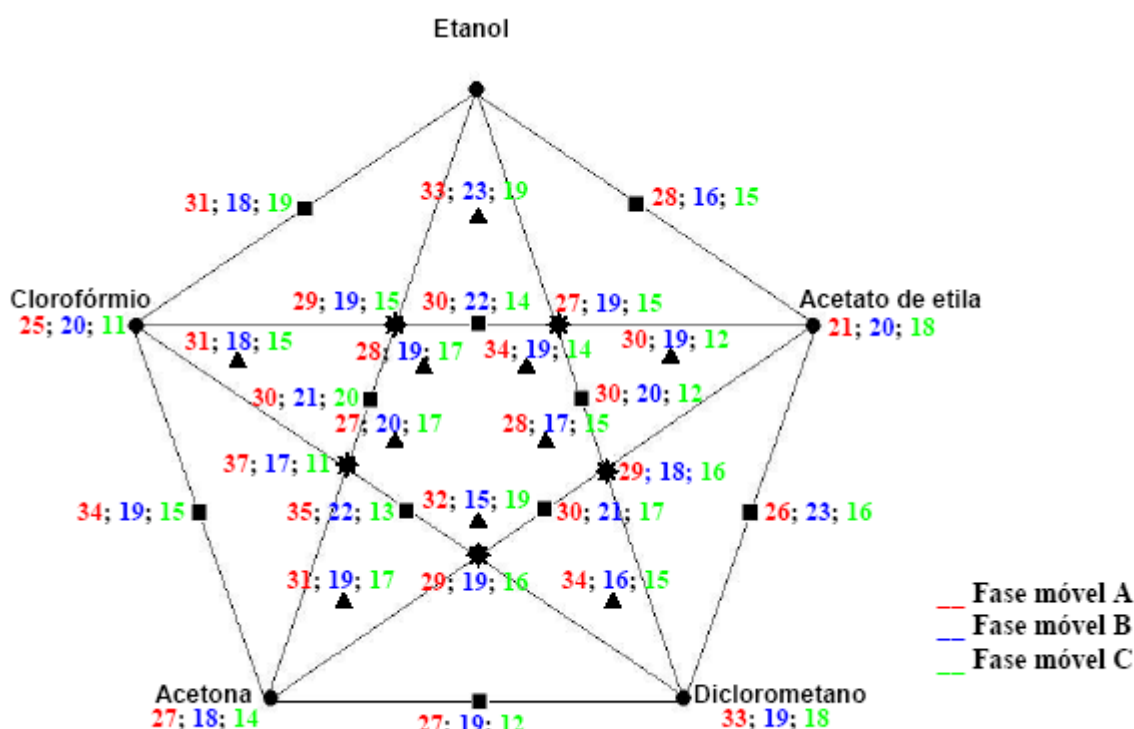


Figura 19 – Planejamento experimental Centróide-Simplex com os valores dos números de picos obtidos nas análises cromatográficas das frações orgânicas com as fases móveis A, B e C.

Observa-se que o aumento da força da fase móvel diminui o número de picos cromatográficos, porém esta diminuição não tem relação com o rendimento das frações.

Analisando o número de picos obtidos durante as análises cromatográficas com a fase móvel A, Figura 19, e de acordo com a Tabela 3, observa-se que a maior quantidade em massa obtida para a fração orgânica (0,6928g) é com uma mistura binária entre os solventes etanol e acetato de etila, extrato 6, que extraiu 28 substâncias ou misturas de substâncias químicas, enquanto que a maior diversidade de compostos químicos (37 picos), foi obtida com uma mistura quaternária entre os solventes etanol, diclorometano, acetona e

clorofórmio, extrato 28, que apresentou um rendimento de apenas 0,3566g.

Dentre os solventes puros, o menor rendimento (0,1644g) foi obtido para o extrato 3, preparado com diclorometano, porém este extraiu a maior variedade de compostos químicos (33 picos). Isto indica que um alto rendimento da fração orgânica não garante uma grande diversidade de compostos químicos extraídos.

A Figura 20 mostra o número de picos obtidos para as 33 frações básicas analisadas nas fases móveis A, B e C.

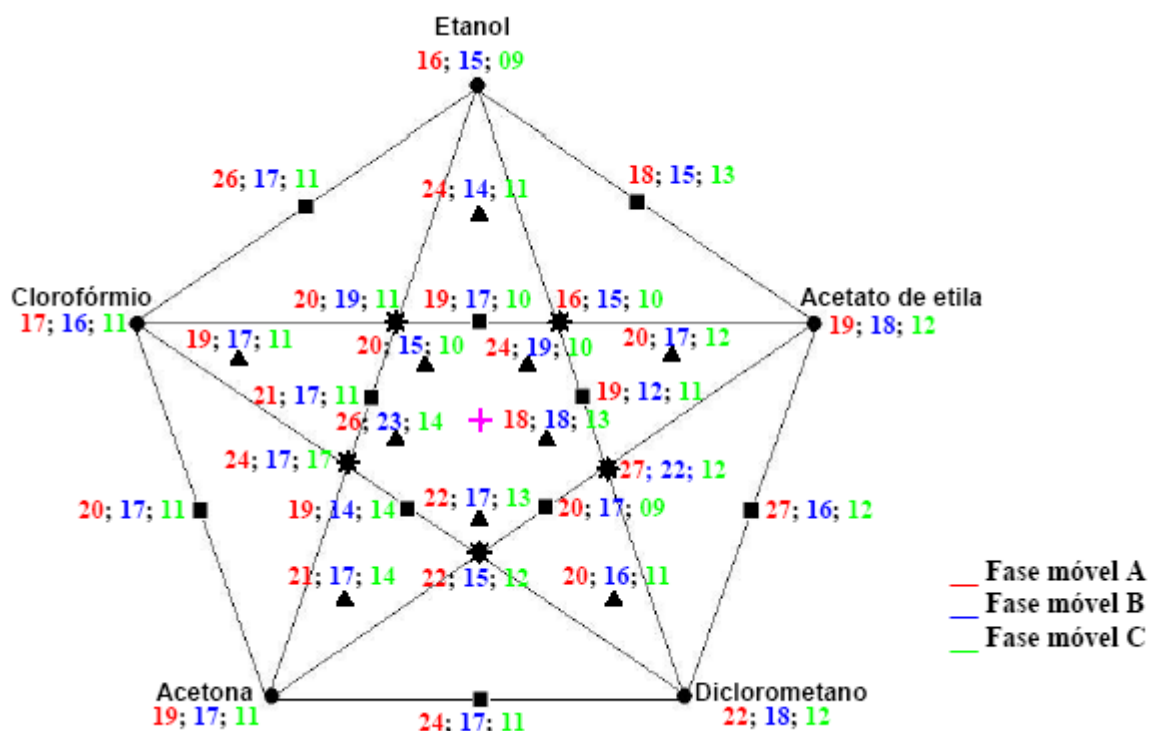


Figura 20 – Planejamento experimental Centróide-Simplex com os valores dos números de picos obtidos nas análises cromatográficas das frações básicas com as fases móveis A, B e C.

O número de picos obtidos nas frações básicas é menor do que nas frações orgânicas, ou seja, a fração orgânica possui maior diversidade de compostos químicos extraídos.

Observa-se novamente que o aumento da força da fase móvel diminui o número de picos cromatográficos, porém esta diminuição não tem relação com o rendimento das frações.

Analisando o número de picos obtidos durante as análises cromatográficas

com a fase móvel A, Figura 20, e de acordo com a Tabela 3, observa-se que a maior quantidade em massa obtida para a fração básica (0,0146g) é com uma mistura ternária entre os solventes acetato de etila, diclorometano e clorofórmio, extrato 23, que extraiu 18 substâncias ou mistura de substâncias, enquanto que a maior diversidade de compostos químicos (27 picos), foi obtida com uma mistura binária entre os solventes acetato de etila e diclorometano, extrato 10, e com uma mistura quaternária entre os solventes etanol, acetato de etila, diclorometano e acetona, extrato 26, que apresentaram um rendimento de 0,0038g e 0,0094g respectivamente.

Dentre os solventes puros, o clorofórmio apresentou o maior rendimento (0,0107g), com 17 picos, porém a maior variedade de compostos químicos extraídos (22 picos) foi com o diclorometano que apresentou um rendimento de apenas 0,0077g.

Na seqüência, a fim de identificar substâncias específicas do material vegetal e investigar possíveis discriminações na composição química das diferentes frações, realizou-se um estudo exploratório dos dados cromatográficos obtidos com a fase móvel A, por ser a que apresentou maior informação química, ou seja, o maior número de picos.

A Figura 21 mostra os cromatogramas das 33 frações básicas da planta *Mikania laevigata* obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos. Nesta, observa-se a influência da composição do sistema extrator na concentração dos compostos químicos, principalmente nos tempos de retenção próximos a 2,7; 3,5; 4,3 e 15,5 min. A Figura mostra também que a intensidade desses quatro picos cromatográficos depende da composição do solvente extrator.

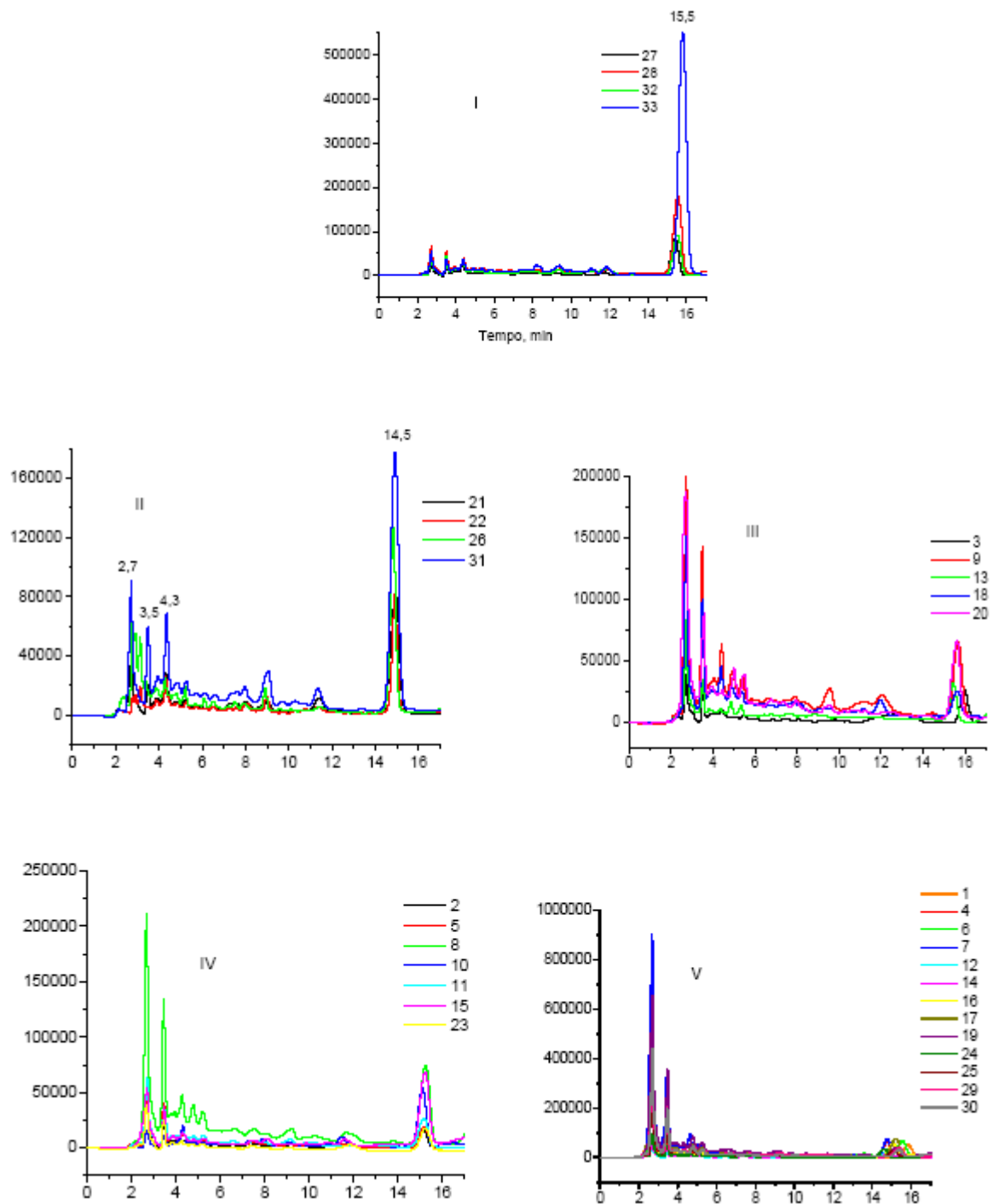


Figura 21 – Cromatogramas das 33 frações básicas da planta *Mikania laevigata* obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.

O conjunto dos dados original desses cromatogramas foi transformado em uma matriz de dimensão 33x1434 (33 amostras/cromatogramas por 1434 variáveis/alturas dos picos), correspondente ao tempo de retenção de 17 minutos. Essa matriz foi submetida ao pré-processamento por comprimento de vetor para neutralizar as variações causadas pela

quantidade de amostra injetada e em seguida submetida à análise de componentes principais.

No restante do trabalho todos os dados obtidos por HPLC, UV-VIS e FTIR foram normalizados por comprimento de vetor.

A Figura 22 representa o gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3. Neste é possível observar a formação de cinco grupos e dois subgrupos dentro do grupo V.

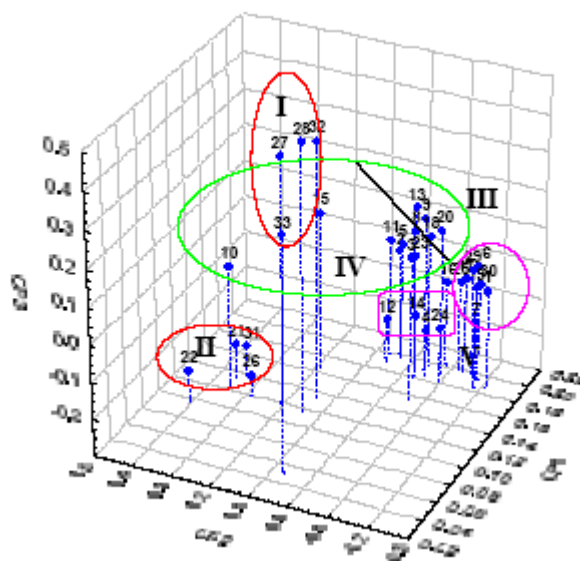


Figura 22 – Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 33 frações básicas da planta *Mikania laevigata*.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 88,95% da variância total contida nos dados e embora a CP1 explique sozinha 69,83% da variância, a melhor discriminação dos grupos pôde ser verificada na projeção das CP2 e CP3, Figura 23. A CP2 consegue discriminar com 10,39% de variância os grupos I, II e IV, localizados na região positiva, dos grupos III e V, na região negativa. A CP3 com apenas 8,73% de variância consegue discriminar o grupo I dos grupos III e IV, localizados na região positiva, enquanto os grupos II e V estão localizados na região negativa.

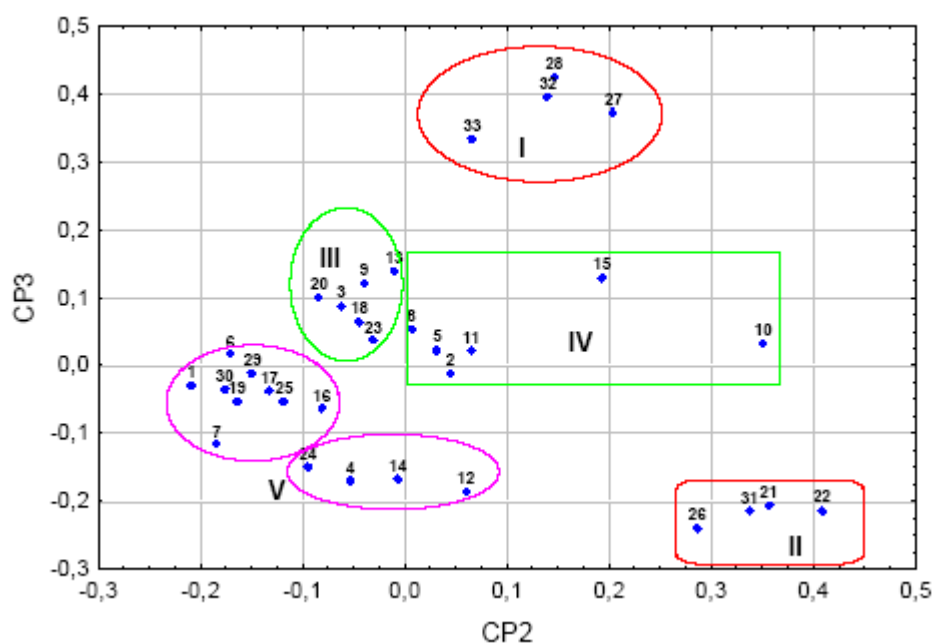


Figura 23 – Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 33 frações básicas da planta *Mikania laevigata*.

Os loadings das CP1, CP2 e CP3 estão apresentados na Figura 24. Esta Figura mostra que todos os valores dos loadings da CP1 são positivos, enquanto que para a CP2 e CP3 é possível observar picos em regiões positivas e negativas.

Nos loadings da CP1 os valores mais altos correspondem às substâncias com tempos de retenção em 2,4 e 3,0 min. Isto indica que as amostras dos grupos I e II, alocadas na parte menos positiva da CP1 (Figura 22), sofrem menor influência das variáveis com valores mais altos de loadings, ou seja, possuem menores quantidades da substância ou misturas de substâncias extraídas nos tempos de retenção em 2,4 e 3,0 min.

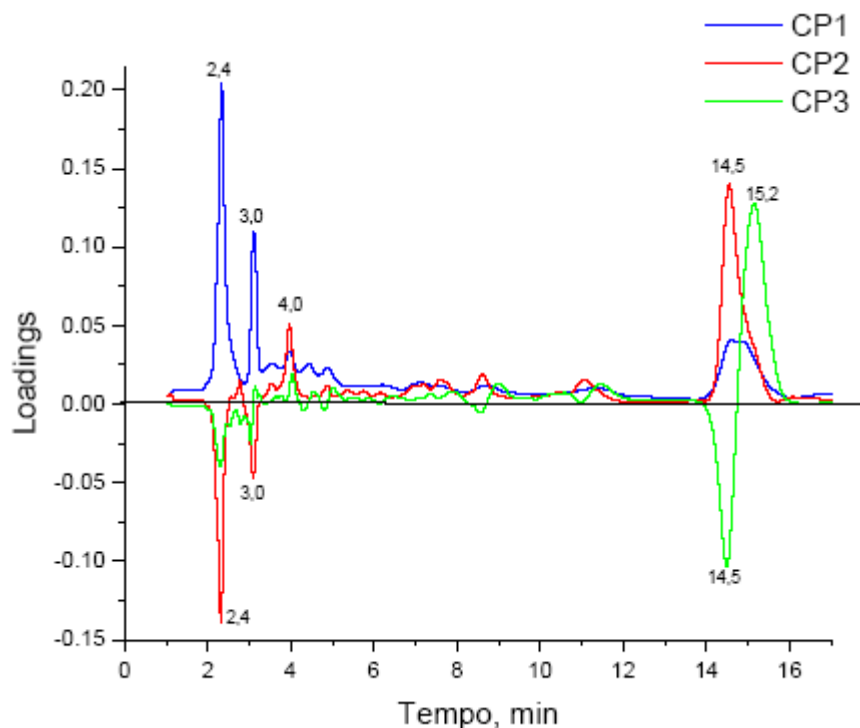


Figura 24 – Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados cromatográficos das 33 frações básicas da *Mikania laevigata*.

Os loadings da CP2 mostram que as amostras dos grupos III e V, que possuem valores de escores negativos (Figura 23), sofrem maior influência das variáveis que apresentam valores negativos de loadings, ou seja, são especialmente caracterizadas pelos tempos de retenção 2,4 e 3,0 min. Já as amostras do grupo II, com valores de escores mais positivos, possuem uma maior quantidade das substâncias extraídas no tempo de retenção em 14,5 min, com valor de loading positivo.

Nos loadings da CP3 a variável que discrimina as amostras dos grupos I, III e IV, que possuem valores de escores positivos, é a substância ou mistura de substâncias extraída no tempo de retenção em 15,2 min. As amostras dos grupos II e V, com valores de escores negativos sofrem maior influência da variável com tempo de retenção em 14,5 min que apresenta valor de loading negativo.

Para confirmar os resultados da análise de componentes principais, a análise hierárquica de agrupamentos foi aplicada aos dados cromatográficos das 33 frações básicas. O dendrograma obtido pelo conjunto de 33 amostras e 1434 valores de altura dos picos cromatográficos está representado na Figura 25, onde pode ser observado no valor de distância Euclidiana de 1,5 os mesmos grupos formados na análise de componentes principais, Figura 22.

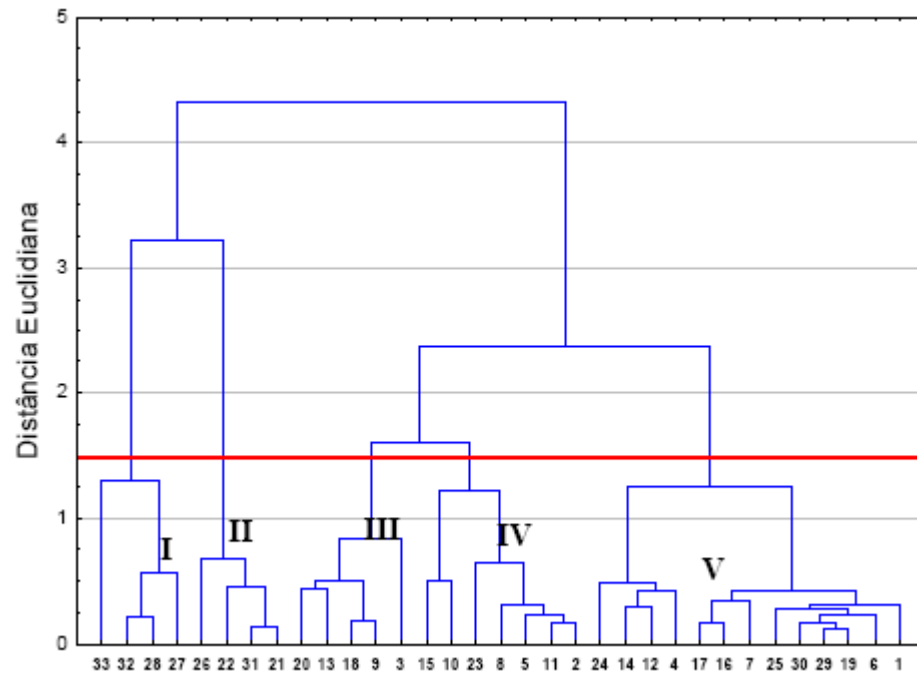


Figura 25 – Dendrograma baseado nos dados cromatográficos das 33 frações básicas da planta *Mikania laevigata*.

A Figura 26 mostra os cromatogramas com tempo de retenção no intervalo de 0 á 17 mim, das 33 frações orgânicas da planta *Mikania laevigata* obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.

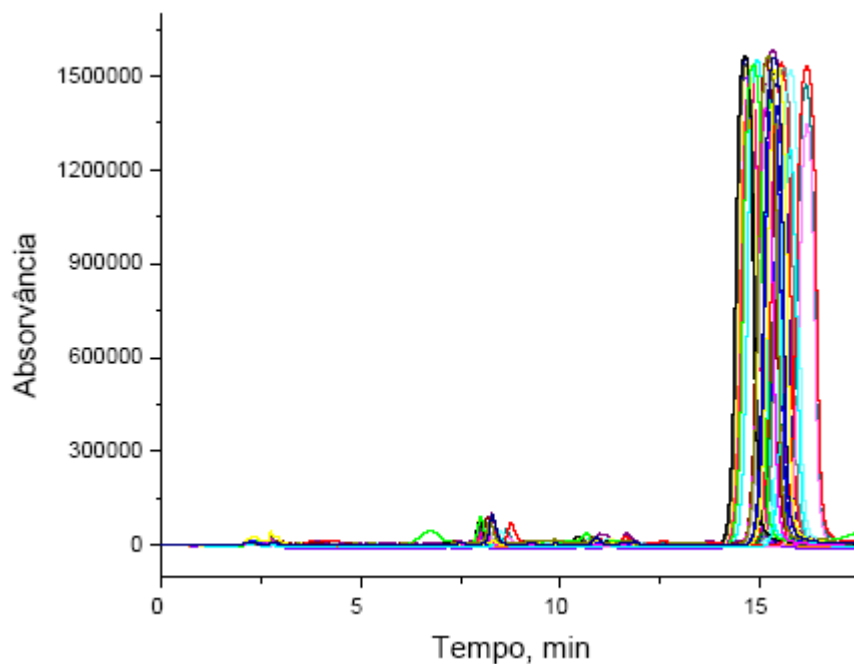


Figura 26 – Cromatogramas com tempo de retenção no intervalo de 0 á 17 mim, das 33 frações orgânicas da planta *Mikania laevigata* obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.

Analisando essa Figura, observa-se que a presença de um pico muito intenso no tempo de retenção de aproximadamente 15 min oculta os outros picos.

A Figura 27 mostra o gráfico dos loadings das CP1 e CP3. Esta Figura confirma que o pico de maior influência, responsável para a discriminação das amostras está em torno de 15 min. Sendo assim, na análise exploratória dos dados foram utilizadas as informações cromatográficas nos tempos de 1,5 à 14 min, Figura 28.

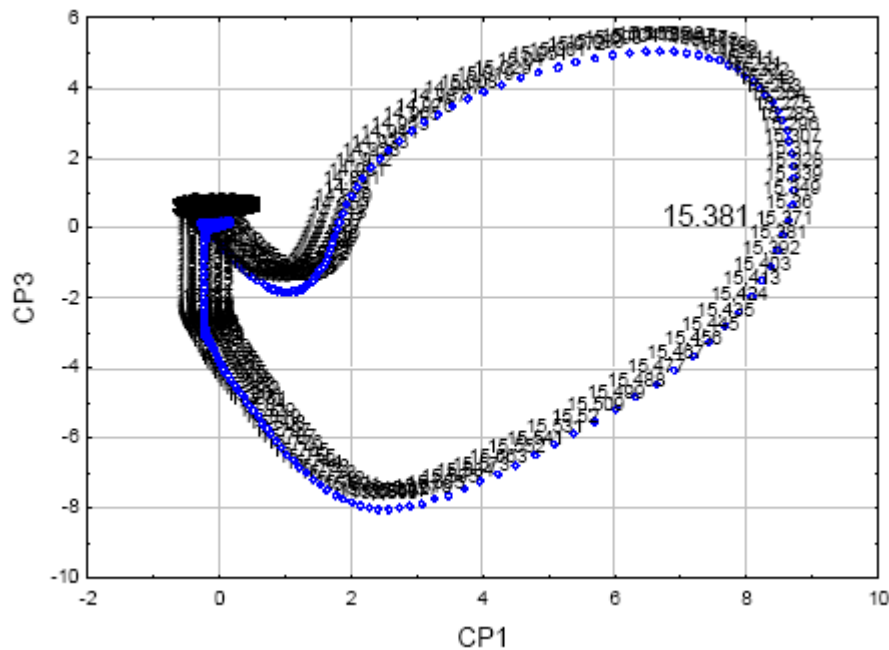


Figura 27 – Gráfico dos loadings das CP1 e CP3 para os dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da *Mikania laevigata*.

Na Figura 28, observa-se a influência da composição do sistema extrator na concentração dos compostos químicos, principalmente nos tempos de retenção próximos a 2,3; 2,7; 8,2; 10,9 e 11,5 min.

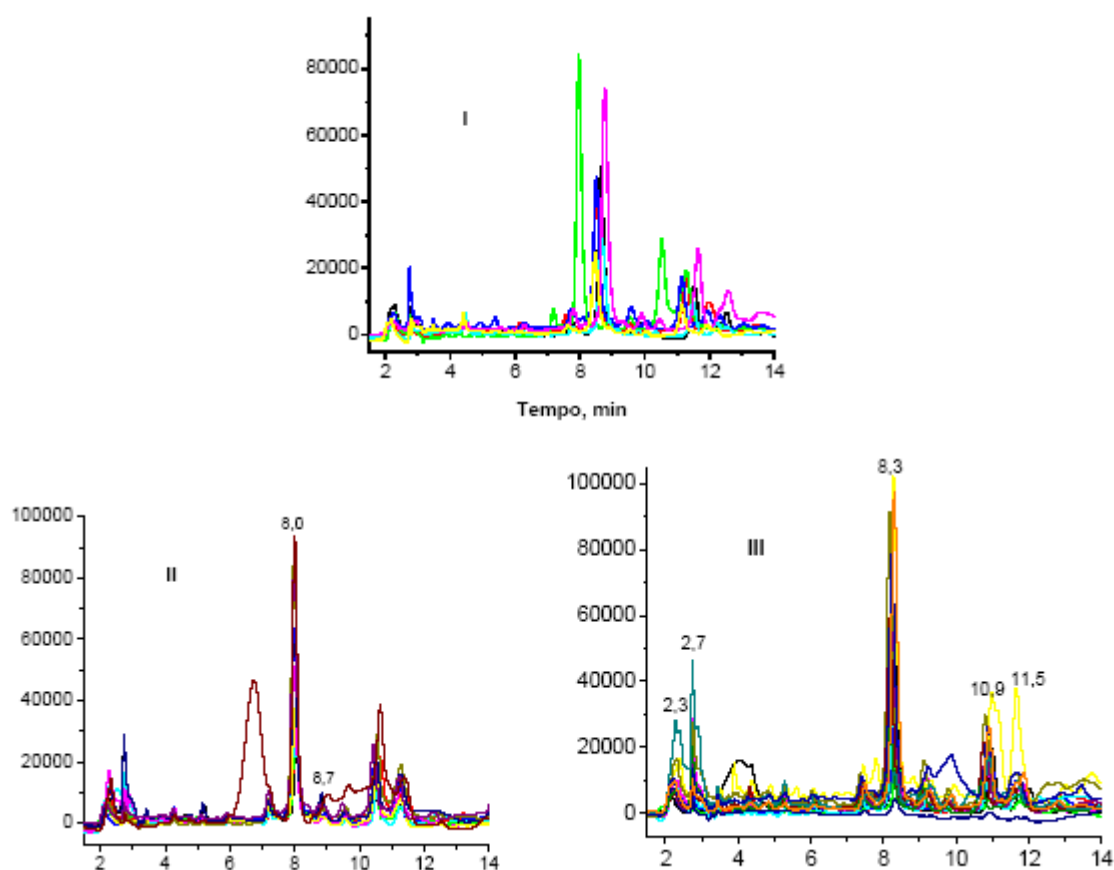


Figura 28 – Cromatogramas com tempo de retenção no intervalo 1,5 á 14 mim, das 33 frações rgânicas da planta *Mikania laevigata* obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.

Para a análise de componentes principais das frações orgânicas, o conjunto dos dados original desses cromatogramas foi transformado em uma matriz de dimensão 33x1172 (33 amostras/cromatogramas por 1172 variáveis/alturas dos picos), correspondente ao tempo de retenção de 14 minutos.

A Figura 29 representa o gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3. Neste é possível observar a formação de três grupos.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 77,23% da variância total contida nos dados e embora a CP1 explique sozinha 50,42% da variância, a melhor discriminação dos grupos pôde ser verificada na projeção das CP2 e CP3, Figura 30. A CP2 consegue discriminar com 17,76% de variância os grupos I e III, localizados na região positiva, do grupo II na região negativa. A CP3 com apenas 9,09% de variância consegue discriminar o grupo I, localizado na região positiva.

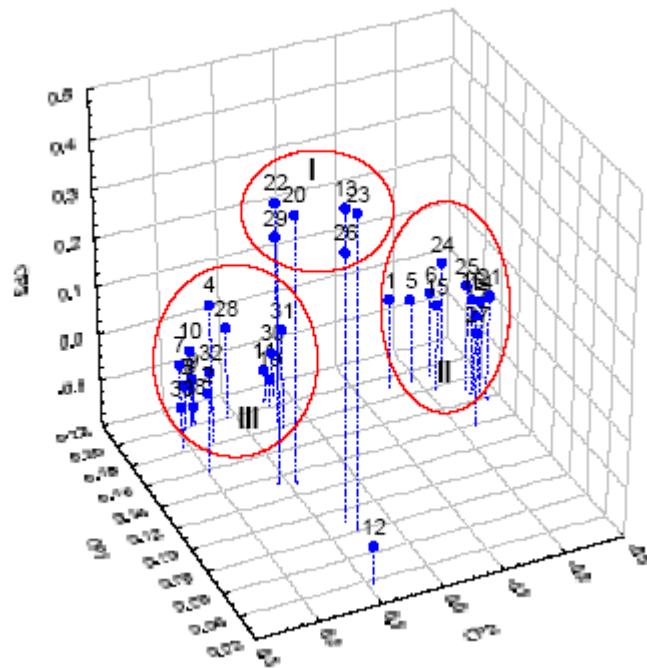


Figura 29 – Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da planta *Mikania laevigata*.

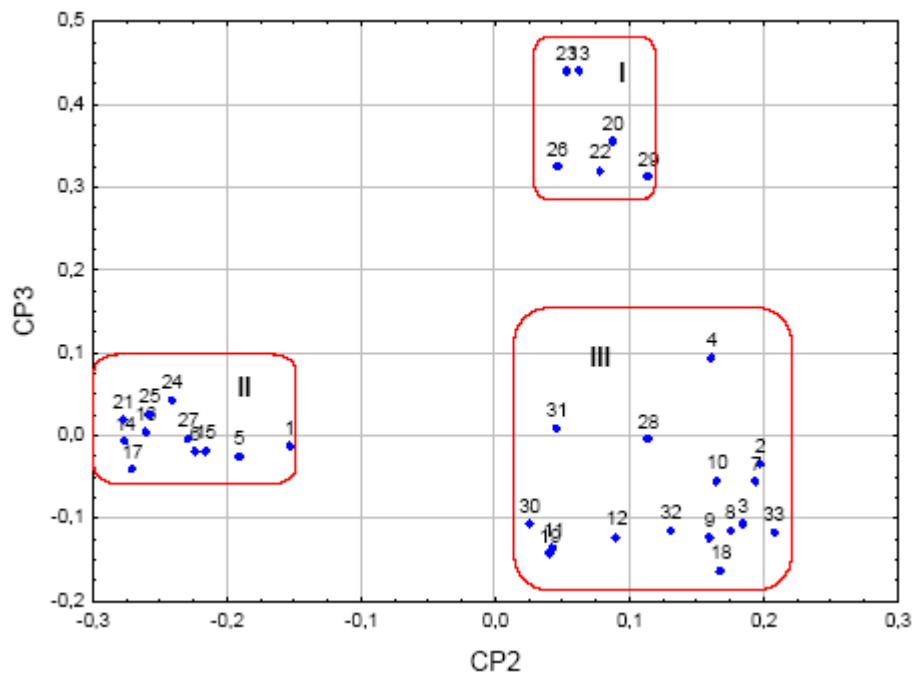


Figura 30 – Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da planta *Mikania laevigata*.

Os loadings das CP1, CP2 e CP3 estão apresentados na Figura 31. Esta Figura mostra que todos os valores dos loadings da CP1 são positivos, enquanto que para a CP2 e CP3 é possível observar picos em regiões positivas e negativas.

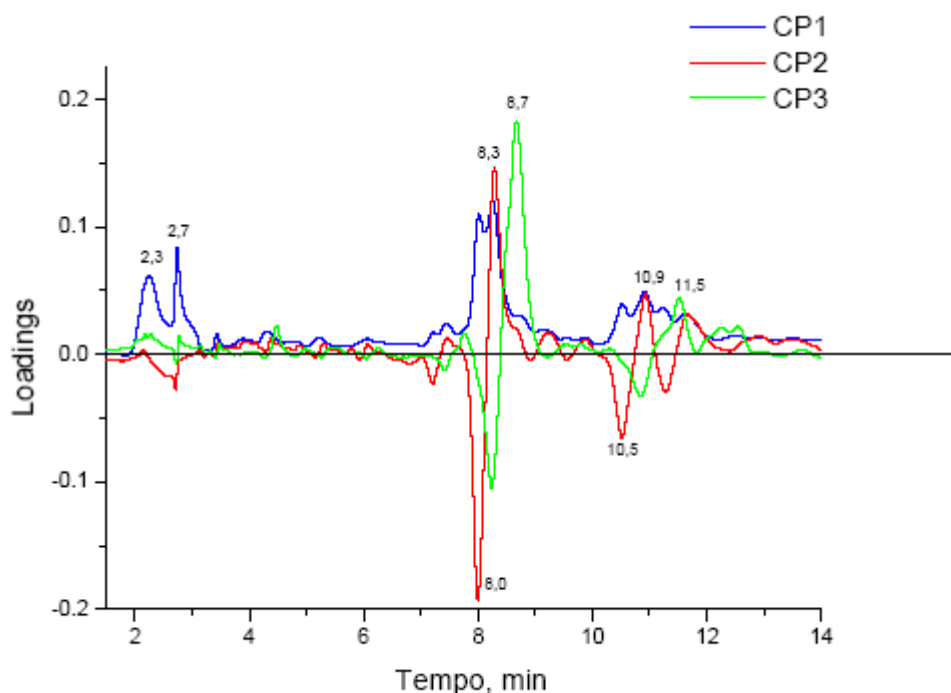


Figura 31 – Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da *Mikania laevigata*.

Os loadings da CP2 mostram que as amostras dos grupos I e III, com valores de escores positivos (Figura 30), permitem extrair uma maior quantidade das substâncias com tempos de retenção em 8,3 e 10,9 min, enquanto que as amostras do grupo II, que possuem valores de escores negativos, são discriminadas principalmente devido à variável com tempos de retenção em 8,0 e 10,5 min.

Nos loadings da CP3 as variáveis que discriminam as amostras do grupo I, com valores de escores positivos, são as substâncias com tempos de retenção 8,7 e 11,3 min.

Para confirmar os resultados da análise de componentes principais, a análise hierárquica de agrupamentos foi aplicada aos dados cromatográficos das 33 frações orgânicas.

O dendrograma obtido pelo conjunto de 33 amostras e 1172 valores de altura dos picos cromatográficos está representado na Figura 32, onde pode ser observado no valor de distância Euclidiana de 2,5 os mesmos grupos formados na análise de componentes principais, Figura 29.

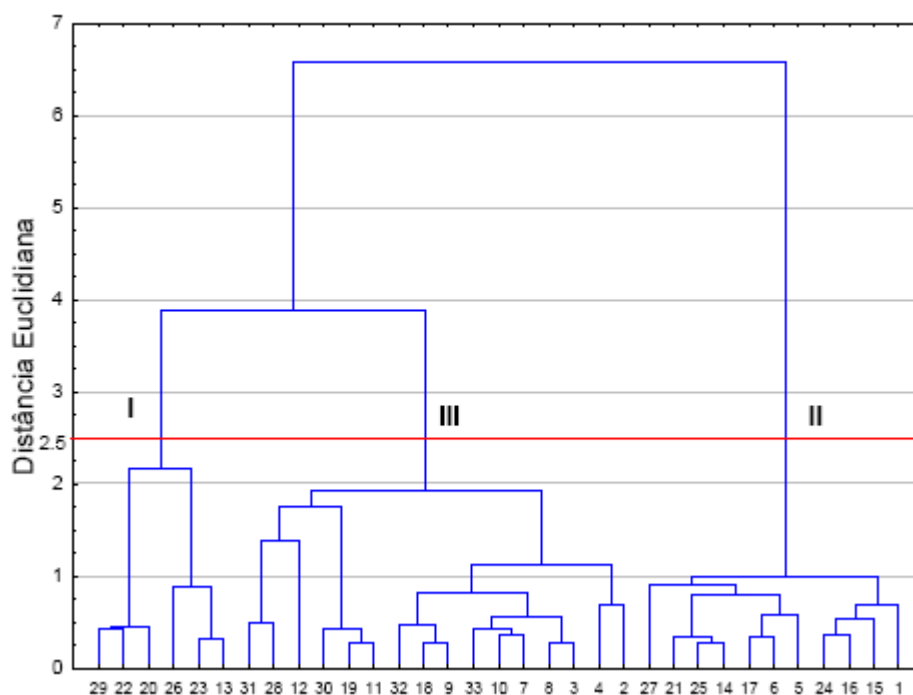


Figura 32 – Dendrograma baseado nos dados cromatográficos das 33 frações orgânicas da planta *Mikania laevigata*.

4.3 RESULTADOS DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A próxima etapa deste trabalho teve como objetivo fazer um estudo exploratório dos dados espectrais obtidos após as análises dos extratos brutos e das frações orgânica e gorduras/graxas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.

A Figura 33 mostra os espectros dos 31 extratos brutos preparados de acordo com o planejamento experimental, Figura 19.

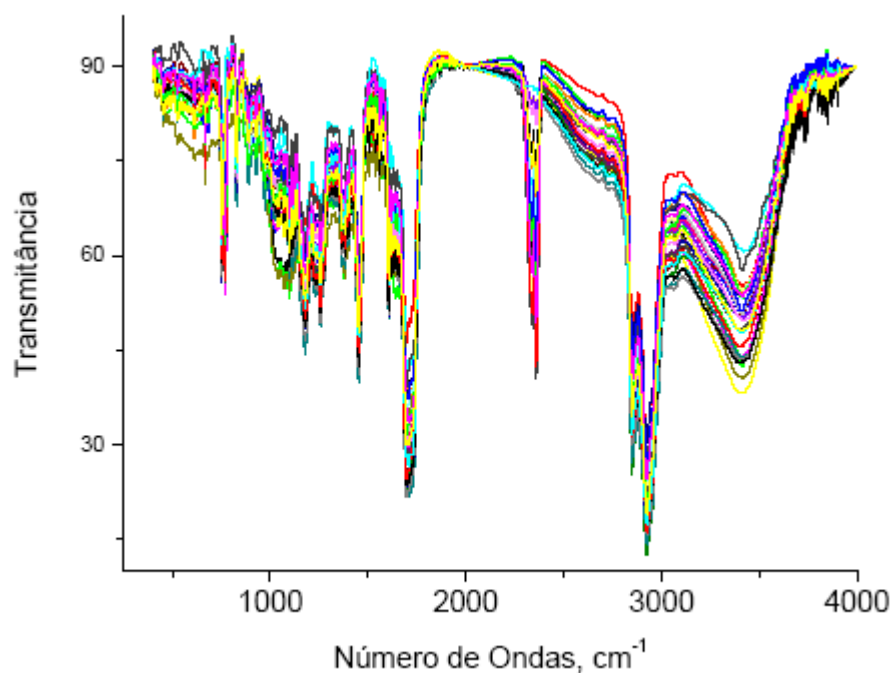


Figura 33 – Espectros de infravermelho dos 31 extratos brutos preparados de acordo com o planejamento experimental.

Para a análise de componentes principais dos extratos brutos, o conjunto dos dados original desses espectros foi transformado em uma matriz de dimensão 31x1866 (31 amostras/espectros por 1866 variáveis/transmitâncias).

A Figura 34 representa o gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3. Neste é possível observar a formação de sete grupos e um subgrupo dentro do grupo IV formado pelas amostras 20, 25 e 13, bem como duas amostras isoladas 2 e 7 nominadas grupos VI e VII, respectivamente.

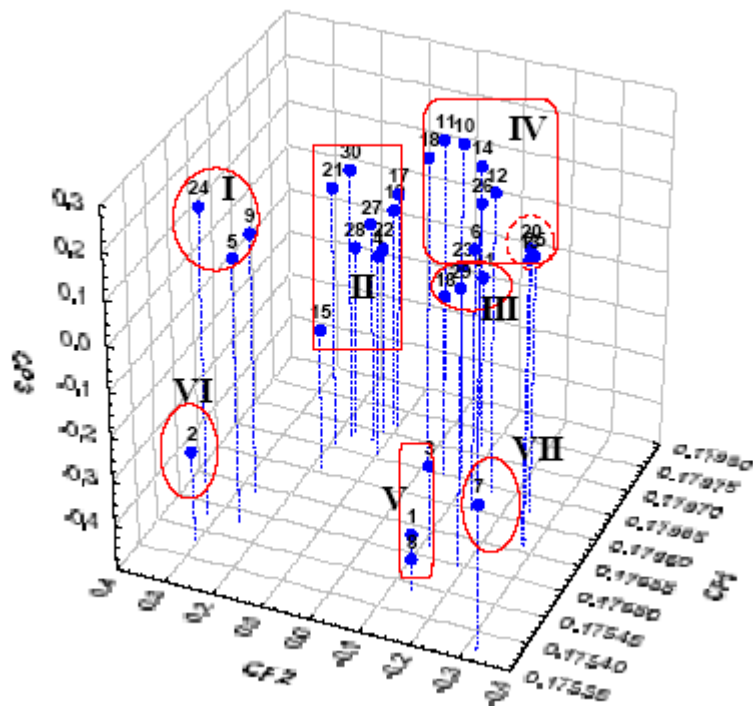


Figura 34 – Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos dos 31 extratos brutos da planta *Mikania laevigata*.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 94,94% da variância total contida nos dados e embora a CP1 explique sozinha 99,82% da variância, a melhor discriminação dos grupos pôde ser verificada na projeção da CP2 e CP3, Figura 35. A CP2 consegue discriminar com 0,07% de variância os grupos I e VI do grupo II, localizados na região positiva, dos outros grupos. A CP3 com apenas 0,05% de variância consegue discriminar os grupos V e VI, localizados na região mais negativa, dos demais grupos.

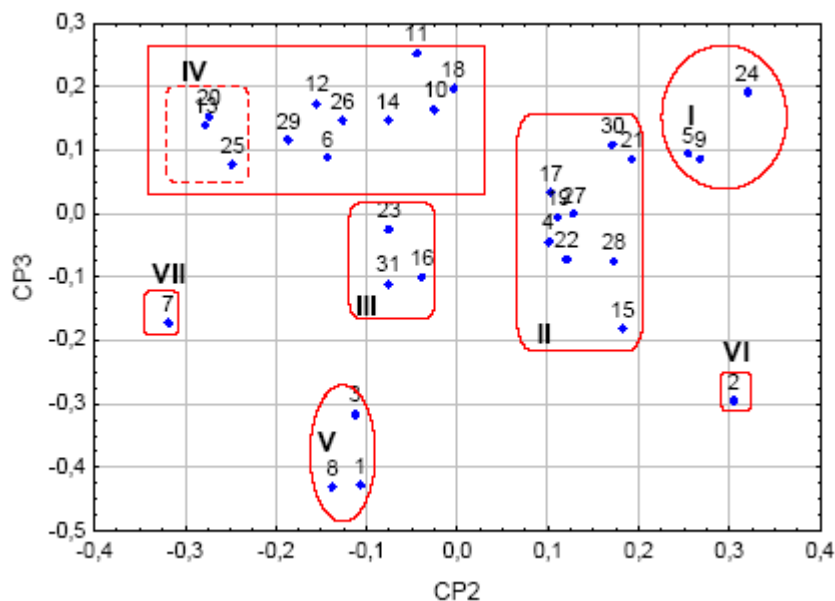


Figura 35 – Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos dos 31 extratos brutos da planta *Mikania laevigata*.

Os loadings das CP1, CP2 e CP3 estão apresentados na Figura 36. Nesta é possível ter uma idéia das regiões espectrais que permitem a distinção entre os grupos formados na Figura 34. Todos os valores dos loadings da CP1 são positivos, enquanto que para a CP2 e CP3 são observadas bandas em regiões positivas e negativas.

Os loadings da CP2 mostram que as amostras dos grupos I, II e VI com valores de escores positivos (Figura 35), sofrem maior influência das transmitâncias que apresentam valores positivos de loadings, ou seja, são especialmente caracterizadas pelos números de ondas 1606, 2777, 2844 e 3225 cm^{-1} . Já as amostras pertencentes aos grupos III, IV, V e VII que possuem valores de escores negativos, sofrem maior influência das transmitâncias com números de ondas 665 e 2254 cm^{-1} , com valores de loadings negativos.

Nos loadings da CP3 as transmitâncias que discriminam as amostras dos grupos V e VI, que possuem valores de escores mais negativos, são caracterizadas pelos números de ondas 665, 1062, 1151, 1350, 1585, 2254, 2734 e 2890 cm^{-1} . Já as transmitâncias que discriminam as amostras dos grupos I e IV, com valores de escores mais positivos, são aquelas que apresentam valores de loadings positivos, ou seja, os números de ondas em 967, 1424 e 3306 cm^{-1} .

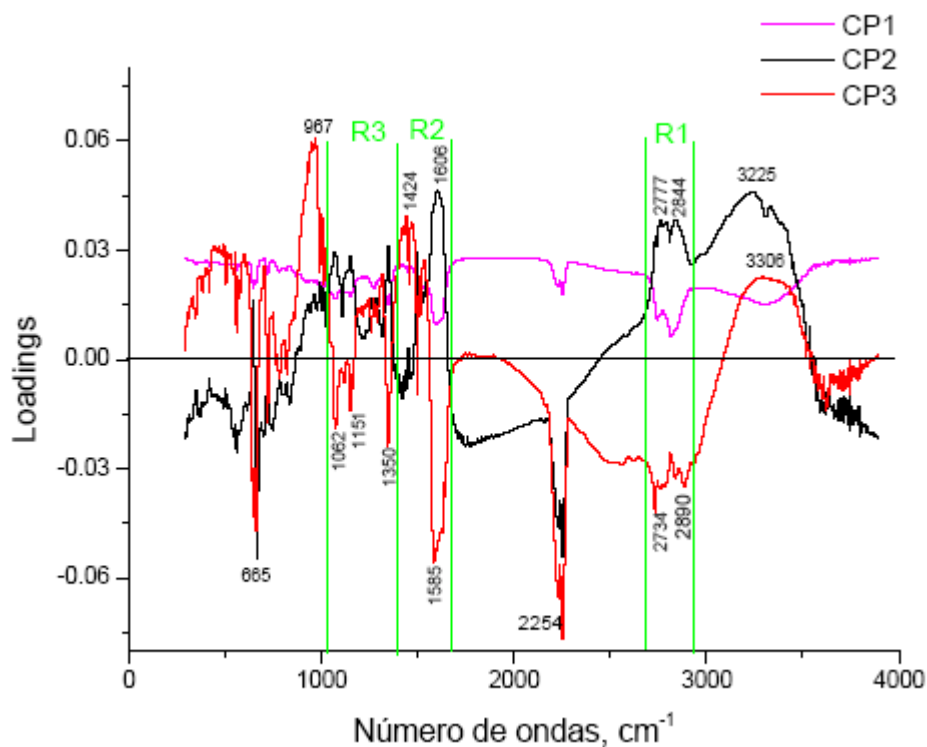


Figura 36 – Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectroscópicos dos 31 extratos brutos.

A região em torno dos números de ondas 3225 e 3306 cm^{-1} caracteriza as absorções correspondentes ao estiramento de OH em álcoois (3600-3200 cm^{-1}), fenóis (3400-3200 cm^{-1}) e ácidos carboxílicos (3550-2500 cm^{-1}), podendo ter contribuições de estiramento de NH em amidas (3500-3070 cm^{-1}) e aminas (3600-3200 cm^{-1}).

As bandas presentes na região R1 (2933-2690 cm^{-1}) são compatíveis com o estiramento de $\text{Csp}^3\text{-H}$ em alcanos (2950-2850 cm^{-1}), H-CO de aldeídos alifáticos (2900-2700 cm^{-1}) e N-CH₃ de aminas alifáticas (2820-2780 cm^{-1}). A banda com frequência de absorção em 2254 cm^{-1} pode indicar a presença de grupamentos nitrila (2251-2000 cm^{-1}), estiramento $\text{C}\equiv\text{C}$ (2260-2170 cm^{-1}) em acetilenos di-substituídos e isocianatos (2275-2240 cm^{-1}).

As bandas presentes na região R2 (1673-1401 cm^{-1}) podem indicar a presença de estiramento de C=C em compostos aromáticos (1600-1450 cm^{-1}), alcenos alifáticos (1695- 1540 cm^{-1}), deformação angular CH de éteres (1475-1440 cm^{-1}), aminas e iminas (1496-1445 cm^{-1}), podendo ainda ter contribuição de absorções de estiramento do grupo carbonila em amida secundária trans (~1540 cm^{-1}), estiramento do grupo CN em alquiminas (1690-1470 cm^{-1}) e de deformação angular NH em aminas (1650-1550 cm^{-1}).

A região R3 entre $1400-1027\text{ cm}^{-1}$ contém bandas características correspondentes ao estiramento de CN em amins terciárias ($1230-1030\text{ cm}^{-1}$), amins aromáticas ($1360-1250\text{ cm}^{-1}$), estiramento de CO em fenóis ($1300-1140\text{ cm}^{-1}$), éteres ($1150-1070\text{ cm}^{-1}$), éster ($1275-1020\text{ cm}^{-1}$) e ácido ($1320-1210\text{ cm}^{-1}$), podendo ainda ter contribuições de deformações angulares CH em alcanos ($1310-1175\text{ cm}^{-1}$), éteres ($1406-1372\text{ cm}^{-1}$), entre outros.

A banda em 967 cm^{-1} pode ser proveniente da deformação angular de aldeídos alifáticos ($975-780\text{ cm}^{-1}$) e em 665 cm^{-1} pode indicar a presença de vibrações correspondente ao estiramento de t-butil ($760-650\text{ cm}^{-1}$).

Para confirmar os resultados da análise de componentes principais, a análise hierárquica de agrupamentos foi aplicada aos dados espectroscópicos dos 31 extratos brutos.

O dendrograma obtido pelo conjunto de 31 amostras e 1866 valores de transmitâncias está representado na Figura 37, onde pode ser observado no valor de distância Euclidiana de 0,055 os mesmos grupos formados na análise de componentes principais, Figura 34.

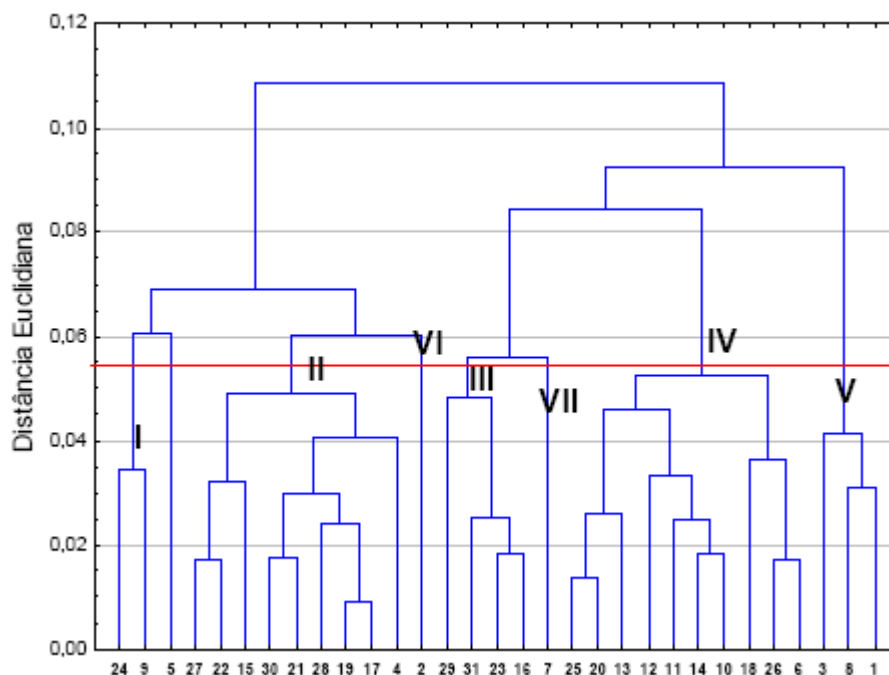


Figura 37 – Dendrograma baseado nos dados espectroscópicos dos 31 extratos brutos de *Mikania laevigata*.

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência de absorção, independentemente da estrutura das moléculas. Neste trabalho os extratos brutos foram submetidos a um fracionamento químico, que possibilitou fazer uma análise mais detalhada dos espectros das frações e identificar algumas bandas características que são específicas para determinados compostos.

A Figura 38 mostra os espectros das 33 frações gorduras /graxas (triplicatas no ponto central) obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.

Para a análise de componentes principais das frações gorduras e graxas, o conjunto dos dados original desses espectros foi transformado em uma matriz de dimensão 33x1866 (33 amostras/espectros por 1866 variáveis/transmitâncias).

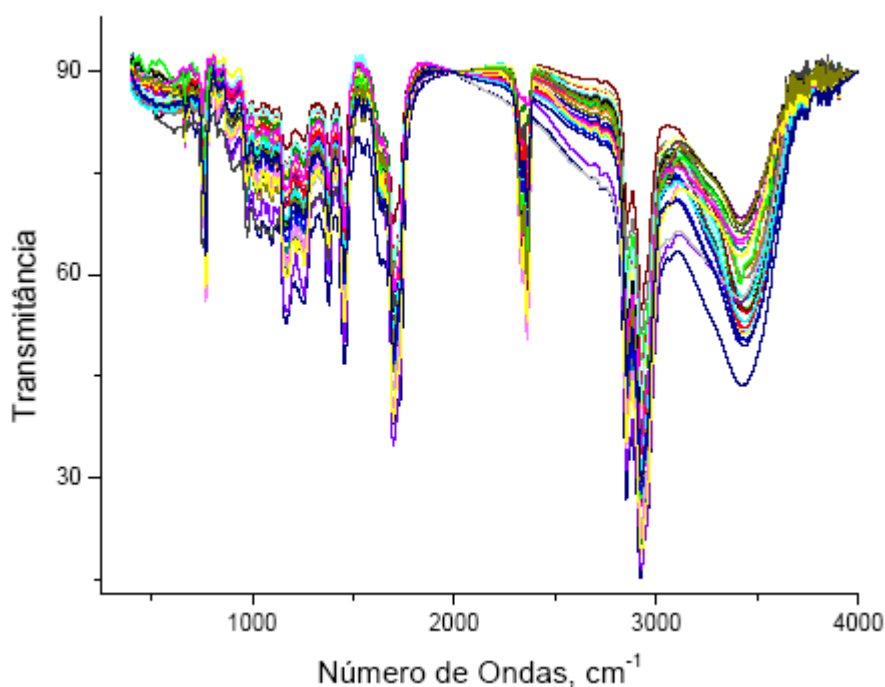


Figura 38 – Espectros de infravermelho das 33 frações gorduras e graxas obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.

A Figura 39 representa o gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3. Neste é possível observar a formação de cinco grupos.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 99,96% da variância total contida nos dados e embora a CP1 explique sozinha 99,80% da variância, a melhor discriminação dos grupos pôde ser verificada na projeção da CP2 e CP3, Figura 40. A

CP2 consegue discriminar com 0,10% de variância o grupo II dos grupos III e IV, localizados na região negativa, dos grupos I e V localizados na região positiva. A CP3 não consegue discriminar sozinha nenhum dos grupos.

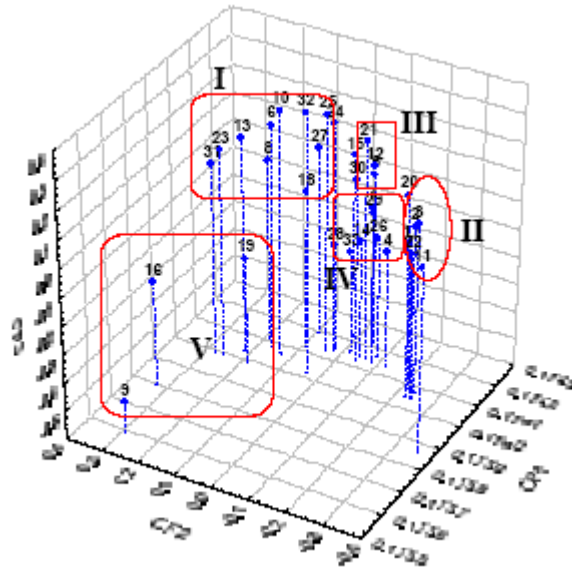


Figura 39– Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos das 33 frações gorduras e graxas.

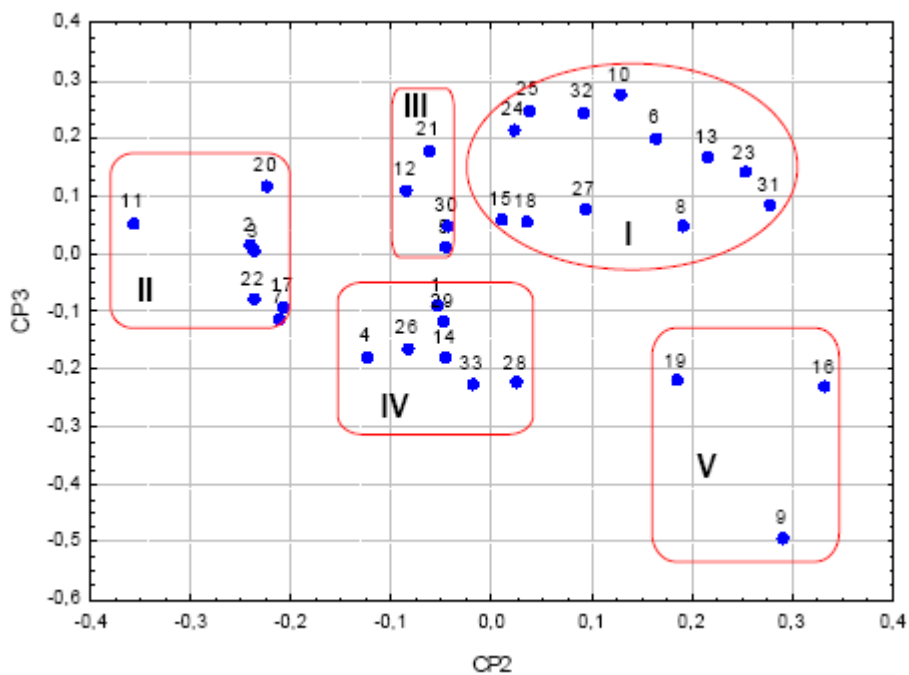


Figura 40 – Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos das 33 frações gorduras e graxas.

Os loadings das CP1, CP2 e CP3 estão apresentados na Figura 41. Nesta é possível ter uma idéia das regiões espectrais que permitem a distinção entre os cinco grupos formados na Figura 39. Todos os valores dos loadings da CP1 são positivos, enquanto que para a CP2 e CP3 são observadas bandas em regiões positivas e negativas.

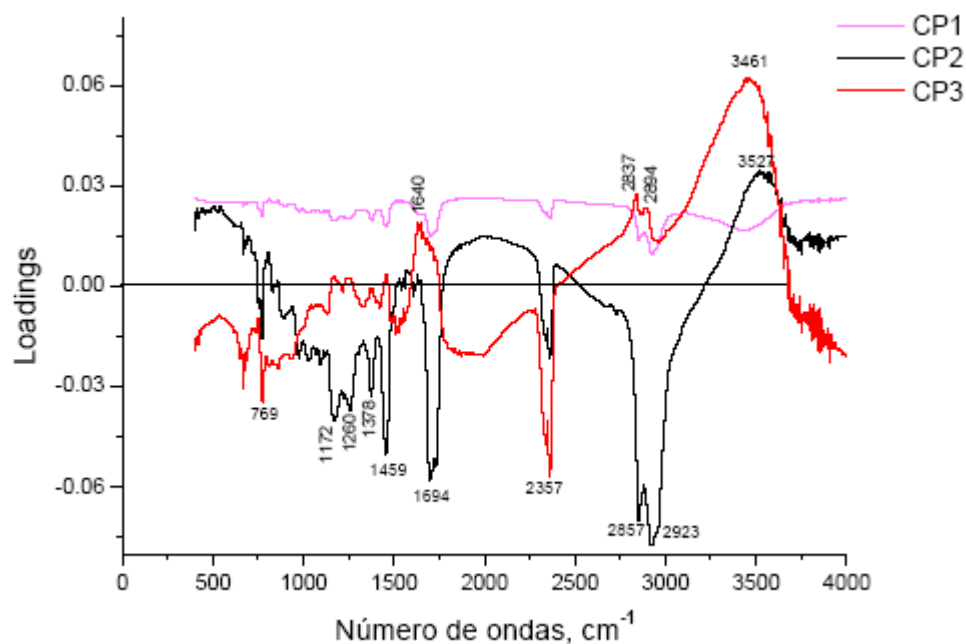


Figura 41 – Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectroscópicos das 33 frações gorduras e graxas.

Os loadings da CP2 mostram que as amostras dos grupos II, III e IV com valores de escores negativos (Figura 40) sofrem maior influência das transmitâncias que apresentam valores negativos de loadings, ou seja, são especialmente caracterizadas pelos números de ondas 1172, 1260, 1378, 1459, 1694, 2357, 2857 e 2923 cm^{-1} . Dentre esses, observa-se que as bandas em 2857 e 2923 cm^{-1} apresentam os menores valores de transmitâncias. Como a intensidade da banda é proporcional à concentração, este resultado pode ser uma evidência de que as amostras desses grupos possuem maiores quantidades de compostos que possuem grupamentos com vibrações de estiramento de $\text{Csp}^3\text{-H}$ em alcanos (2950-2850 cm^{-1}) e O=C-H de aldeídos alifáticos (2900-2700 cm^{-1}), sendo esses característicos na composição dos extratos de gorduras e graxas.

Nos loadings da CP3 as transmitâncias com números de ondas 1640, 2837, 2894 e 3461 cm^{-1} , discriminam as amostras dos grupos I e III que possuem escores positivos. As bandas em 3461 cm^{-1} são compatíveis com as absorções correspondentes ao estiramento

de OH em álcoois ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$), fenóis ($3400-3200\text{ cm}^{-1}$) e ácidos carboxílicos ($3550-2500\text{ cm}^{-1}$), podendo ter contribuições de estiramento de NH em amidas ($3500-3070\text{ cm}^{-1}$) e aminas ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$). Em 1640 e 1694 cm^{-1} são compatíveis com estiramento de C=C em alcenos ($1675-1635\text{ cm}^{-1}$) e estiramento de C=O em quinonas ($1690-1635\text{ cm}^{-1}$), aldeídos ($1740-1660\text{ cm}^{-1}$), cetonas ($1700-1680\text{ cm}^{-1}$), ácidos carboxílicos ($1800-1670\text{ cm}^{-1}$), amida ($1690-1630\text{ cm}^{-1}$) e outros.

Para confirmar os resultados da análise de componentes principais, a análise hierárquica de agrupamentos foi aplicada aos dados espectroscópicos das 33 frações gorduras e graxas. O dendrograma obtido pelo conjunto de 33 amostras e 1866 valores de transmitâncias está representado na Figura 42, onde pode ser observado no valor de distância Euclidiana de 0,075 os mesmos grupos formados na análise de componentes principais, Figura 39.

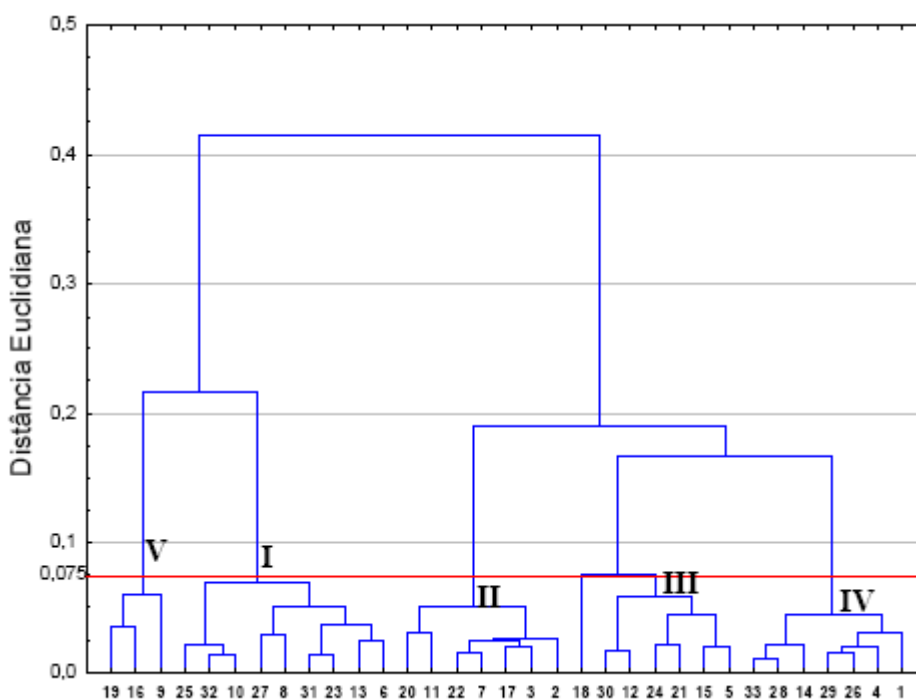


Figura 42 – Dendrograma baseado nos dados espectroscópicos das 33 frações gordura e graxas.

A Figura 43 mostra os espectros das 33 frações orgânicas (triplicatas no ponto central) obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.

Para a análise de componentes principais das frações orgânicas, o conjunto dos dados original desses espectros foi transformado em uma matriz de dimensão 33×1866 (33 amostras/espectros por 1866 variáveis/transmitâncias).

A Figura 44 representa o gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3. Neste é possível observar a formação de seis grupos, bem como duas amostras isoladas 20 e 28 nominadas grupo V e VI, respectivamente.

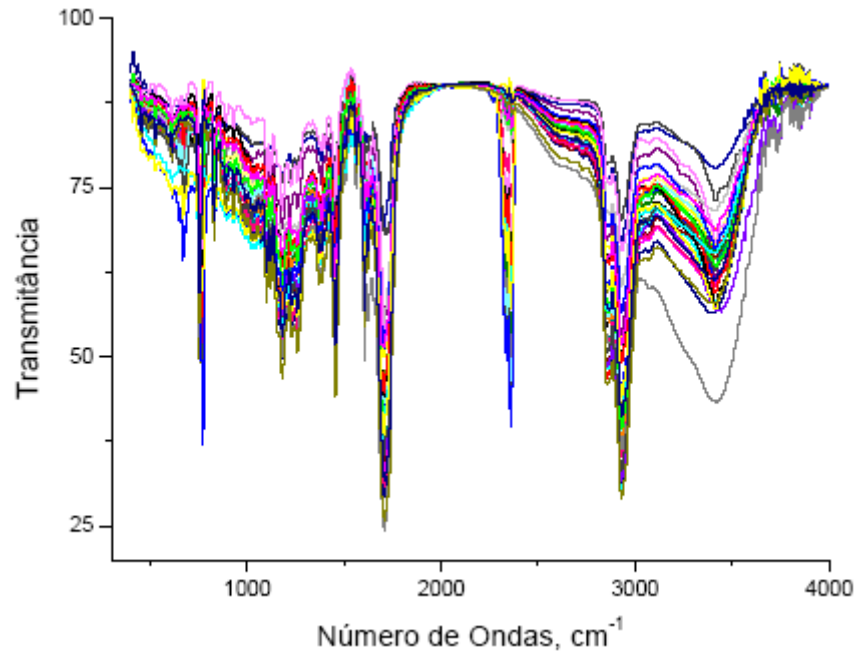


Figura 43 – Espectros de infravermelho das 33 frações orgânicas obtidas após o fracionamento químico dos extratos brutos.

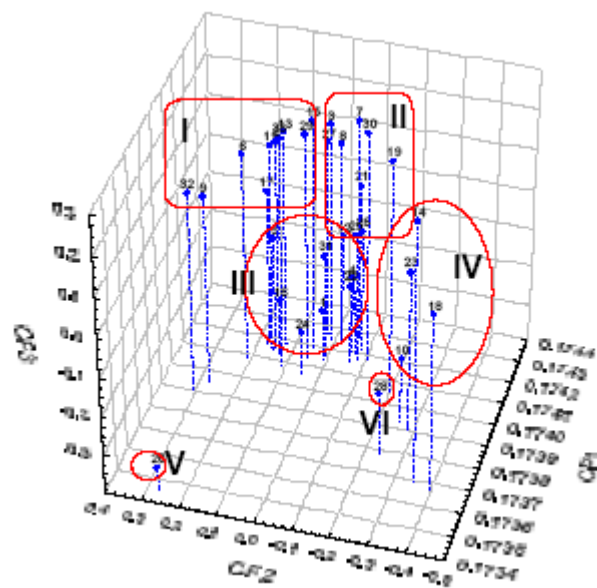


Figura 44 – Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos das 33 frações orgânicas.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 99,94% da variância total contida nos dados e embora a CP1 explique sozinha 99,75% da variância, a melhor discriminação dos grupos pôde ser verificada na projeção da CP2 e CP3, Figura 45. A CP2 consegue discriminar com 0,13% de variância os grupos IV e VI dos outros grupos. A CP3 com apenas 0,06% de variância consegue discriminar os grupos III, V e VI localizados na região negativa, do grupo I.

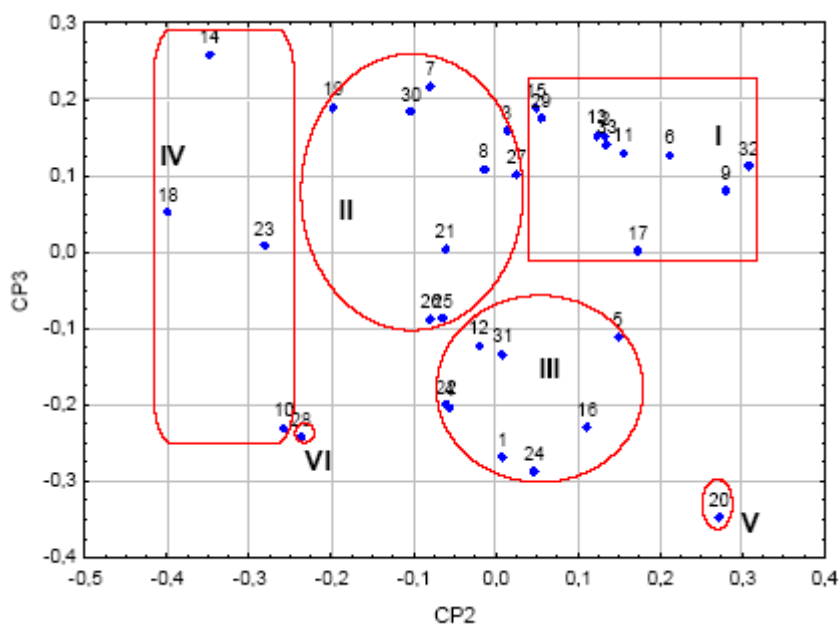


Figura 45 – Gráfico dos escores das CP2 e CP3 dos dados espectroscópicos dos 33 frações orgânicas.

Os loadings das CP1, CP2 e CP3 estão apresentados na Figura 46. Nesta é possível ter uma idéia das regiões espectrais que permitem a distinção entre os grupos formados na Figura 44. Todos os valores dos loadings da CP1 são positivos, enquanto que para a CP2 e CP3 são observadas bandas em regiões positivas e negativas.

Os loadings da CP2 mostram que as amostras dos grupos IV e VI, com valores de escores negativos (Figura 45), sofrem maior influência das transmitâncias que apresentam valores negativos de loadings, ou seja, são especialmente caracterizadas pelos números de ondas 1187, 1253, 1459, 1694, 2856 e 2930 cm^{-1} .

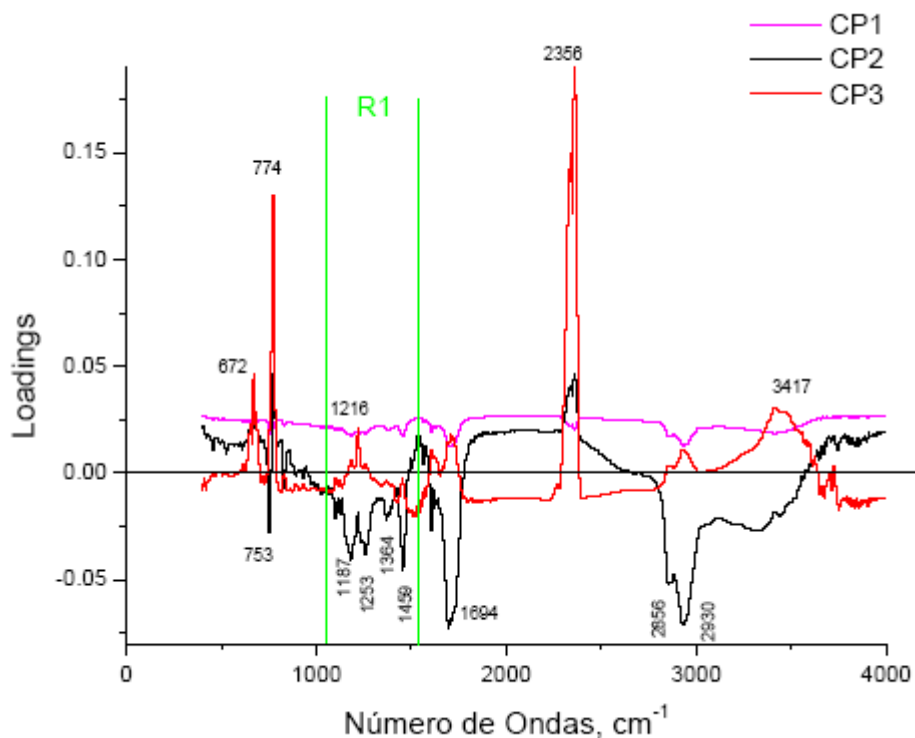


Figura 46 – Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectroscópicos das 33 frações orgânicas.

A região R1 entre $1532\text{-}1069\text{ cm}^{-1}$ contém bandas características correspondentes ao estiramento de C=C em compostos aromáticos ($1600\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$), deformações angulares CH em alkenos ($1420\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$), alcanos ($1465\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$), éteres alifáticos ($1480\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$), cetonas ($1465\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$), amidas ($1480\text{-}1432\text{ cm}^{-1}$), aminas e iminas ($1496\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$), podendo ainda ter contribuições das vibrações de estiramento C-C em alcanos ($1255\text{-}1145\text{ cm}^{-1}$), cetonas ($1250\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$), antracenos ($1415\text{-}1385\text{ cm}^{-1}$) e naftalenos ($1390\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$), deformações angulares de OH em fenóis ($1410\text{-}1310\text{ cm}^{-1}$) e álcoois ($1350\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$), presença do grupo CO em anidridos ($1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$), álcoois ($1150\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$), fenol ($1300\text{-}1140\text{ cm}^{-1}$), éteres ($1300\text{-}1010\text{ cm}^{-1}$), a presença de estiramento CN em aminas ($1350\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$) entre outros.

A banda presente em 1694 cm^{-1} é compatível com estiramento de C=C em alkenos alifáticos ($1695\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$) e pode indicar a presença do grupo carbonila em cetonas ($1725\text{-}1665\text{ cm}^{-1}$), aldeídos ($1740\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$), ácido carboxílico ($1760\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$), amida ($1695\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) e outros.

Nos loadings da CP3 as transmitâncias com números de ondas 672, 774, 1216, 2356 e 3417 cm^{-1} discriminam as amostras do grupo I que possuem escores positivos.

As bandas em 672 e 774 cm^{-1} podem indicar a presença de oscilação CH em alcanos (770-715 cm^{-1}), vibrações de estiramento CC em alcanos (905-750) e t-butil (760-650 cm^{-1}). A banda em 1216 cm^{-1} é compatível com deformações angulares =CH2 em alcenos (1250-1000 cm^{-1}), estiramento de CC em alcanos (1255-1145 cm^{-1}) e cetonas (1250-1030 cm^{-1}), estiramento de CO em fenol (1300-1140 cm^{-1}), éteres (1225-1010 cm^{-1}), ácidos carboxílicos (1260-1110 cm^{-1}) e estiramento de CN em aminas terciárias (1230-1030 cm^{-1}). Em 3417 cm^{-1} pode indicar a presença de estiramento de OH em álcoois (3600-3200 cm^{-1}), fenóis (3400-3200 cm^{-1}) e ácidos carboxílicos (3550-2500 cm^{-1}), podendo ter contribuições de estiramentos de NH em amidas (3500-3070 cm^{-1}), aminas (3600-3200 cm^{-1}) e C=NH (3400-3300 cm^{-1}).

Para confirmar os resultados da análise de componentes principais, a análise hierárquica de agrupamentos foi aplicada aos dados espectroscópicos das 33 frações orgânicas. O dendrograma obtido pelo conjunto de 33 amostras e 1866 valores de transmitâncias está representado na Figura 47, onde pode ser observado no valor de distância Euclidiana de 0,08 os mesmos grupos formados na análise de componentes principais, Figura 44.

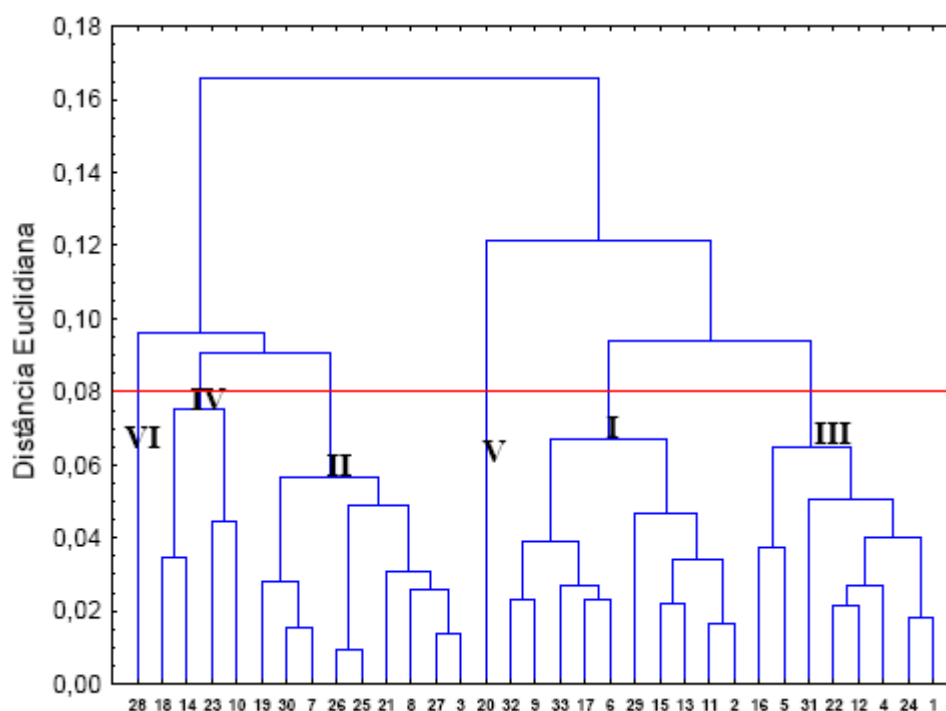


Figura 47 – Dendrograma baseado nos dados espectroscópicos das 33 frações orgânicas.

4.4 RESULTADOS DA ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA NO ULTRAVIOLETA–VISÍVEL

Os extratos brutos e as frações básica e gorduras e graxas também foram analisados por espectrofotometria no ultravioleta visível.

Para a análise de componentes principais dos extratos brutos, o conjunto dos dados original dos espectros UV-VIS foi transformado em uma matriz de dimensão 33x1466 (33 amostras/espectros por 1466 variáveis/absorvâncias).

A Figura 48 representa o gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3. Neste é possível observar a formação de dois grupos, bem como dois subgrupos dentro de cada um deles.

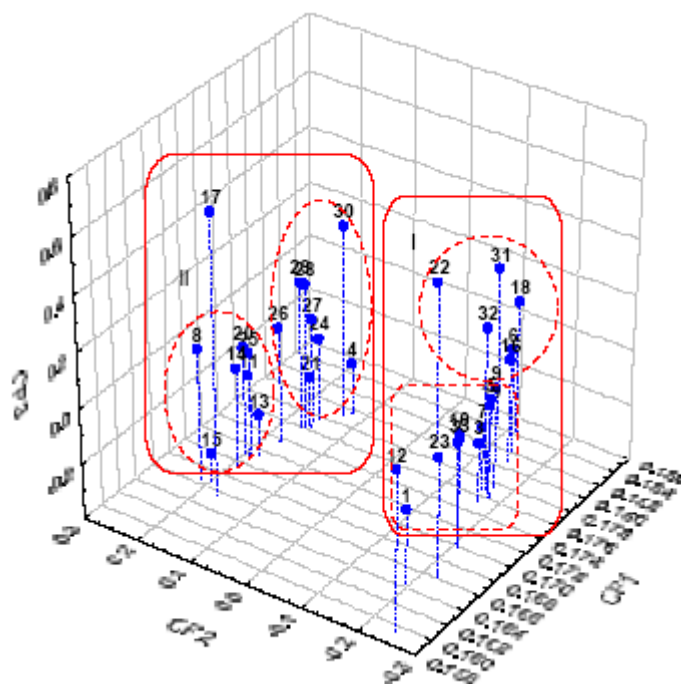


Figura 48 – Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectrofotométricos dos 33 extratos brutos da planta *Mikania laevigata*.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 97,54% da variância total contida nos dados.

A CP1 explica sozinha 81,91% da variância dos dados e não permite a discriminação dos grupos, Figura 49. A CP2 consegue discriminar com 14,8% de variância o

grupo I, localizado na região negativa, do grupo II na região positiva.

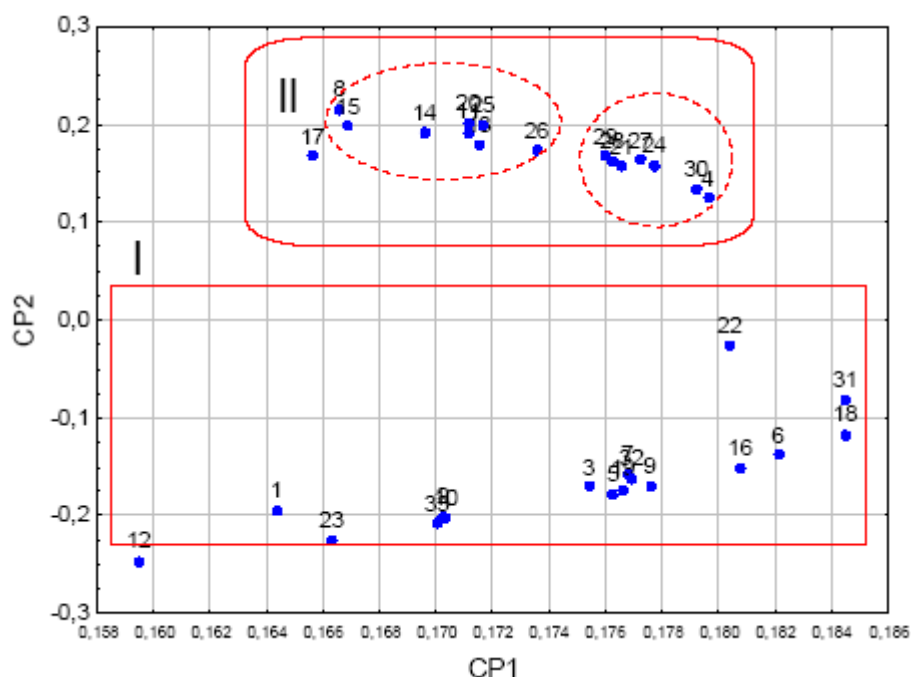


Figura 49 – Gráfico dos escores das CP1 e CP2 para os dados espectrofotométricos dos 33 extratos brutos da planta *Mikania laevigata*.

Os loadings das CP1, CP2 e CP3 estão apresentados na Figura 50. Nesta é possível ter uma idéia das regiões espectrais que permitem a distinção entre os grupos formados na Figura 48. Todos os valores dos loadings da CP1 são positivos, enquanto que para a CP2 e CP3 são observadas bandas em regiões positivas e negativas.

Os loadings da CP2 mostram que as amostras do grupo I, que possuem valores de escores negativos (Figura 49), possuem maior influência das absorvâncias com valores negativos de loadings, ou seja, são especialmente caracterizadas pela banda que absorve nos comprimentos de onda de 240-298 nm. Isto pode ser confirmado pelos espectros de absorção no ultravioleta/visível para os 33 extratos brutos, Figura 51, onde é possível observar que somente as amostras do grupo I absorvem na região de 240-298 nm.

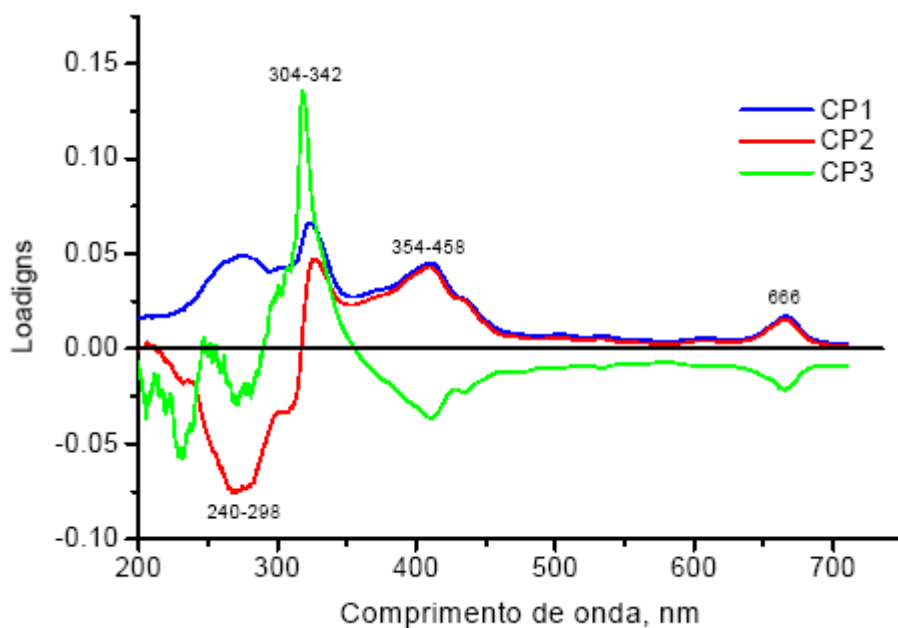


Figura 50 – Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectrofotométricos dos 33 extratos brutos da planta *Mikania laevigata*.

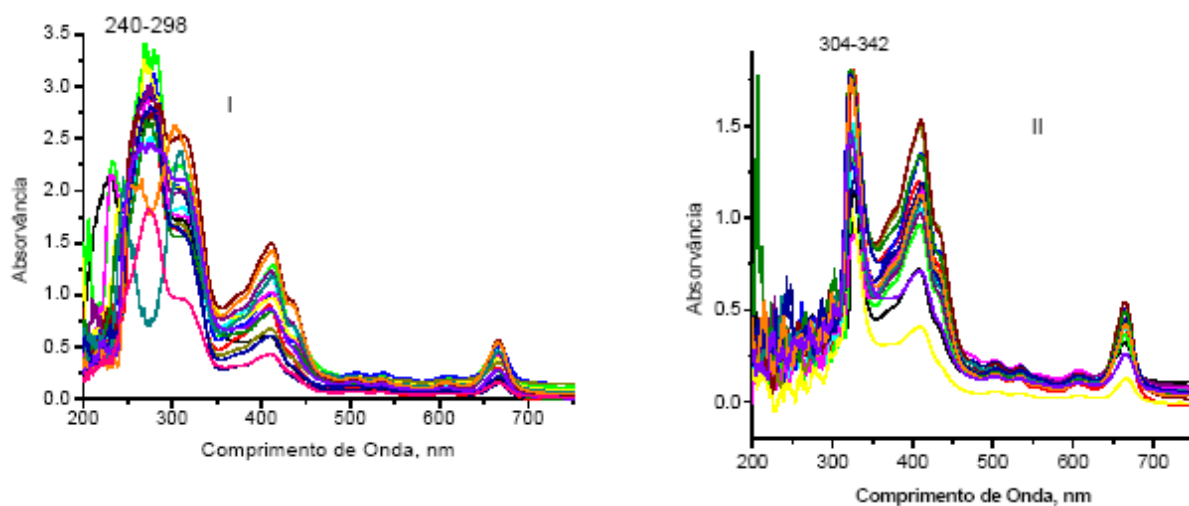


Figura 51 – Espectros de absorção no ultravioleta/visível dos 33 extratos brutos que compõem os grupos I e II.

Para confirmar os resultados da análise de componentes principais, a análise hierárquica de agrupamentos foi aplicada aos dados espectrofotométricos dos 33 extratos brutos. O dendrograma obtido pelo conjunto de 33 amostras e 1466 valores de absorvâncias está representado na Figura 52, onde pode ser observado no valor de distância Euclidiana de

0,65 os mesmos grupos e os subgrupos formados na análise de componentes principais, Figura 48.

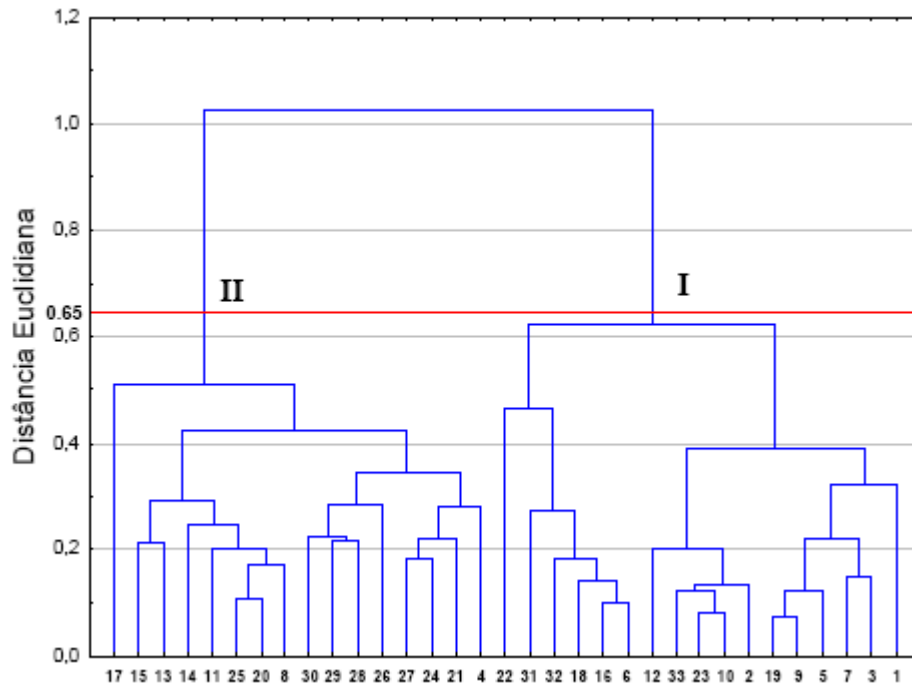


Figura 52 – Dendrograma baseado nos dados espectrofotométricos dos 33 extratos brutos da planta *Mikania laevigata*.

Para a análise de componentes principais da fração básica, o conjunto dos dados original dos espectros UV-VIS foi transformado em uma matriz de dimensão 33x846 (33 amostras/espectros por 846 variáveis/absorvâncias).

A Figura 53 representa o gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3. Neste é possível observar a formação de dois grupos.

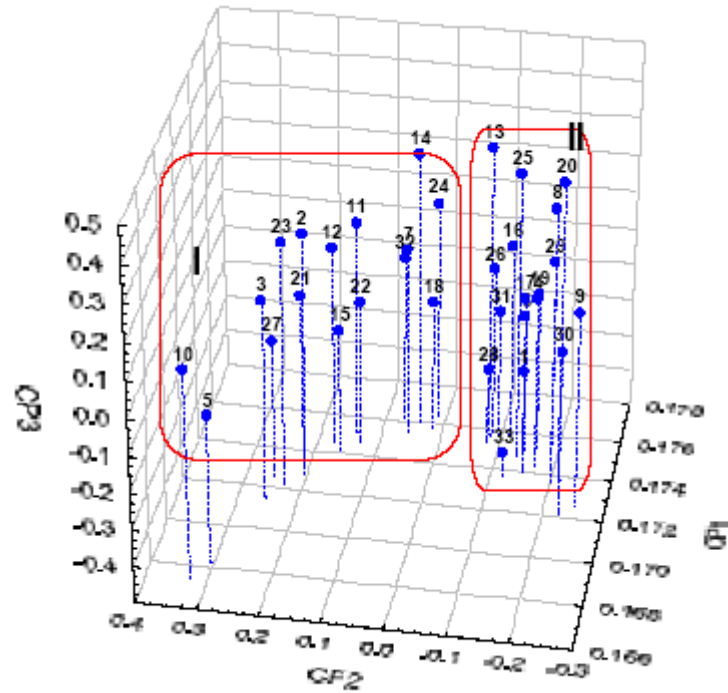


Figura 53 – Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 para os dados espectrofotométricos das 33 frações básicas da planta *Mikania laevigata*.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 98,90% da variância total contida nos dados e embora a CP1 explique sozinha 96,60% da variância, não permite a discriminação entre os grupos. A melhor discriminação pôde ser verificada na projeção das CP2 e CP3, Figura 54. A CP2 consegue discriminar com 1,99% de variância o grupo I, localizado na região positiva, do grupo II na região negativa. A CP3 com apenas 0,31% de variância não permite a discriminação entre os grupos.

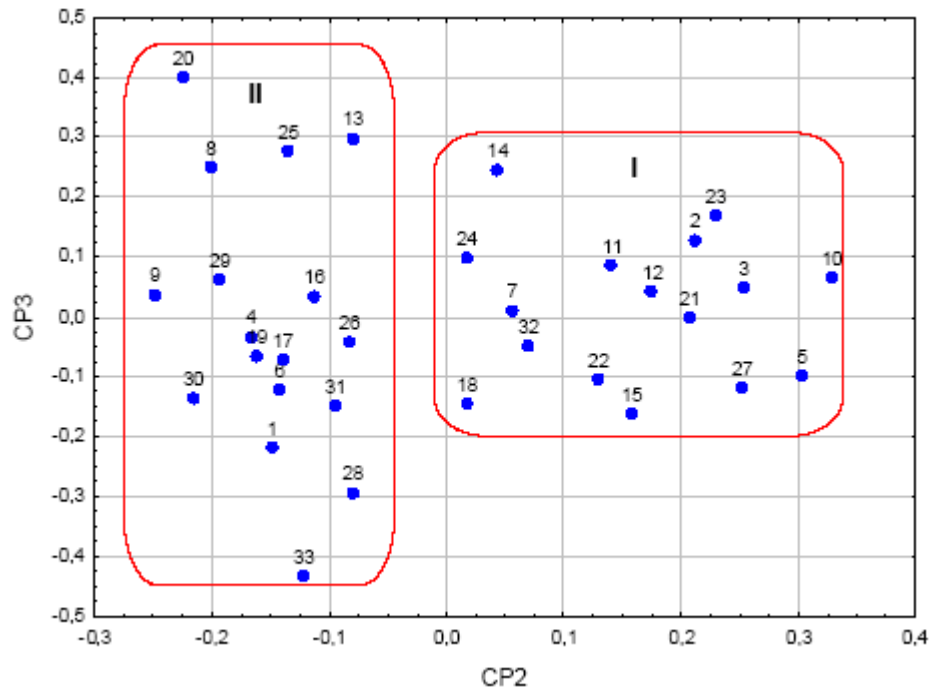


Figura 54 – Gráfico dos escores das CP2 e CP3 para os dados espectrofotométricos das 33 frações básicas da planta *Mikania laevigata*.

A Figura 55 mostra os espectros de absorção no ultravioleta/visível das 33 frações básicas que compõem os grupos I e II.

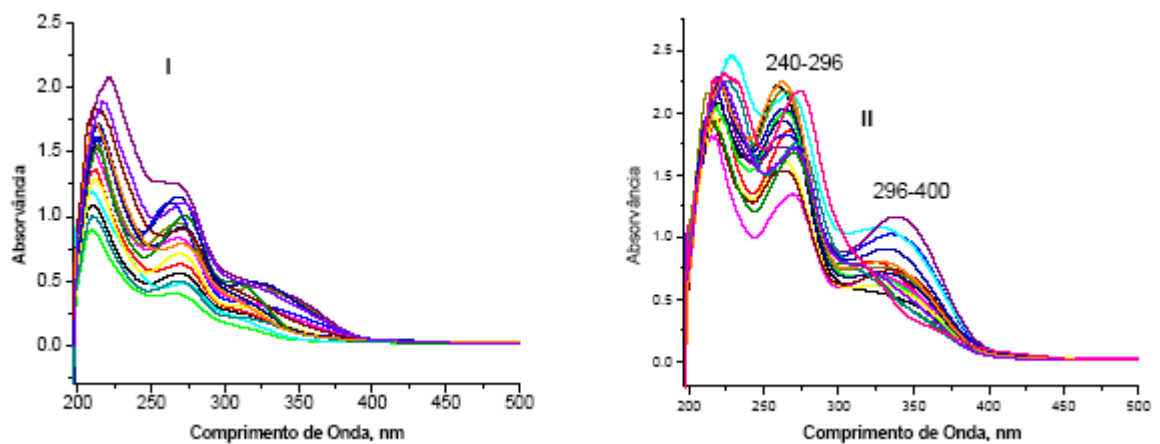


Figura 55 – Espectros de absorção no ultravioleta/visível das 33 frações básicas que compõem os grupos I e II.

Os loadings da CP2 estão apresentados na Figura 56. Analisando esta Figura verifica-se que as amostras do grupo I, com valores de escores positivos (Figura 54) possuem maior influência das absorvâncias com valores positivos de loadings, ou seja, são especialmente caracterizadas pela banda que absorve nos comprimentos de onda de 197-232 nm. Já as amostras do grupo II, com valores de escores negativos, possuem maior influência das bandas que absorvem nos comprimentos de ondas de 240-296 e 296-400 nm, com valores negativos de loadings.

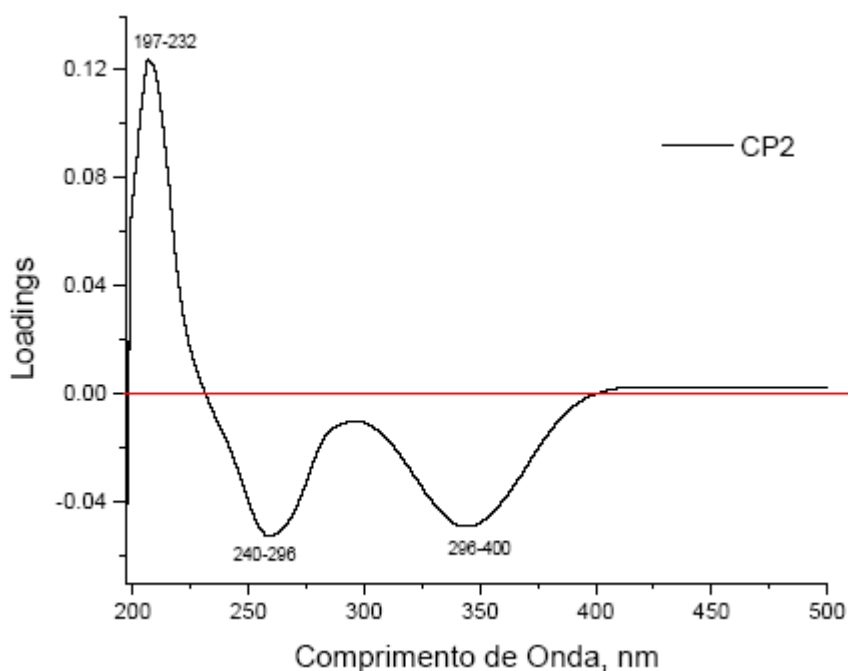


Figura 56 – Gráfico dos loadings da CP2 para os dados espectrofotométricos das 33 frações básicas da planta *Mikania laevigata*.

Para confirmar os resultados da análise de componentes principais, a análise hierárquica de agrupamentos foi aplicada aos dados espectrofotométricos das 33 frações básicas. O dendrograma obtido pelo conjunto de 33 amostras e 846 valores de absorvâncias está representado na Figura 57, onde pode ser observado no valor de distância Euclidiana de 0,5 os mesmos grupos formados na análise de componentes principais, Figura 53.

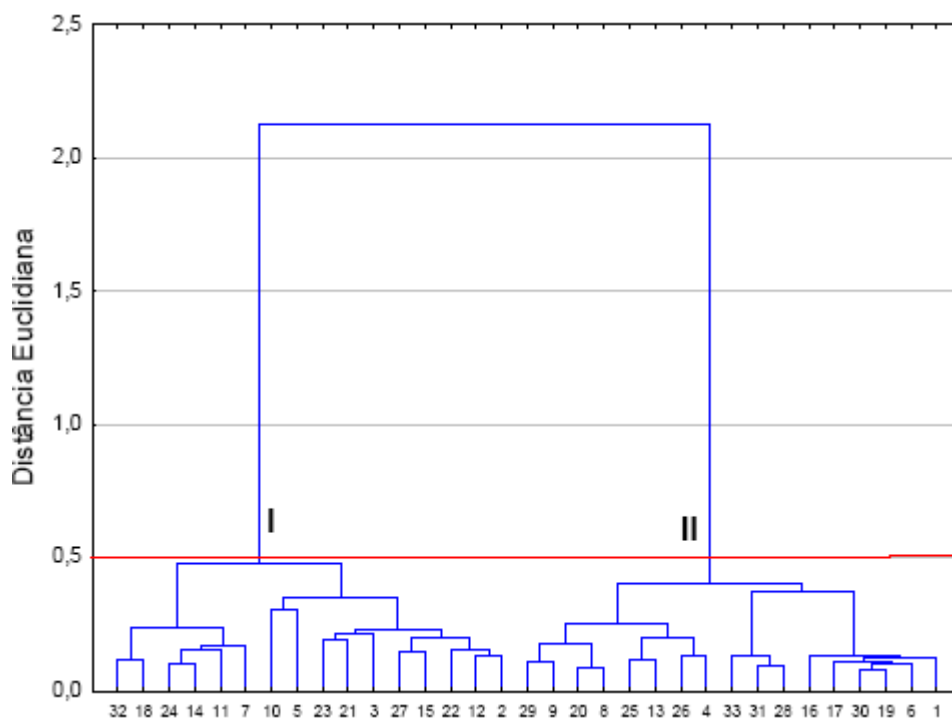


Figura 57 – Dendrograma baseado nos dados espectrofotométricos das 33 frações básicas da planta *Mikania laevigata*.

Para a análise de componentes principais das frações gorduras e graxas, o conjunto dos dados original dos espectros UV-VIS foi transformado em uma matriz de dimensão 33x1591 (33 amostras/espectros por 1591 variáveis/absorvâncias).

A Figura 58 representa o gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3. Neste é possível observar a formação de dois grupos e dois subgrupos dentro do grupo II, bem como as amostras isoladas 1, 3 e 18.

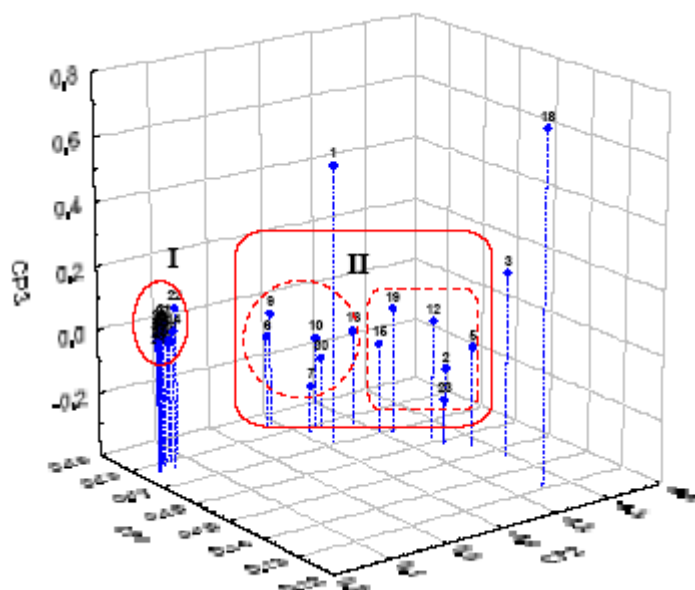


Figura 58 – Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 para dados espectrofotométricos das 33 frações gorduras e graxas da planta *Mikania laevigata*.

As três primeiras componentes principais (CP) explicam 98,58% da variância total contida nos dados e embora a CP1 explique sozinha 84,86% da variância, a melhor discriminação dos grupos pôde ser verificada na projeção das CP2 e CP3, Figura 59. A CP2 consegue discriminar com 12,20% de variância o grupo I, localizado na região positiva, do grupo II e das amostras isoladas 1, 3 e 18 na região negativa. A CP3 com apenas 1,52% de variância consegue discriminar os grupos I e II, localizados na região negativa, das amostras isoladas na região positiva.

Os loadings das CP1, CP2 e CP3 estão apresentados na Figura 60. Nesta é possível ter uma idéia das regiões espectrais que permitem a distinção entre os grupos formados na Figura 58. Todos os valores dos loadings da CP1 são positivos, enquanto que para a CP2 e CP3 são observadas bandas em regiões positivas e negativas.

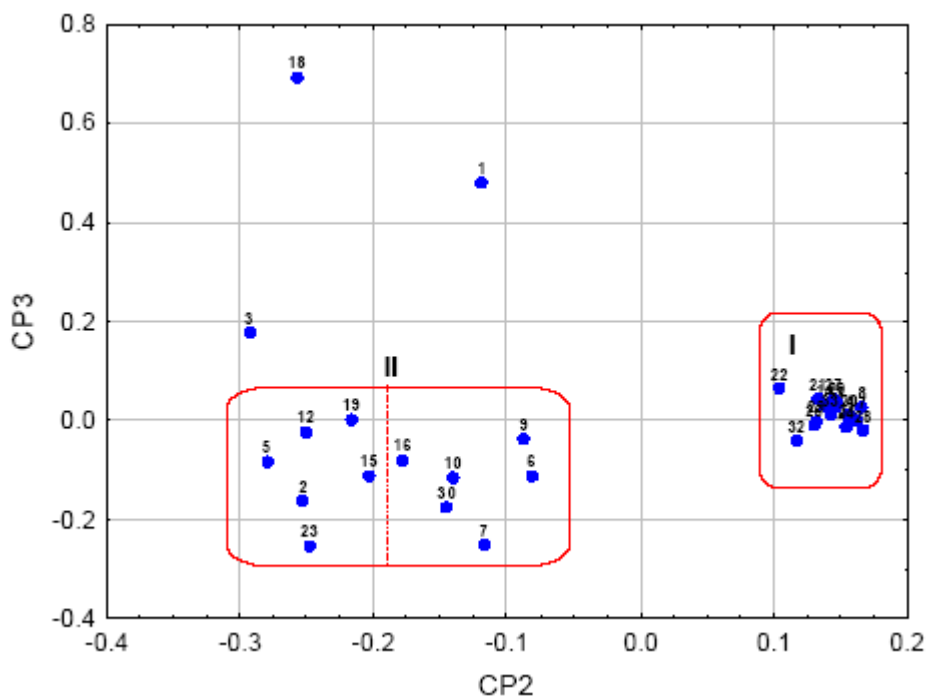


Figura 59 – Gráfico dos escores das CP2 e CP3 para dados espectrofotométricos das 33 frações gorduras e graxas da planta *Mikania laevigata*.

Os loadings da CP2 mostram que as amostras do grupo II, que possuem valores de escores negativos (Figura 59), possuem maior influência das absorvâncias com valores negativos de loadings, ou seja, são especialmente caracterizadas pela banda que absorve nos comprimentos de onda de 218-317 nm. Isto pode ser confirmado pelos espectros de absorção no ultravioleta/visível para as 33 frações gorduras e graxas, Figura 61, onde é possível observar que somente as amostras do grupo II absorvem na região de 218-317 nm.

Os loadings da CP3 mostram que as amostras isoladas 1, 3 e 18, que possuem valores de escores positivos, possuem maior influência das absorvâncias com valores positivos de loadings, ou seja, são especialmente caracterizadas pela banda que absorve nos comprimentos de onda de 198-248 nm. Isto pode ser confirmado pelos espectros de absorção no ultravioleta/visível, Figura 62, onde é possível observar que as amostras 1, 3 e 18 absorvem na região de 198-248 nm.

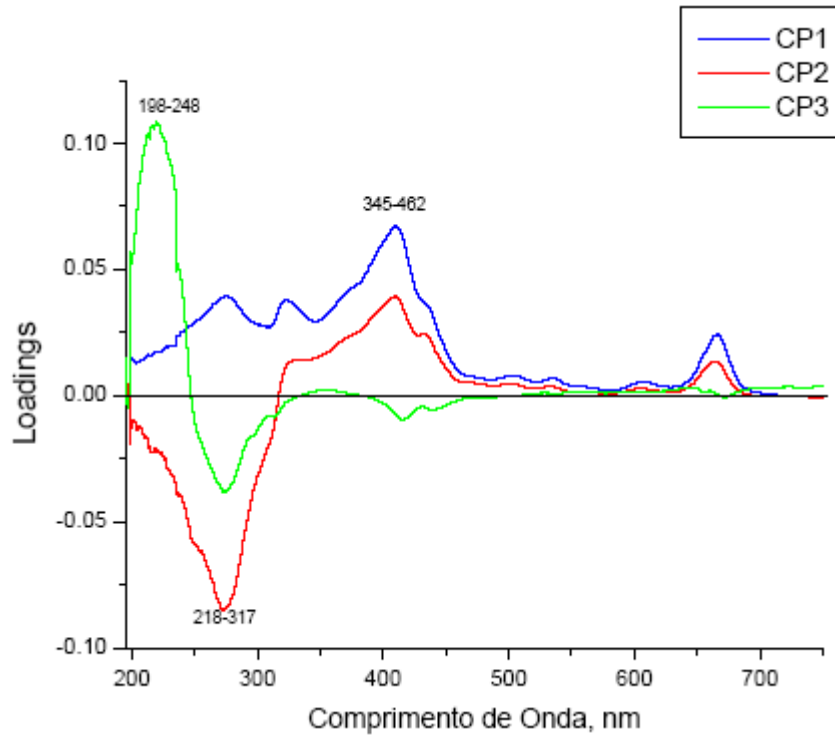


Figura 60 – Gráfico dos loadings das CP1, CP2 e CP3 para dados espectrofotométricos das 33 frações gorduras e graxas da planta *Mikania laevigata*.

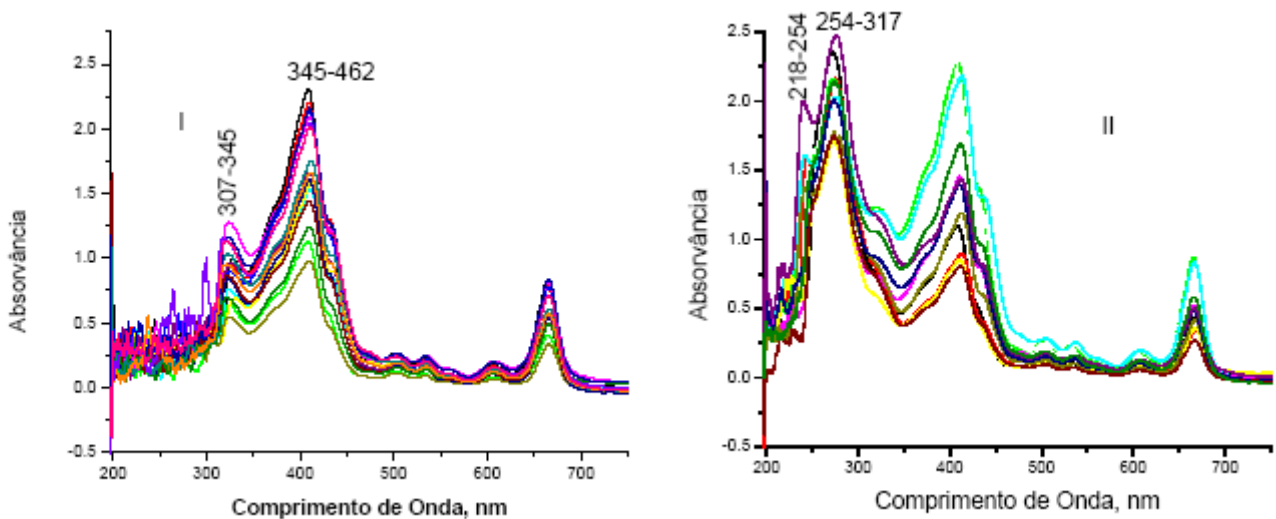


Figura 61 – Espectros de absorção no ultravioleta/visível das frações gorduras e graxas que compõem os grupos I e II.

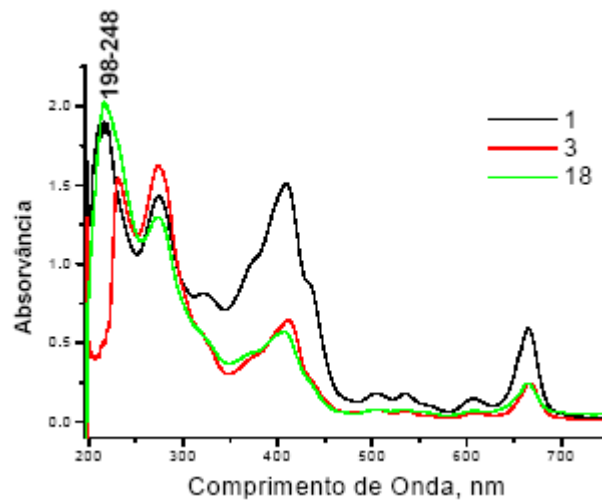


Figura 62 – Espectros de absorção no ultravioleta/visível das frações básicas 1, 3 e 18.

Para confirmar os resultados da análise de componentes principais, a análise hierárquica de agrupamentos foi aplicada aos dados espectrofotométricos das 33 frações gorduras e graxas. O dendrograma obtido pelo conjunto de 33 amostras e 1591 valores absorvâncias está representado na Figura 63, onde pode ser observado no valor de distância Euclidiana de 0,375 os mesmos grupos formados na análise de componentes principais, bem como as amostras isoladas 1, 3 e 18, Figura 58.

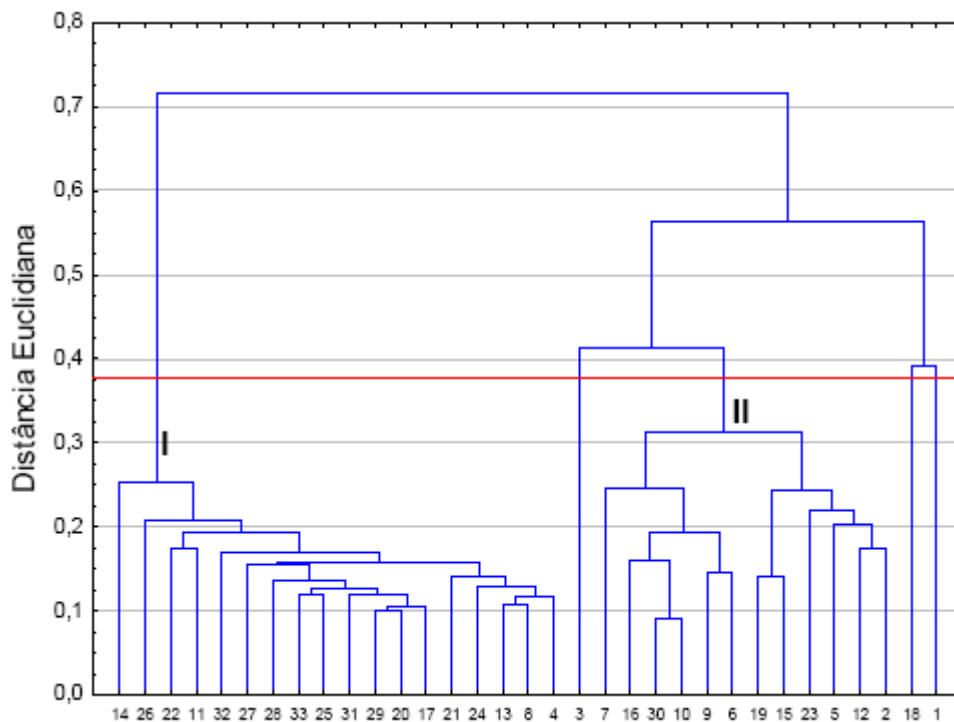


Figura 63 – Dendrograma baseado nos dados espectrofotométricos das 33 frações gorduras e graxas da planta *Mikania laevigata*.



Capítulo V

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi feita a análise exploratória do efeito do solvente na análise de metabólitos secundários das folhas de *Mikania laevigata* Sch. Bip. por métodos quimiométricos.

Na primeira etapa foram avaliados os efeitos de cinco solventes extratores, etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio, no rendimento obtido dos extratos brutos, fibras, resíduos, frações básica, orgânica e gorduras e graxas. A partir deste estudo foi possível concluir que:

- O maior rendimento para o extrato bruto foi obtido utilizando uma mistura binária entre os solventes etanol e diclorometano.
- O maior rendimento para a fração neutra foi verificado com uma mistura dos solventes etanol, diclorometano e clorofórmio na proporção 1:1:1.
- O extrato preparado com a mistura ternária de etanol, acetato de etila e acetona obteve uns dos menores rendimentos para a fração orgânica. Os maiores rendimentos para esta fração foram observados para os extratos preparados com uma mistura binária de etanol e acetato de etila (0,6928g) e mistura ternária entre os solventes etanol, acetato de etila e clorofórmio (0,5650g).
- Todos os modelos testados para a fração básica apresentaram falta de ajuste no nível de 90% e 95% de confiança. Analisando apenas os valores experimentais dos rendimentos obtidos na figura do planejamento, foi possível verificar que entre os solventes puros, apenas o clorofórmio apresentou maior rendimento. Dois efeitos de interações sinérgicos significativos também foram observados.
- O maior rendimento das fibras (0,0584g) foi obtido com o extrato de número 14, preparado com acetona e clorofórmio na proporção 1:1, enquanto que o menor foi observado para o extrato de número 8 (0,0123g), preparado com uma mistura binária entre os solventes etanol e acetona.
- Os maiores valores de resíduos são verificados para os extratos 7 (50% etanol, 50% diclorometano) e 14 (50% acetona, 50% clorofórmio).

- Por fim, pode-se concluir que os maiores rendimentos foram alcançados sempre com misturas binárias ou ternárias, ou seja, no processo de extração de metabólitos secundários a utilização de misturas é mais eficiente do que o solvente puro.

Na segunda etapa foram avaliados a influência da força cromatográfica da fase móvel e do solvente extrator, na qualidade da impressão digital cromatográfica dos metabólitos secundários da planta do gênero *Mikania*, para as frações orgânica e básica. Foi possível concluir que:

- Aumentando a força cromatográfica da fase móvel de 1,0 para 2,0 diminui o número de picos no cromatograma.
- O número de picos cromatográficos obtidos na impressão digital não está relacionado com o rendimento das frações.
- O número de picos obtidos nas frações básicas é menor do que nas frações orgânicas, ou seja, a fração orgânica possui maior diversidade de compostos químicos extraídos.

Na seqüência, realizou-se um estudo exploratório dos dados cromatográficos obtidos com a fase móvel 65% água, 17,5% metanol e 17,5% acetonitrila, por ser a que apresentou maior informação química.

Para as frações básicas foi possível concluir que:

- A intensidade dos picos cromatográficos nos tempos de retenção próximos a 2,7; 3,5; 4,3 e 15,5 min depende da composição do solvente extrator.
- As amostras dos grupos I e II possuem menores quantidades da substância ou misturas de substâncias extraídas nos tempos de retenção de 2,4 e 3,0 min.
- Uma maior quantidade da substância ou misturas de substâncias extraídas nos tempos de retenção de 2,4 e 3,0 min são encontradas nas amostras dos grupos III e V.
- As amostras do grupo II possuem uma maior quantidade da substância ou misturas de substâncias extraídas no tempo de retenção de 14,5 min.

Para as frações orgânicas foi possível concluir que:

- A composição do sistema extrator influencia na concentração dos compostos químicos extraídos, principalmente nos tempos de retenção próximos a 2,3; 2,7; 8,2; 10,9 e 11,5 min.
- As amostras do grupo II permitem extrair uma maior quantidade das substâncias com tempos de retenção de 8,0 e 10,5 min.
- As amostras do grupo I são discriminadas principalmente devido à variável com tempos de retenção de 8,7 e 11,3 min.
- Os resultados obtidos com a análise de componentes principais foram confirmados pela análise hierárquica de agrupamentos.

Na terceira etapa com o estudo exploratório dos dados espectrais obtidos após as análises dos extratos brutos e das frações orgânica e gorduras/graxas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier foi possível:

- Traçar o perfil dos diferentes extratos e frações, identificando qualitativamente as amostras de composições químicas diferentes.
- Determinar as regiões discriminatórias dos grupos funcionais que são específicas para determinados compostos químicos.
- As frações gorduras e graxas 2, 3, 5, 7, 11, 12, 17, 20, 21, 22 e 30 apresentam maiores quantidades de grupamentos com ν Csp³-H de alcanos (2950-2850 cm⁻¹) e ν O=C-H de aldeídos alifáticos (2900-2700 cm⁻¹), sendo esses característicos na composição dos extratos de gorduras e graxas.
- Os resultados obtidos com a análise de componentes principais foram confirmados pela análise hierárquica.

Outra parte do trabalho foi fazer um estudo exploratório dos dados espectrais obtidos após as análises dos extratos brutos e das frações básicas e gorduras/graxas por espectrofotometria no ultravioleta visível. Foi possível concluir que:

- As amostras dos extratos brutos dividiram-se em dois grupos nas componentes principais CP1 e CP2, e somente as amostras do grupo I

absorveram na região de 240-298 nm.

- Na análise de componentes principais para as frações básicas somente a CP2 conseguiu discriminar os dois grupos formados.
- As amostras do grupo I das frações básicas são especialmente caracterizadas pela banda que absorve nos comprimentos de onda de 197-232 nm, enquanto que as do grupo II são nos comprimentos de onda de 240-296 e 296-400 nm.
- Na análise das frações gorduras e graxas as amostras dividiram-se em dois grupos nas CP1 e CP2, com exceção par as amostras 1, 3 e 18 que ficaram isoladas.
- Somente as amostras do grupo II das frações gorduras e graxas absorvem na região de 218-317 nm.
- As amostras isoladas 1, 3 e 18 são especialmente caracterizadas pela banda que absorve nos comprimentos de onda de 198-248 nm.
- Os resultados obtidos com a análise de componentes principais foram confirmados pela análise hierárquica e pelos espectros de absorção no ultravioleta/visível.



Capítulo VI

Referências

REFERÊNCIAS

1. Schulz, H., Baranska, M.; **Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy**; *Vibrational Spectroscopy*, v.43, p. 13- 25, 2007.
2. Rhodes, M. J. C.; **Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems**; *Plant Mol. Biol.*, v. 24, n 1, p. 1-20, 1994.
3. Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; 4 ed.; Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed da UFSC, 2002.
4. Harbone, J.B., Tomas-Barberan, F.A.; **Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids**; Oxford Science Publications, p. 159-208, 1991.
5. Post-Beittenmiller, D.; **Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**; v. 47, p. 405-430, 1996.
6. Li, B. Y., Hu, Y., Liang, Y. Z., Xie, P. S. e Du, Y. D.; **Quality evaluation of fingerprints of herbal medicine with chromatographic data**; *Analytica Chimica Acta*, v. 514, p. 69-77, 2004.
7. Scarminio, I. S., Almeida, A. A.; **Statistical mixture design optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea**; *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 414-420, 2007.
8. Coenegeracht, P. M. J., Metting, H. J., Smilde, A. K., Coenegeracht-Lamers, P. J. M.; **A chemometric investigation of the selective of multisolvent mobile phase systems in RP-HPLC**; *Chromatographia*, v. 27, p. 135-141, 1989.
- 9 Snyder, L. R., Kirkland, J. J.; **Introduction to modern liquid chromatography**; 2 ed.; Editora John Wiley & Sons Inc, New York, 1997.
- 10 Bruns R. E., Scarminio I. S., Neto B. B.; **Statistical Design – Chemometrics**; Elsevier, Amsterdam, 2006.

- 11 Cornell, J. A.; **Experiments with Mixture: designs, models, and the analysis of mixture data**; 3a ed., John Wiley & Sons Ltd, NY, 2002.
- 12 Soares, P. K. Scarminio I. S.; **Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus *Bauhinia***; *Phytochemical Analysis*, v. 19, p. 78-85, 2008.
- 13 Lonni, A. A. S. G., Scarminio, I. S., Silva, L. M. C., Trevisan, D. T.; **Differentiation of species of the *Baccharis* genus by HPLC and chemometric methods**; *Analytical Science*, v. 19, p. 1013-1018, 2003.
- 14 Soares, P. K., Scarminio, I. S., Bruns, R E.; **Statistical mixture design – varimax factor optimization for selective compound extraction from plant material**; *Analytica Chimica*, v. 613, p. 48-55, 2008.
- 15 Neto, B. B., Scarminio, I. S., Bruns, R E.; **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**; ed. Campinas, Editora da UNICAMP, 2003.
- 16 Wang, S., Ma, H. Q., Sun, Y. J., Qiao, C. D., Shao, S. J. e Jiang, S. X.; **Fingerprint quality control of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels by high-performance liquid chromatography coupled with discriminant analysis**; *Talanta*, v. 72, p. 434-436, 2007.
- 17 Fan, X. H., Cheng, Y. T., Ye, Z. L., Lin, R. C., Qian, Z. Z.; **Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines**; *Analytica Chimica Acta*, V. 555, p. 217-224, 2006.
- 18 Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; **Practical HPLC method development**; 2^a ed Canadá: John Wiley & Sons, 1997
- 19 Zhao, L., Hunang, C., Shan, Z., Xiang, B., Mei, L.; **Fingerprint analysis of *Psoralea carylifolia* L. by HPLC and LC-MN**; *Journal of chromatography B*, v. 821, p. 67-74, 2005.
- 20 Jiang, F., Tao, Y., Shao, Y.; **Fingerprint quality control of Qianghuo by HPLC- DAD**; *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 265-270, 2007.

- 21 Ciela, L., Bogucka-Kocka, A., Hajnos, M., Petruczynik, A., Waksmundzka-Hajnos, M.; **Two-dimensional thin-layer chromatography with adsorbent gradient as a method of chromatographic fingerprinting of furanocoumarins for distinguishing selected varieties and forms of *Heracleum* spp**; Journal of chromatography A, v.1207, p. 160-168, 2008.

- 22 Soares P. K.; **Taxonomia por abordagem metabolômica e métodos quimiométricos para análise e rastreio de plantas do gênero Bauhinia**; 2006. 99 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina.

- 23 Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L.; **Practical HPLC method development**; 2 ed. Editora John Wiley & Sons Inc, New York, 1997

- 24 Drasar, p., Moravcova, J.; **Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines**; Journal of chromatography B, v. 812, p. 3-21, 2004.

- 25 Heyden, Y. V., Xu, C. J., Liang, Y. Z., Chau, F. T.; **Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines**; Journal of chromatography A, v. 1134, p. 253-259, 2006.

- 26 Heyden, Y. V., Alaerts, G., Matthijs, N., Smeyers-Verbeke, J.; **Chomatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns**; Journal of chromatography A, “article in press”, 2007.

- 27 Magalhães, P. M.; **Monografias de cultivo em plantas medicinais**; Campinas, 1998, s.n. (Datilografado).

- 28 Oliveira, F., Saito, M. L., Garcia, L.O.; **Morfologia externa das partes aéreas e anatomia foliar das espécies brasileiras de *Mikania* secção Globosae Bobinson- visão farmacognóstica**; LECTA-USF, v. 12, p. 23-65, 1994.

- 29 V. Lucas; **Estudo farmacognóstico do guaco *Mikania glomerata* Sprengel**, Revista da Flora Medicinal; v. 9, p. 101-132, 1942.

- 30 Suyenaga, E. S., Reche, E., Farias, F. M., Schapoval, E. E., Chaves, C. G. M., Henriques, A. T.; **Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania***; Phytotherapy research, v. 16, p. 519-523, 2002.

- 31 Santos, S. C.; **Caracterização Cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* Schultz BIP.ex Baker e *M. glomerata* SPRENGEL e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar;** 2005, 93 f. Dissertação de Mestrado, UNICAMP.
- 32 Leite, M. G. R., Souza, C. L., Silva, M. A. M., Moreira, L. K. A., Matos, F. J. A., and Viana, G. S. B.; **Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco);** *Justicia pectoralis* Jac (anador) e *Torresea cearensis* Fr. All (cumarú), *Revista Brasileira de Farmácia*, v.1, p. 12-15, 1993.
- 33 Rehder, V. L. G., Sartoratto, A., Magalhães, P. M., Figueira, G.M., Montanari, I., and Lourenço C. M.; **Teor de cumarina em *Mikania laevigata* Schultz ex Baker em função do cultivo, colheita e secagem;** *Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, São Paulo, p. 107, 1998.
- 34 Soares R. M., Costa S. S., Jansen, J. M., Silva, C. A. Lopes, C. S., Bernardo-Filho M., Nascimento S. V., Crddli D. N., Portela N. B.; **Bronchodilatador activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea;** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 54, p. 249-256, 2002.
- 35 Borges, W.N.; **Aplicação de métodos de Reconhecimento de Padrões para classificação de Óleos Vegetais;** *Dissertação de Mestrado (2001)* – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás.
- 36 OTTO, M.; **Chemometrics – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry;** Weinheim: Wiley, 1999.
- 37 Johnson, A. R., Wichem, W. D.; **Applied Multivariate Statistical Analysis;** Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 4º Edição, 1998.
- 38 Beebe, K. R., Pell, R. J., Seasholtz, M. B.; **Chemometrics: a practical guide;** Editora John Wiley & Sons Ltd, New York, 1998.
- 39 Hendricks, M. M. W. B., Juarez, L. C., De Bont, D., Hall, R. D.; **Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts;** *Anal. Chim. Acta*, v. 545, p. m53-64, 2005.
- 40 Massart, D. L., Detryer, A. e Heyden, Y. V.; **Chemometric comparison of recent chromatographic and eletrophoretic methods in a quantitative structure- retention and retentio-activity relationship context;** *Journal of chromatogrphy A*, v. 986, p. 227-238, 2003.

- 41 Detroyer, A., Questier, F., Heyden, Y. V. Borosy, A. P. e Guo, Q.; **Exploratory chemometric analysis of the classification of pharmaceutical substances based on chromatographic data**; Journal of chromatography A, v. 897, p. 23-36, 2000.
- 42 Reyment, R. e Jöreskog, K. G.; **Applied factor analysis in the natural sciences**; Cambridge University Press, Cambridge,UK, 1996.
- 43 Reyment, R. e Jöreskog, K. G.; **Applied factor analysis in the natural sciences**; Cambridge University Press, Cambridge,UK, 1996.
- 44 Brereton, R. G., Thurston, T. J., Foord, D. J. e Escott, R. E. A.; Principal component plots for exploratory investigation of reactions using ultraviolet-visible spectroscopy: application to the formation of benzophenone phenylhydrazone; Talanta, v. 63, p. 757-769, 2004.
- 45 Camarão, E. B., Melecchi, M. S., Peres, V. F., Dariva, C., Zini, C. A., Abad, F., C., Martinez, M. M.; **Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers**; Ultrasonics Sonochemistry.
- 46 Galagovsky, K. L.; **Química orgânica: fundamentos teóricos-práticos para el laboratorio**; Buenos Aires: Editora Eudeba, 1995.
- 47 Box, G. E. P. e Draper, N. R.; **Empirical model-building and response surfaces**; New York, Wiley, 1987.