



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SABRINA AFONSO

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANALGÉSICA EM CAMUNDONGOS DE EXTRATOS DAS  
FOLHAS DE *Vernonia condensata* BAKER**

---

Londrina  
2011

**SABRINA AFONSO**

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANALGÉSICA EM CAMUNDONGOS DE EXTRATOS DAS  
FOLHAS DE *Vernonia condensata* BAKER**

Dissertação apresentada por Sabrina Afonso ao Programa de Mestrado em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Estefânia Gastaldello  
Moreira

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

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

A257a Afonso, Sabrina.

Análise exploratória e avaliação da atividade analgésica em camundongos de extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker / Sabrina Afonso. – Londrina, 2011.  
145 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Co-orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Quimiometria – Teses. 3. Analgesia – Teses. 4. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 5. Vernonia – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Moreira, Estefânia Gastaldello. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 543

**SABRINA AFONSO**

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANALGÉSICA EM CAMUNDONGOS DE EXTRATOS DAS FOLHAS  
DE *Vernonia condensata* BAKER**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Ieda Spacino Scarminio (Orientadora)  
UEL – Londrina - PR

---

Profª. Dra. Isabel Craveiro Moreira  
UTFPR – Londrina - PR

---

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 02 de março de 2011.

*Aos meus pais, Laudemiro e Fátima e às  
minhas irmãs, Manoela e Renata, pelo apoio,  
amor e confiança.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho em todos os momentos.

A minha família, pela confiança depositada em mim, e em especial, a minha irmã Renata que esteve comigo me ajudando durante todo o tempo.

A Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio, pela orientação, apoio e confiança durante todo o trabalho.

A Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira pela co-orientação, amizade e carinho.

Aos professores do Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina pela contribuição na minha formação.

Aos técnicos: Nelson Janeiro Rodriguez pela liofilização das amostras e Jurandir Pereira Pinto pela ajuda nas análises cromatográficas.

Aos amigos do mestrado, Adriana, Elaine, Raquel e Edmar, pela amizade em todos os momentos.

Aos amigos do LQCN, Aldair, Leandro, Fernanda, Elis, Ivanira, Letícia, Talita e Guilherme, pela ajuda em todas as etapas do trabalho.

Aos amigos do LEMA, Danilo e José Luiz, pela alegria em todos os momentos.

Aos amigos do LAFT, Wagner, Vitor, Bianca e André, pela ajuda nos testes farmacológicos.

Ao Thiago pelo carinho, amor e compreensão em todas as horas.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

AFONSO, Sabrina. **Análise exploratória e avaliação da atividade analgésica em camundongos de extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker**. 2001. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

Neste estudo avaliou-se a atividade analgésica em camundongos por meio do modelo de contorções abdominais e da placa quente, bem como a dose letal média,  $DL_{50}$ , usando diferentes frações de dois extratos de folhas de *Vernonia condensata* Baker. As frações que apresentaram atividade analgésica foram as frações polares dos extratos aquosos de folhas coletadas no outono e verão na dose de 25 mg/kg, frações polares dos extratos orgânicos (60% de acetona:30% de diclorometano:10% de etanol) de folhas coletadas no outono, inverno e verão na dose de 400 mg/kg e frações intermediárias dos extratos orgânicos das folhas coletadas no outono nas doses de 25 e 400 mg/kg e no verão na dose de 100 mg/kg. As frações polares apresentaram baixa toxicidade aguda ( $DL_{50} > 2000$  mg/kg). Métodos quimiométricos foram associados a dados espectroscópicos e cromatográficos para discriminar as diferentes frações dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas em diferentes épocas do ano. Modelos de análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica (AH), aplicados aos dados fornecidos pela cromatografia e espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível e infravermelho, mostraram-se ferramentas úteis na investigação da composição química dos extratos. Os dados espectroscópicos associados a métodos quimiométricos indicaram a presença de alcalóides com esqueleto semelhante à boldina e de lactonas sesquiterpênicas, que são compostos que apresentam atividade anti-inflamatória, na fração polar e intermediária, respectivamente. As características da impressão digital cromatográfica foram sensíveis a força cromatográfica. A melhor fase móvel para produzir impressão digital informativa, isto é, maior quantidade de picos no cromatograma, foi 26% de acetonitrila, 51% de água e 23% de metanol (v/v/v).

**Palavras-chave:** *Vernonia condensata*. Atividade analgésica. Métodos quimiométricos.

AFONSO, Sabrina. **Exploratory analysis and evaluation of analgesic activity in mice of extracts of *Vernonia condensata* Baker leaves**. 2001. 145 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

### ABSTRACT

In this study we evaluated in mice the analgesic activity through the abdominal writhing model and hot plate, as well as the median lethal dose, LD<sub>50</sub>, using different fractions of two extracts of *Vernonia condensata* Baker. The fractions that presented analgesic activity were the polar fraction of aqueous extract of leaves collected in autumn and summer at a dose of 25 mg/kg, polar fraction of organic extract (60% acetone:30% dichloromethane:10% ethanol) of leaves collected in autumn, winter and summer at a dose of 400 mg/kg and intermediate fraction of organic extract of leaves collected in autumn at a dose of 25 and 400 mg/kg and in the summer at a dose of 100 mg/kg. The polar fractions presented low acute toxicity (LD<sub>50</sub> > 2000 mg/kg). Chemometrics methods were associated with chromatographic and spectroscopic data to discriminate different fractions of extracts from the leaves of *Vernonia condensata* Baker collected at different times of the year. Models of principal component analysis (PCA) and hierarchical analysis (AH), applied to data from the chromatography and absorption spectroscopy in the ultraviolet-visible and infrared have proved to be useful tools in the investigation of the chemical composition of extracts. The spectroscopic data associated with chemometrics methods indicated the presence of alkaloids with framework similar to boldine and sesquiterpene lactones, which are compounds that show anti-inflammatory activity, in the polar fraction and intermediate, respectively. The characteristics of the chromatographic fingerprint were sensitive to chromatography strength. The best mobile phase to produce information fingerprint, this is, a larger number of peaks in the chromatogram, was 26% acetonitrile, 51% water and 23% methanol (v/v/v).

**Keywords:** *Vernonia condensate*. Analgesic activity. Chemometric methods.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$	ácido
$\beta$	básico
$\pi$	dipolo
$\varepsilon$	matriz dos resíduos
$\Phi_i$	fração de volume
ACN	acetonitrila
ACP	Análise de Componentes Principais
AH	Análise Hierárquica
ANOVA	Análise de variância
Bc	boldo comercial
CCD	cromatografia de camada delgada
CEEA	comitê de ética em experimentação animal
CG	cromatografia gasosa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CP1	primeira componente principal
CP2	segunda componente principal
CP3	terceira componente principal
CP4	quarta componente principal
CP5	quinta componente principal
$d_{ik}$	distância euclidiana entre os pontos i e k
$d_{máx}$	distância máxima entre dois pontos
DL <sub>50</sub>	dose letal média
EA	extrato aquoso
EC	eletroforese capilar
EM	espectrometria de massas
EPM	erro padrão da média
EO	extrato orgânico
FB	fração básica
FI	fração de polaridade intermediária
FM	fase móvel
FN	fração neutra
FP	fração polar

<b>FUEL</b>	Fundação da Universidade Estadual de Londrina
<b>I</b>	inverno
<b>IBU</b>	ibuprofeno
<b>IV</b>	infravermelho
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MTC</b>	medicina tradicional chinesa
<b><i>n</i></b>	objetos (amostras)
<b>O</b>	outono
<b>ODCE</b>	Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômico
<b><i>p</i></b>	variáveis
<b><i>P</i></b>	matriz dos pesos
<b>P</b>	primavera
<b>P'</b>	índice de polaridade
<b>PDA</b>	detector de arranjo de fotodiodo
<b><i>q</i></b>	número de componentes principais
<b>RMN</b>	ressonância magnética nuclear
<b>S</b>	força
<b>S<sub>i</sub></b>	força do solvente puro
<b>S<sub>ij</sub></b>	índice de similaridade entre os pontos <i>i</i> e <i>j</i>
<b>SDA</b>	State Drug Administration
<b><i>t</i></b>	transposta
<b><i>T</i></b>	matriz dos escores
<b>tipo-Q</b>	estudo da relação entre amostras
<b>tipo-R</b>	estudo da relação entre variáveis
<b>UV-Vis</b>	ultravioleta-visível
<b>V</b>	verão
<b>VEI</b>	veículo
<b><i>X</i></b>	matriz de dados originais
<b><i>x<sub>d</sub></i></b>	acidez
<b><i>x<sub>e</sub></i></b>	basicidade
<b><i>x<sub>n</sub></i></b>	dipolaridade
<b>WHO</b>	World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura molecular da boldina.....	28
<b>Figura 2</b> – Estrutura molecular da $\gamma$ - lactona.....	29
<b>Figura 3</b> – Estrutura molecular do flavonóide.....	29
<b>Figura 4</b> – Representação do símbolo da Quimiometria.....	35
<b>Figura 5</b> – Sequência da análise multivariada dos dados experimentais por métodos quimiométricos.....	37
<b>Figura 6</b> – Esquema da decomposição da matriz X no produto de duas matrizes.....	38
<b>Figura 7</b> – Fotos da espécie <i>Vernonia condensata</i> Baker e da exsicata depositada no herbário FUEL.....	43
<b>Figura 8</b> – Sequência do procedimento para o preparo do extrato orgânico.....	46
<b>Figura 9</b> – Sequência do procedimento para o preparo do extrato aquoso.....	47
<b>Figura 10</b> – Esquema utilizado para o fracionamento do extrato bruto.....	48
<b>Figura 11</b> – Procedimento para estimar a $DL_{50}$ com dose inicial de 2000 mg/kg.....	49
<b>Figura 12</b> – Procedimento experimental para avaliar a atividade analgésica pelo método das contorções abdominais.....	50
<b>Figura 13</b> – Procedimento experimental para avaliar a atividade analgésica por meio do tempo de reação dos animais ao estímulo térmico da placa quente.....	51
<b>Figura 14</b> – Triângulo de seletividade de solventes para cromatografia.....	53
<b>Figura 15</b> – Triângulo dos solventes metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e água ( $H_2O$ ) utilizados como fase móvel nas análises cromatográficas.....	54
<b>Figura 16</b> – Gráfico da média do teor de umidade e teor de cinzas totais do material vegetal coletado nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p>0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.....	58
<b>Figura 17</b> – Gráfico do rendimento médio dos extratos bruto extraídos em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p>0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.....	59
<b>Figura 18</b> – Gráfico do rendimento médio das fibras dos extratos em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios	

padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey .....	60
<b>Figura 19</b> – Gráfico do rendimento médio da fração neutra dos extratos em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.....	61
<b>Figura 20</b> – Gráfico do rendimento médio da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey .....	62
<b>Figura 21</b> – Gráfico do rendimento médio da fração básica dos extratos em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.....	62
<b>Figura 22</b> – Gráfico do rendimento médio da fração polar dos extratos em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.....	63
<b>Figura 23</b> – Eficácia do ibuprofeno (IBU) e de diferentes doses da fração polar do extrato aquoso (FPEA) das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas no outono, inverno e verão em inibir contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,8% em camundongos machos. Os dados representam a porcentagem de inibição média em relação ao grupo controle (VEI) e os erros padrões da média de 7 a 11 camundongos em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado com VEI (Teste de Kruskal Wallis complementado com Dunn).....	65
<b>Figura 24</b> – Eficácia do ibuprofeno (IBU) e de diferentes doses da fração polar do extrato orgânico (FPEO) das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas no outono, inverno e verão em inibir contorções abdominais	

induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,8% em camundongos machos. Os dados representam a porcentagem de inibição média em relação ao grupo controle (VEI) e os erros padrões da média de 7 a 11 camundongos em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado com VEI (Teste de Kruskal Wallis complementado com Dunn).....	66
<b>Figura 25</b> – Eficácia do ibuprofeno (IBU) e de diferentes doses da fração intermediária do extrato orgânico (FIEO) das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas no outono, inverno e verão em inibir contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,8% em camundongos machos. Os dados representam a porcentagem de inibição média em relação ao grupo controle (VEI) e os erros padrões da média de 9 a 10 camundongos em cada grupo. * $p < 0,05$ comparado com VEI (Teste de Kruskal Wallis complementado com Dunn).....	67
<b>Figura 26</b> – Eficácia das diferentes doses da fração polar do extrato aquoso (FPEA) e fração polar do extrato orgânico (FPEO) das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas no outono (O) em relação ao grupo controle negativo (veículo – VEI). Os dados representam o tempo de reação média dos animais ao estímulo nociceptivo da placa quente e os erros padrões da média de oito camundongos em cada grupo. $p > 0,05$ comparado com VEI (ANOVA).....	68
<b>Figura 27</b> – Espectros de absorção no ultravioleta-visível da fração de polaridade intermediária dos extratos aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.....	69
<b>Figura 28</b> – Gráfico dos escores das componentes 1 e 2 da fração de polaridade intermediária dos extratos aquoso e orgânico no ultravioleta-visível, que explicam 97,88% da variância total dos dados.....	70
<b>Figura 29</b> – Gráfico dos loadings das componentes 1 e 2 da fração de polaridade intermediária dos extratos aquoso e orgânico no ultravioleta-visível .....	71
<b>Figura 30</b> – Dendograma obtido pela análise hierárquica da fração de polaridade intermediária dos extratos aquoso e orgânico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker no ultravioleta-visível .....	72
<b>Figura 31</b> – Espectros de absorção no ultravioleta-visível da fração polar dos extratos aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano .....	73

<b>Figura 32</b> – Gráfico dos escores das componentes 1 e 3 da fração polar dos extratos aquoso e orgânico no ultravioleta-visível, que explicam 93,81% da variância total dos dados .....	74
<b>Figura 33</b> – Gráfico dos loadings das componentes 1 e 3 da fração polar dos extratos aquoso e orgânico no ultravioleta-visível.....	75
<b>Figura 34</b> – Dendograma obtido pela análise hierárquica da fração polar dos extratos aquoso e orgânico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker no ultravioleta-visível.....	76
<b>Figura 35</b> – Espectros de absorção no infravermelho da fração de polaridade intermediária dos extratos aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.....	77
<b>Figura 36</b> – Gráfico dos escores das componentes 1 e 3 da fração de polaridade intermediária dos extratos aquoso e orgânico no infravermelho, que explicam 97,24% da variância total dos dados.....	78
<b>Figura 37</b> – Gráfico dos loadings das componentes 1 e 3 da fração de polaridade intermediária dos extratos aquoso e orgânico no infravermelho.....	79
<b>Figura 38</b> – Dendograma obtido pela análise hierárquica da fração de polaridade intermediária dos extratos aquoso e orgânico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker no infravermelho.....	80
<b>Figura 39</b> – Espectros de absorção no infravermelho da fração polar dos extratos aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano .....	81
<b>Figura 40</b> – Gráfico dos escores das componentes 1 e 2 da fração polar dos extratos aquoso e orgânico no infravermelho, que explicam 92,04% da variância total dos dados .....	81
<b>Figura 41</b> – Gráfico dos loadings das componentes 1 e 2 da fração polar dos extratos aquoso e orgânico no infravermelho .....	82
<b>Figura 42</b> – Dendograma obtido pela análise hierárquica da fração polar dos extratos aquoso e orgânico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker no infravermelho .....	83
<b>Figura 43</b> – Gráfico dos números de picos no cromatograma da fração polar do extrato em meio aquoso ( <b>a, b, c</b> ), fração polar do extrato em meio orgânico ( <b>d, e, f</b> ), fração intermediária do extrato em meio orgânico ( <b>g, h, i</b> ) e boldina ( <b>j</b> ), nas forças 1,0, 1,5 e 2,0 das nove fases móveis estudadas, monitoradas em 210 nm.....	86

<b>Figura 44</b> – Cromatograma das 9 amostras da fração polar do extrato aquoso (FPEA) e da boldina obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	87
<b>Figura 45</b> – Gráfico dos escores das CP1 e CP2 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato aquoso da amostra comercial de boldo e das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas nas quatro estações do ano mostrando a formação de cinco grupos .....	88
<b>Figura 46</b> – Gráfico dos loadings das CP1 e CP2 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato aquoso da amostra comercial de boldo e das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas nas quatro estações do ano.....	89
<b>Figura 47</b> – Cromatograma das amostras do grupo I discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	90
<b>Figura 48</b> – Cromatograma das amostras do grupo II discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	91
<b>Figura 49</b> – Cromatograma das amostras do grupo III discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	91
<b>Figura 50</b> – Cromatograma das amostras do grupo IV discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	92
<b>Figura 51</b> – Cromatograma das amostras do grupo V discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	92
<b>Figura 52</b> – Análise hierárquica dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato aquoso da amostra comercial de	

boldo e das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas nas quatro estações do ano .....	93
<b>Figura 53</b> – Gráfico dos escores das CP1 e CP4 que explicam 80,33 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEABc mostrando a formação de 8 grupos .....	94
<b>Figura 54</b> – Gráfico dos loadings da CP1 e CP4 para os espectros da FPEABc obtidos por CLAE.....	95
<b>Figura 55</b> – Gráficos dos 8 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEABc no comprimento de onda de 190 a 400 nm .....	95
<b>Figura 56</b> – Gráfico dos escores das CP2, CP4 e CP5 que explicam 24,88 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEAO2 mostrando a formação de 7 grupos .....	96
<b>Figura 57</b> – Gráfico dos loadings da CP2, CP4 e CP5 para os espectros da FPEAO2 obtidos por CLAE.....	97
<b>Figura 58</b> – Gráficos dos 7 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEAO2 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.....	98
<b>Figura 59</b> – Gráfico dos escores da CP1 e CP2 que explicam 93,32 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEAV1 mostrando a formação de 8 grupos .....	99
<b>Figura 60</b> – Gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para os espectros da FPEAV1 obtidos por CLAE.....	100
<b>Figura 61</b> – Gráficos dos 8 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEAV1 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.....	100
<b>Figura 62</b> – Gráfico dos espectros semelhantes obtidos pela análise por CLAE da FPEAV1 e FPEAO2 .....	101
<b>Figura 63</b> – Cromatograma das 9 amostras da fração polar do extrato orgânico (FPEO) e da boldina obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	103
<b>Figura 64</b> – Gráfico dos escores das CP1 e CP5 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas nas quatro estações do ano mostrando a formação de quatro grupos.....	103

<b>Figura 65</b> – Gráfico dos loadings das CP1 e CP5 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas nas quatro estações do ano.....	104
<b>Figura 66</b> – Cromatograma da amostra do grupo I discriminada pela projeção dos escores da CP1 e CP5, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	105
<b>Figura 67</b> – Cromatograma das amostras do grupo II discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP5, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	106
<b>Figura 68</b> – Cromatograma das amostras do grupo III discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP5, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	106
<b>Figura 69</b> – Cromatograma das amostras do grupo IV discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP5, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	107
<b>Figura 70</b> – Análise hierárquica dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas nas quatro estações do ano .....	108
<b>Figura 71</b> – Gráfico dos escores da CP1 e CP4 que explicam 84,26 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEOBc mostrando a formação de 7 grupos .....	109
<b>Figura 72</b> – Gráfico dos loadings da CP1 e CP4 para os espectros da FPEOBc obtidos por CLAE.....	110
<b>Figura 73</b> – Gráficos dos 7 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEOBc no comprimento de onda de 190 a 400 nm .....	110
<b>Figura 74</b> – Gráfico dos escores das CP1 e CP2 que explicam 93,23 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEOO2 mostrando a formação de 8 grupos .....	111

<b>Figura 75</b> – Gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para os espectros da FPEOO2 obtidos por CLAE.....	112
<b>Figura 76</b> – Gráficos dos 8 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEOO2 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.....	113
<b>Figura 77</b> – Gráfico dos escores das CP1 e CP3 que explicam 71,63 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEOV1 mostrando a formação de 7 grupos .....	114
<b>Figura 78</b> – Gráfico dos loadings da CP1 e CP3 para os espectros da FPEOV1 obtidos por CLAE.....	114
<b>Figura 79</b> – Gráficos dos 7 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEOV1 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.....	115
<b>Figura 80</b> – Gráfico dos espectros semelhantes obtidos pela análise por CLAE da FPEOO2 e FPEOV1 .....	116
<b>Figura 81</b> – Cromatograma das 9 amostras da fração intermediária do extrato orgânico (FIEO) e da boldina obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	116
<b>Figura 82</b> – Gráfico dos escores das CP1 e CP3 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração intermediária do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas nas quatro estações do ano mostrando a formação de quatro grupos .....	117
<b>Figura 83</b> – Gráfico dos loadings das CP1 e CP3 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração intermediária do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas nas quatro estações do ano.....	118
<b>Figura 84</b> – Cromatograma das amostras do grupo I discriminada pela projeção dos escores da CP1 e CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	119
<b>Figura 85</b> – Cromatograma das amostras do grupo II discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	119

<b>Figura 86</b> – Cromatograma da amostra do grupo III discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	120
<b>Figura 87</b> – Cromatograma da amostra do grupo IV discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H <sub>2</sub> O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm .....	120
<b>Figura 88</b> – Análise hierárquica dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração intermediária do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas nas quatro estações do ano.....	121
<b>Figura 89</b> – Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 que explicam 99,52 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FIEOBc mostrando a formação de 5 grupos .....	122
<b>Figura 90</b> – Gráfico dos loadings da CP1, CP2 e CP3 para os espectros da FIEOBc obtidos por CLAE.....	123
<b>Figura 91</b> – Gráficos dos 5 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FIEOBc no comprimento de onda de 190 a 400 nm .....	110
<b>Figura 92</b> – Gráfico dos escores da CP2 e CP4 que explicam 19,27 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FIEOO2 mostrando a formação de 7 grupos .....	124
<b>Figura 93</b> – Gráfico dos loadings da CP2 e CP4 para os espectros da FIEOO2 obtidos por CLAE.....	125
<b>Figura 94</b> – Gráficos dos 7 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FIEOO2 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.....	125
<b>Figura 95</b> – Gráfico dos escores das CP2 e CP4 que explicam 13,50 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FIEOV1 mostrando a formação de 10 grupos .....	126
<b>Figura 96</b> – Gráfico dos loadings da CP2 e CP4 para os espectros da FIEOV1 obtidos por CLAE.....	127
<b>Figura 97</b> – Gráficos dos 10 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FIEOV1 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.....	128

<b>Figura 98</b> – Gráfico dos espectros semelhantes obtidos pela análise por CLAE da FIEOO2 e FIEOV1 .....	128
<b>Figura 99</b> – Gráfico dos escores das CP1 e CP2 que explicam 91,15 % da variância total dos dados dos espectros da boldina mostrando a formação de 5 grupos .....	130
<b>Figura 100</b> – Gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para os espectros da boldina obtidos por CLAE.....	131
<b>Figura 101</b> – Gráficos dos 5 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da boldina no comprimento de onda de 190 a 400 nm .....	131
<b>Figura 102</b> – Gráfico dos espectros semelhantes obtidos pela análise por CLAE de todas as amostars em relação à boldina.....	132
<b>Figura 103</b> – Espectros dos picos dos cromatogramas no tempo de retenção de 2,742 minutos da boldina, da amostra comercial e das frações dos extratos de <i>V. condensata</i> Baker.....	133
<b>Figura 104</b> – Relação entre os espectros dos cromatogramas dos extratos e as estruturas de alguns alcalóides encontrados na literatura.....	134

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Solventes dos grupos determinados por Snyder .....	53
<b>Tabela 2</b> – Força e proporções dos solventes utilizados como fase móvel para a análise cromatográfica. ....	55
<b>Tabela 3</b> – Número de contorções abdominais para avaliação da atividade analgésica da fração polar do extrato aquoso (FPEA), fração polar do extrato orgânico (FPEO) e fração intermediária do extrato orgânico (FIEO) das folhas de <i>Vernonia condensata</i> Baker coletadas no outono (O), inverno (I) e verão (V) .....	64

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	23
1.1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1.1 Plantas Medicinais.....	24
1.1.2 Gênero <i>Vernonia</i> .....	25
1.1.3 Metabólitos Secundários.....	26
1.1.3.1 Alcalóides.....	27
1.1.3.2 Terpenóides.....	28
1.1.3.3 Compostos fenólicos.....	29
1.1.4. Extração.....	30
1.1.5 Testes Farmacológicos.....	30
1.1.6 Técnicas Espectroscópicas.....	31
1.1.7 Técnicas Cromatográficas.....	31
1.2 OBJETIVO GERAL.....	32
1.2.1 Objetivos Específicos.....	32
<b>CAPÍTULO II - MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS</b> .....	34
<b>2 QUIMIOMETRIA</b> .....	35
2.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS.....	36
2.2 PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS.....	37
2.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	38
2.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA.....	39
<b>CAPÍTULO III - METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	41
<b>3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	42
3.1 EQUIPAMENTOS.....	42
3.2 REAGENTES E FÁRMACOS.....	42
3.3 PLANTA.....	43
3.4 COLETA.....	44
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	44
3.5.1 Determinação da Perda por Dessecação.....	44
3.5.2 Determinação do Teor de Cinzas Totais.....	45
3.6 EXTRATO ORGÂNICO.....	45

3.7	EXTRATO AQUOSO .....	46
3.8	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS .....	47
3.9	TESTES FARMACOLÓGICOS.....	48
3.9.1	Animais.....	48
3.9.2	Determinação da Toxicidade Aguda .....	49
3.9.3	Atividade Analgésica.....	50
3.9.3.1	Método das Contorções Abdominais.....	50
3.9.3.2	Método da Placa Quente.....	51
3.10	ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL .....	52
3.11	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER .....	52
3.12	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	52
3.12.1	Escolha da Fase Móvel.....	52
3.12.2	Preparo das amostras para Análise Cromatográfica .....	55
3.13	ANÁLISE DOS DADOS.....	56
<b>CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>		<b>57</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	58
4.2	RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	59
4.3	TESTES FARMACOLÓGICOS.....	63
4.3.1	Toxicidade Aguda .....	63
4.3.2	Atividade Analgésica.....	63
4.3.2.1	Método das Contorções Abdominais.....	64
4.3.2.2	Método da Placa Quente.....	67
4.4	ANÁLISE POR UV-VIS .....	68
4.5	ANÁLISE POR FT-IR .....	76
4.6	ANÁLISE POR CLAE.....	85
4.6.1	Análise Exploratória da Fração Polar do Extrato em meio Aquoso.....	87
4.6.2	Análise Exploratória da Fração Polar do Extrato em meio Orgânico .....	102
4.6.3	Análise Exploratória da Fração Intermediária do Extrato em meio Orgânico .....	116
<b>CAPÍTULO V - CONCLUSÃO .....</b>		<b>136</b>

**5 CONCLUSÕES..... 137**

**REFERÊNCIAS ..... 140**



## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Plantas Medicinais

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos e o seu uso no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana<sup>1</sup>.

As plantas medicinais constituem fonte imediata e viável de medicamentos para enfermidades com poucos recursos terapêuticos<sup>2</sup>. Acredita-se que entre os motivos que explicam a opção pelo uso delas estão: a insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos medicamentos alopáticos, aliados à admiração pelos produtos naturais<sup>3</sup>.

Nas últimas décadas o interesse no estudo de plantas para fins medicinais tem sido crescente em todo o mundo, principalmente depois de um período em que a química sintética trouxe grandes avanços no desenvolvimento de novos medicamentos. Durante a primeira metade do século XX, acredita-se que tudo poderia ser sintetizado em laboratório, entretanto, as plantas, ainda hoje, continuam sendo fonte importante de substâncias farmacológicas ativas<sup>4</sup>. Elas representam as maiores fontes de substâncias ativas que podem ser usadas na área terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de substâncias produzidas.

Na busca de novos medicamentos originados de plantas estão envolvidos diversos conhecimentos como aspectos agrônômicos, botânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos<sup>5</sup>. É inegável a contribuição da medicina popular na busca de novos princípios ativos para o desenvolvimento de novas drogas. Dificilmente uma planta é escolhida por acaso para desenvolver uma pesquisa. Dados revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso<sup>6</sup>.

Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular<sup>7</sup>.

As plantas são comercializadas apoiadas em propagandas que prometem “benefícios seguros, já que são naturais”. Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validação científica, por não terem suas ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos ou clínicos<sup>8</sup>. Poucos destes produtos foram estudados de acordo com protocolos científicos modernos. A maioria não

pode, portanto, ser aceita como medicamento ético de prescrição livre porque, em geral, são produtos sem eficácia comprovada na espécie humana, sem estudos da eventual toxicidade e sem controle de qualidade apropriado<sup>3</sup>. Se a espécie vegetal medicinal estudada sofreu apenas investigação fitoquímica, deixando de lado a abordagem farmacológica, são válidos estudos que interliguem áreas multidisciplinares como etnobotânica, química e farmacologia, buscando resultados que possam validar ou não o uso da planta como medicinal<sup>1</sup>.

Um dos fatores de extrema importância para a descoberta de princípios ativos naturais consiste, principalmente, na interação entre a química e a farmacologia. Quanto mais estreita for esta colaboração, mais rápidos e consistentes serão os resultados<sup>9</sup>.

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

A etnofarmacologia é definida como "a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem". Constitui-se um elemento metodológico fundamental na busca de novas substâncias bioativas<sup>6</sup>.

### 1.1.2 Gênero *Vernonia*

Várias espécies do gênero *Vernonia* (Asteraceae = Compositae) são usadas na medicina tradicional, principalmente na América do Sul, Central, bem como na África<sup>10</sup>.

No Brasil, a *Vernonia condensata* Baker é uma das espécies de *Vernonia* mais frequentemente usada na medicina popular para várias indicações, tais como distúrbios gastrintestinais, dores de cabeça e estimulantes do apetite<sup>10</sup>. Alguns usos tradicionais das folhas de *Vernonia condensata* Baker podem ser justificados por dados fornecidos em estudos farmacológicos<sup>11</sup>.

A espécie *Vernonia condensata* Baker é possivelmente nativa da África e foi trazida ao Brasil ainda nos tempos coloniais pelos escravos. Os nomes populares mais comuns são 'boldo', 'boldo grande', 'assa-peixe', 'figatil', 'macelão', 'alumã', entre outros<sup>12</sup>.

Na composição química de *Vernonia condensata* Baker são documentadas as presenças de saponinas, glicosídeos cardiotônicos (vernonina), flavonóides, alcalóides e lactonas sesquiterpênicas<sup>10,13</sup>.

Outras plantas também são conhecidas como boldo, como o boldo-da-terra (*Plectranthus barbatus*) e boldo-miúdo (*Plectranthus neochilus*) pertencentes à família Lamiaceae<sup>13</sup>. Porém a espécie mais conhecida é o boldo do Chile (*Peumus Boldus* Molina) da família Monimiaceae, que tem como princípio ativo a boldina, um alcalóide com propriedades anti-inflamatórias associadas a atividade antioxidante<sup>14</sup>.

### 1.1.3 Metabólitos Secundários

As plantas produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos primários de crescimento e desenvolvimento metabólico<sup>15</sup>. Na análise metabolômica, o objetivo é analisar tantos metabólitos quanto possíveis em uma única análise<sup>16</sup>. Em muitos casos, estes metabólitos são únicos em cada espécie de planta, pois estas têm seu próprio conjunto específico de metabólitos secundários. As funções que esses metabólitos secundários exercem nas plantas vieram a ser apreciadas num contexto analítico apenas recentemente<sup>15</sup>.

Estes metabólitos representam muitas classes de diferentes compostos incluindo aminoácidos, gorduras, carboidratos e ácidos orgânicos. Isto gera problemas na escolha do protocolo de extração, porque as condições de extração diferem muito para os diferentes tipos de compostos. Por exemplo, para extração de metabólitos polares são usados o etanol, metanol ou água, enquanto que para os mais lipofílicos o solvente mais comum é o clorofórmio. A escolha dos solventes envolve um compromisso entre maximizar a eficiência das interações entre as moléculas e garantir o maior ou menor número de metabólitos dependendo do caso em estudo<sup>17</sup>.

A investigação preliminar de constituintes químicos representa, muitas vezes, um estímulo motivador da curiosidade, já que possibilita o conhecimento prévio dos extratos e indica a natureza das substâncias presentes, facilitando a escolha de técnicas de fracionamento cromatográfico. As principais classes de constituintes químicos de plantas detectadas com a aplicação de testes analíticos padrões são: ácidos graxos, terpenóides, esteróides, fenóis, alcalóides, cumarinas e flavonóides<sup>1</sup>.

Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos são a sazonalidade, ritmo circadiano (ciclo noite/dia), desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitudes, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos<sup>18</sup>.

A época em que a planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos, não são constantes durante todo o ano. A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura<sup>18</sup>.

Estudos recentes mostraram que as condições climáticas influenciaram na composição volátil de uma espécie vegetal usada para sintomas de enxaqueca<sup>19</sup>. Porém outros estudos mostram que os metabólitos secundários de uma espécie vegetal selvagem amostrada diretamente em seu habitat em três diferentes populações se mantiveram em concentrações constantes durante os anos de estudo, demonstrando, portanto, que em alguns casos o metabolismo secundário pode não se alterar em função de fatores climáticos, temporais ou ambientais<sup>20</sup>.

Os metabólitos secundários extraídos de plantas têm uma grande importância para a fitoquímica, medicina e possuem diversas aplicações industriais. Essas classes de compostos podem ser classificadas em três grupos com base na estrutura química: alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos<sup>21</sup>.

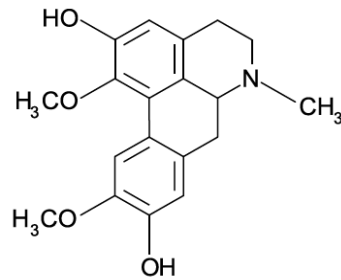
#### 1.1.3.1 Alcalóides

Os alcalóides são metabólitos secundários encontrados nas plantas constituídos por uma enorme quantidade de substâncias estruturalmente diferentes, e por isso a definição química para essa classe de compostos é muito difícil<sup>22</sup>.

Os alcalóides são produzidos através dos precursores aminoácidos, terpenos ou esteróides, que colaboram com a sua formação. As estruturas desses metabólitos apresentam cadeias carbônicas cíclicas que determinam a classificação dos mesmos<sup>22</sup>.

Segundo alguns estudos recentes, a boldina é um alcalóide encontrado no boldo e possui atividades farmacológicas em função da sua propriedade antioxidante<sup>14</sup>.

A Figura 1 mostra a estrutura molecular da boldina.

**Figura 1** – Estrutura molecular da boldina

### 1.1.3.2 Terpenóides

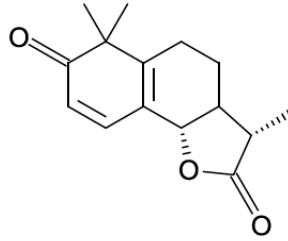
Os terpenóides possuem uma diversa, difundida e numerosa família de compostos constuídas a partir do isopreno que compreendem compostos chamados terpenóides, terpenos ou isoprenóides. A classe dos terpenóides tem como principal grupo os sesquiterpenos, que englobam as lactonas sesquiterpênicas<sup>23</sup>.

Devido a sua ampla atividade biológica, as lactonas sesquiterpênicas constituem uma classe de substâncias com potencial para utilização na medicina, destacando-se as atividades citotóxicas, antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória, esquistossomicida, antimalárica e antifúngica<sup>24</sup>.

As lactonas sesquiterpênicas são caracterizadas por apresentarem um grupo lactona na sua estrutura. Estudos de estrutura-atividade indicaram que os grupos  $\gamma$  – lactona e a carbonila  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  – insaturada presentes nestes compostos estão relacionados com sua atividade antiinflamatória<sup>23</sup>.

Estudos também mostraram que as lactonas sesquiterpênicas, além de apresentar uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas como atividade antimicrobiana, antitumoral e antiinflamatória, também tem efeito no sistema nervoso central e cardiovascular, assim como potencial alergênico<sup>25</sup>. As atividades são mediadas quimicamente por estruturas de carbonila  $\alpha$ ,  $\beta$  - insaturada como uma  $\alpha$  - metileno -  $\gamma$  - lactona, uma ciclopentenona  $\alpha$ ,  $\beta$  - insaturada ou um éster conjugado. As diferentes atividades entre as lactonas sesquiterpênicas pode ser explicadas pelos diferentes números de elementos estruturais alquila. Vários estudos têm investigado como as lactonas sesquiterpênicas apresentam o seu efeito antiinflamatório<sup>24,25</sup>. Entretanto, apesar da literatura apresentar alguns resultados, o mecanismo molecular pelo qual eles mostram o seu efeito de antiinflamatório ainda não foi suficientemente explicado<sup>25</sup>.

A Figura 2 mostra a estrutura molecular básica da  $\gamma$ - lactona.

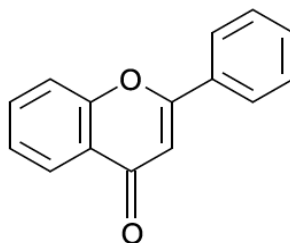
**Figura 2** – Estrutura molecular da  $\gamma$ - lactona

### 1.1.3.3 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos presentes nas plantas compreendem uma grande diversidade de compostos como os flavonóides (antocianinas, flavonas, flavononas) e várias classes de não-flavonóides (ácidos fenólicos)<sup>26</sup>. Essa classe de compostos apresenta diversidade estrutural, mas possui pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila<sup>22</sup>. A maioria dos extratos vegetais que mostram uma forte atividade antioxidante apresenta em sua composição química, compostos fenólicos que são os principais responsáveis por esta atividade<sup>27</sup>.

Atualmente existe um grande interesse econômico e farmacêutico pelos compostos fenólicos, principalmente os flavonóides por consequência das diversas propriedades que eles apresentam, entre elas, antitumoral, antiinflamatória e antiviral<sup>22</sup>.

A Figura 3 mostra a estrutura molecular básica do flavonóide.

**Figura 3** – Estrutura molecular do flavonóide

#### 1.1.4 Extração

Uma das preocupações no processo de extração é a manutenção das substâncias da planta, portanto deve ser realizada de maneira cuidadosa. Na extração nem sempre se utiliza um único solvente, mas misturas de diferentes solventes com polaridades diferentes. Por outro lado, o meio extrativo depende, sobretudo, da solubilidade das substâncias a extrair e de sua estabilidade, sendo que a escolha da melhor condição experimental pode ser feita através de um planejamento experimental centróide simplex<sup>28</sup>.

Para a investigação dos constituintes presentes nos extratos da planta, também é necessário submeter o extrato bruto (total) a um fracionamento químico prévio das principais classes de metabólitos. Neste procedimento, a quantidade e os tipos de componentes separados nas diferentes frações variam de acordo com a planta<sup>9</sup>.

#### 1.1.5 Testes Farmacológicos

Alguns usos tradicionais das folhas de *Vernonia condensata* Baker podem ser justificados por dados fornecidos por estudos farmacológicos. Em alguns estudos, demonstrou-se que extratos aquosos de suas folhas possuem propriedades analgésicas e inibem as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos<sup>11</sup>.

O extrato aquoso mostrou também ação protetora da mucosa gástrica dos efeitos ulcerogênicos provocados pelos antiinflamatórios não-esteroidais indometacina e ácido acetilsalicílico. O pré-tratamento com extrato aquoso também é capaz de inibir o edema da pata e a hiperalgesia, induzidos por carragenina em ratos, assim como a peritonite induzida por caulim em camundongos<sup>11</sup>.

A avaliação da atividade antinociceptiva feita por meio do modelo de contorções abdominais induzidos por ácido acético em camundongos foi desenvolvida por Koster<sup>29</sup> e modificado por vários pesquisadores ao longo dos anos<sup>30</sup>. Este modelo configura uma metodologia clássica para a avaliação da atividade analgésica<sup>31</sup>.

Além do método das contorções abdominais, o método da placa quente também é muito utilizado para avaliar a atividade analgésica em animais. A placa quente tem por finalidade medir o tempo de reação dos animais ao estímulo térmico<sup>32,33</sup>.

Os dois métodos são avaliados em conjunto, uma vez que, os testes de reação ao calor, como a placa quente, são seletivos para o estudo de compostos com ação

analgésica exercida por mecanismos centrais, e o teste de indução de contorções abdominais tem ampla utilização na pesquisa de compostos com ação periférica<sup>34,35</sup>.

Comitês de ética internacionais têm desenvolvido protocolos que minimizam o número de animais utilizados para a determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>). A DL<sub>50</sub>, dose que causa a morte de metade do número de animais teste, é realizada de acordo com o guia 423 editado pela Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômico de 2001 (ODCE)<sup>36</sup>.

#### 1.1.6 Técnicas Espectroscópicas

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo, difíceis de serem identificadas<sup>7</sup>.

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas<sup>37</sup>.

A determinação espectrofotométrica na região do ultravioleta-visível é preferível porque possibilita a obtenção de rapidez, alta precisão e reprodutibilidade para matrizes complexas usando procedimentos relativamente simples e econômicos quando comparados a técnicas cromatográficas<sup>38</sup>.

A identificação dos compostos orgânicos pode ser feita através da espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM), sendo as duas primeiras de ampla utilização por serem as mais simples e apresentarem baixo custo<sup>1</sup>.

#### 1.1.7 Técnicas Cromatográficas

A impressão digital cromatográfica tem mostrado ser o método mais conveniente e efetivo para assegurar à qualidade de materiais a base de plantas, especialmente quando existe falta de padrões autênticos para identificação dos componentes ativos. Ela foi introduzida e aceita pela WHO (World Health Organization) como estratégia de identificar e avaliar qualitativamente uma planta medicinal. Em 2000 a State Drug Administration (SDA) da China começou a desenvolver a impressão digital para MTC (medicina tradicional chinesa)

como padrão de controle de qualidade. Desde então, aumentou-se o interesse no desenvolvimento de metodologia analítica para a obtenção da impressão digital de plantas medicinais e produtos acabados, não somente na China, mas em vários países<sup>39</sup>.

A impressão digital cromatográfica de uma planta medicinal para o controle de qualidade é um cromatograma complexo usado para comparação de perfis<sup>39</sup>. 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 por técnicas analíticas<sup>40</sup>.

Diversas técnicas cromatográficas, tal como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar (EC) e cromatografia de camada delgada (CCD) pode ser aplicada para este tipo de análise<sup>41</sup>.

Algumas classes de compostos tais como: alcalóides, alcoóis, antibióticos, aromáticos, barbitúricos, agrotóxicos clorados e vitaminas são facilmente separadas por CLAE em fase reversa<sup>42</sup>.

Uma dificuldade na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a escolha da melhor fase móvel para uma dada amostra<sup>43</sup>, já que, é preciso um conhecimento muito amplo das propriedades cromatográficas dos solventes, a fim de que, se possa otimizar a força cromatográfica e a seletividade suprindo uma retenção conveniente dos componentes de interesse da amostra e uma uniformidade dos picos dentro do cromatograma<sup>44</sup>. Por isso, na cromatografia líquida, a atenção especial é dada na otimização da fase móvel<sup>45</sup>.

## 1.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade analgésica das frações dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker obtidas em diferentes épocas do ano e discriminar as diferentes frações dos extratos por meio de métodos quimiométricos associados aos dados espectroscópicos e cromatográficos.

### 1.2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Aplicar métodos quimiométricos de análise multivariada associados aos dados espectroscópicos e cromatográficos para comparar a variação composicional das frações dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker obtidas em diferentes épocas do ano.

- ✓ Estimar a dose letal média das frações dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker.
- ✓ Avaliar a atividade analgésica das frações dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker obtidas em diferentes épocas do ano.



## *Capítulo II*

### *Métodos*

### *Quimiométricos*

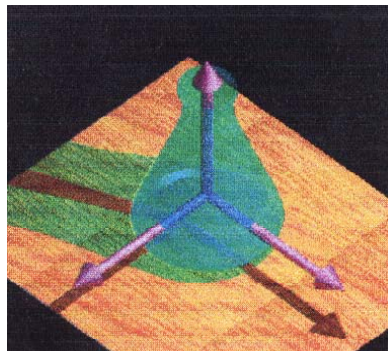
## 2 QUIMIOMETRIA

A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento, sendo univariada quando somente uma variável é medida sistematicamente por várias amostras. Há muito tempo, a estatística univariada vem sendo aplicada a problemas químicos, mas sua utilização tornou-se limitada. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, ganhando rapidamente popularidade e dando origem a uma nova disciplina, denominada Quimiometria<sup>46</sup>.

De maneira mais direta, a Quimiometria pode ser definida como uma área da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar procedimentos experimentais de forma otimizada e fornecer o máximo de informação química relevante com a análise dos dados obtidos<sup>47</sup>.

A Figura 4 representa o símbolo da Quimiometria.

**Figura 4** – Representação do símbolo da Quimiometria



Desta forma, a análise multivariada se refere a todas as técnicas estatísticas que simultaneamente analisam múltiplas medidas sobre indivíduos ou objetos sob investigação. Assim, qualquer análise simultânea de mais do que duas variáveis pode ser considerada, a princípio, como multivariada<sup>48</sup>.

Apesar de a análise multivariada ter suas raízes nas estatísticas univariada e bivariada, a extensão para o domínio multivariado introduz conceitos adicionais e questões que têm particular relevância. Esses conceitos variam da necessidade de uma compreensão conceitual do constructo da análise multivariada – a variável estatística – até pontos específicos que lidam com os tipos de escalas de medida empregadas e as questões estatísticas

de testes de significâncias e níveis de confiança. Cada conceito tem um papel significativo na aplicação bem sucedida de qualquer técnica multivariada<sup>48</sup>.

Uma série de técnicas estatísticas tem sido utilizada para se desenvolver metodologias multivariadas e para extrair informações dos espectros e cromatogramas, com o objetivo de identificar as espécies presentes e determinar quantitativamente as concentrações de algumas ou todas elas. A aplicabilidade de cada metodologia depende do conjunto de dados submetidos a análise<sup>49</sup>.

## 2.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE DADOS

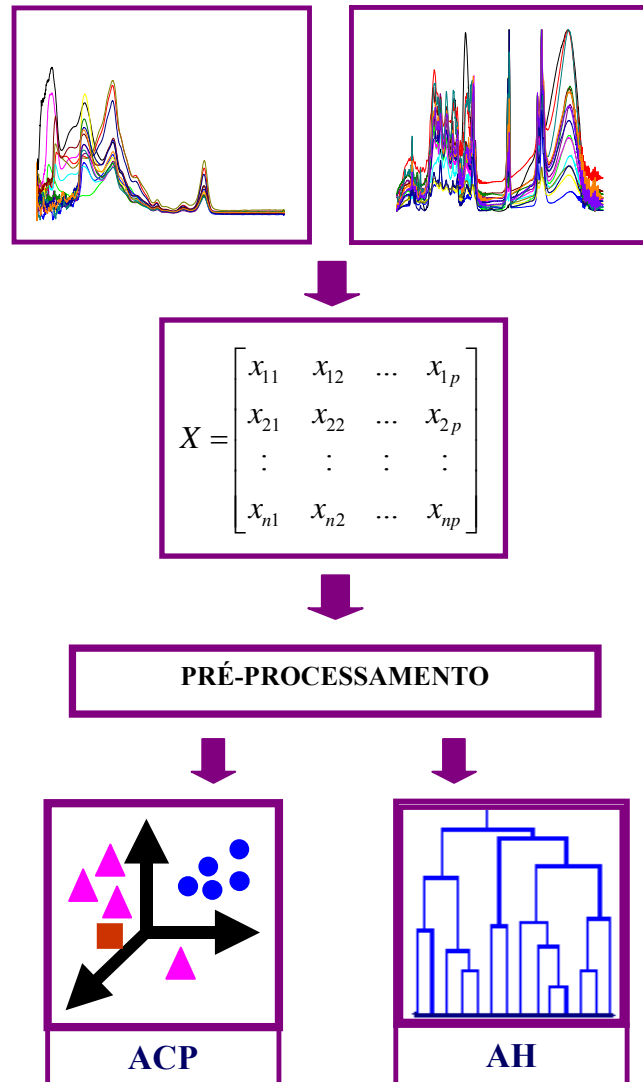
O objetivo da análise exploratória é extrair informações dos dados, estabelecendo relações entre objetos e variáveis. A análise exploratória não estabelece modelos *à priori*, mas permite que, a partir das relações observadas nos dados, sejam levantadas hipóteses e modelos propostos<sup>50</sup>.

Na análise exploratória, os dados fornecidos pelos equipamentos são inspecionados visualmente de modo a se verificar possíveis problemas como variação de linha de base, sobreposição de bandas e ruídos<sup>51</sup>. Os dados são então convertidos em matriz de dados, representadas por  $X$ . As  $n$  linhas da matriz representam os objetos, que são as amostras, onde cada valor representa uma medida de uma amostra específica e as  $p$  colunas são as variáveis que representam propriedades medidas para cada amostra. Em seguida é realizada uma pré-seleção das variáveis quando necessário para definir a região do espectro ou cromatograma que contém a informação que será utilizada no cálculo<sup>48</sup>.

O pré-processamento é uma etapa importante da análise, pois os dados de uma forma geral contêm fontes de variação, como erros aleatórios ou sistemáticos ou unidades diferentes. Ele é definido como qualquer manipulação matemática nos dados com o objetivo de remover ou reduzir estas fontes irrelevantes de variação<sup>50</sup>.

A sequência básica da análise de dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrada na Figura 5.

**Figura 5** – Sequência da análise multivariada dos dados experimentais por métodos quimiométricos.



## 2.2 PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS

O pré-processamento pode ser classificado em dois tipos básicos, dependendo de como são operados. O pré-processamento por linhas, que opera sobre as amostras, e o pré-processamento por colunas, que opera sobre as variáveis. Dentre os tipos de pré-processamento por linhas está a normalização<sup>50</sup>.

A normalização é um passo importante no pré-processamento dos dados e a escolha do critério de normalização não são arbitrários. A normalização nas amostras é feita dividindo cada variável por uma constante e os dois tipos mais comuns são a normalização por área unitária e normalização por comprimento do vetor unitário<sup>50</sup>.

### 2.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

A análise de componentes principais é uma abordagem estatística que pode ser usada para analisar inter-relações entre um grande número de variáveis e explicar essas variáveis em termos de suas dimensões inerentes comuns<sup>48</sup>.

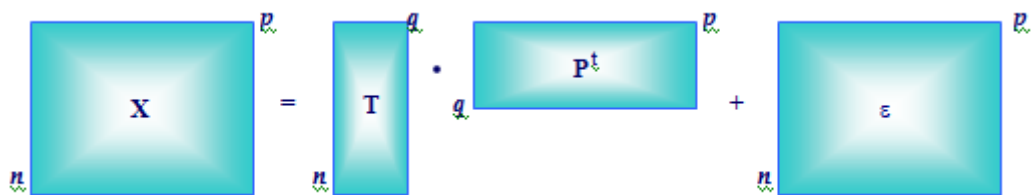
O objetivo é encontrar um meio de condensar a informação contida em várias variáveis originais em um conjunto menor de variáveis estatísticas com uma perda mínima de informação. Pelo fato de fornecer uma estimativa empírica da estrutura das variáveis consideradas, a ACP se torna uma base objetiva para criar escalas múltiplas<sup>48</sup>.

A ACP transforma a matriz de dados originais  $X_{n \times p}$ , formada por  $n$  objetos e  $p$  variáveis, no produto de duas matrizes menores, como mostra a Equação 1.

$$\mathbf{X}_{n \times p} = \mathbf{T}_{n \times q} \times \mathbf{P}^t_{q \times p} + \boldsymbol{\varepsilon}_{n \times p} \quad (1)$$

Onde,  $\mathbf{T}$  é a matriz dos escores,  $\mathbf{P}$  é a matriz dos pesos,  $\boldsymbol{\varepsilon}$  é a matriz dos resíduos. O sobrescrito t indica a transposta da matriz e  $q$  é um escalar que indica o número de componentes principais que descreve a maior parte da variância dos dados. Como  $q$  normalmente é menor do que  $p$  ou  $n$ , uma matriz maior é transformada em duas matrizes

**Figura 6** – Esquema da decomposição da matriz  $X$  no produto de duas matrizes.



A ACP pode ser realizada utilizando-se dois tipos de métodos, o método do tipo-R, que se refere ao estudo da relação entre as variáveis e o método do tipo-Q, que se refere ao estudo da relação entre as amostras<sup>50</sup>.

Após os cálculos, os resultados são utilizados para interpretar a distribuição das amostras num gráfico bidimensional das componentes principais e posteriormente identificar e julgar a importância das variáveis originais escolhidas, pois as variáveis originais

com maiores valores de loadings na combinação linear das componentes principais são as mais importantes no ponto de vista estatístico<sup>50</sup>.

## 2.4 ANÁLISE HIERÁRQUICA (AH)

A análise de agrupamentos é uma técnica analítica para desenvolver subgrupos significativos de indivíduos ou objetos. Especificamente, o objetivo é classificar uma amostra de indivíduos ou objetos em um número menor de grupos mutuamente excludentes, com base nas similaridades entre eles<sup>48</sup>.

Os métodos hierárquicos de aglomeração começam com uma matriz de distâncias entre objetos. Todos os objetos começam sozinhos em grupos de tamanho um, e grupos que estão próximos se unem. Desta forma os grupos são unidos em termos de vizinhos mais próximos<sup>52</sup>.

A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma no qual as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. A suposição básica de sua interpretação é que, quanto menor for a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras<sup>53</sup>.

Existem muitas maneiras de procurar agrupamentos no espaço p-dimensional. A maneira matematicamente mais simples consiste em agrupar os pares de pontos (amostras) que estão mais próximos, usando a distância Euclidiana definida na Equação 2, e substituí-los por um novo ponto, localizado na metade da distância entre eles.

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

Nesta equação,  $d_{ik}$  é a distância Euclidiana entre os pontos  $i$  e  $k$ . O procedimento descrito é repetido até que todos os pontos sejam agrupados em um só ponto, levando à construção do dendrograma, no qual no eixo horizontal são colocadas as amostras e no eixo vertical, o índice de similaridade ( $S_{ij}$ ) entre os pontos  $i$  e  $j$ , calculado segunda a Equação 3.

$$S_{ij} = \left[ 1 - \frac{d_{ij}}{d_{\text{máx}}} \right] \quad (3)$$

Onde  $S_{ij}$  é a distância entre os pontos  $i$  e  $j$ , e  $d_{\text{máx}}$  é a distância máxima entre qualquer par de pontos.

A análise de agrupamentos complementa a análise de componentes principais, sendo outra forma de visualizar as semelhanças e diferenças na composição das amostras.



*Capítulo III*

*Metodología*

*Experimental*

### 3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

#### 3.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: balança analítica AY220 Shimadzu; estufa S150S-D Biopar; forno mufla MA385 Marconi; liquidificador TA-02 Skymesen; evaporador rotatório 802 Fisatom; ultrassom Ultracleaner 800 Unique; pHmetro digital PG2000 Gehaka; chapa aquecedora 78HW-1 Biomixer; liofilizador L101 Liobras; vórtex Q.220.1 Quimis; espectrofotometro UV-Vis Thermo Scientific Evolution 60; espectrofotometro FT-IR 8300 Shimadzu; purificador de água Millipore Plus; cromatógrafo líquido de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) e bomba quaternária Termo-Electron Corporation.

#### 3.2 REAGENTES E FÁRMACOS

Os reagentes utilizados na extração foram: álcool etílico absoluto P.A.; diclorometano P.A. e acetona P.A., todos da marca Vetec com 99,5% de pureza e água destilada.

Para o fracionamento dos extratos foram utilizados: acetato de etila P.A.; metanol P.A. e clorofórmio P.A., todos da marca Vetec com 99,5% de pureza; ácido sulfúrico P.A. (99%) da marca Vetec; hidróxido de amônio (97%) da marca Merck.

Para as análises no UV-Vis foram utilizados: acetato de etila P.A. e metanol P.A., da marca Vetec com 99,5% de pureza e água destilada.

Para as análises no FT-IR foram utilizados: clorofórmio P.A. com 99,5% de pureza da marca Dinâmica e brometo de potássio P.A. – A.C.S. com 99,0% de pureza da marca Synth.

Para as análises no CLAE foram utilizados: para fase móvel: acetonitrila e metanol de grau HPLC da marca Vetec e água ultrapura Milli-Q.

As amostras comerciais utilizadas foram: Boldo do Chile (*Peumus boldus*), lote: BOL 0310 VM, Nutri Comércio de Ervas Ltda e o medicamento Hepatilon<sup>®</sup>, flaconete de 10 ml contendo extrato 0,1% de *Peumus boldus*, padronizado em 0,67 mg de boldina, Kley Hertz S.A. – Indústria e Comércio, do laboratório HERTZ<sup>®</sup>.

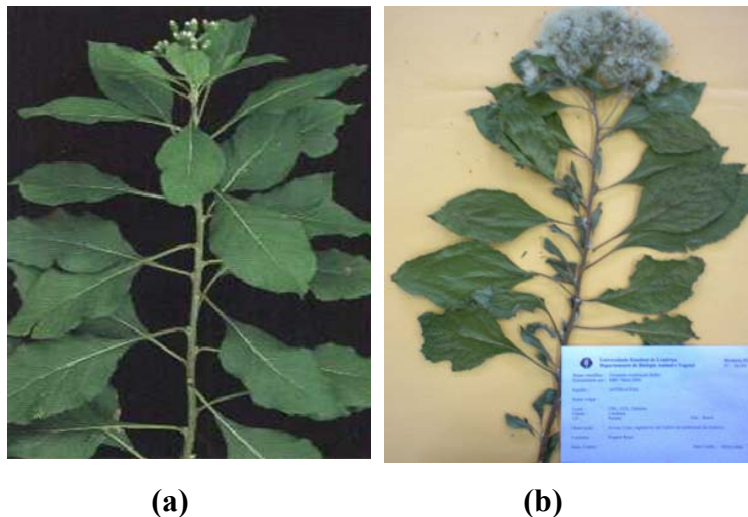
Para a realização dos testes farmacológicos foram utilizados: água destilada; Tween 80 Polioxietileno Fisher Scientific Company; ácido acético glacial P.A. (99%) da marca Biotec e o medicamento ibuprofeno (Spidufen<sup>®</sup> 400, granulado), laboratório Zambon Switzerland Ltda.

### 3.3 PLANTA

A espécie estudada neste trabalho é a *Vernonia condensata* Baker, conhecida popularmente por boldo e classificada pelo taxonomista Manuel R. C. Paiva do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina. A exsicata foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina com o número de registro 38.694.

A Figura 7 mostra as fotos da espécie *Vernonia condensata* Baker e da exsicata depositada no herbário FUEL.

**Figura 7** – Fotos **(a)** da espécie *Vernonia condensata* Baker e **(b)** da exsicata depositada no herbário FUEL.



### Características da Espécie *Vernonia condensata* Baker<sup>12</sup>

Reino: Plantae

Família: Asteraceae (Compositae)

Gênero: Vernonia

Espécie: *Vernonia condensata*

Nome Científico: *Vernonia condensata* Baker

Nome Popular: boldo, alumã, boldo-goiano, boldo-baiano, heparém, árvore do pinguço.

Características Botânicas: arbusto grande ou arvoreta, pouco ramificada, de ramos quebradiços de 2-4 metros de altura. Folhas com sabor amargo seguido de doce quando mastigadas.

### 3.4 COLETA

A coleta das folhas do boldo foi realizada no jardim experimental do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina nas quatro estações do ano de 2009, no horário das 8h às 8h30. Após a coleta, as folhas foram fragmentadas com tesoura e secas por sete dias em lugar arejado à temperatura ambiente. Após a secagem, as folhas foram submetidas à turbólise e armazenadas em frascos protegidos da luz, umidade, ataque de fungos, insetos e roedores.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

#### 3.5.1 Determinação da Perda por Dessecação<sup>54</sup>

Os pesa-filtros foram lavados, deixados em estufa por 40 minutos a 105°C, resfriados em dessecador com cristais de sílica e pesados com a tampa. Foram pesados exatamente 2,0g do material vegetal nos pesa-filtros. As amostras foram deixadas em estufa por 2 horas a 105°C, resfriadas em dessecador e pesadas; novamente as mesmas foram submetidas à estufa por mais 30 minutos, resfriadas e pesadas. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados calculados através da Equação 4. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

$$U (\%) = \frac{Pfa - Pfd}{Pa} \times 100 \quad (4)$$

Onde: *Pfa* = pesa-filtro antes da secagem

*Pfd* = pesa-filtro depois da secagem

*Pa* = peso da amostra

### 3.5.2 Determinação do Teor de Cinzas Totais<sup>54</sup>

Os cadinhos foram lavados, calcinados em mufla por 12 horas a 450°C, resfriados em dessecador com cristais de sílica e pesados. Foram pesados exatamente 3,0g do material vegetal nos cadinhos. As amostras foram pré-incineradas em bico de Bunsen, deixadas na mufla por 12 horas a 450°C, resfriadas em dessecador e pesadas; novamente as mesmas foram submetidas à mufla por mais 1 hora, resfriadas e pesadas. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados calculados através da Equação 5. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

$$C_{\text{totais}} (\%) = \frac{Pca - Pcd}{Pa} \times 100 \quad (5)$$

Onde:  $Pca$  = peso do cadinho antes da calcinação

$Pcd$  = peso do cadinho depois da calcinação

$Pa$  = peso da amostra

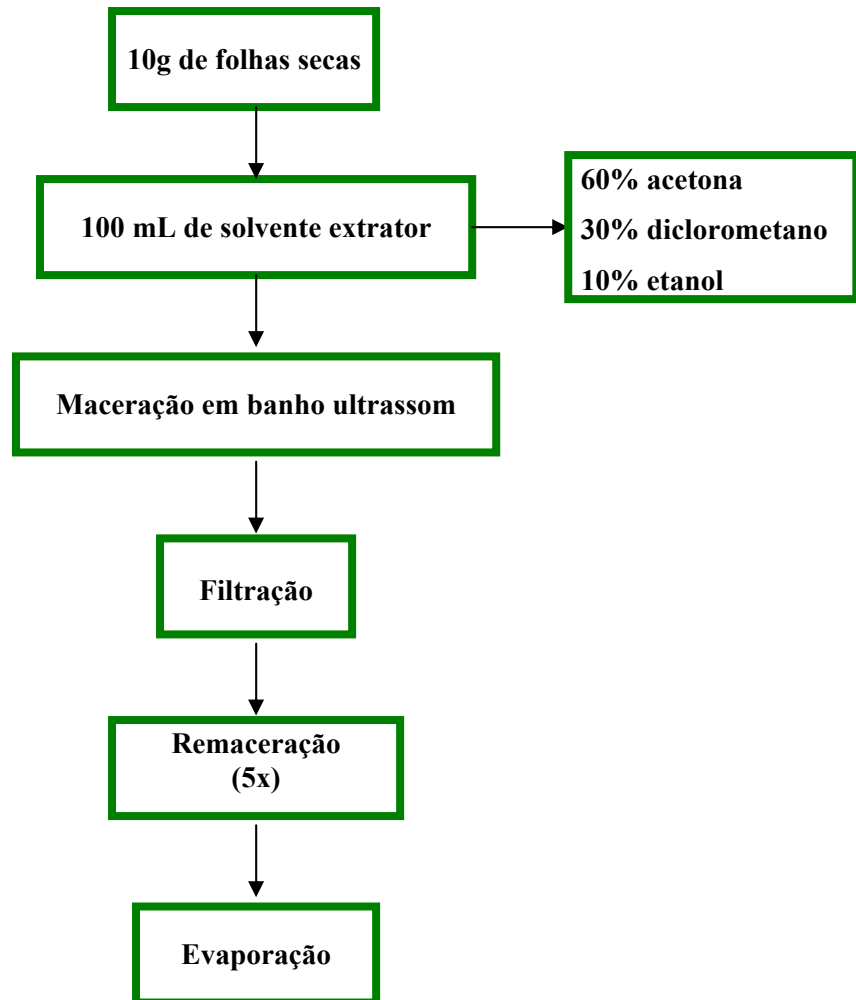
### 3.6 EXTRATO ORGÂNICO

Os extratos orgânicos foram preparados pesando-se 10,0 g de folhas secas de *Vernonia condensata* Baker e submetendo-se à extração com 100 mL de solvente extrator, composto de uma mistura de 60% de acetona, 30% de diclorometano e 10% de etanol, baseada em um planejamento experimental com quatro componentes. Esta proporção foi otimizada em estudo anterior do grupo de pesquisa do Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais em colaboração com a Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira do Laboratório de Análises Farmacológicas e Toxicológicas<sup>55</sup>.

O sistema foi submetido à maceração em banho de ultrassom por 30 minutos. Em seguida, os extratos foram filtrados em algodão e remacerações foram realizadas por mais cinco vezes nas mesmas condições. Os extratos obtidos foram submetidos à evaporação num evaporador rotativo a 70 °C e colocados para secar a temperatura ambiente até atingir peso constante<sup>55</sup>. Para o cálculo do rendimento, os extratos das folhas coletadas em cada estação do ano foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

O procedimento experimental está resumido na Figura 8.

**Figura 8** – Sequência do procedimento para o preparo do extrato orgânico.

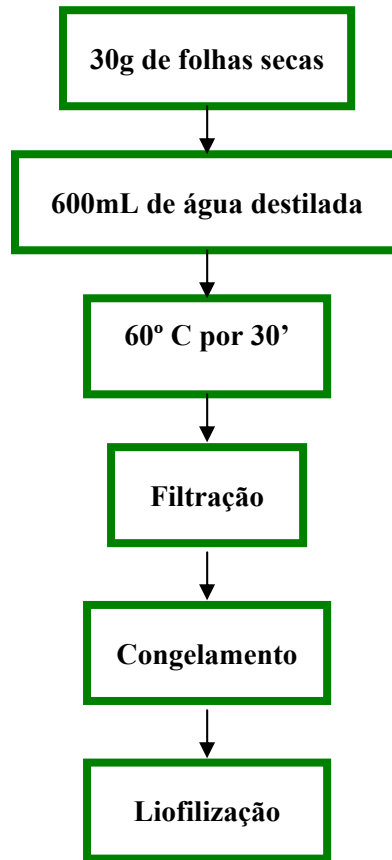


### 3.7 EXTRATO AQUOSO

O extrato aquoso foi preparado pesando-se 30,0 g de folhas secas de *Vernonia condensata* Baker e submetidas à extração com 600 mL de água destilada a 60°C por 30 minutos. Esta mistura foi filtrada em algodão, congelada e liofilizada<sup>55</sup>. Para o cálculo do rendimento, os extratos das folhas coletadas em cada estação do ano foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

O procedimento experimental está resumido na Figura 9.

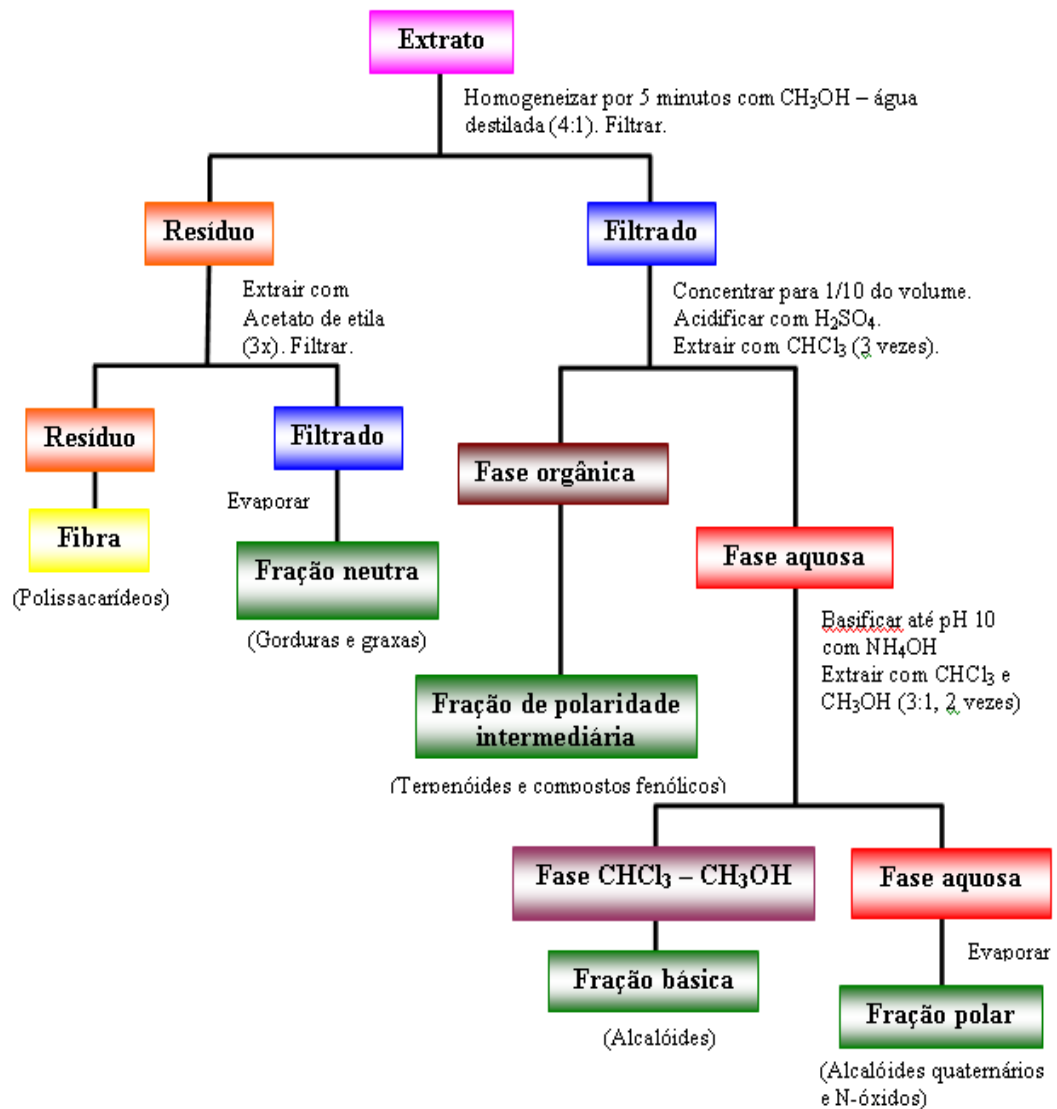
**Figura 9** – Sequência do procedimento para o preparo do extrato aquoso.



### 3.8 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

Para a investigação dos constituintes presentes nos extratos da planta, pode-se submeter o extrato bruto a um fracionamento químico prévio das principais classes de metabólitos. O fracionamento dos extratos aquoso e orgânico foi feito de acordo com o esquema<sup>30</sup> da Figura 10. Para o cálculo do rendimento, as fibras e as quatro frações dos extratos aquoso e orgânico das folhas coletadas em cada estação do ano foram realizadas em duplicata. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

**Figura 10** – Esquema utilizado para o fracionamento do extrato bruto



### 3.9 TESTES FARMACOLÓGICOS

#### 3.9.1 Animais

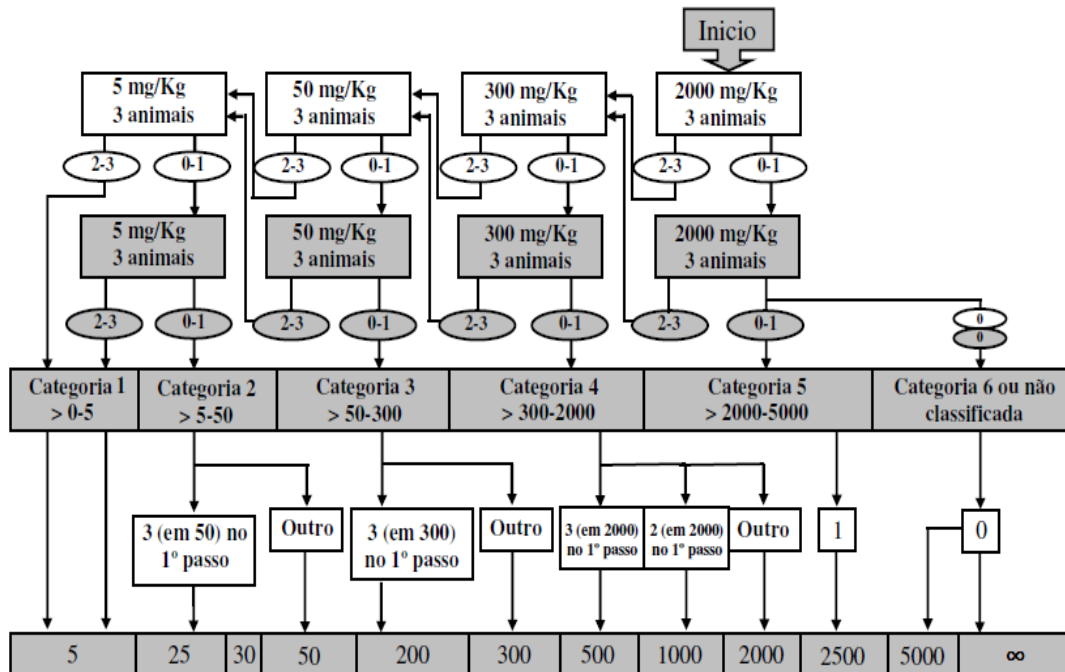
Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, albinos, machos pesando aproximadamente 25g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram levados ao biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas e mantidos sob condições controladas de temperatura ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação (ciclo claro-escuro de 12 horas), com livre acesso à água e ração. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL (CEEA, 78/09).

3.9.2. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

A dose letal média (DL<sub>50</sub>) é um teste para determinar a toxicidade aguda, cujo parâmetro avaliado é a morte do animal.

A dose de 2000mg/kg da fração polar do extrato aquoso, fração polar do extrato orgânico e fração intermediária do extrato orgânico das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas na estação do outono foram administradas por via oral (método de gavagem) a três camundongos previamente mantidos em jejum de três horas com água a vontade. A mortalidade foi monitorada por 14 dias. Finalizado este período, outros três camundongos receberam a mesma dose de cada fração, sendo monitorados pelo mesmo período. Esse procedimento foi repetido de acordo com a quantidade de animais mortos em cada etapa. Após todas as etapas necessárias o teste foi finalizado e a DL<sub>50</sub> foi estimada de acordo com o guia 423 editado pela Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômicos (ODCE, 2001)<sup>36</sup> demonstrado na Figura 11.

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



### 3.9.3 Atividade Analgésica

#### 3.9.3.1 Método das contorções abdominais

Para a avaliação do efeito antinociceptivo das frações dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker foi utilizado o modelo de contorções abdominais, que configura uma metodologia clássica para tal avaliação<sup>31</sup>. Para o ensaio das contorções abdominais, cada grupo consistiu de 8 a 11 animais. Os animais foram mantidos em jejum durante três horas antes de receberem, por gavagem, a fração polar do extrato aquoso (FPEA), fração polar do extrato orgânico (FPEO) e fração intermediária do extrato orgânico (FIEO), das folhas coletadas no outono (O), inverno (I) e verão (V), nas doses de 25, 100 e 400 mg/kg.

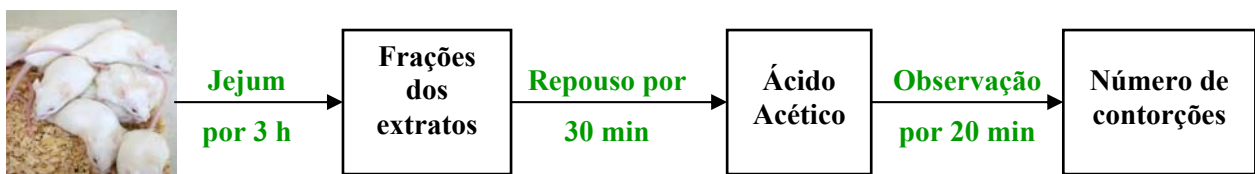
Para monitorar a eficácia da metodologia foi feito um grupo controle negativo e um controle positivo para cada dois extratos da planta testados. Os animais do grupo controle positivo receberam uma droga de referência, o analgésico ibuprofeno na dose de 200 mg/kg por gavagem (ibuprofeno – IBU) e os do grupo controle negativo receberam água destilada também por gavagem (veículo – VEI).

A fração polar aquosa e a fração polar orgânica foram dissolvidas em água destilada e a fração intermediária orgânica em Tween 80 2% (v/v).

Trinta minutos após, administrou-se, por via intraperitoneal, ácido acético 0,8% diluído em salina, na razão de 0,1 mL/10 g de peso corpóreo do animal. Os animais foram observados por 20 minutos individualmente em gaiolas transparentes e anotou-se o número de contorções abdominais que eles apresentaram. Considerou-se uma contorção abdominal o comportamento do animal de arrastar sua barriga e esticar as patas traseiras.

O procedimento experimental para avaliação do efeito antinociceptivo pelo método das contorções abdominais induzidas por ácido acético está resumido na Figura 12.

**Figura 12** – Procedimento experimental para avaliar a atividade analgésica pelo método das contorções abdominais.



Os resultados do número de contorções abdominais dos animais foram expressos como mediana com seus valores de mínimo e máximo e a porcentagem de inibição das contorções de cada grupo foi calculada através da Equação 7.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [(m\acute{e}dia \text{ do tratamento} / m\acute{e}dia \text{ do controle negativo}) \times 100] \quad (7)$$

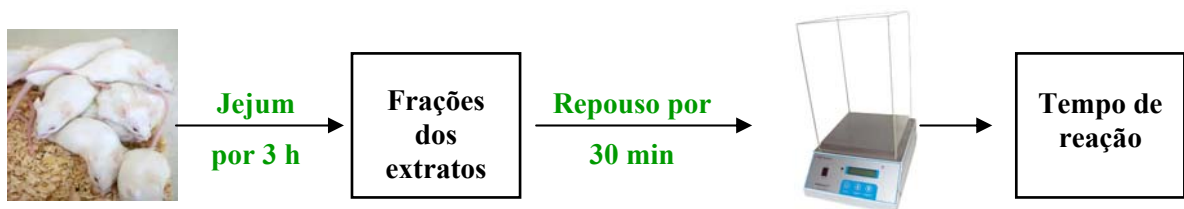
### 3.9.3.2 Método da Placa Quente

Para o método da placa quente cada grupo consistiu de oito animais. Esses animais foram mantidos em jejum de três horas com água à vontade antes de receberem, por gavagem, a fração polar do extrato aquoso e fração polar do extrato orgânico nas doses de 25 e 400 mg/kg de folhas coletadas no outono. Foram utilizadas essas amostras por apresentarem melhor eficiência em inibir as contorções abdominais em camundongos. Para monitorar a eficácia da metodologia foi feito um grupo controle negativo (veículo – VEI). Os animais do grupo veículo receberam água destilada, também por gavagem.

No método da placa quente, mede-se, individualmente, o tempo de reação dos animais ao estímulo térmico na placa aquecida a 58°C. Neste método considera-se como reação ao estímulo térmico, o ato do animal levantar e/ou lambe as patas. O tempo máximo de contato com a placa é de 60 segundos para evitar lesões nas patas dos animais<sup>56</sup>.

O procedimento experimental para avaliação do efeito antinociceptivo pelo método da placa quente está resumido na Figura 13.

**Figura 13** – Procedimento experimental para avaliar a atividade analgésica por meio do tempo de reação dos animais ao estímulo térmico da placa quente.



Os grupos testados tiveram seus efeitos comparados com o grupo controle negativo para fins de se avaliar a presença de propriedades antinociceptivas para os extratos em estudo e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) dos tempos de reação.

### 3.10 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

Para a análise por espectrofotometria no UV-VIS, foram pesados 5,0 mg de cada fração dos extratos aquoso e orgânico e diluídos em 2,0 mL do solvente extrator. Estas amostras foram deixadas no ultrassom por 10 minutos.

A fração neutra foi diluída 1:25 (v/v) em acetato de etila. A fração básica foi diluída 1:10 (v/v) em metanol. A fração de polaridade intermediária foi diluída 1:10 (v/v) em metanol. E a fração polar foi diluída 1:5 (v/v) em água. Os espectros foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 190-900 nm, com resolução de 1,0 nm.

### 3.11 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Para a análise por espectroscopia na região do infravermelho, as pastilhas foram preparadas pesando 1,0 mg de cada uma das quatro frações dos extratos aquoso e orgânico, adicionado 200 mg de brometo de potássio e algumas gotas de clorofórmio. Os espectros no infravermelho foram registrados na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4,0  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.12 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

#### 3.12.1 Escolha da Fase Móvel (FM)

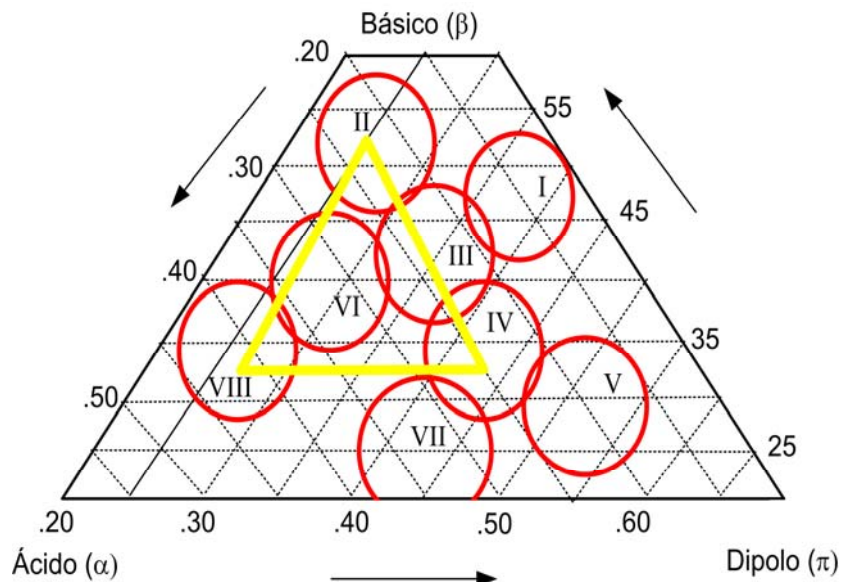
Uma alternativa para a escolha da FM é usar o triângulo de seletividade de solvente proposto por Snyder. Além do índice de polaridade ( $P'$ ), esta abordagem conduz a uma descrição dos diferentes solventes em termos de acidez ( $x_d$ ), basicidade ( $x_e$ ) e dipolaridade ( $x_n$ ). A vantagem do triângulo de Snyder é o agrupamento de solventes de acordo com o tipo de interação com os compostos de interesse. Solventes quimicamente semelhantes que possuem parâmetros de seletividade similares ( $x_d$ ,  $x_e$  e  $x_n$ ) fazem parte do mesmo grupo, embora possam apresentar diferentes valores de polaridade<sup>44</sup>. A Tabela 1 mostra a divisão desses grupos<sup>57</sup>, colocando-se entre parênteses o solvente mais usado.

**Tabela 1** – Solventes dos grupos determinados por Snyder.

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

Para a realização deste trabalho foram escolhidas fases móveis de grupos e parâmetros diferentes, sinalizada por um triângulo amarelo mostrado na Figura 14<sup>58</sup>.

A água foi o eluente usado para todas a fases móveis (grupoVII) e como modificadores orgânicos foram empregados o metanol do grupo II e a acetonitrila do grupo VI.

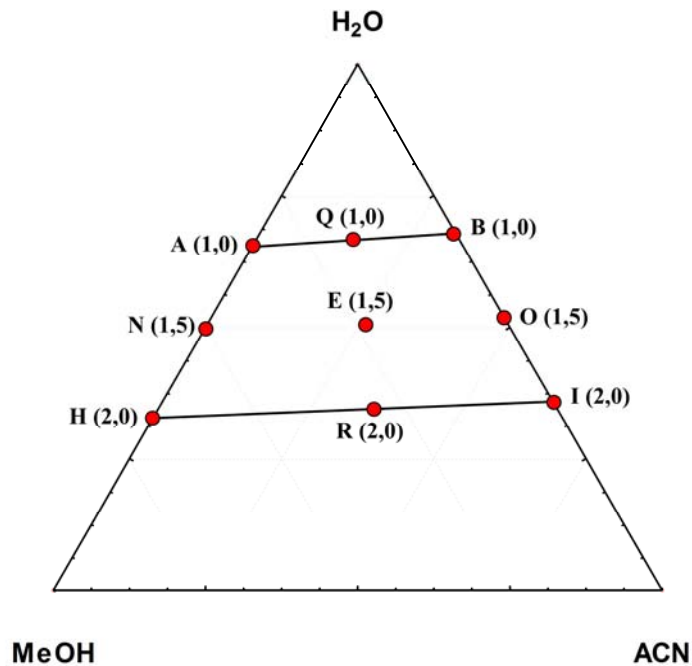
**Figura 14** – Triângulo de seletividade de solventes para cromatografia

O índice de polaridade pode ser utilizado para calcular a força da fase móvel, onde os parâmetros usados para a CLAE são: água ( $S_i = 0$ ), metanol ( $S_i = 3,0$ ), acetonitrila ( $S_i = 3,1$ )<sup>42</sup>. A força do solvente é expressa pela somatória do produto da força do solvente puro ( $S_i$ ) multiplicada pela fração de volume ( $\Phi_i$ ), como mostra a Equação 6:

$$S = \sum S_i \Phi_i \quad (6)$$

A escolha das diferentes fases móveis foi feita através de um planejamento experimental de misturas mostrado na Figura 15<sup>58</sup>. A região estudada é determinada pelo trapézio marcado pelas letras **A, N, H, B, O, I, Q, E, R**.

**Figura 15** – Triângulo dos solventes metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e água (H<sub>2</sub>O) utilizados como fase móvel nas análises cromatográficas.



Todas as fases móveis foram sonicadas por 15 minutos antes das análises, para desgaseificação, ou seja, eliminar os gases dissolvidos na fase móvel que poderiam causar instabilidade no detector.

A força dos solventes utilizados na fase móvel e suas proporções estão representados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Força e proporções dos solventes utilizados como fase móvel para a análise cromatográfica.

Fase	ACN	H <sub>2</sub> O	MeOH	Força
A	0%	66,5%	33,5%	1,0
Q	16%	67%	17%	1,0
B	32%	68%	0%	1,0
N	0%	50%	50%	1,5
E	26%	51%	23%	1,5
O	48%	52%	0%	1,5
H	0%	33%	67%	2,0
R	35%	35%	30%	2,0
I	64,5%	35,5%	0%	2,0

### 3.12.2 Preparo das Amostras para Análise Cromatográfica

As amostras foram preparadas pesando-se 5,0 mg da fração intermediária do extrato orgânico (FIEO), fração polar do extrato orgânico (FPEO) e fração polar do extrato aquoso (FPEA), re-dissolvidas em 3,00 mL dos solventes extratores. Após 1 hora, as amostras foram filtradas duas vezes em filtro de nylon Milipore Millex de 0,22  $\mu\text{m}$ , colocadas em eppendorf e armazenadas em freezer até a leitura.

Para a análise por CLAE foi utilizada uma coluna C<sub>18</sub> KINETEX 2,6 $\mu\text{m}$  HILIC 100Å da PHENOMENEX (150 x 4,6 mm) nas seguintes condições: volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , vazão da fase móvel a 1,0 mL min<sup>-1</sup>, detecção monitorada no comprimento de onda de 210 nm, 240 nm e 254 nm e tempo de análise de 15 minutos. Para o processamento dos dados foi utilizado o Software ChromQuest 4.2.

A fração intermediária do extrato orgânico, fração polar do extrato orgânico e a fração polar do extrato aquoso de uma amostra comercial de boldo (*Peumus boldus*) e um medicamento a base de boldina (Hepatilon<sup>®</sup>) também foram analisadas por CLAE para fins comparativos. Essas amostras foram preparadas da mesma forma que as amostras descritas anteriormente.

### 3.13 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados da caracterização do material vegetal e do rendimento foram analisados por ANOVA complementada com Tukey com 95% de confiança utilizando o programa GraphPad InStat.

Os dados da atividade analgésica pelo método das contorções abdominais foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn. Um teste estatístico não paramétrico foi escolhido porque o teste de Bartlett indicou que, em alguns experimentos, os grupos não apresentaram variâncias homogêneas.

Os dados da atividade analgésica pelo método da placa quente foram analisados por ANOVA utilizando o programa GraphPad InStat.

Para o processamento dos dados obtidos por UV-Vis, FT-IR e CLAE foram utilizados métodos quimiométricos de Análise das Componentes Principais (ACP) e o dendograma da Análise Hierárquica foi calculado utilizando o programa STATISTICA 7.



*Capítulo IV*

*Resultados*

*e*

*Discussão*

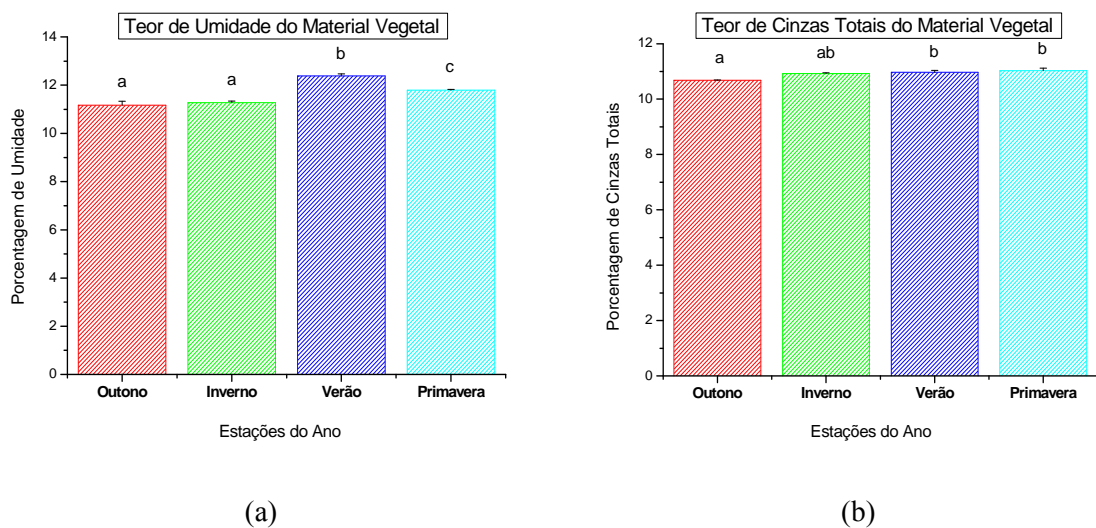
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A primeira etapa deste trabalho foi caracterizar o material vegetal por meio de análises físico-químicas da planta.

A Figura 16 apresenta a média do teor de umidade e a média do teor de cinzas totais do material vegetal calculado para as amostras coletadas nas quatro estações do ano. Análise de variância (ANOVA) complementada com teste de Tukey foi usada para testar a significância nos resultados. Letras iguais não são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p < 0,05$ ).

**Figura 16** – Gráfico da média do (a) teor de umidade e (b) teor de cinzas totais do material vegetal coletado nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.



A Figura 16a mostra que as folhas coletadas na estação do verão apresentam maior teor de umidade. A Figura 16b mostra a variação no teor de cinzas totais. Observa-se que as amostras coletadas no outono apresentam menor teor de cinzas totais, porém as folhas provenientes do inverno não apresentaram diferença significativa em relação as do outono.

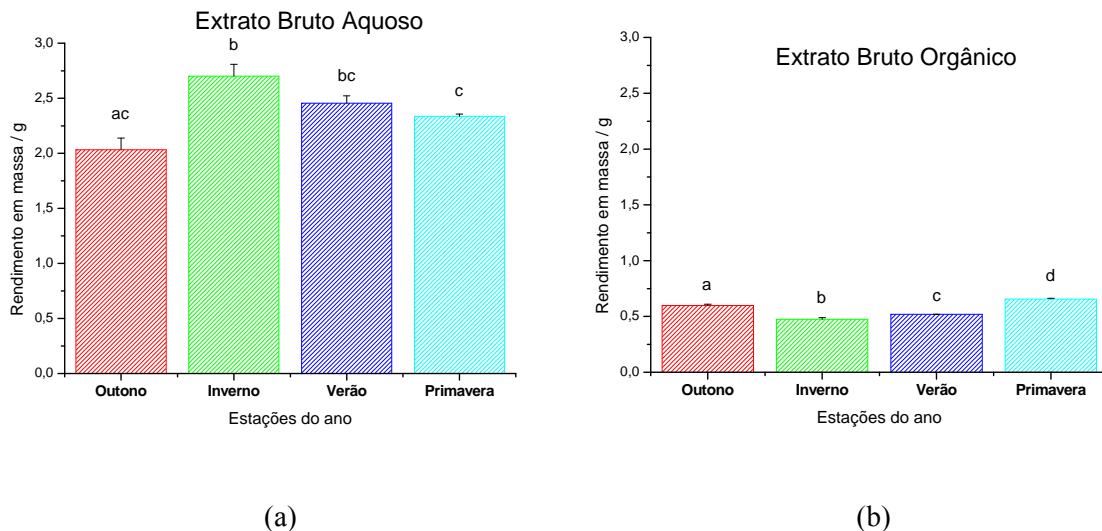
Segundo SCHWANZ (2006), várias bibliografias estabelecem que para material vegetal os teores de perda por dessecação podem variar de 8 a 14% e os teores de cinzas totais aceito para as folhas de boldo variam entre 10 e 15%, mostrando que os resultados encontrados neste trabalho se encontram dentro do limite aceito.

## 4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Após a caracterização do material vegetal, outra etapa importante do trabalho foi avaliar o rendimento em peso dos extratos no processo de extração das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

A Figura 17 mostra o rendimento médio dos extratos bruto extraídos em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.

**Figura 17** – Gráfico do rendimento médio dos extratos bruto em meio (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.

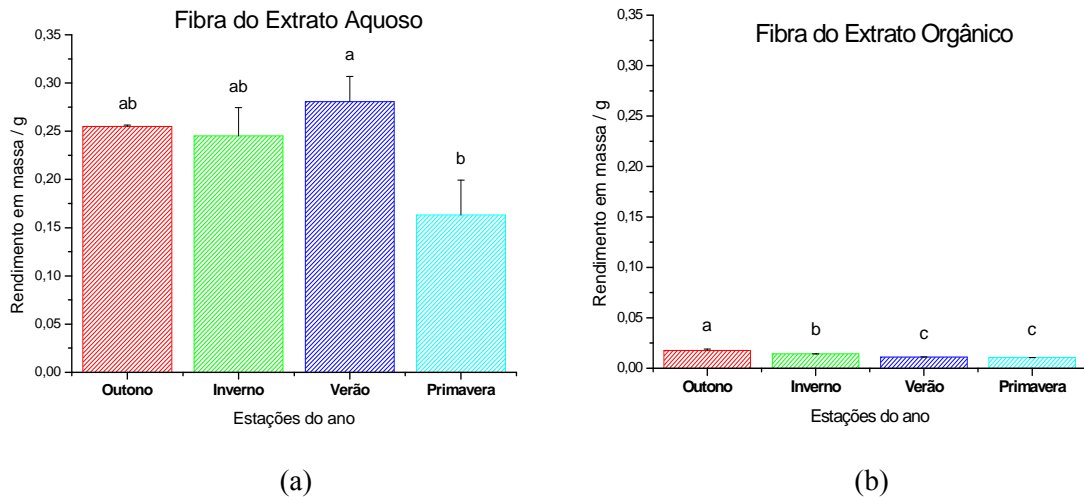


A Figura 17a mostra que o maior rendimento em peso no extrato bruto extraído em meio aquoso foi obtido das folhas coletadas no inverno, porém as folhas coletadas no verão não foram significativamente diferentes das provenientes do inverno. Observa-se também que o maior rendimento em peso no extrato bruto extraído em meio orgânico (Figura 17b) foi obtido das folhas coletadas na primavera e o menor das folhas coletadas no inverno.

Como o extrato bruto em meio aquoso apresentou um rendimento muito maior que o extrato em meio orgânico foi feito um teste pesando a mesma quantidade de folhas (10 g) para comparação entre os dois meios. O resultado desse teste mostrou que o extrato em meio aquoso rende quase o dobro do extrato em meio orgânico, mas isso não significa que a água consiga extrair maior diversidade de metabólitos secundários.

A Figura 18 mostra o rendimento médio das fibras extraídas em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.

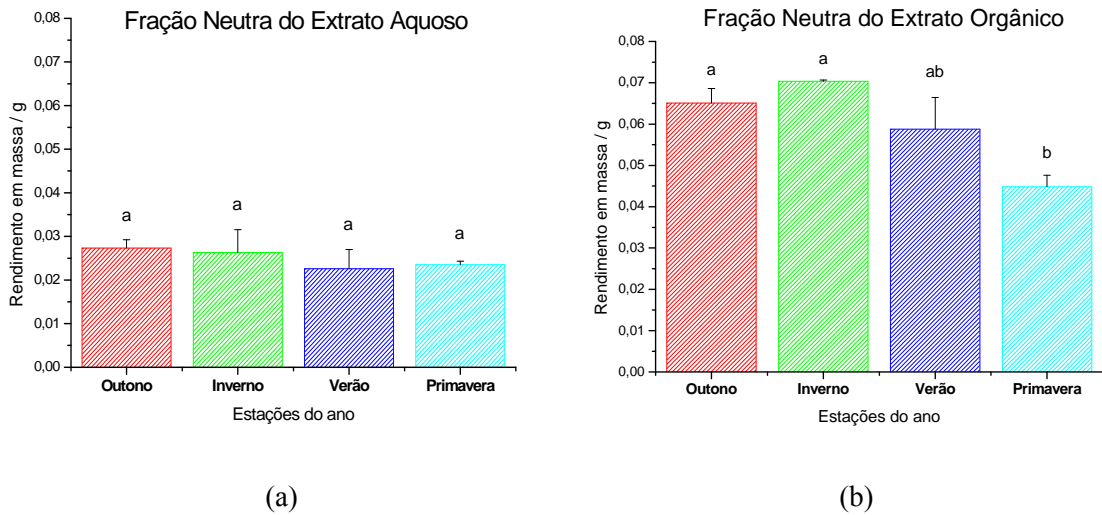
**Figura 18** – Gráfico do rendimento médio das fibras dos extratos em meio (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.



Observa-se que as folhas coletadas no verão apresentaram maior rendimento médio em massa para as fibras extraídas em meio aquoso, mas estatisticamente estas não são diferentes das folhas coletadas no outono e inverno, enquanto que em meio orgânico as folhas coletadas no outono apresentaram maior rendimento médio e são estatisticamente diferentes das folhas coletadas nas outras estações do ano, Figura 18b.

A Figura 19 mostra o rendimento médio da fração neutra extraídas em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.

**Figura 19** – Gráfico do rendimento médio da fração neutra dos extratos em meio (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.

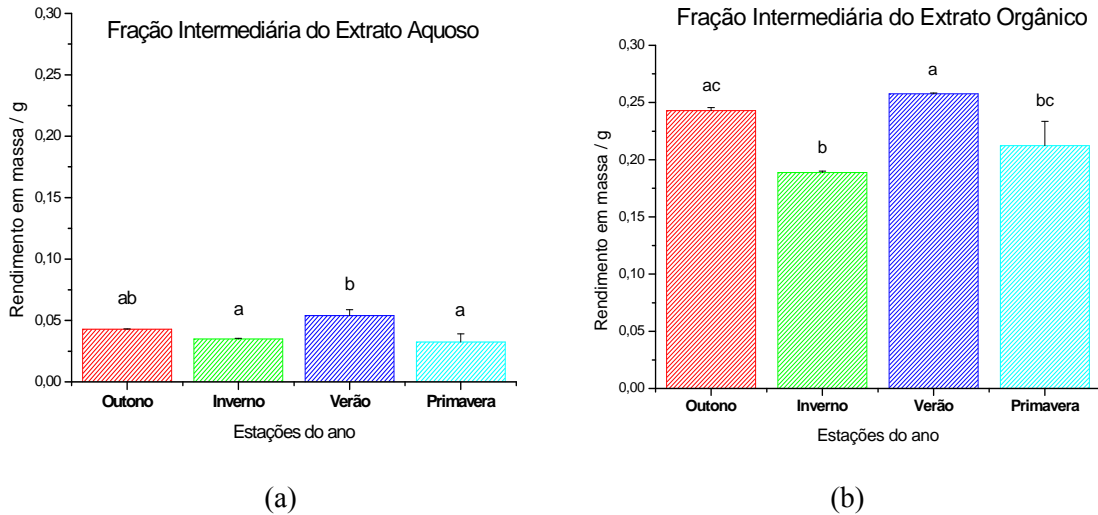


A Figura 19a mostra que as folhas coletadas nas quatro estações do ano não apresentaram diferença significativa nos rendimentos da fração neutra dos extratos obtidos em meio aquoso, enquanto que as folhas coletadas na primavera apresentaram menor rendimento médio em meio orgânico, porém as folhas da primavera não foram estatisticamente diferentes das folhas do verão.

A Figura 20 mostra o rendimento médio da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.

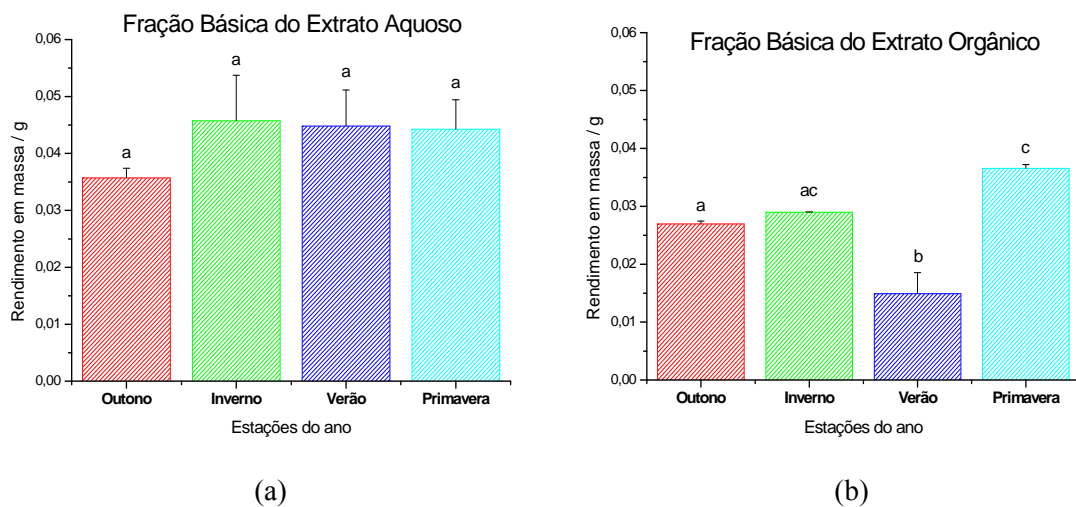
Observa-se que as folhas coletadas na estação do verão apresentam maior rendimento médio na fração de polaridade intermediária do extrato em meio aquoso, mas esta não foi estatisticamente diferente das folhas provenientes do outono. Já no meio orgânico o maior rendimento foi com as folhas coletadas no outono e verão.

**Figura 20** – Gráfico do rendimento médio da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.



A Figura 21 mostra o rendimento médio da fração básica extraída em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.

**Figura 21** – Gráfico do rendimento médio da fração básica dos extratos em meio (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.

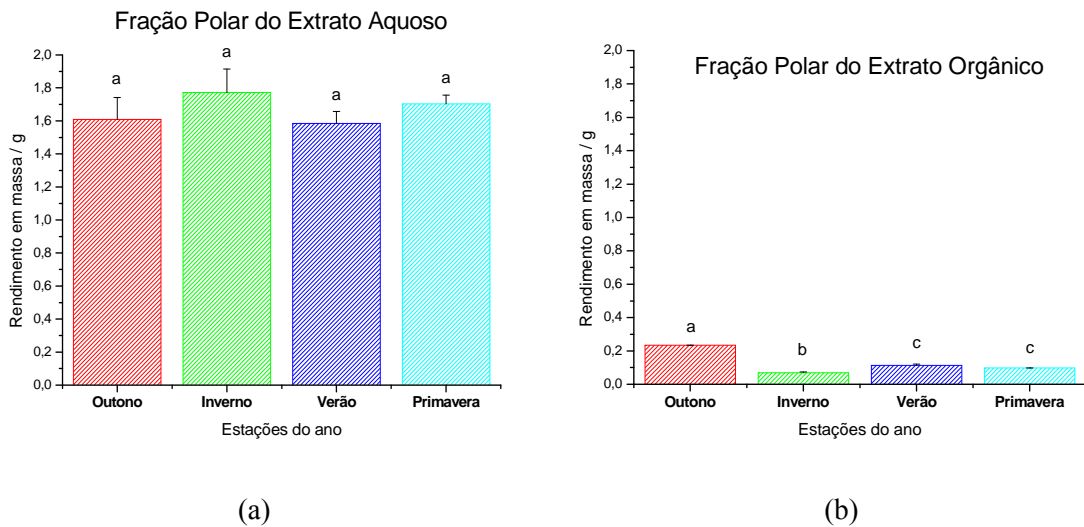


O rendimento da fração básica em meio aquoso das folhas coletadas nas quatro estações do ano não apresentou diferença significativa, Figura 21a.

A Figura 21b mostra que o menor rendimento da fração básica em meio orgânico foi obtido das folhas coletadas no verão.

A Figura 22 apresenta o rendimento médio da fração polar extraída em meio aquoso e orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.

**Figura 22** – Gráfico do rendimento médio da fração polar dos extratos em meio (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e os desvios padrões das duplicatas. Letras diferentes são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança, ( $p > 0,05$ ) ANOVA complementada com teste de Tukey.



O rendimento da fração polar em meio aquoso não apresentou diferença significativa entre as folhas coletadas nas quatro estações do ano. Já no extrato em meio orgânico o maior rendimento foi das folhas provenientes do outono e o menor das folhas coletadas no inverno. Entretanto, o extrato aquoso mostrou ter um rendimento muito maior que o extrato orgânico para as quatro estações do ano.

### 4.3 TESTES FARMACOLÓGICOS

#### 4.3.1 Toxicidade Aguda

Os resultados da dose letal média mostraram que a  $DL_{50}$  da fração polar do extrato em meio aquoso é maior que 5000 mg/kg, da fração polar do extrato em meio orgânico é 2500 mg/kg e da fração intermediária do extrato em meio orgânico é 500mg/kg, sendo que, considera-se baixa toxicidade quando o extrato apresenta dose letal média maior que 2000 mg/kg.

### 4.3.2 Atividade Analgésica

#### 4.3.2.1 Método das contorções abdominais

O teste de Kruskal-Wallis complementado com o teste de Dunn mostrou que todos os grupos controle positivo (Ibuprofeno - IBU) foram diferentes dos grupos controle negativo (Veículo - VEI), validando as condições experimentais para avaliar a atividade analgésica pelo método das contorções abdominais das frações dos extratos de *Vernonia condensata* Baker.

A Tabela 3 mostra o resultado do número de contorções abdominais dos camundongos expressos como mediana com seus valores de mínimo e máximo para avaliar a atividade analgésica da fração polar do extrato em meio aquoso (FPEA), fração polar do extrato em meio orgânico (FPEO) e fração intermediária do extrato em meio orgânico (FIEO) das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas no outono (O), inverno (I) e verão (V), nas doses de 25, 100 e 400 mg/kg, além dos grupos controle negativo (veículo – VEI) e controle positivo (ibuprofeno – IBU).

**Tabela 3** – Número de contorções abdominais para avaliação da atividade analgésica da fração polar do extrato em meio aquoso (FPEA), fração polar do extrato em meio orgânico (FPEO) e fração intermediária do extrato em meio orgânico (FIEO) das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas no outono (O), inverno (I) e verão (V).

Amostras	Controles		Doses (mg / kg)		
	VEI	IBU	25	100	400
<b>FPEAO</b>	43,5 (23 – 55)	9,5 (0 – 19) *	4,5 (0 – 30) *	7,0 (0 – 68)	26,0 (0 – 51)
<b>FPEAI</b>	51,5 (31 – 67)	4,0 (0 – 14) *	20,5 (0 – 44)	33,5 (0 – 65)	23,0 (9 – 32)
<b>FPEAV</b>	53,0 (45 – 71)	18,5 (0 – 34) *	4,0 (0 – 17) *	18,5 (7 – 67)	30,5 (10 – 63)
<b>FPEOO</b>	43,5 (23 – 55)	9,5 (0 – 19) *	28,0 (0 – 61)	6,0 (0 – 69)	8,5 (0 – 23) *
<b>FPEOI</b>	51,5 (31 – 67)	4,0 (0 – 14) *	32,0 (1 – 43)	22,0 (0 – 41)	6,0 (0 – 16) *
<b>FPEOV</b>	53,0 (45 – 71)	18,5 (0 – 34) *	24,0 (2 – 44)	12,0 (0 – 48) *	8,5 (0 – 33) *
<b>FIEOO</b>	47,5 (23 – 74)	1,0 (0 – 16) *	19,5 (0 – 56) *	35,5 (3 – 53)	16,0 (0 – 36) *
<b>FIEOI</b>	47,5 (23 – 74)	1,0 (0 – 16) *	20,0 (6 – 48)	15,5 (1 – 52)	21,0 (0 – 49)
<b>FIEOV</b>	47,5 (23 – 74)	1,0 (0 – 16) *	8,0 (0 – 44)	10,0 (0 – 34) *	20,0 (0 – 49)

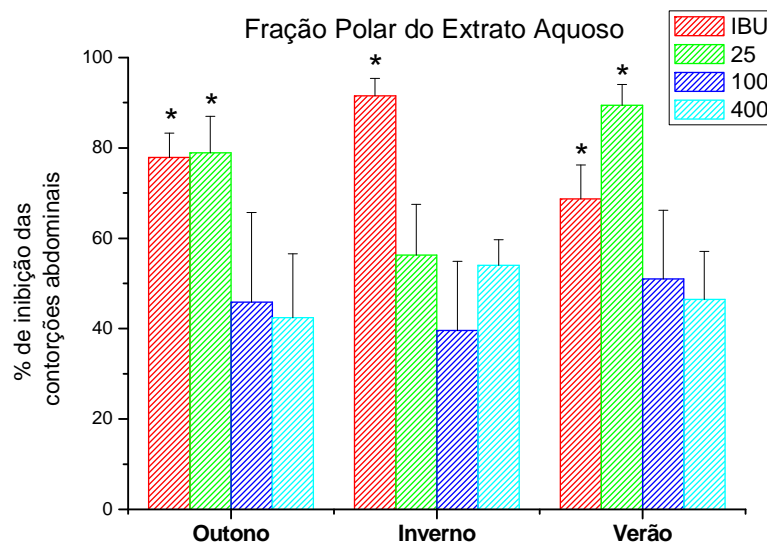
Dados expressos como mediana (valor mínimo – valor máximo).

\* p < 0,05 comparado com VEI (Teste de Kruskal Wallis complementado com Dunn).

A Figura 23 apresenta a porcentagem de inibição das contorções abdominais, em relação ao grupo veículo, dos grupos tratados com a fração polar do extrato em meio aquoso (FPEA) das folhas coletadas no outono (O), inverno (I) e verão (V).

Na fração polar do extrato em meio aquoso, a melhor dose para inibir as contorções abdominais nos camundongos foi de 25 mg/kg, com exceção das amostras provenientes do inverno que não apresentou atividade analgésica estatisticamente significativa. Esses resultados mostram que a água tem um poder de extração de compostos com efeito analgésico maior que os solventes orgânicos.

**Figura 23** – Eficácia do ibuprofeno (IBU) e de diferentes doses da fração polar do extrato em meio aquoso (FPEA) das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas no outono, inverno e verão em inibir contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,8% em camundongos machos. Os dados representam a porcentagem de inibição média em relação ao grupo controle (VEI) e os erros padrões da média de 7 a 11 camundongos em cada grupo.



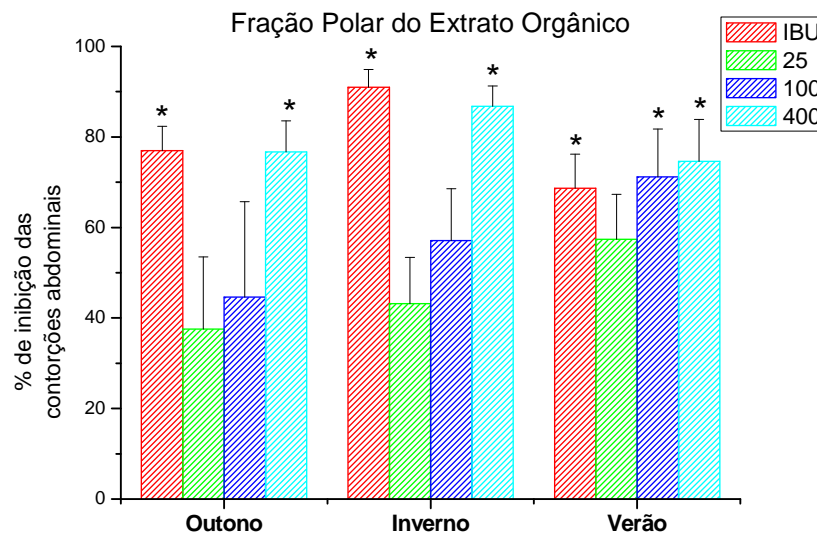
\*  $p < 0,05$  comparado com VEI (Teste de Kruskal Wallis complementado com Dunn).

A Figura 24 apresenta a porcentagem de inibição das contorções abdominais, em relação ao grupo veículo, dos grupos tratados com a fração polar do extrato em meio orgânico (FPEO) das folhas coletadas no outono (O), inverno (I) e verão (V).

Na fração polar do extrato em meio orgânico de folhas coletadas no outono, inverno e verão, a dose de 400 mg/kg mostrou ser a mais eficiente em inibir as contorções

abdominais em camundongos. Ainda mais, nas amostras provenientes do verão, a dose de 100 mg/kg também foi eficaz .

**Figura 24** – Eficácia do ibuprofeno (IBU) e de diferentes doses da fração polar do extrato em meio orgânico (FPEO) das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas no outono, inverno e verão em inibir contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,8% em camundongos machos. Os dados representam a porcentagem de inibição média em relação ao grupo controle (VEI) e os erros padrões da média de 7 a 11 camundongos em cada grupo.

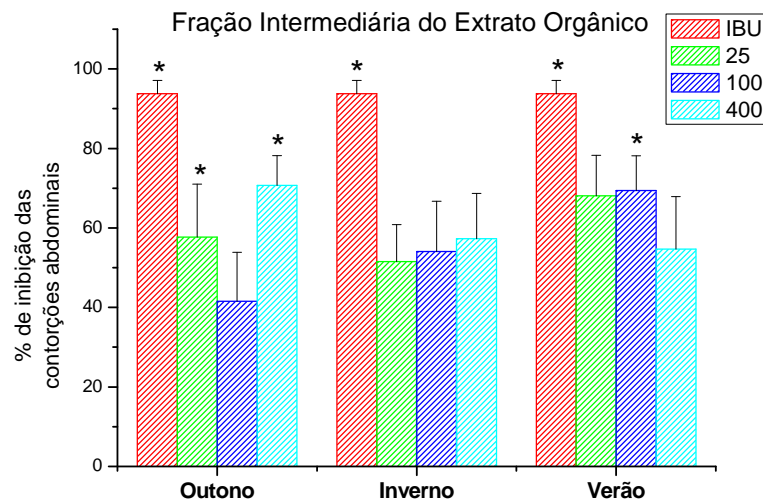


\*  $p < 0,05$  comparado com VEI (Teste de Kruskal Wallis complementado com Dunn).

A Figura 25 apresenta a porcentagem de inibição das contorções abdominais, em relação ao grupo veículo, dos grupos tratados com a fração intermediária do extrato em meio orgânico (FIEO) das folhas coletadas no outono (O), inverno (I) e verão (V).

A fração intermediária do extrato em meio orgânico apresenta diferença significativa em relação ao VEI apenas nas doses 25 e 400 mg/kg de amostras provenientes do outono e na dose de 100 mg/kg do verão. Amostras provenientes do inverno não apresentaram atividade analgésica estatisticamente significativa.

**Figura 25** – Eficácia do ibuprofeno (IBU) e de diferentes doses da fração intermediária do extrato em meio orgânico (FIEO) das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas no outono, inverno e verão em inibir contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,8% em camundongos machos. Os dados representam a porcentagem de inibição média em relação ao grupo controle (VEI) e os erros padrões da média de 9 a 10 camundongos em cada grupo.

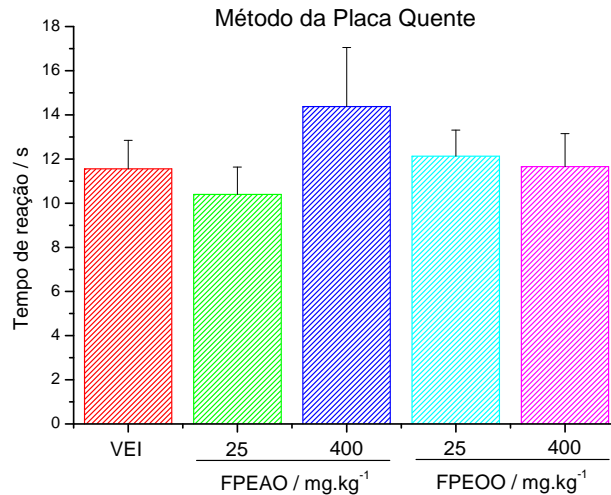


\*  $p < 0,05$  comparado com VEI (Teste de Kruskal Wallis complementado com Dunn).

#### 4.3.2.2 Método da placa quente

A Figura 26 mostra o resultado do tempo de reação (permanência) dos animais sobre a placa quente após serem tratados com a fração polar do extrato em meio aquoso (FPEA) e fração polar do extrato em meio orgânico (FPEO) de folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas no outono (O) nas doses de 25 e 400 mg/kg, além do controle negativo (veículo – VEI). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de oito animais para cada grupo.

**Figura 26** – Eficácia das diferentes doses da fração polar do extrato em meio aquoso (FPEA) e fração polar do extrato em meio orgânico (FPEO) das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas no outono (O) em relação ao grupo controle negativo (veículo – VEI). Os dados representam o tempo de reação média dos animais ao estímulo nociceptivo da placa quente e os erros padrões da média de oito camundongos em cada grupo.  $p > 0,05$ , ANOVA.



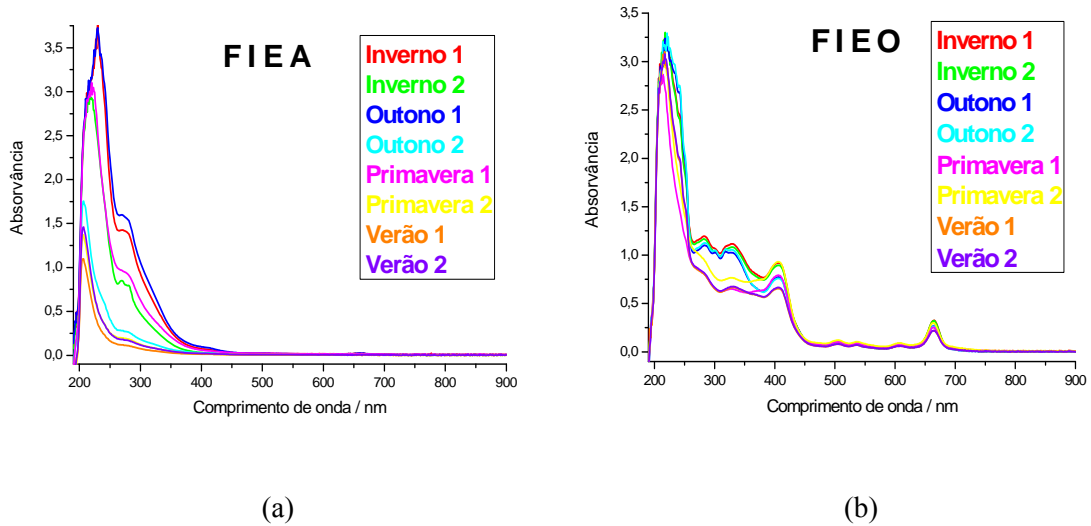
Os resultados da atividade analgésica pelo método da placa quente foram analisados por ANOVA e mostraram que não há diferença significativa das frações testadas com o grupo controle negativo ( $p > 0,05$ ), sugerindo que a *Vernonia condensata* Baker não possui efeito antinociceptivo central, apenas periférico, uma vez que diminuiu de forma significativa o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, mas não alterou a reação à placa quente<sup>26</sup>.

#### 4.4 ANÁLISE POR UV-VIS

Para as análises por espectrofotometria no ultravioleta-visível foram selecionadas as amostras da fração polar e intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico por apresentarem atividade analgésica.

A Figura 27 apresenta os espectros de UV-Vis da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico. Observa-se que os espectros dos extratos em meio aquoso são muito diferentes daqueles extraídos em meio orgânico, embora no intervalo de 200-300 nm eles sejam mais similares. Mesmo sendo visual esta diferença, para fins de comparação entre as estações, os dados de absorvância foram sujeitos a análise de componentes principais e hierárquica.

**Figura 27** – Espectros de absorção no ultravioleta-visível da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.

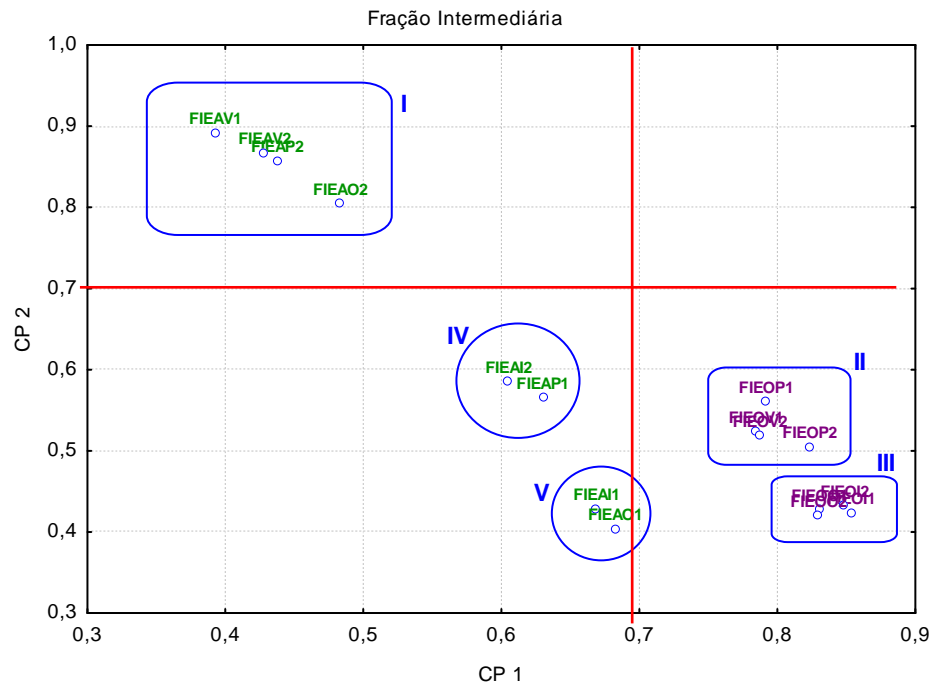


Os dados dos espectros foram dispostos em uma matriz de dimensão 16 x 653 (16 amostras x 653 variáveis) e sujeitos a análise de componentes principais e hierárquica. As duas primeiras componentes principais permitem explicar 97,88 % da variância total dos dados.

A Figura 28 mostra a projeção da CP1 com a CP2, no qual é possível ver a formação de cinco grupos.

A primeira componente principal separa os grupos II e III (extrato orgânico), localizados na parte mais positiva da CP1, dos grupos I, IV e V (extrato aquoso), localizados na parte menos positiva da CP1. Já a segunda componente principal separa o grupo I, localizado na parte mais positiva da CP2, dos demais grupos.

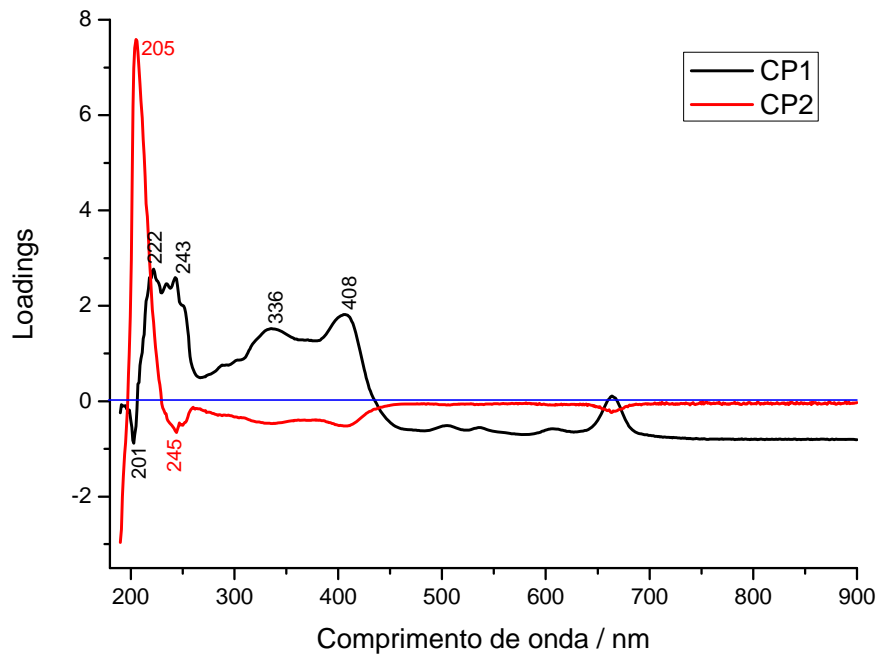
**Figura 28** – Gráfico dos escores das componentes 1 e 2 da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico no ultravioleta-visível, que explicam 97,88 % da variância total dos dados.



O gráfico dos loadings das componentes 1 e 2, Figura 29, mostra as variáveis com maior influência na discriminação das amostras.

Observa-se que os comprimentos de onda de 222, 243, 336 e 408 nm, que estão localizados na parte positiva da CP1 no gráfico dos loadings, influenciam na separação dos grupos II e III (extrato em meio orgânico). Os grupos I, IV e V (extrato aquoso), localizados na região menos positiva da CP1 no gráfico dos escores, são discriminados pelo comprimento de onda de 201 nm. O valor positivo da CP2, localizado no comprimento de onda de 205 nm, influencia na separação do grupo I, mostrando que a água extrai maior quantidade de compostos com absorção na região de 201 e 205 nm. Os grupos II, III, IV e V, posicionados na parte menos positiva da CP2, são mais influenciados pelas variáveis com comprimento de onda de 245 nm.

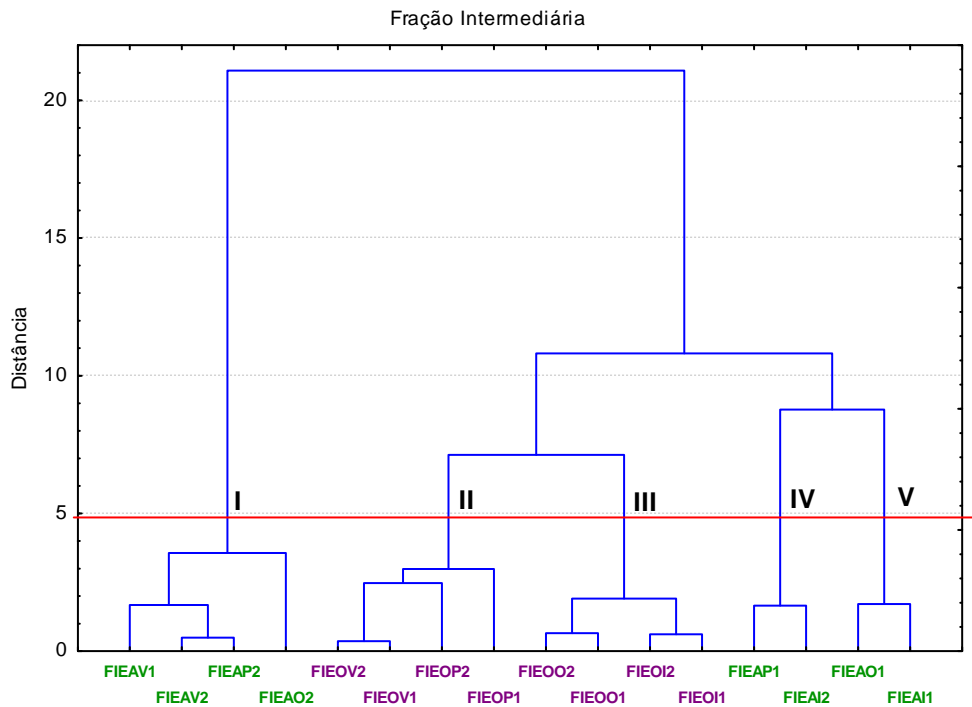
**Figura 29** – Gráfico dos loadings das componentes 1 e 2 da fração de polaridade intermediária dos extratos aquoso e orgânico no ultravioleta-visível.



A análise hierárquica também foi aplicada aos dados de absorvância no ultravioleta-visível. A Figura 30 apresenta o dendrograma obtido na análise hierárquica.

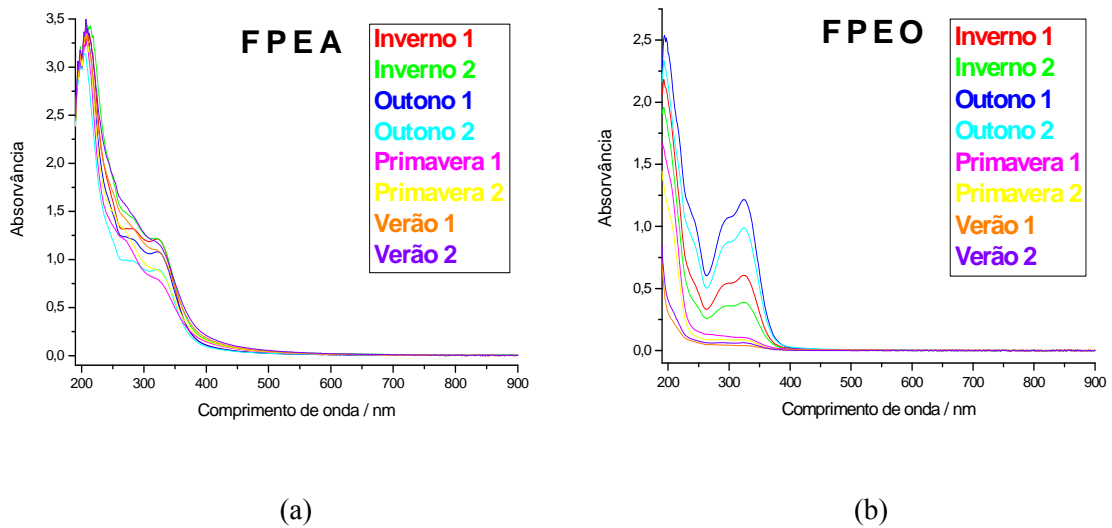
No dendrograma da análise hierárquica é possível observar os cinco grupos formados na projeção da CP1 com a CP2 concordando com os resultados obtidos pelo gráfico dos escores.

**Figura 30** – Dendrograma obtido pela análise hierárquica da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico das folhas de *Vernonia condensata* Baker no ultravioleta-visível.



A Figura 31 apresenta os espectros de UV-Vis da fração polar dos extratos em meio aquoso e orgânico. Nesta Figura também é possível observar a diferença dos espectros nos dois meios de extração, principalmente no intervalo de 250-400 nm. Mesmo a diferença sendo visual, os dados de absorvância foram sujeitos a análise de componentes principais e hierárquica para comparar a diferença na composição química entre as quatro estações do ano.

**Figura 31** – Espectros de absorção no ultravioleta-visível da fração polar dos extratos (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.



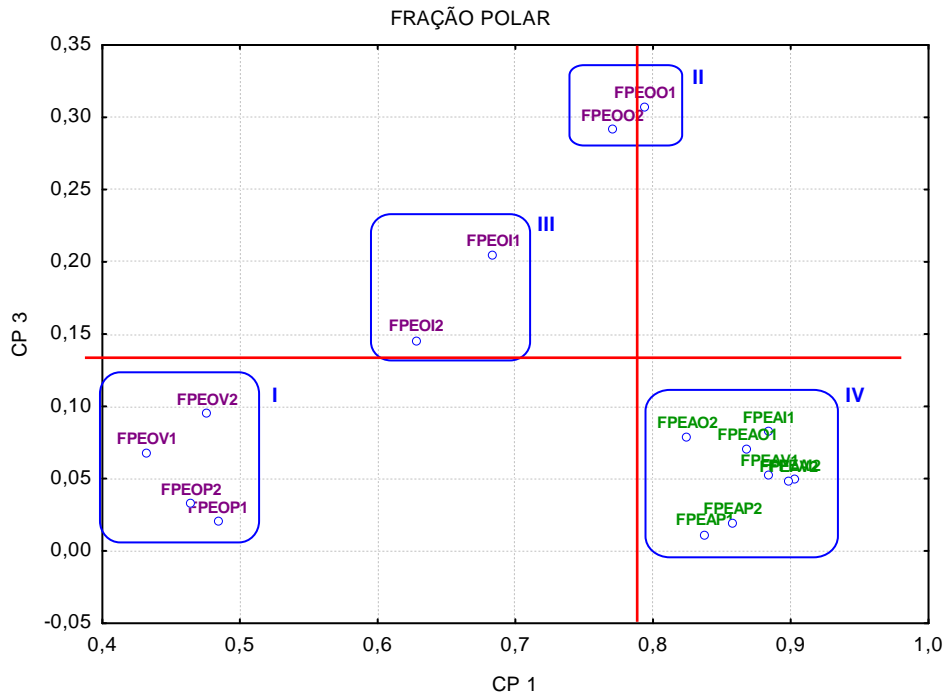
Os dados dos espectros da fração polar obtidos dos extratos em meio aquoso e orgânico foram dispostos em uma matriz de dimensão 16 x 653 (16 amostras x 653 variáveis). As três primeiras componentes principais permitem explicar 99,49 % da variância total dos dados.

A Figura 32 mostra a projeção da CP1 com a CP3, no qual é possível ver a formação de quatro grupos.

A primeira componente principal separa o grupo IV (extrato em meio aquoso), localizados na parte mais positiva da CP1, dos grupos I, II e III (extrato em meio orgânico), localizados na parte menos positiva da CP1. Já a terceira componente principal separa os grupos II e III (outono e inverno do extrato em meio orgânico), localizados na parte mais positiva da CP3, dos grupos I (primavera e verão do extrato em meio orgânico) e IV (extrato aquoso), localizados na parte menos positiva da CP3.

Observa-se que não houve separação dos extratos da fração polar em meio aquoso em relação às estações do ano, assim como, o rendimento dessas amostras também não apresentaram diferença significativa.

**Figura 32** – Gráfico dos escores das componentes 1 e 3 da fração polar dos extratos em meio aquoso e orgânico no ultravioleta-visível, que explicam 93,81% da variância total dos dados.

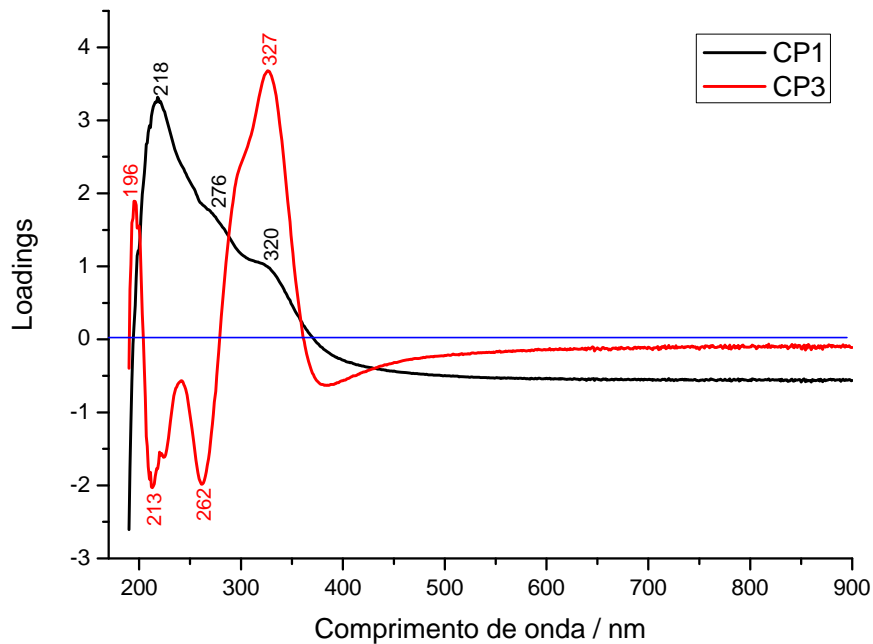


O gráfico dos loadings das componentes 1 e 3, Figura 33, mostra as variáveis com maior influência na discriminação das amostras.

Observa-se que os comprimentos de onda de 218, 276 e 320 nm estão localizados na parte positiva da CP1 influenciando a separação do grupo IV (extrato em meio aquoso) dos demais grupos (extrato em meio orgânico). Os valores positivos da CP3, referentes aos comprimentos de onda de 196 e 327 nm, influenciam na separação dos grupos II e III (amostras provenientes do outono e inverno em meio orgânico). Os grupos I (amostras provenientes da primavera e verão em meio orgânico) e IV (extrato em meio aquoso), posicionados na parte menos positiva da CP3, são mais influenciados pelas variáveis com comprimento de onda de 213 e 262 nm.

Observa-se que as amostras provenientes do outono e inverno da fração polar em meio orgânico extraíram maior quantidade de compostos com absorvância na região de 327 nm.

**Figura 33** – Gráfico dos loadings das componentes 1 e 3 da fração polar dos extratos em meio aquoso e orgânico no ultravioleta-visível.

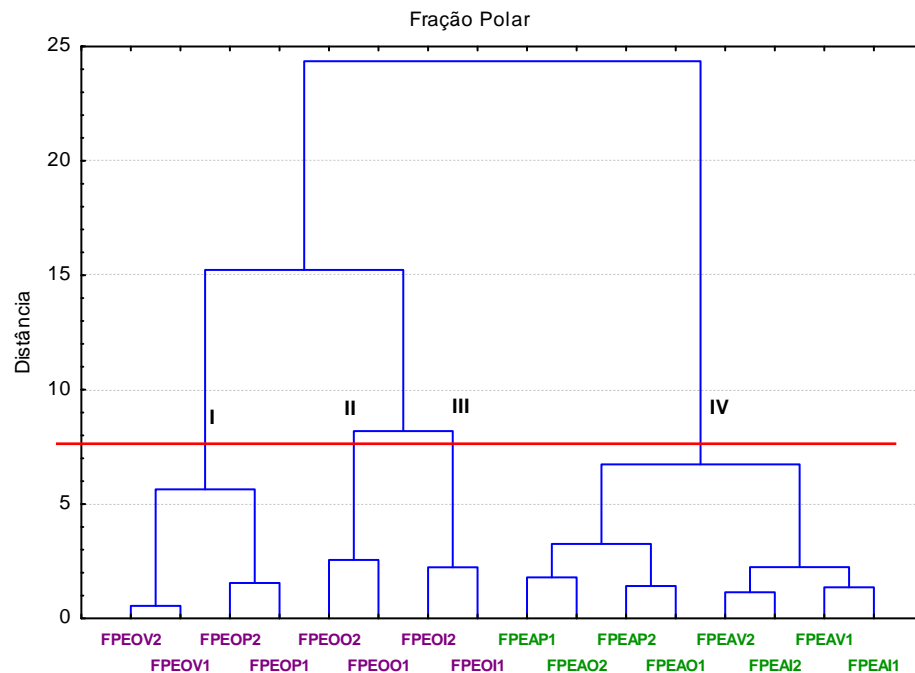


Schwanz (2006) e Hidalgo *et al.* (2010), mostraram que a boldina e seus derivados apresentam bandas de absorção nas regiões de 220, 280 e 310 nm.

No presente trabalho também foram encontradas bandas de absorção nas regiões de 218, 276 e 320 nm. Esses comprimentos de onda encontrados nos espectros da fração polar são responsáveis pela separação das amostras extraídas em meio aquoso, indicando a presença de boldina ou derivados nessas amostras.

A análise hierárquica também foi aplicada aos dados de absorvância no ultravioleta-visível. A Figura 34 apresenta o dendrograma obtido na análise hierárquica.

**Figura 34** – Dendrograma obtido pela análise hierárquica da fração polar dos extratos aquoso e orgânico das folhas de *Vernonia condensata* Baker no ultravioleta-visível.



No dendrograma da análise hierárquica é possível observar os quatro grupos formados na projeção da CP1 com a CP3 concordando com os resultados obtidos pelo gráfico dos escores.

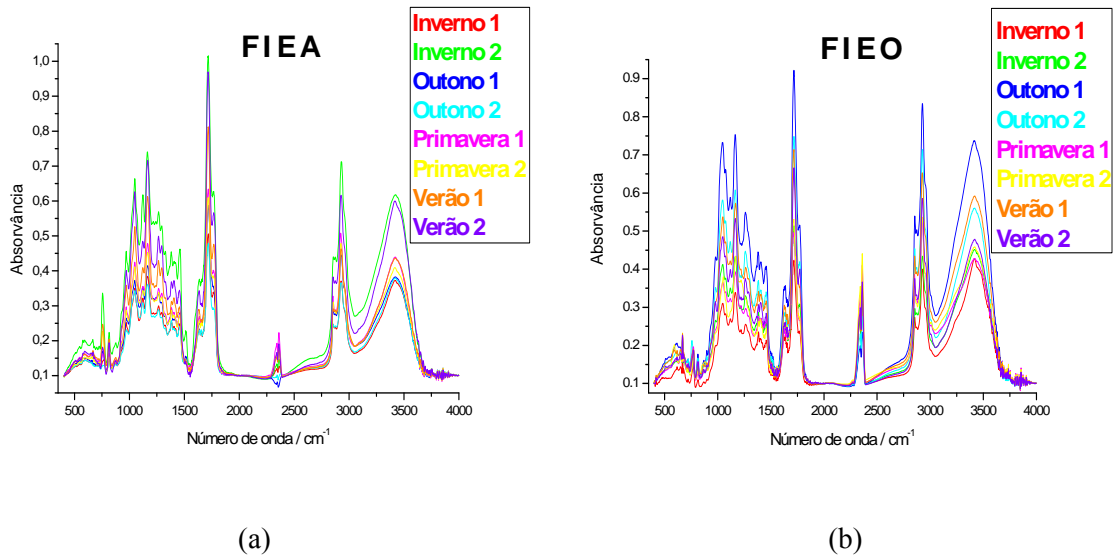
#### 4.5 ANÁLISE POR FT-IR

As frações do extrato em meio aquoso e orgânico foram analisadas por espectrofotometria no infravermelho.

A Figura 35 apresenta os espectros de FT-IR da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico.

Nos espectros de infravermelho também existe diferença entre os extratos preparados em meio aquoso daqueles preparados em meio orgânico, mas no mesmo meio é difícil discriminar as diferentes estações do ano. Sendo assim, os dados de absorvância foram dispostos em uma matriz de dimensão 16 x 1866 (16 amostras x 1866 variáveis) e sujeitos as análises de componentes principais e hierárquica.

**Figura 35** – Espectros de absorção no infravermelho da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.

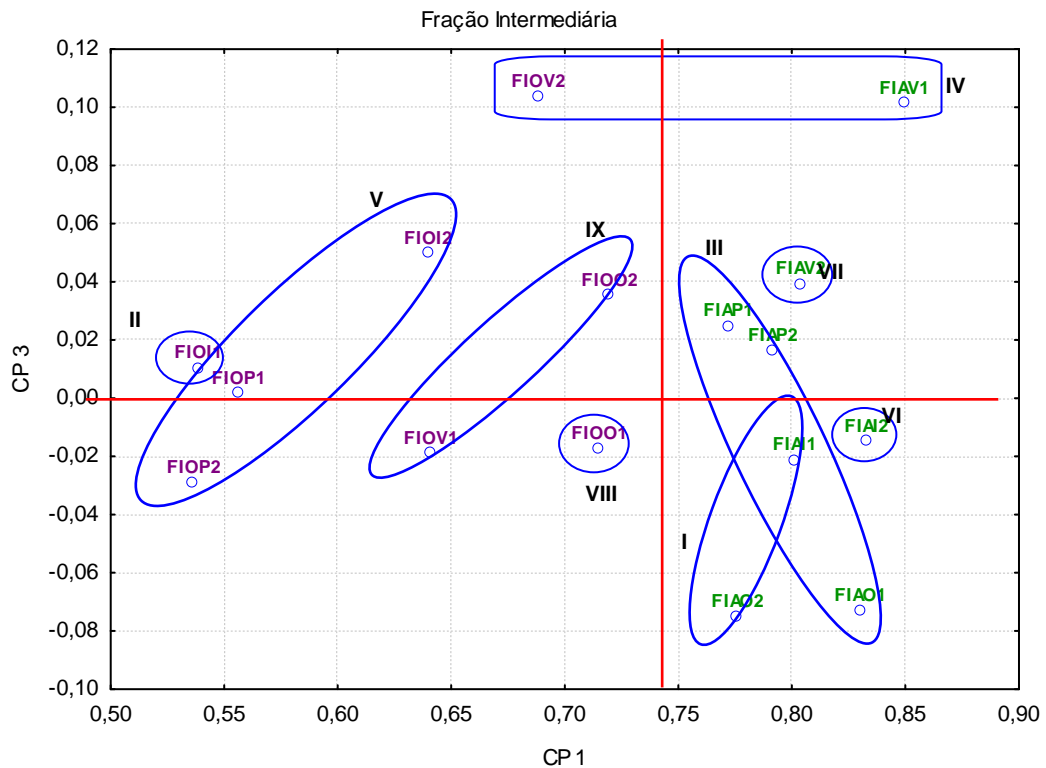


A Figura 36 mostra a projeção da CP1 com a CP3, no qual é possível ver a formação de nove grupos. As três primeiras componentes principais permitem explicar 99,39 % da variância total dos dados.

A primeira componente principal separa os extratos em meio aquoso, localizados na parte mais positiva da CP1, dos extratos em meio orgânico, localizados na parte menos positiva da CP1.

Já a terceira componente principal separa os grupos II, IV e VII, localizados na parte positiva da CP3, dos grupos I, VI e VIII, localizados na parte negativa. Enquanto que os grupos III, V e IX se encontram na região intermediária da CP3.

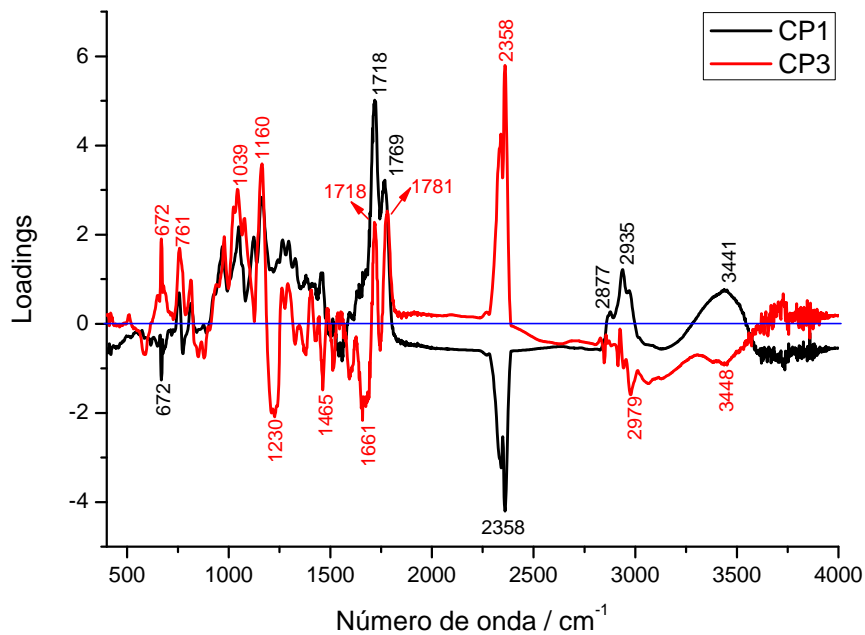
**Figura 36** – Gráfico dos escores das componentes 1 e 3 da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico no infravermelho, que explicam 97,24 % da variância total dos dados.



O gráfico dos loadings das componentes 1 e 3, Figura 37, mostra as variáveis com maior influência na discriminação das amostras.

Observa-se que os números de onda de 1718, 1769, 2877, 2935 e 3441  $\text{cm}^{-1}$  estão localizados na parte positiva da CP1 no gráfico dos loadings influenciando a separação dos extratos em meio aquoso daqueles extraídos com solvente orgânico. Os valores positivos da CP3 no gráfico dos loadings, localizados nos números de onda de 672, 761, 1039, 1160  $\text{cm}^{-1}$ , influenciam na separação do grupo II, IV e VII. Os grupos I, VI, e VIII, posicionados na parte negativa da CP3 no gráfico dos escores, são mais influenciados pelas variáveis com valores de 1230, 1465, 1661, 2979 e 3448  $\text{cm}^{-1}$ .

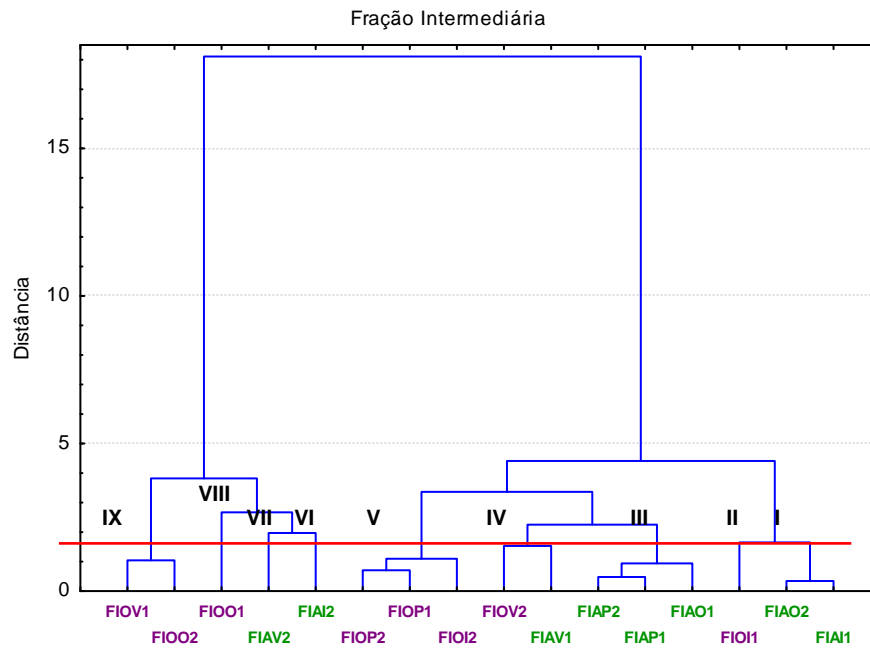
**Figura 37** – Gráfico dos loadings das componentes 1 e 3 da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico no infravermelho.



A análise hierárquica também foi aplicada aos dados de absorvância no infravermelho. A Figura 38 apresenta o dendrograma obtido na análise hierárquica.

No dendrograma da análise hierárquica é possível observar os nove grupos formados na projeção da CP1 com a CP3 concordando com os resultados obtidos pelo gráfico dos escores.

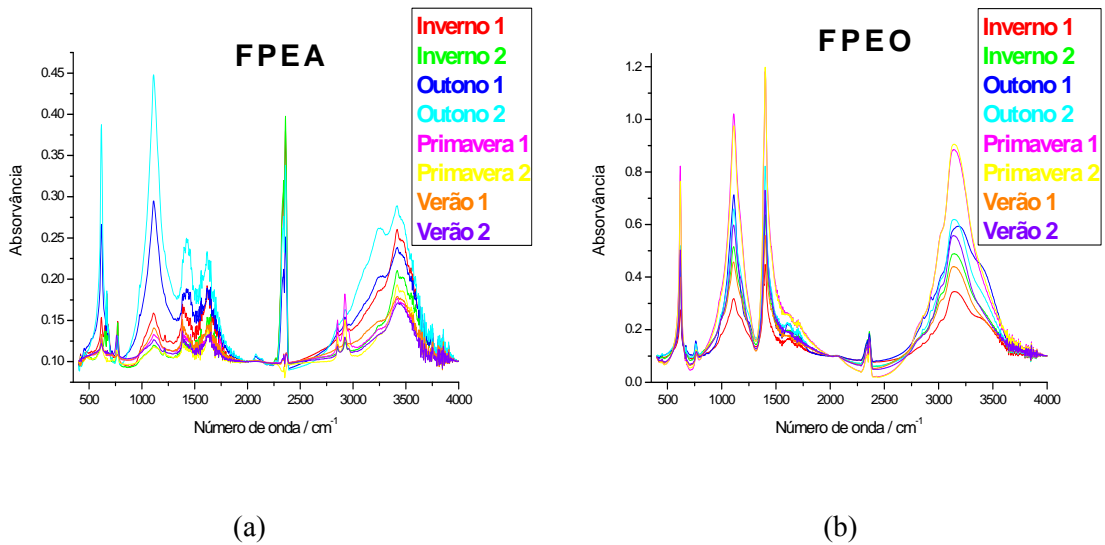
**Figura 38** – Dendrograma obtido pela análise hierárquica da fração de polaridade intermediária dos extratos em meio aquoso e orgânico das folhas de *Vernonia condensata* Baker no infravermelho.



Nos espectros de infravermelho também existe diferença entre os extratos preparados em meio aquoso daqueles preparados em meio orgânico, mas visualmente é difícil discriminar as diferentes estações do ano dentro do mesmo meio extrator. Sendo assim, os dados de absorvância foram dispostos em uma matriz de dimensão 16 x 1866 (16 amostras x 1866 variáveis) e sujeitos as análises de componentes principais e hierárquica.

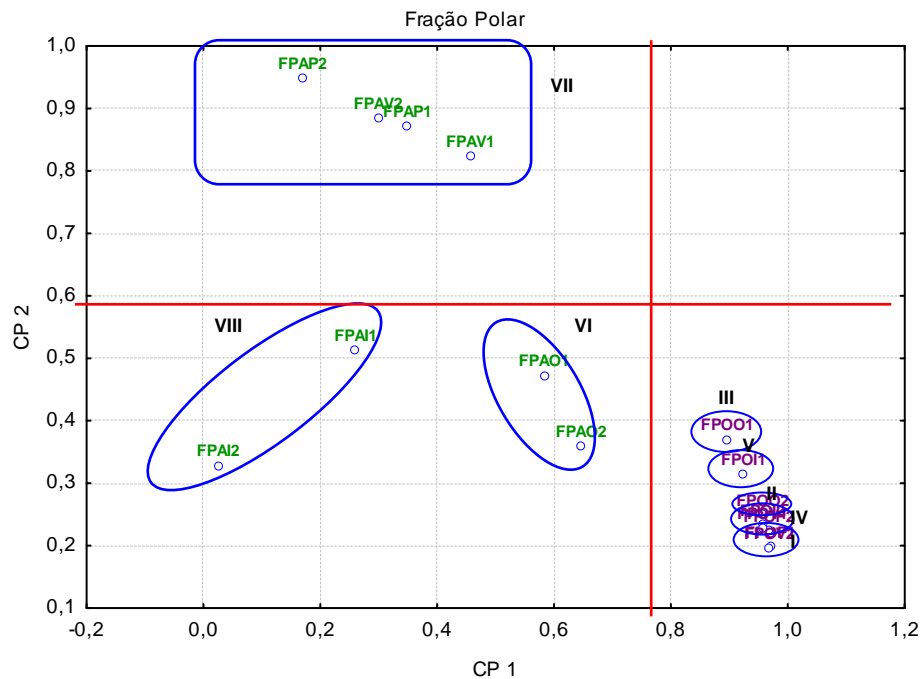
A Figura 39 apresenta os espectros de FT-IR da fração polar dos extratos em meio aquoso e orgânico.

**Figura 39** – Espectros de absorção no infravermelho da fração polar dos extratos em meio (a) aquoso e (b) orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano.



A Figura 40 mostra a projeção da CP1 com a CP2, no qual é possível ver a formação de oito grupos. As duas primeiras componentes principais permitem explicar 92,04% da variância total dos dados.

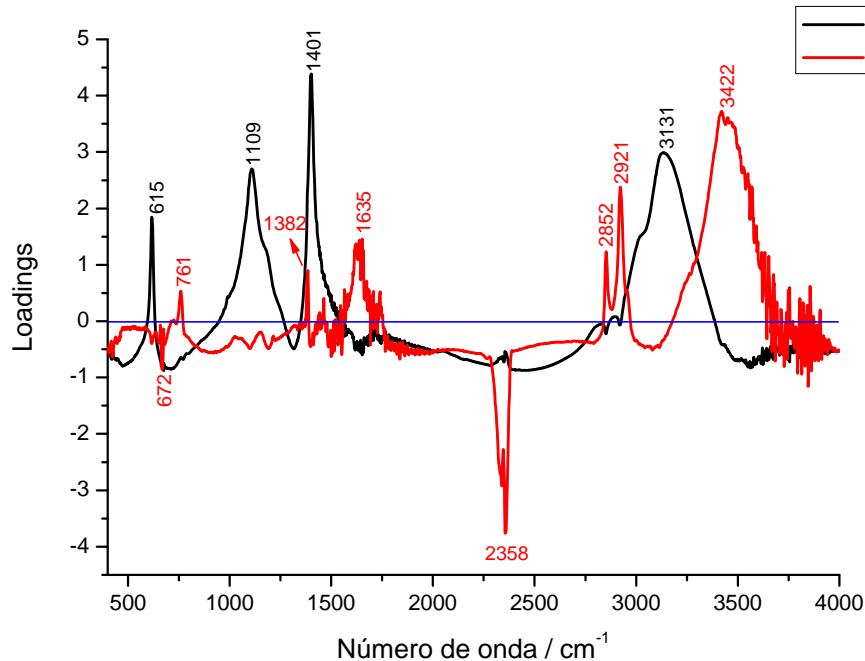
**Figura 40** – Gráfico dos escores das componentes 1 e 2 da fração polar dos extratos em meio aquoso e orgânico no infravermelho, que explicam 92,04% da variância total dos dados.



A primeira componente principal separa os extratos em meio orgânico, localizados na parte mais positiva da CP1, dos extratos em meio aquoso, localizados na parte menos positiva da CP1. Já a segunda componente principal separa o grupo VII (primavera e verão do extrato em meio aquoso), localizado na parte mais positiva da CP2, dos demais grupos (outono e inverno do extrato em meio aquoso e extrato em meio orgânico) localizados na região menos positiva da CP2.

O gráfico dos loadings das componentes 1 e 2, Figura 41, mostra as variáveis com maior influência na discriminação das amostras.

**Figura 41** – Gráfico dos loadings das componentes 1 e 2 da fração polar dos extratos em meio aquoso e orgânico no infravermelho.



Observa-se que os números de onda de 1109, 1401 e 3131 cm<sup>-1</sup>, na parte positiva da CP1 no gráfico dos loadings, estão influenciando a separação dos extratos em meio orgânico, dos extratos em meio aquoso.

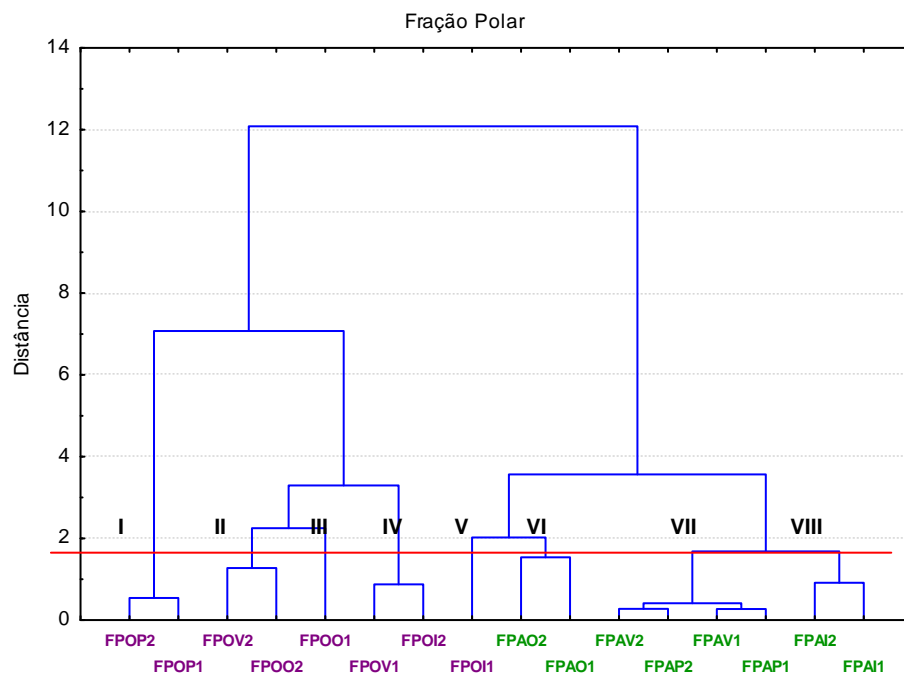
Os valores positivos da CP2, referentes aos números de onda de 761, 1382, 1635, 2852, 2921 e 3422 cm<sup>-1</sup>, influenciam na separação do grupo VII (primavera e verão do extrato em meio aquoso), mostrando que a fração polar extraída em meio aquoso das folhas

coletadas na primavera e verão extraem maior compostos com absorvância na região de  $3422\text{ cm}^{-1}$ .

A análise hierárquica também foi aplicada aos dados de absorvância no infravermelho. A Figura 42 apresenta o dendrograma obtido na análise hierárquica.

No dendrograma da análise hierárquica é possível observar os oito grupos formados na projeção da CP1 com a CP2 concordando com os resultados obtidos pelo gráfico dos escores.

**Figura 42** – Dendrograma obtido pela análise hierárquica da fração polar dos extratos em meio aquoso e orgânico das folhas de *Vernonia condensata* Baker no infravermelho.



As bandas largas em  $3448$ ,  $3441$  e  $3422\text{ cm}^{-1}$  encontradas nos espectros de infravermelho, nas frações polar e intermediária, são características de vibrações de deformação axial da ligação N-H ( $3550\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ ), sendo estas bandas de estiramento assimétrico e simétrico de N-H de aminas e estiramento N-H de amidas secundárias<sup>60,61</sup>.

Segundo Odiongenyi *et al.* (2009), o extrato etanólico de *Vernonia amygdalina* apresenta absorção em  $3402\text{ cm}^{-1}$ . Kolot e Grinberg (2004) mostraram que o óleo da semente de *Vernonia galamensis* apresenta absorção em  $3450\text{ cm}^{-1}$ . Raghavan e Emekalam (2001) também mostraram que o óleo de outras espécies de vernonia apresenta bandas de

absorção em  $3450\text{ cm}^{-1}$ , sendo que estas bandas citadas são características de deformação axial da ligação O-H de alcoóis e fenóis.

A região em torno de  $3131\text{ cm}^{-1}$ , encontrada no espectro da fração polar, é característica de deformação axial da ligação O-H. Essa diminuição na frequência é explicada pelo fato do átomo de hidrogênio desta ligação ser fixado na estrutura por uma ponte com outro átomo de oxigênio da molécula. Esse tipo de ponte pode ser observado na estrutura da launobina, um alcalóide isoquinolino com estrutura semelhante a da boldina<sup>65</sup>.

As bandas de absorção em  $2979$ ,  $2935$ ,  $2921$ ,  $2877$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$ , encontradas nos espectros das frações polar e intermediária, são características de deformação axial da ligação C-H de alcanos alifáticos ( $2990\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ )<sup>61</sup>, sendo estas bandas de estiramento assimétrico de  $\text{CH}_3$  ( $2984\text{ cm}^{-1}$ )<sup>66</sup>, acoplamento mecânico de estiramento assimétrico de  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  ( $2959\text{ cm}^{-1}$ )<sup>66</sup>, estiramento assimétrico de  $\text{CH}_2$  ( $2930\text{ cm}^{-1}$ )<sup>66</sup>, estiramento simétrico de  $\text{CH}_3$  ( $2919\text{ cm}^{-1}$ )<sup>64</sup>, acoplamento mecânico de estiramento simétrico de  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  ( $2879\text{ cm}^{-1}$ )<sup>66</sup> e estiramento simétrico de  $\text{CH}_2$  ( $2850\text{ cm}^{-1}$ )<sup>64</sup>.

A banda em  $2358\text{ cm}^{-1}$  presente nas frações polar e intermediária, são características de deformação axial da ligação N-H de amins terciárias ( $2700\text{-}2250\text{ cm}^{-1}$ ), ou estiramento assimétrico de  $\text{CO}_2$  livre<sup>60,61</sup>.

As bandas de absorção em  $1769$  e  $1718\text{ cm}^{-1}$ , encontradas nos espectros das frações polar e intermediária, podem ser atribuídas à deformação axial da ligação C=O de ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e amidas ( $1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$ ) ou, de acordo com a relação entre a posição da carbonila e o tamanho do anel da lactona, pode ser atribuído a  $\gamma$ -lactonas ( $1795\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ ) e/ou  $\delta$ -lactonas ( $1760\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ). A banda de absorção de  $\nu\text{ C=O}$  das  $\gamma$ -lactamas ocorre entre  $1750$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  e os valores entre  $1760$  e  $1730\text{ cm}^{-1}$  correspondem as  $\beta$ -lactamas<sup>60,61,64</sup>.

A forte banda de absorção em  $1769\text{ cm}^{-1}$ , no espectro da fração intermediária que pode ser atribuído ao estiramento de C=O de  $\gamma$ -lactona ( $1760\text{ cm}^{-1}$ )<sup>67</sup>, indica a presença de lactonas sesquiterpênicas no extrato da *Vernonia condensata* Baker, que podem apresentar uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas como atividade antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória.

Os números de onda em  $1661$  e  $1635\text{ cm}^{-1}$ , encontrados nos espectros da fração polar e intermediária dos extratos, podem ser atribuídas como deformação axial da ligação C=C de alcenos ou hidrocarbonetos aromáticos, ou ainda, deformação angular simétrica da ligação N-H de amins primárias e secundárias ( $1670\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ )<sup>60,61</sup>.

A região em  $1465\text{ cm}^{-1}$ , identificada no espectro da fração intermediária, é característica de deformação angular assimétrica de  $\text{CH}_2$  de alcanos ( $1467\text{ cm}^{-1}$ )<sup>61</sup>. A região em  $1457\text{ cm}^{-1}$ , da fração neutra, é atribuída como deformação angular assimétrica de  $\text{CH}_3$  de alcanos ( $1457\text{ cm}^{-1}$ )<sup>64</sup>. O número de onda de  $1382\text{ cm}^{-1}$ , no espectro da fração polar, é caracterizado por deformação angular simétrica de  $\text{CH}_3$  de alcanos ( $1384\text{ cm}^{-1}$ )<sup>64</sup>.

O valor de  $1401\text{ cm}^{-1}$ , no espectro da fração polar, pode ser atribuído pela deformação axial da ligação C-N ( $1420\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ )<sup>61</sup>.

As bandas em  $1230$ ,  $1160$ ,  $1109$ ,  $1039\text{ cm}^{-1}$ , encontradas nos espectros das frações polar e intermediária, são características de deformação axial da ligação C-N de aminas alifáticas e deformação angular da ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos ( $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ )<sup>60,66</sup>, deformação axial da ligação C-O de alcoóis, fenóis, ésteres e lactonas<sup>62,64</sup>.

As bandas de absorção em  $1109$  e  $1160\text{ cm}^{-1}$ , presentes nos espectros da fração polar e intermediária, respectivamente, correspondentes a um estiramento da ligação C-O, indica uma possível presença de lactonas e de alguns tipos de alcalóides como a boldina, que possuem propriedades anti-inflamatórias.

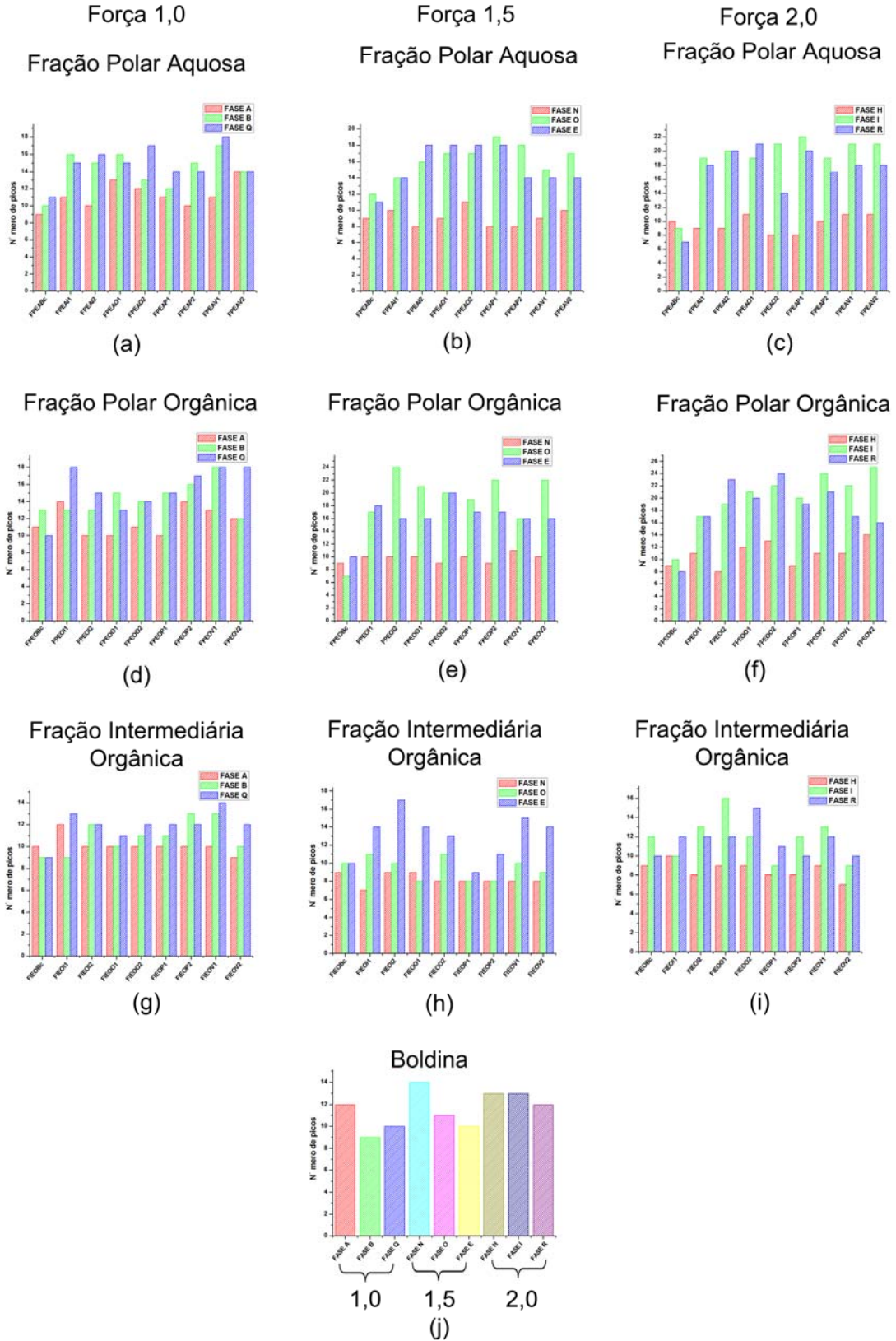
Os valores de  $761$  e  $672\text{ cm}^{-1}$ , identificadas nas frações polar e intermediária, são atribuídas à vibração de deformação angular fora do plano da ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos ou alcenos ( $1000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ ), deformação angular simétrica fora do plano da ligação N-H de aminas ( $909\text{-}667\text{ cm}^{-1}$ ), de amidas ( $800\text{-}667\text{ cm}^{-1}$ ) e lactamas ( $800\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ), ou ainda, deformação axial da ligação N-O de nitritos ( $850\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ )<sup>61,66</sup>.

#### 4.6 ANÁLISE POR CLAE

Outra etapa de extrema importância na análise de plantas é a cromatografia em fase reversa e um dos parâmetros a serem avaliados é a influência da fase móvel na qualidade da impressão digital cromatográfica dos metabólitos secundários da planta *Vernonia condensata* Baker. Desta forma, a fim de se obter o perfil cromatográfico com maior número de picos e investigar possíveis discriminações na composição química, as frações dos extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker foram submetidas às análises cromatográficas.

O monitoramento foi feito nos comprimentos de onda de  $210$ ,  $240$  e  $254\text{ nm}$  nas nove fases. Como o comprimento de onda em  $210\text{ nm}$  apresentou maior o número de picos, este foi selecionado para investigar a melhor separação entre as fases estudadas (Figura 43).

**Figura 43** – Gráfico dos números de picos no cromatograma da fração polar do extrato em meio aquoso (**a, b, c**), fração polar do extrato em meio orgânico (**d, e, f**), fração intermediária do extrato em meio orgânico (**g, h, i**) e boldina (**j**), nas forças 1,0, 1,5 e 2,0 das nove fases móveis estudadas, monitoradas em 210 nm.

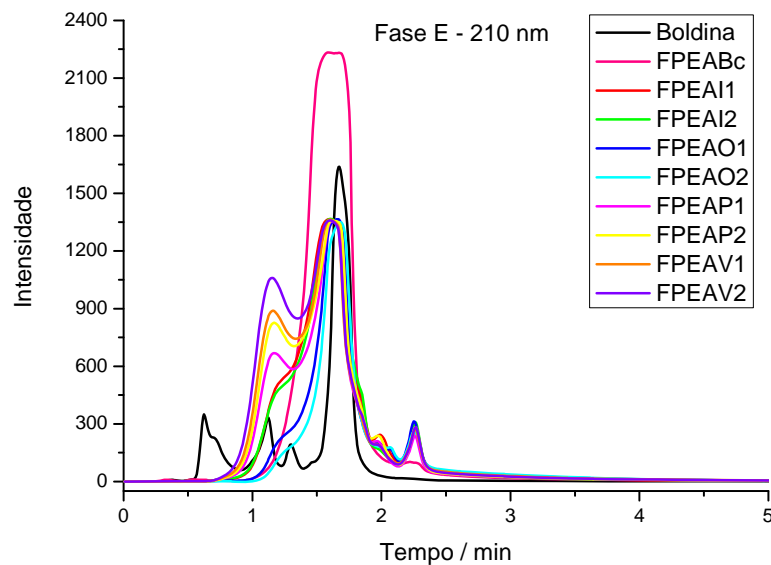


As melhores fases móveis para investigar os compostos presentes na planta foram as fases compostas por acetonitrila/água e acetonitrila/água/metanol, principalmente de força 1,5 e 2,0. Sendo assim, para aplicação dos métodos quimiométricos, foi considerado o monitoramento em 210 nm na fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) por apresentar uma das melhores separações dos compostos químicos presentes no extrato.

#### 4.6.1 Análise Exploratória da Fração Polar do Extrato em meio Aquoso

A Figura 44 mostra os cromatogramas das 9 amostras da fração polar do extrato em meio aquoso (FPEA) e da boldina na fase móvel E (26% ACN:51% H<sub>2</sub>O:23% MeOH) monitorada em 210 nm.

**Figura 44** – Cromatograma das 9 amostras da fração polar do extrato aquoso (FPEA) e da boldina obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



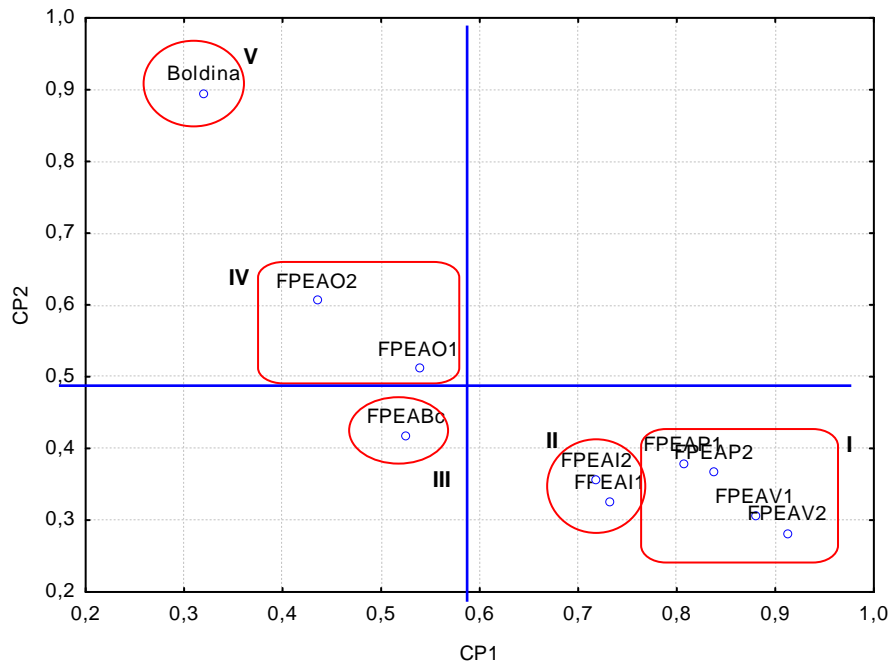
Observa-se no cromatograma a influência das estações do ano na concentração dos compostos químicos, principalmente nos tempos de retenção próximos a 1,13 e 1.65 minutos.

Os dados dos cromatogramas foram transformados em uma matriz de dimensão 10 x 1800 (10 amostras x 1800 variáveis), correspondendo ao tempo de retenção de 15 minutos. Essa matriz foi submetida ao pré-processamento para minimizar as variações

causadas pela quantidade de amostras injetadas e em seguida submetida à análise de componentes principais.

As duas primeiras componentes principais (CP) explicam 96,96 % da variância total contida nos dados, Figura 45.

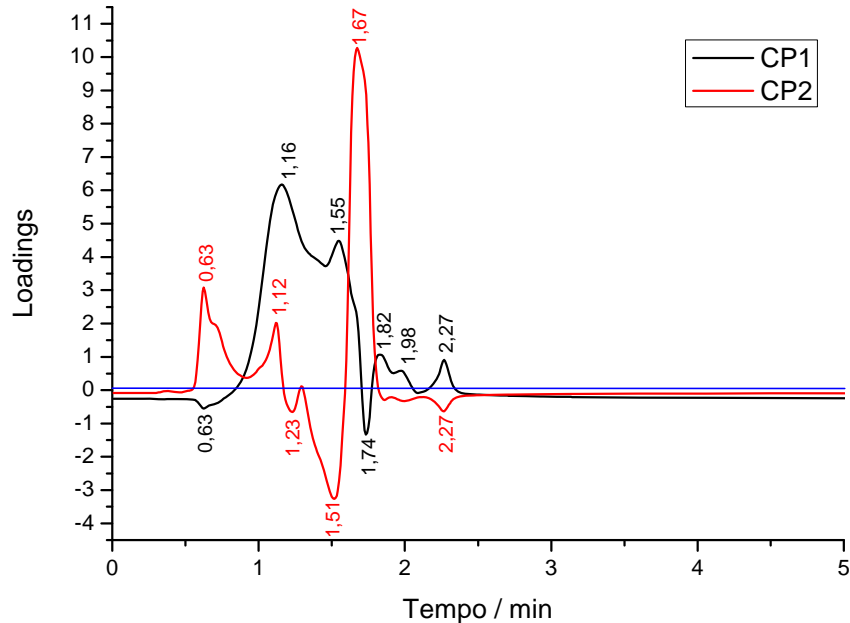
**Figura 45** – Gráfico dos escores das CP1 e CP2 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato aquoso da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano mostrando a formação de cinco grupos.



No gráfico dos escores (Figura 45), a CP1, com 90,48% da variância total dos dados, separa os extratos da fração polar em meio aquoso de folhas coletadas no inverno, verão e primavera localizados na região mais positiva da CP1, dos extratos da fração polar em meio aquoso de folhas coletadas no outono, da amostra comercial e da boldina que estão localizados na região menos positiva da CP1 no gráfico dos escores. A CP2, com apenas 6,48% da variância total dos dados, consegue discriminar os extratos da fração polar em meio aquoso de folhas coletadas no inverno, verão e primavera e da amostra comercial localizados na região menos positiva da CP2, dos extratos da fração polar em meio aquoso de folhas coletadas no outono e da boldina que estão localizados na região mais positiva da CP2 no gráfico dos escores.

A Figura 46 representa o gráfico dos valores dos loadings das componentes 1 e 2.

**Figura 46** – Gráfico dos loadings das CP1 e CP2 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato aquoso da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano.



Os extratos da fração polar em meio aquoso de folhas coletadas no inverno, verão e primavera que estão localizados na região mais positiva da CP1 no gráfico dos escores são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos na CP1, ou seja, com tempos de retenção em torno de 1,16; 1,55; 1,82; 1,98 e 2,27 minutos.

Os extratos provenientes do outono, da amostra comercial e a boldina que estão localizados na região menos positiva da CP1 no gráfico dos escores são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP1, ou seja, com tempos de retenção em torno de 0,63 e 1,74 minutos.

Os tempos em torno de 1,23; 1,51 e 2,27 minutos, localizados na região negativa da CP2 no gráfico dos loadings, tem maior influência na separação dos extratos provenientes do inverno, verão, primavera e da amostra comercial que estão localizados na região menos positiva da CP2 no gráfico dos escores.

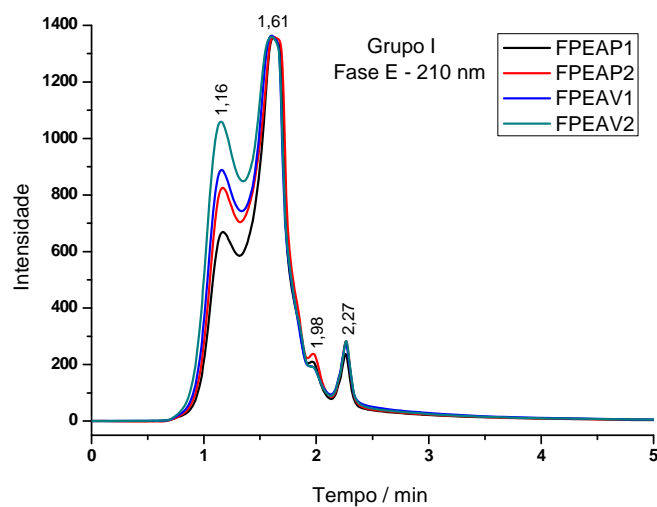
Os tempos em 0,63; 1,12 e 1,67 minutos, localizados na região positiva da CP2 na Figura 46, influenciam na discriminação da amostra da boldina e dos extratos provenientes das folhas coletadas no outono (Figura 45) em relação aos outros extratos. Observa-se que esses tempos de retenção são característicos da boldina.

As Figuras 47 a 51 mostram os cromatogramas dos cinco grupos apresentados na Figura 45. Observando o cromatograma da boldina (Figura 51) e dos extratos

provenientes das folhas coletadas no outono (Figura 50), podemos dizer que a CP2 discrimina as amostras pela concentração de derivados alcaloídicos isoquinolínicos semelhantes a boldina.

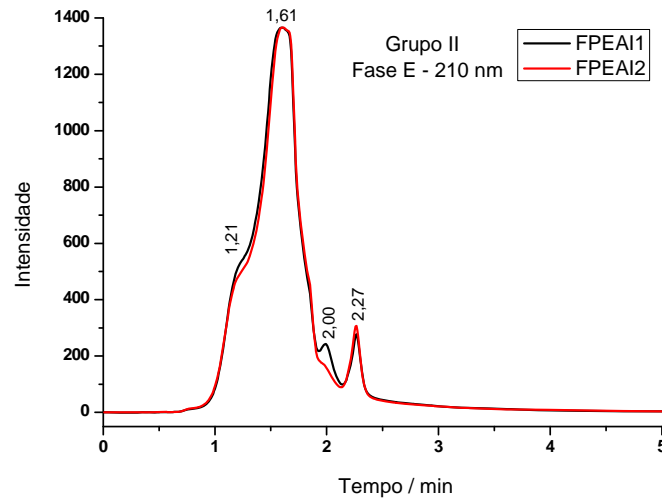
A Figura 47 mostra os cromatogramas das amostras do grupo I, que contém a fração polar do extrato em meio aquoso das folhas coletadas no verão e na primavera.

**Figura 47** – Cromatograma das amostras do grupo I discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



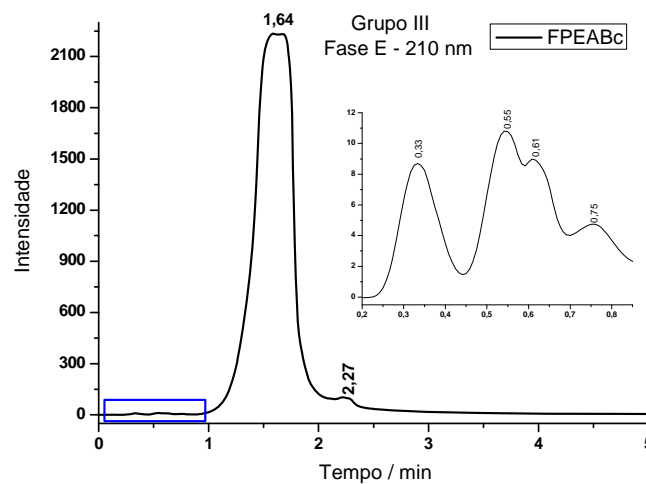
A Figura 48 mostra os cromatogramas das amostras do grupo II, que contém a fração polar do extrato em meio aquoso das folhas coletadas no inverno.

**Figura 48** – Cromatograma das amostras do grupo II discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



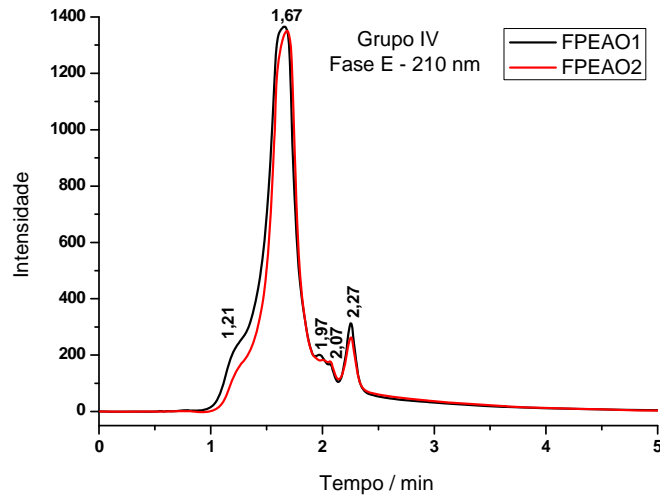
A Figura 49 mostra o cromatograma da amostra do grupo III, que é formado apenas pela fração polar do extrato em meio aquoso da amostra comercial.

**Figura 49** – Cromatograma das amostras do grupo III discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



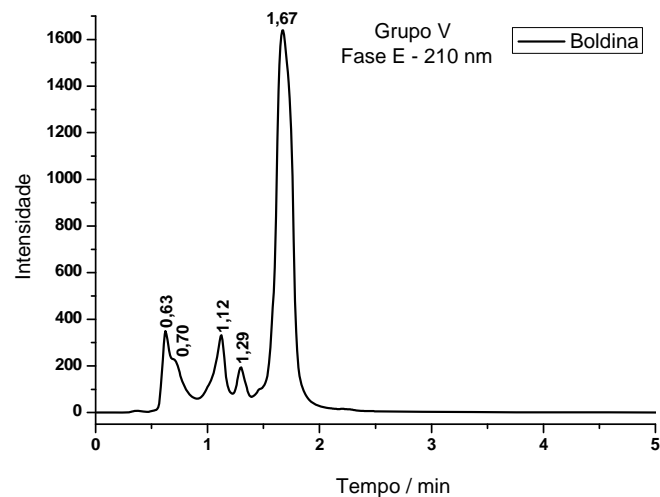
A Figura 50 mostra o cromatograma das amostras do grupo IV, que contém a fração polar do extrato em meio aquoso das folhas coletadas no outono.

**Figura 50** – Cromatograma das amostras do grupo IV discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



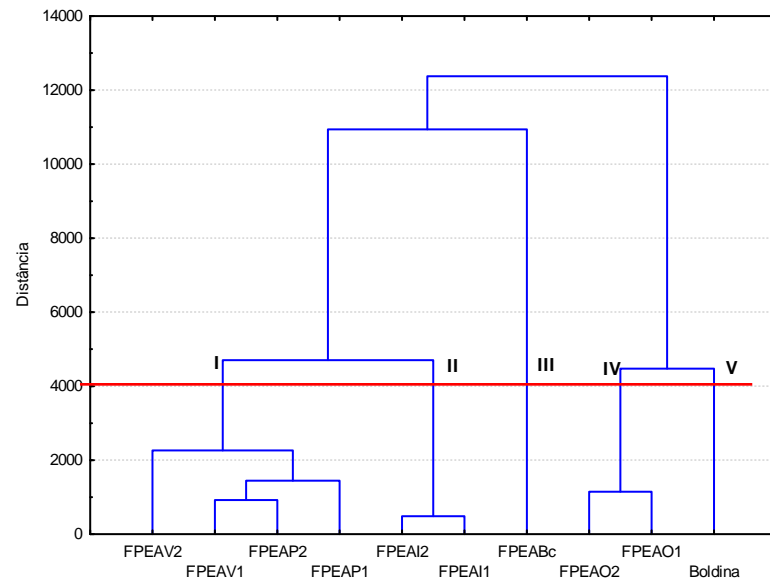
A Figura 51 mostra o cromatograma da amostra do grupo V, que é formado apenas pela boldina.

**Figura 51** – Cromatograma das amostras do grupo V discriminado pela projeção dos escores da CP1 e CP2, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



A Figura 52 mostra a análise hierárquica dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato em meio aquoso da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano confirmando a formação de cinco grupos de composição química diferente.

**Figura 52** – Análise hierárquica dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato em meio aquoso da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano.

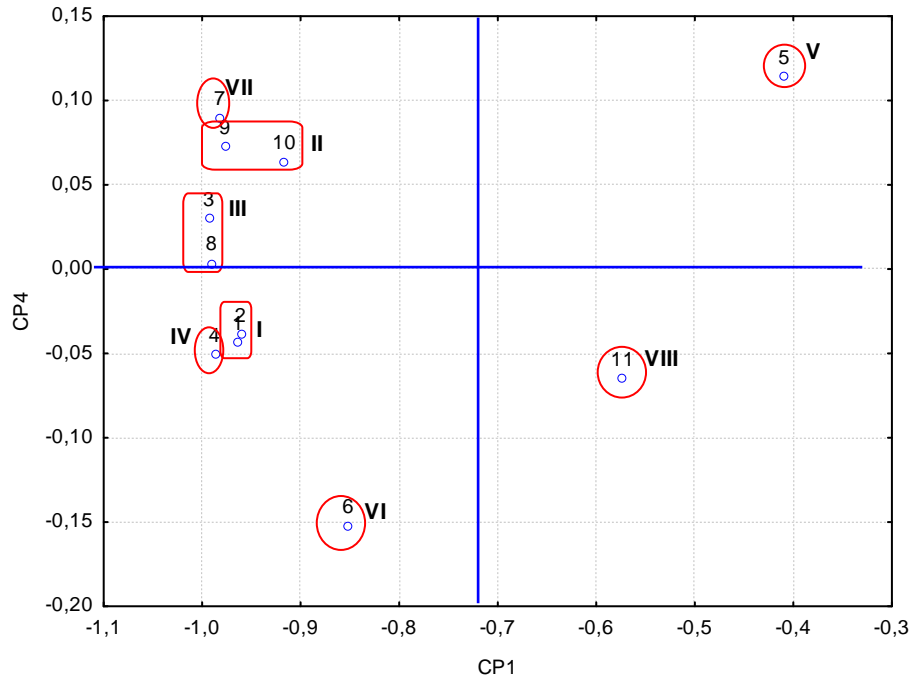


Os espectros UV dos picos nos cromatogramas das amostras FPEABc (grupo III), FPEAO2 (grupo IV) e FPEAV1 (grupo I) foram normalizados e submetidos à ACP para verificar a variedade de grupos de moléculas presentes nas amostras.

A amostra FPEABc apresentou 11 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos dos espectros foram dispostos em uma matriz de dados.

A Figura 53 mostra a separação dos 11 espectros obtidos dos 11 picos na análise por CLAE da amostra FPEABc no gráfico dos escores da CP1 e CP4.

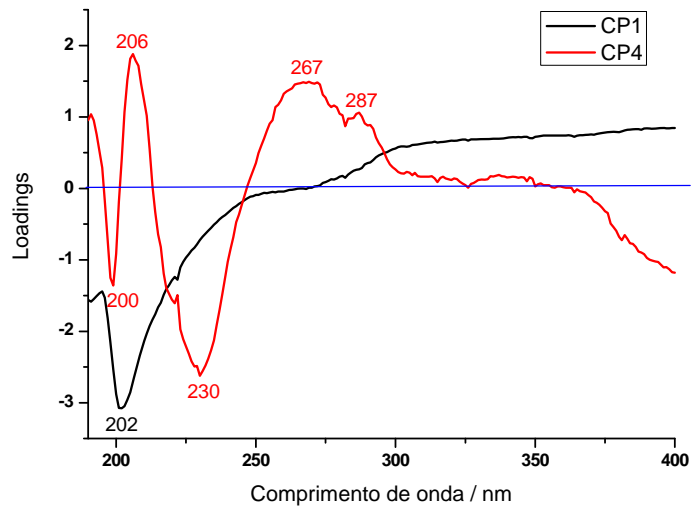
**Figura 53** – Gráfico dos escores das CP1 e CP4 que explicam 80,33 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEABc mostrando a formação de 8 grupos.



A Figura 54 mostra o gráfico dos loadings da CP1 e CP4 para os espectros obtidos na análise por CLAE da FPEABc.

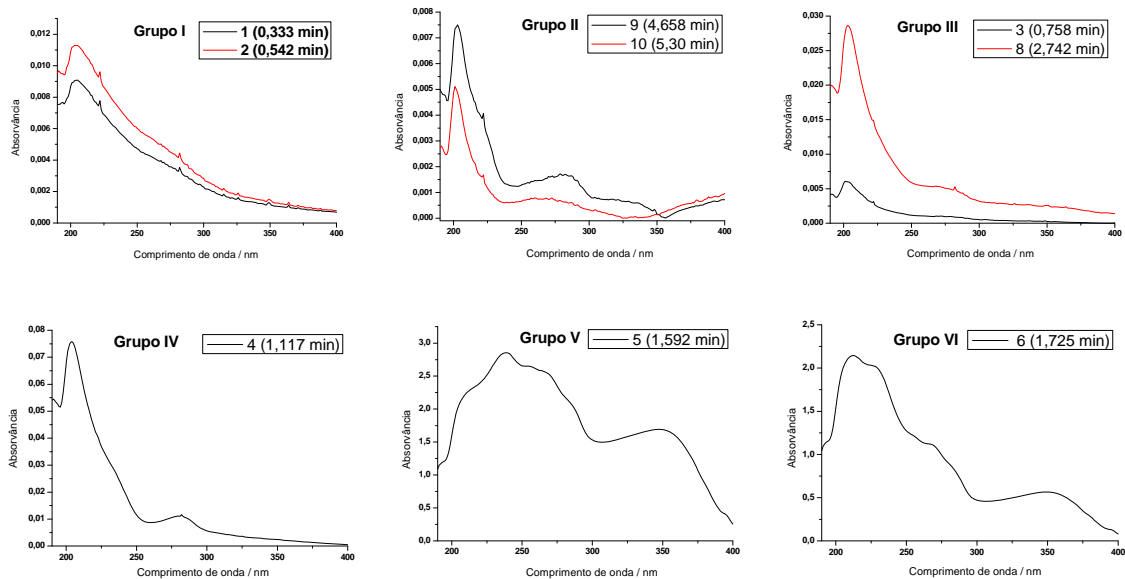
Os valores de 206, 267 e 287 nm na região positiva da CP4 no gráfico dos loadings influenciam na separação dos grupos II, III, V e VII que estão localizados na região positiva da CP4 no gráfico dos escores. As bandas na região negativa da CP4 com comprimento de onda em 200 e 230 nm têm maior influência na separação dos grupos de espectros I, IV, VI e VIII que estão localizados na região negativa da CP4 no gráfico dos escores.

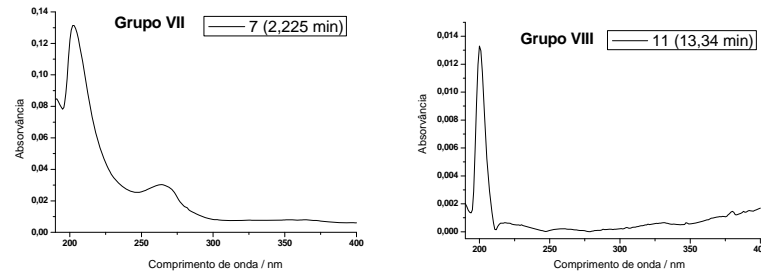
**Figura 54** – Gráfico dos loadings da CP1 e CP4 para os espectros da FPEABc obtidos por CLAE.



Na Figura 55 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos oito grupos de compostos químicos presentes na FPEABc.

**Figura 55** – Gráficos dos 8 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEABc no comprimento de onda de 190 a 400 nm.

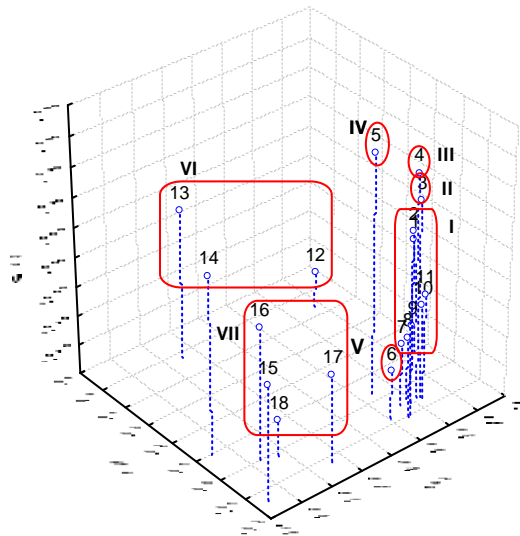




A amostra FPEAO2 apresentou 18 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos do espectro foram dispostos em uma matriz de dados.

A Figura 56 mostra a separação dos 18 espectros obtidos dos 18 picos na análise por CLAE da amostra FPEAO2 no gráfico dos escores da CP2, CP4 e CP5.

**Figura 56** – Gráfico dos escores das CP2, CP4 e CP5 que explicam 24,88 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEAO2 mostrando a formação de 7 grupos.



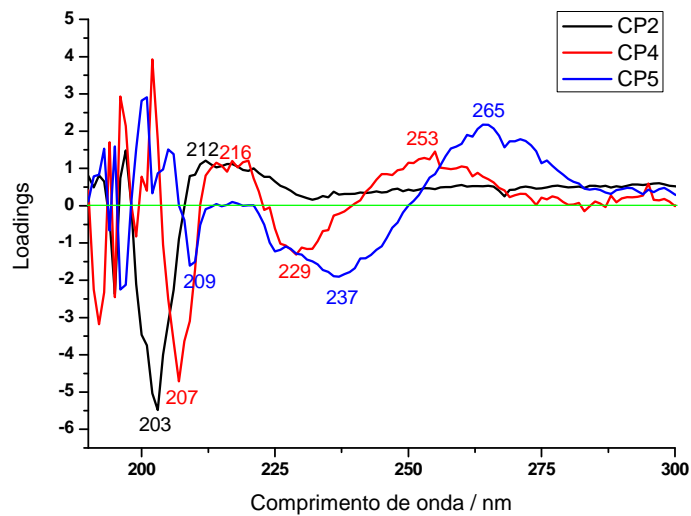
A Figura 57 mostra o gráfico dos loadings da CP2, CP4 e CP5 para os espectros obtidos na análise por CLAE da FPEAO2.

O valor de 212 nm na região positiva da CP2 no gráfico dos loadings influencia na separação dos grupos de espectros I, II, III, IV e V que estão localizados na região positiva da CP2 no gráfico dos escores, dos grupos VI e VII que está localizado na região negativa da CP2 e é influenciado pelo comprimento de onda de 203 nm.

As bandas na região positiva da CP4 com comprimento de onda em 216 e 253 nm têm maior influência na separação dos grupos de espectros III, IV e VI que estão localizados na região positiva da CP4 no gráfico dos escores. Os grupos I, II, V e VII localizados na região negativa da CP4 no gráfico dos escores são influenciados pelos comprimentos de onda em 207 e 229 nm localizados na região negativa da CP4 no gráfico dos loadings.

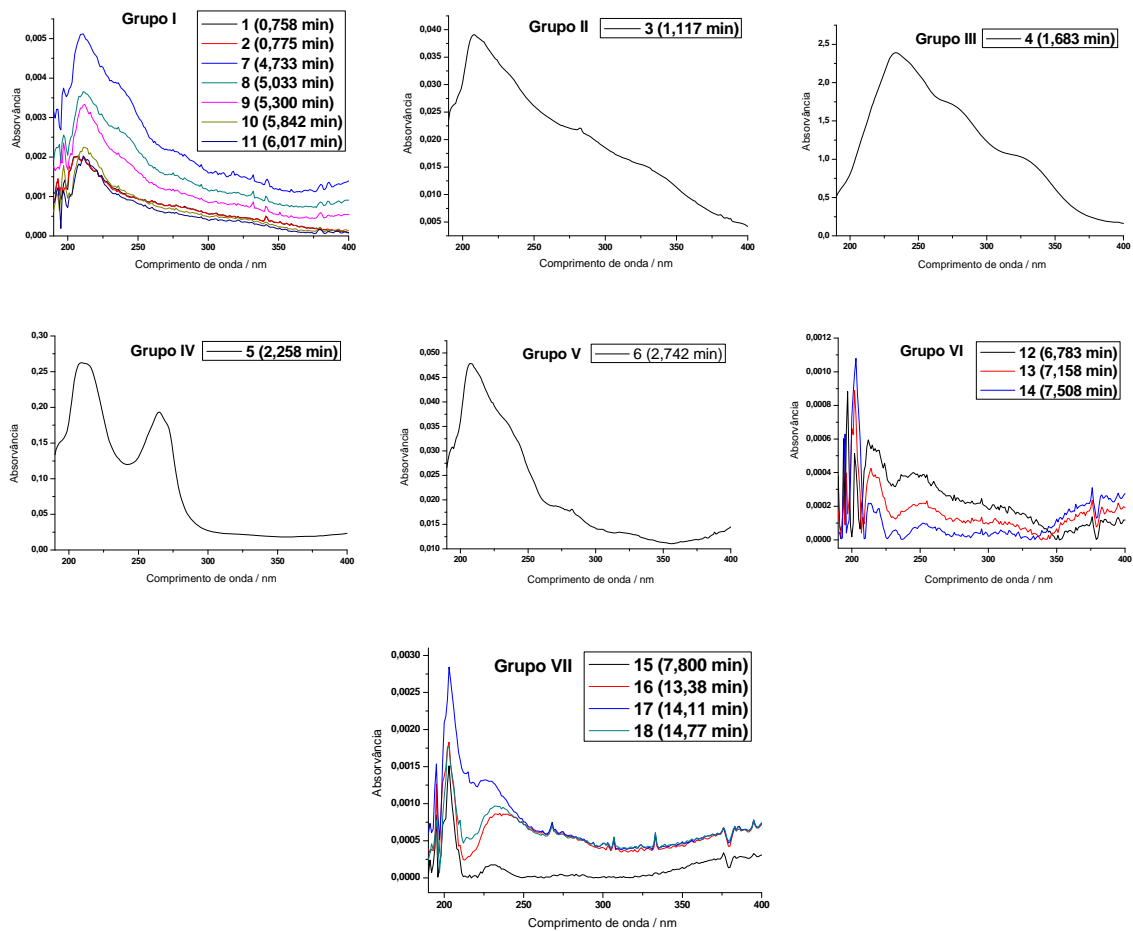
As bandas na região positiva da CP5 com comprimento de onda em 265 nm têm maior influência na separação dos grupos II, III e IV que estão localizados na região positiva da CP5 no gráfico dos escores. Os grupos I, V, VI e VII localizados na região negativa da CP5 no gráfico dos escores são influenciados pelos comprimentos de onda em 209 e 237 nm localizados na região negativa da CP5 no gráfico dos loadings.

**Figura 57** – Gráfico dos loadings da CP2, CP4 e CP5 para os espectros da FPEAO2 obtidos por CLAE.



Na Figura 58 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos sete grupos de compostos químicos presentes na FPEAO2 obtido das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

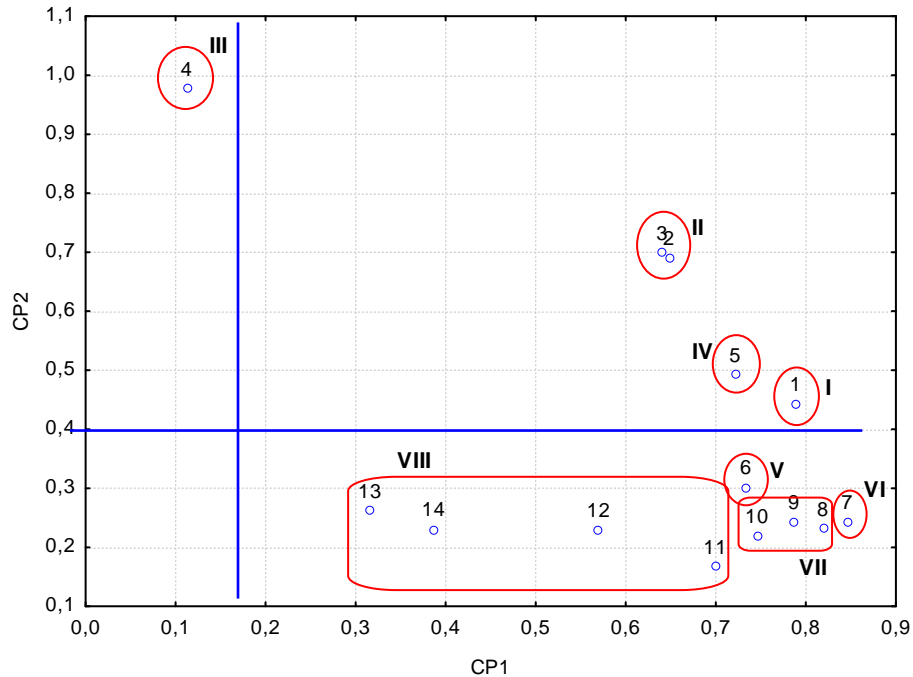
**Figura 58** – Gráficos dos 7 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEAO2 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.



A amostra FPEAV1 apresentou 14 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos do espectro foram dispostos em uma matriz de dados.

A Figura 59 mostra a separação dos 14 espectros obtidos dos 14 picos na análise por CLAE da amostra FPEAV1 no gráfico dos escores da CP1 e CP2.

**Figura 59** – Gráfico dos escores da CP1 e CP2 que explicam 93,32 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEAV1 mostrando a formação de 8 grupos.

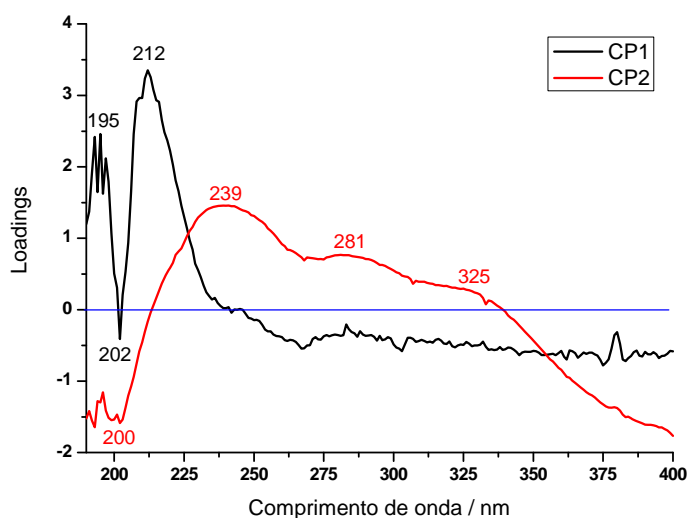


A Figura 60 mostra o gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para os espectros obtidos na análise por CLAE da FPEAV1.

Os valores de 195 e 212 nm na região positiva da CP1 no gráfico dos loadings influenciam na separação dos grupos de espectros I, II, IV, V, VI, VII e VIII que estão localizados na região mais positiva da CP1 no gráfico dos escores, do grupo III que está localizado na região menos positiva da CP1 e é influenciado pelo comprimento de onda de 202 nm.

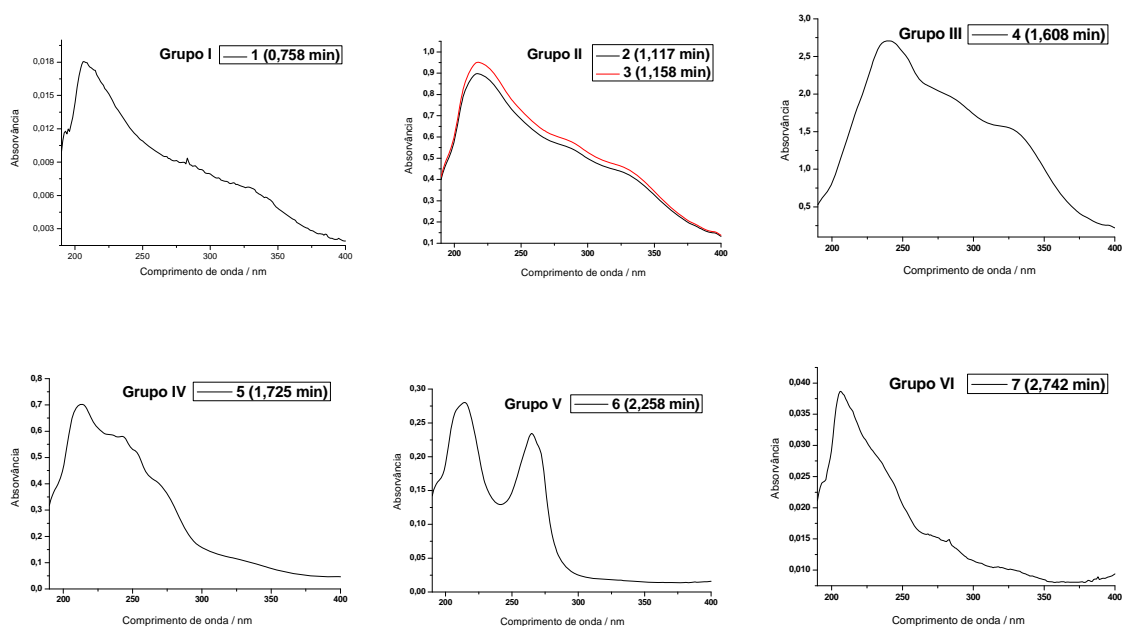
As bandas na região positiva da CP2 com comprimento de onda em 239, 281 e 325 nm têm maior influência na separação dos grupos de espectros I, II, III e IV que estão localizados na região mais positiva da CP2 no gráfico dos escores. Os grupos V, VI, VII e VIII localizados na região menos positiva da CP2 no gráfico dos escores são influenciados pelo comprimento de onda em 200 nm localizado na região negativa da CP2 no gráfico dos loadings.

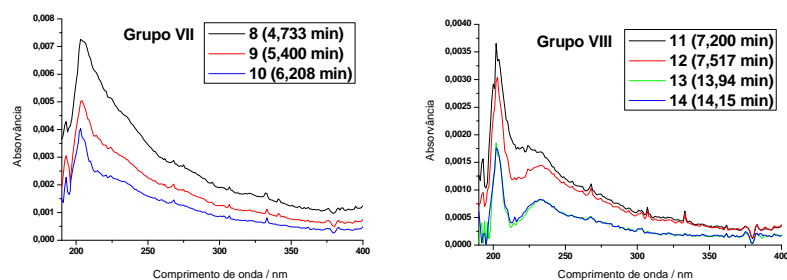
**Figura 60** – Gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para os espectros da FPEAV1 obtidos por CLAE



Na Figura 61 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos oito grupos de compostos químicos presentes na FPEAV1 obtido das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

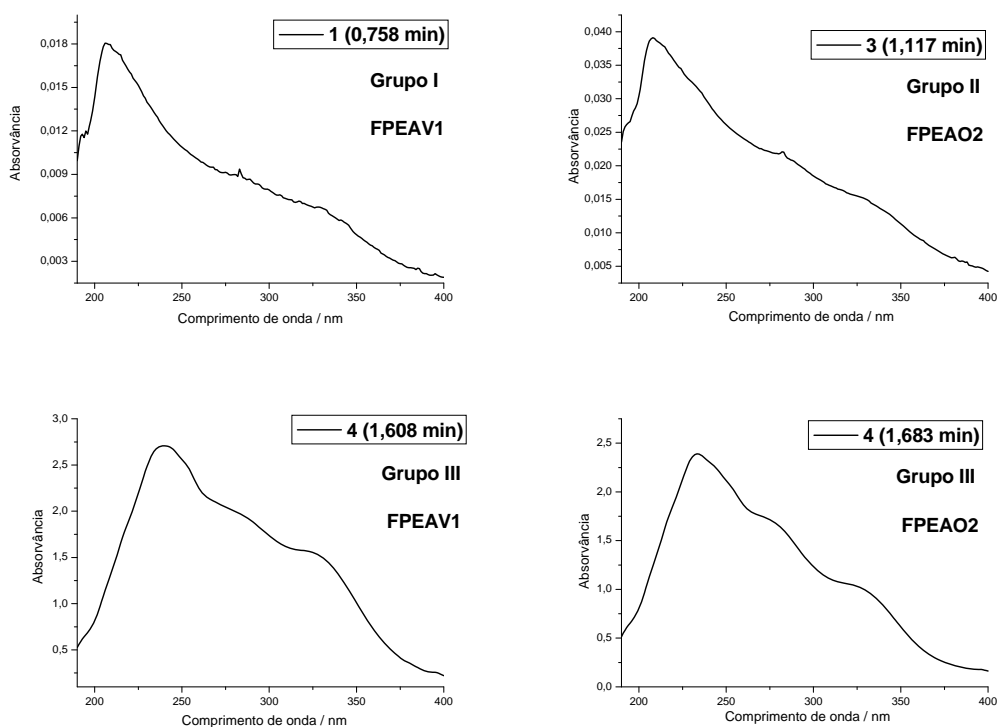
**Figura 61** – Gráficos dos 8 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEAV1 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.

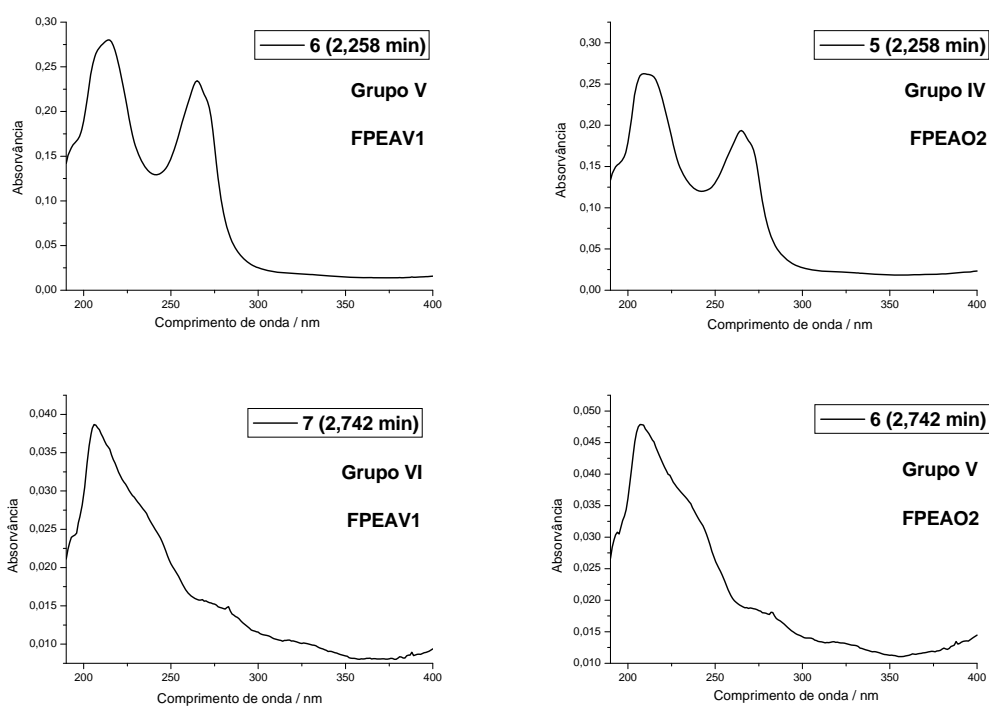




Observa-se na Figura 62 que existem alguns espectros da FPEAV1 e da FPEAO2 que apresentam o mesmo perfil espectroscópico. Essa semelhança é visível quando relacionamos os espectros dos grupos I, III, V e VI da FPEAV1 com os espectros dos grupos II, III, IV e V da FPEAO2, respectivamente. Desta forma, os resultados mostraram que existem compostos da planta que são produzidos tanto no outono quanto no verão. A fração polar do extrato em meio aquoso de folhas coletadas no outono e verão foram eficaz em inibir as contorções abdominais em camundongos (Figura 23), confirmando que as duas amostras produzem os mesmos tipos compostos, uma vez que, os espectros dos picos no cromatograma mostram ser semelhantes.

**Figura 62** – Gráfico dos espectros semelhantes obtidos pela análise por CLAE da FPEAV1 e FPEAO2.



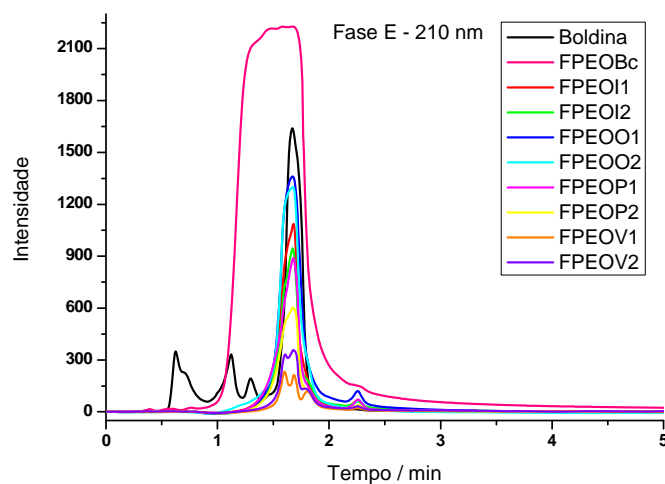


#### 4.6.2 Análise Exploratória da Fração Polar do Extrato em meio Orgânico

A Figura 63 mostra os cromatogramas das 9 amostras da fração polar do extrato orgânico (FPEO) e da boldina na fase móvel E monitorada em 210 nm.

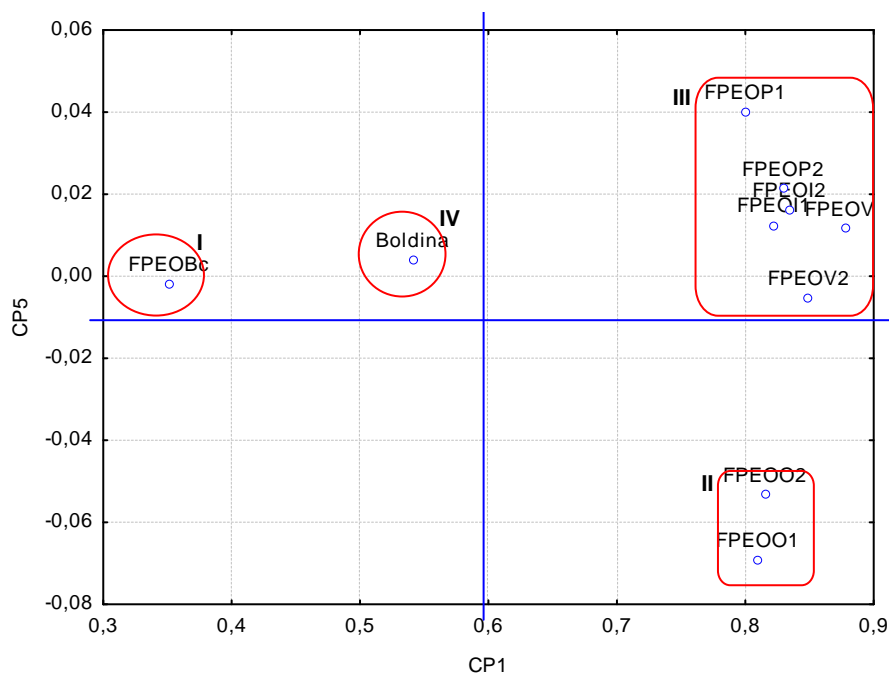
Observa-se no cromatograma a influência das estações do ano na concentração dos compostos químicos, principalmente nos tempos de retenção de 1,67 e 2,27 minutos.

**Figura 63** – Cromatograma das 9 amostras da fração polar do extrato orgânico (FPEO) e da boldina obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



A Figura 64, mostra a projeção da CP1 x CP5, onde a CP1 explica 92,21 % da variância total contida nos dados e a CP5 explica 0,10%.

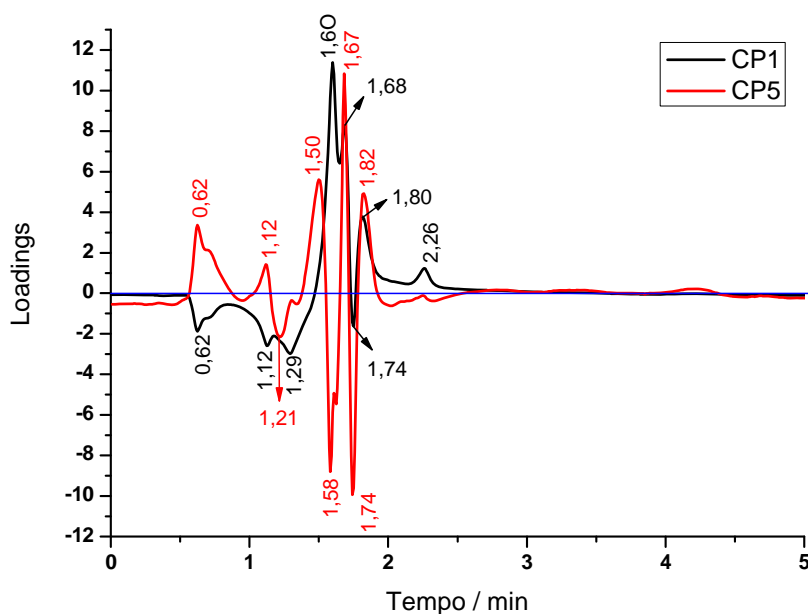
**Figura 64** – Gráfico dos escores das CP1 e CP5 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano mostrando a formação de quatro grupos.



A CP1 separa os extratos da fração polar em meio orgânico de folhas coletadas nas quatro estações do ano que estão localizados na região mais positiva da CP1 do extrato da fração polar em meio orgânico da amostra comercial e da boldina que estão localizados na região menos positiva da CP1 no gráfico dos escores. A CP5 consegue discriminar as amostras provenientes do outono que estão localizados na região negativa da CP3 dos demais grupos no gráfico dos escores.

O gráfico dos loadings das componentes 1 e 5 está representado na Figura 65.

**Figura 65** – Gráfico dos loadings das CP1 e CP5 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano.

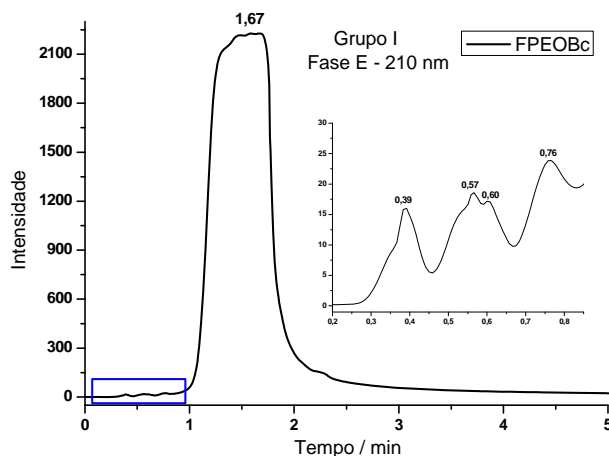


Os extratos da fração polar em meio orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano que estão localizados na região mais positiva da CP1 no gráfico dos escores são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos na CP1, ou seja, com tempos de retenção em torno de 1,60; 1,68; 1,80 e 2,26 minutos. A boldina e a fração polar do extrato em meio orgânico da amostra comercial, localizados na região menos positiva da CP1 no gráfico dos escores, são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP1, ou seja, com tempos de retenção em torno de 0,62; 1,12; 1,29 e 1,74 minutos.

Os tempos em torno de 1,21; 1,58 e 1,74 minutos, localizados na região negativa da CP5 no gráfico dos loadings, tem maior influência na separação dos extratos da fração polar em meio orgânico das folhas coletadas no outono que estão localizados na região negativa da CP5 no gráfico dos escores. Observa-se que os valores de 0,62, 1,12 e 1,67 minutos, localizados na região positiva da CP5, são característicos do cromatograma da boldina.

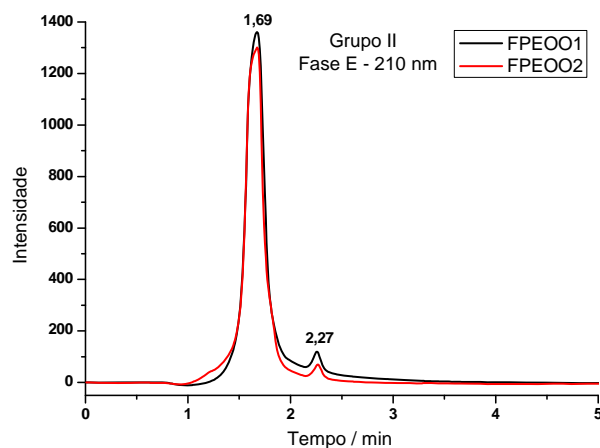
A Figura 66 mostra os cromatogramas das amostras do grupo I, que contém apenas a amostra comercial de boldo.

**Figura 66** – Cromatograma da amostra do grupo I discriminada pela projeção dos escores da CP1 e CP5, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



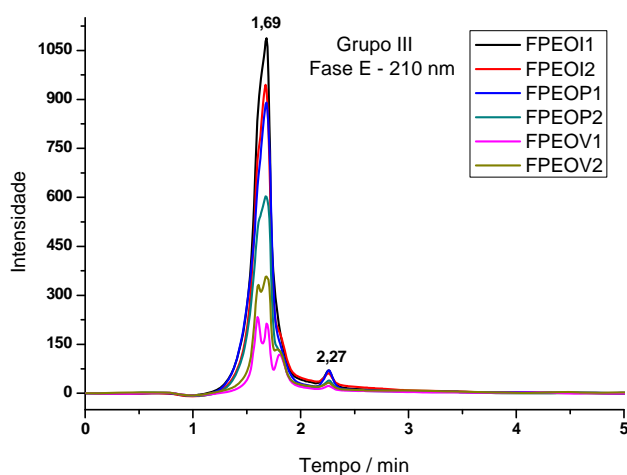
A Figura 67 mostra os cromatogramas das amostras do grupo II, que contém a fração polar do extrato em meio orgânico das folhas coletadas no outono.

**Figura 67** – Cromatograma das amostras do grupo II discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP5, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



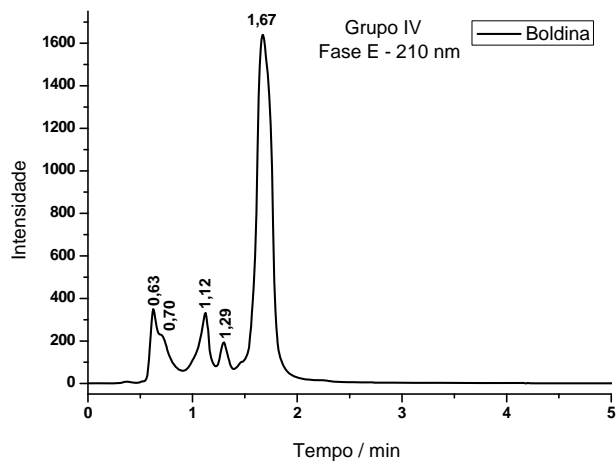
A Figura 68 mostra o cromatograma das amostras do grupo III, que é formado pela fração polar do extrato em meio orgânico das folhas coletadas no inverno, verão e primavera.

**Figura 68** – Cromatograma das amostras do grupo III discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP5, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



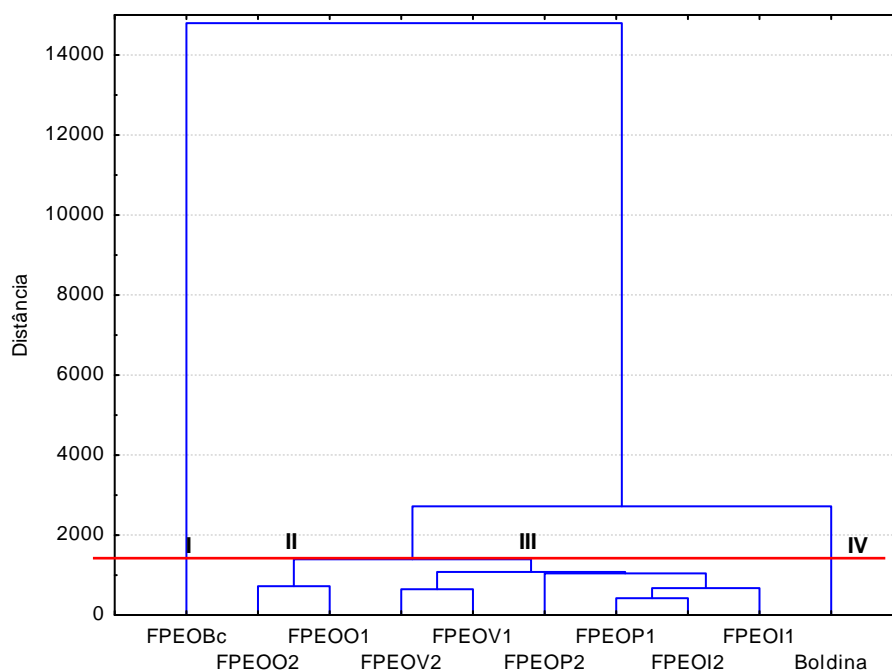
A Figura 69 mostra o cromatograma das amostras do grupo IV, que é composto apenas pela boldina.

**Figura 69** – Cromatograma das amostras do grupo IV discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP5, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



A Figura 70 mostra a análise hierárquica dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano confirmando a formação de quatro grupos de composição química diferente.

**Figura 70** – Análise hierárquica dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração polar do extrato em meio orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano.

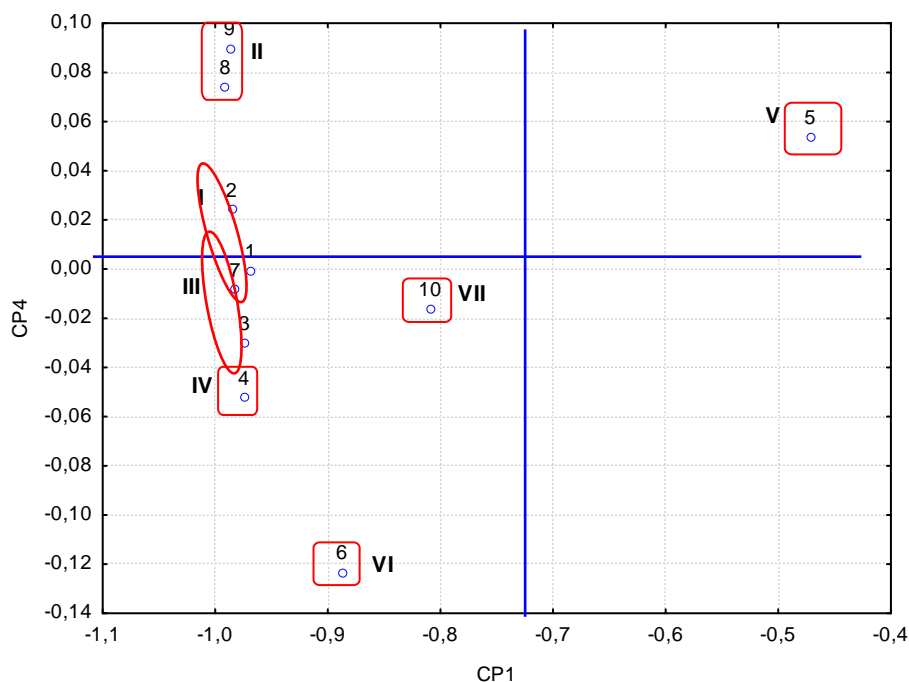


Os espectros UV dos picos nos cromatogramas das amostras FPEOBc (grupo I), FPEOO2 (grupo II) e FPEOV1 (grupo III) foram normalizados e submetidos à ACP para verificar a variedade de grupos de moléculas presentes nas amostras.

A amostra FPEOBc apresentou 10 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos do espectro foram dispostos em uma matriz de dados.

A Figura 71 mostra a separação dos 10 espectros obtidos dos 10 picos na análise por CLAE da amostra FPEOBc no gráfico dos escores da CP1 e CP4.

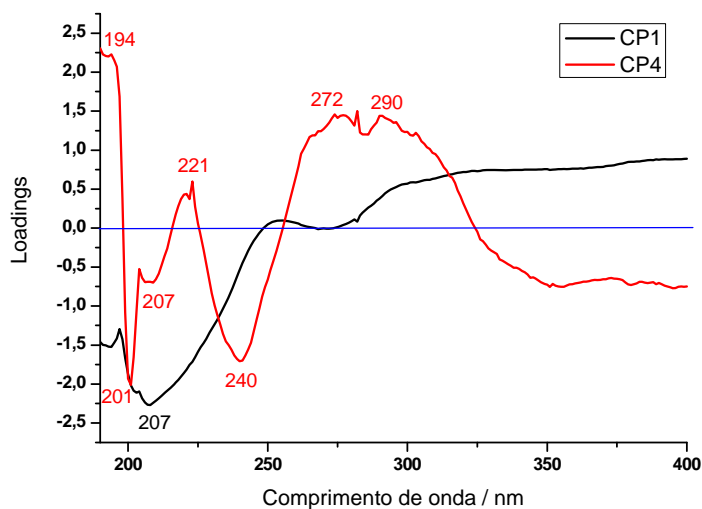
**Figura 71** – Gráfico dos escores da CP1 e CP4 que explicam 84,26 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEOBc mostrando a formação de 7 grupos.



A Figura 72 mostra o gráfico dos loadings da CP1 e CP4 para os espectros obtidos na análise por CLAE da FPEOBc.

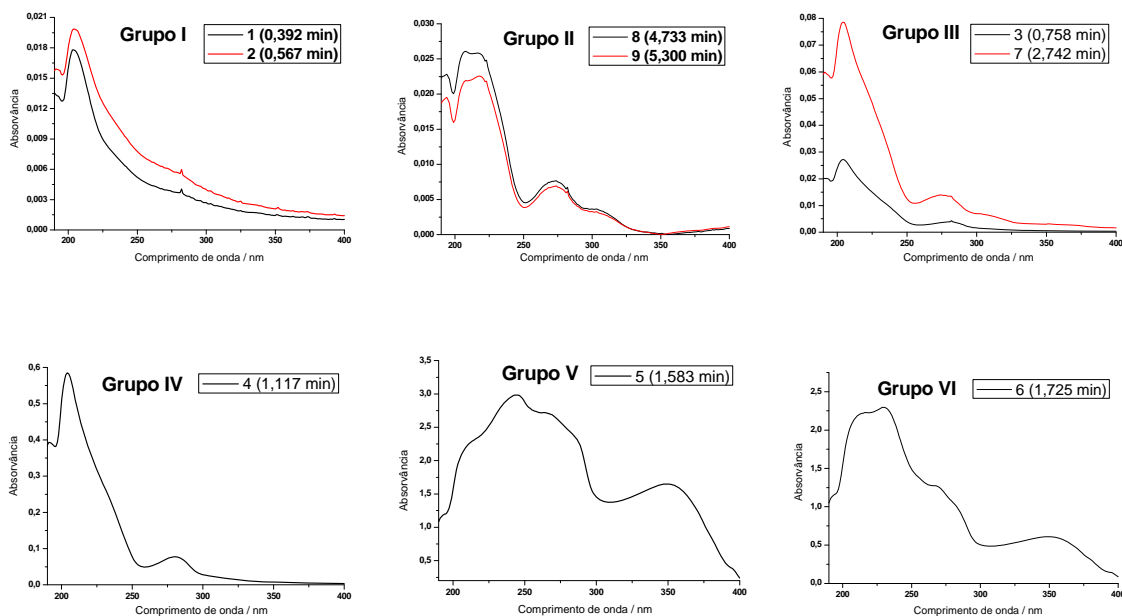
Os valores de 194, 221, 272 e 290 nm na região positiva da CP4 no gráfico dos loadings influenciam na separação dos grupos de espectros I, II e V que estão localizados na região positiva da CP4 no gráfico dos escores. As bandas na região negativa da CP4 com comprimento de onda em 201, 207 e 240 nm têm maior influência na separação dos grupos de espectros III, IV, VI e VII que estão localizados na região negativa da CP4 no gráfico dos escores.

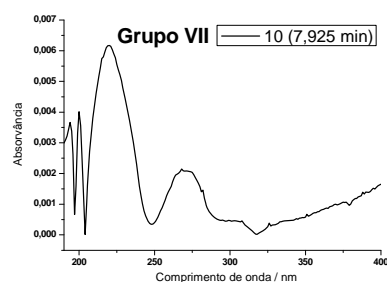
**Figura 72** – Gráfico dos loadings da CP1 e CP4 para os espectros da FPEOBc obtidos por CLAE.



Na Figura 73 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos sete grupos de compostos químicos presentes na FPEOBc.

**Figura 73** – Gráficos dos 7 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEOBc no comprimento de onda de 190 a 400 nm.

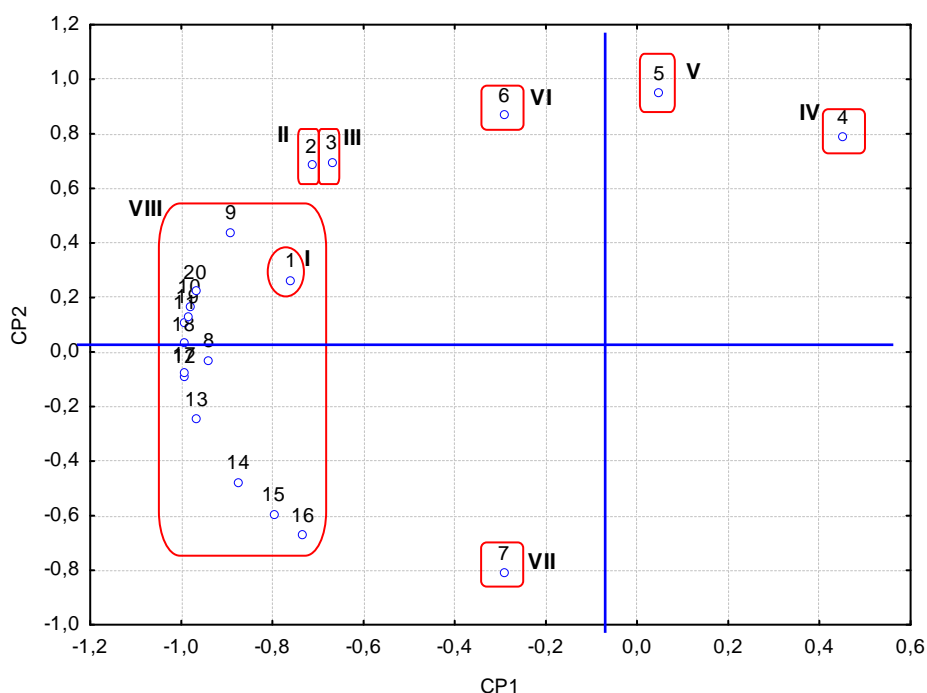




A amostra FPEOO2 apresentou 20 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos do espectro foram dispostos em uma matriz de dados.

A Figura 74 mostra a separação dos 20 espectros obtidos dos 20 picos na análise por CLAE da amostra FPEOO2 no gráfico dos escores da CP1 e CP2.

**Figura 74** – Gráfico dos escores das CP1 e CP2 que explicam 93,23 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEOO2 mostrando a formação de 8 grupos.



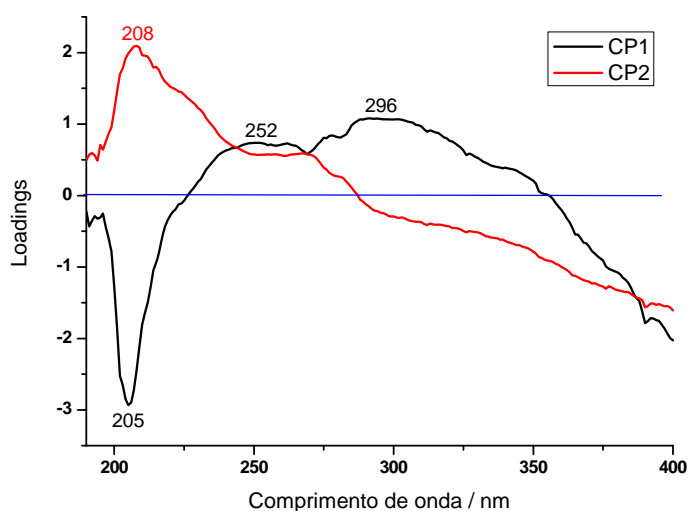
A Figura 75 mostra o gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para os espectros obtidos na análise por CLAE da FPEOO2.

Os valores de 252 e 296 nm na região positiva da CP1 no gráfico dos loadings influencia na separação dos grupos IV e V que estão localizados na região positiva da CP1 no gráfico dos escores. As bandas na região negativa da CP1 com comprimento de

onda em 205 nm têm maior influência na separação dos grupos I, II, III, VI, VII e VIII que estão localizados na região negativa da CP1 no gráfico dos escores.

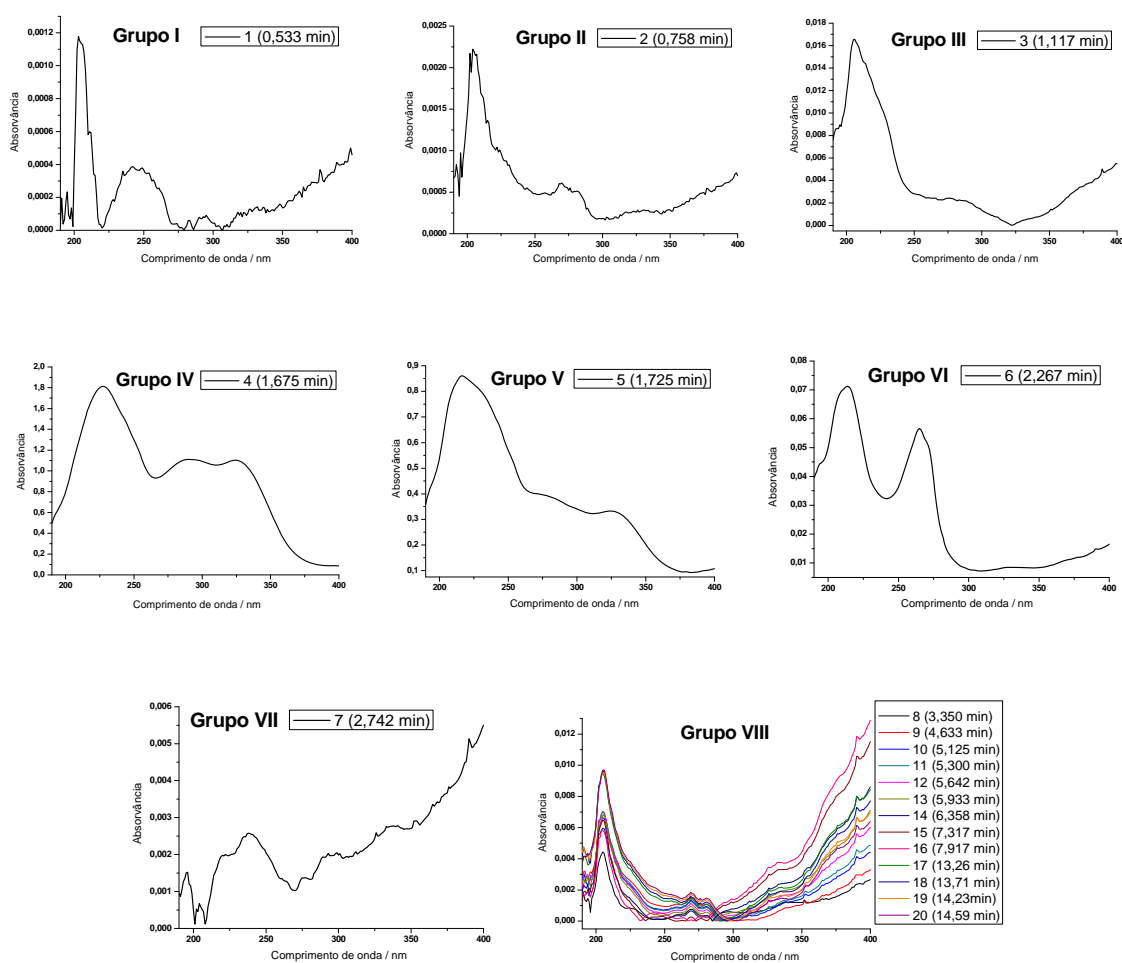
Os grupos I, II, III, IV, V e VI localizados na região positiva da CP2 no gráfico dos escores são influenciados pelo comprimento de onda em 208 nm localizados na região positiva da CP2 no gráfico dos loadings.

**Figura 75** – Gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para os espectros da FPEOO2 obtidos por CLAE.



Na Figura 76 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos oito grupos de compostos químicos presentes na FPEOO2 obtido das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

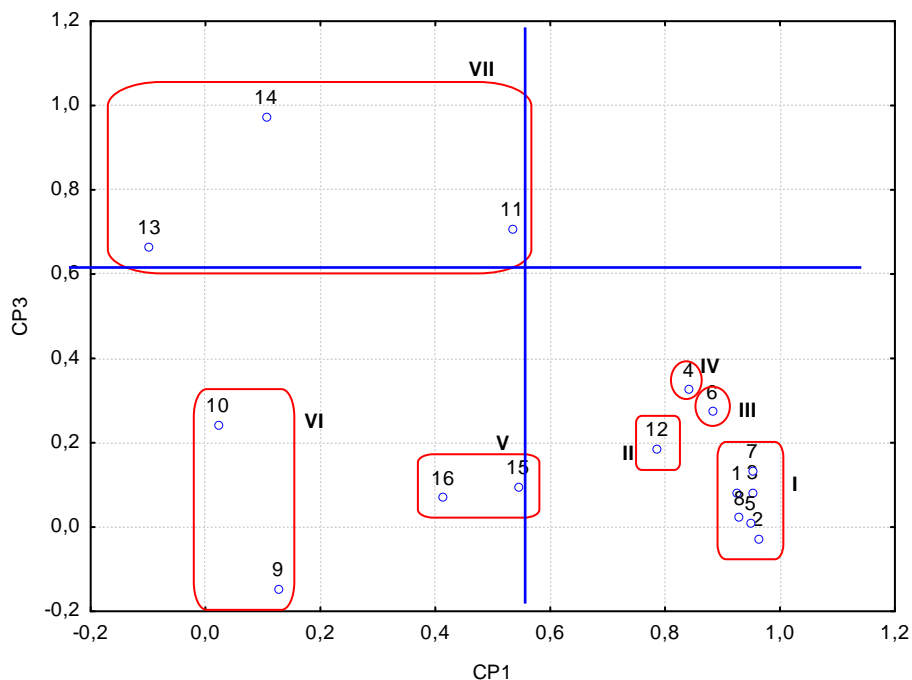
**Figura 76** – Gráficos dos 8 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEOO2 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.



A amostra FPEOV1 apresentou 16 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos do espectro foram dispostos em uma matriz de dados.

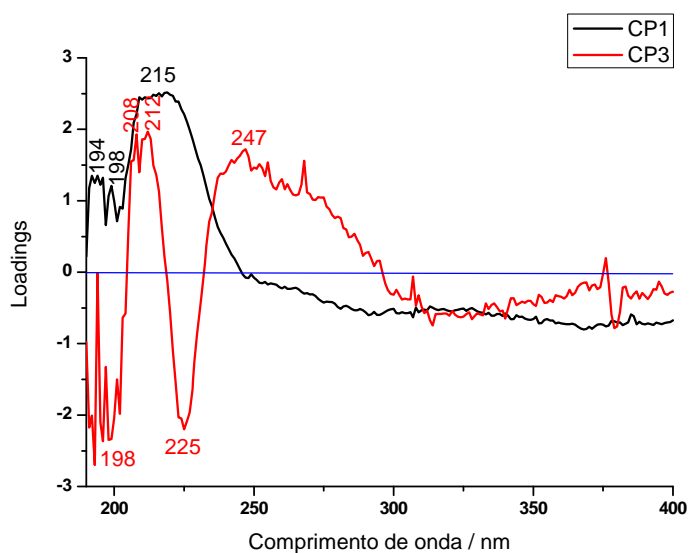
A Figura 77 mostra a separação dos 16 espectros obtidos dos 16 picos na análise por CLAE da amostra FPEOV1 no gráfico dos escores da CP1 e CP3.

**Figura 77** – Gráfico dos escores das CP1 e CP3 que explicam 71,63 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FPEOV1 mostrando a formação de 7 grupos.



A Figura 78 mostra o gráfico dos loadings da CP1 e CP3 para os espectros obtidos na análise por CLAE da FPEOV1.

**Figura 78** – Gráfico dos loadings da CP1 e CP3 para os espectros da FPEOV1 obtidos por CLAE.

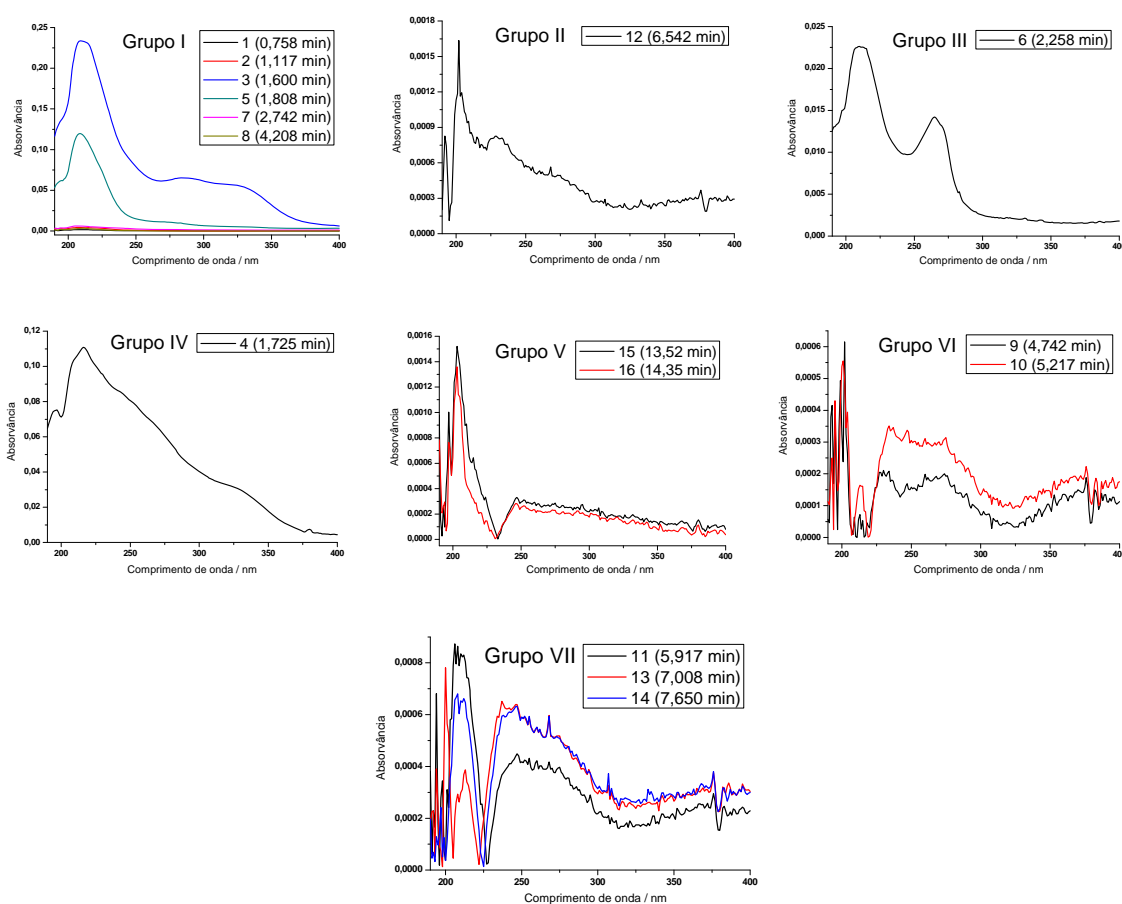


Os valores de 194, 198 e 215 nm na região positiva da CP1 no gráfico dos loadings influenciam na separação dos grupos I, II, III e IV que estão localizados na região mais positiva da CP1 no gráfico dos escores. As bandas na região positiva da CP3 com

comprimento de onda em 208, 212 e 247 nm têm maior influência na separação do grupo VII que está localizado na região mais positiva da CP3 no gráfico dos escores. Os grupos I, II, III, IV, V e VI que estão localizados na região menos positiva da CP3 no gráfico dos escores são influenciados pelos valores de 198 e 225 nm do gráfico dos loadings.

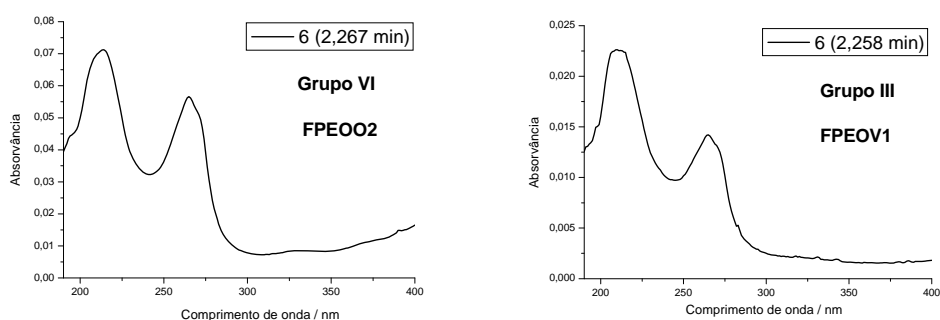
Na Figura 79 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos oito grupos de compostos químicos presentes na FPEOV1 obtido das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

**Figura 79** – Gráficos dos 7 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FPEOV1 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.



Observa-se que existe um espectro da FPEOO2 e da FPEOV1 que apresentam o mesmo perfil espectroscópico. Essa semelhança é visível quando relacionamos o espectro do grupo VI da FPEOO2 com o espectro do grupo III da FPEOV1 (Figura 80), mostrando desta forma, que existem compostos da planta que são produzidos tanto no outono quanto no verão.

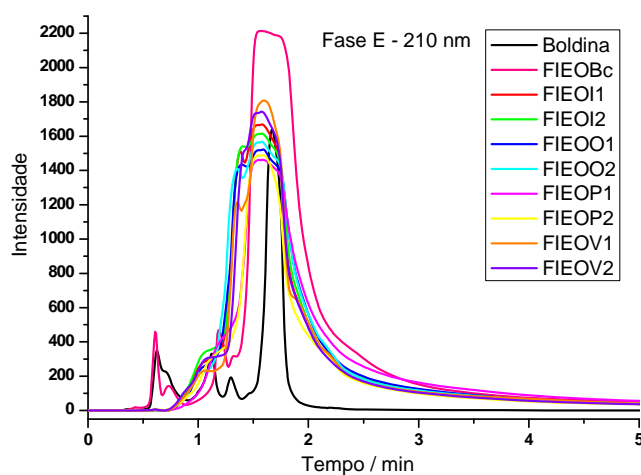
**Figura 80** – Gráfico dos espectros semelhantes obtidos pela análise por CLAE da FPEOO2 e FPEOV1.



#### 4.6.3 Análise Exploratória da Fração Intermediária do Extrato em meio Orgânico

A Figura 81 mostra os cromatogramas das 9 amostras da fração intermediária do extrato orgânico (FIEO) e da boldina na fase móvel E monitorada em 210 nm.

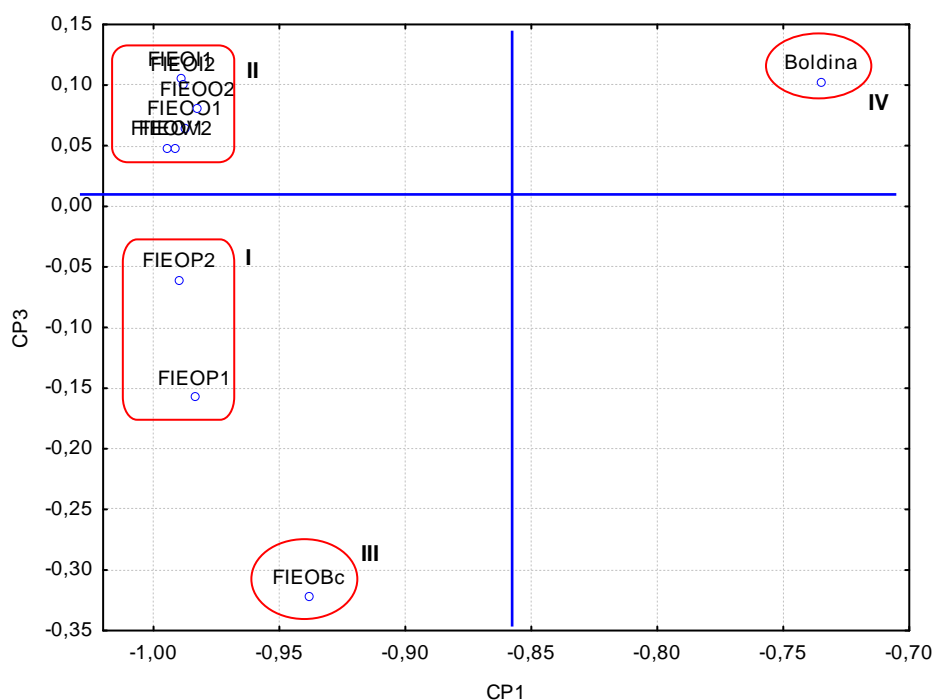
**Figura 81** – Cromatograma das 9 amostras da fração intermediária do extrato orgânico (FIEO) e da boldina obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



Observa-se no cromatograma a influência das estações do ano na concentração dos compostos químicos, principalmente nos tempos de retenção próximos a 1,61 minutos.

A Figura 82 mostra a projeção da CP1 x CP3, onde a CP1 explica 92,34 % da variância total contida nos dados e a CP3 explica 1,80%.

**Figura 82** – Gráfico dos escores das CP1 e CP3 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração intermediária do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano mostrando a formação de quatro grupos.

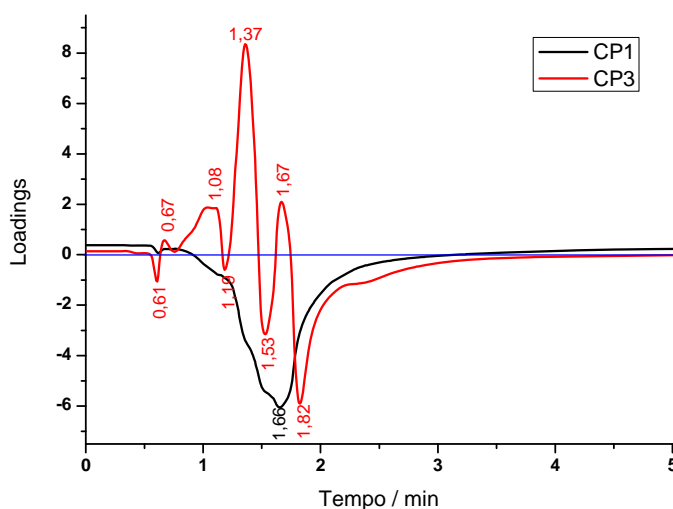


A CP1 separa os extratos da fração intermediária no meio orgânico das folhas coletadas nas quatro estações do ano e da amostra comercial que estão localizados na região mais negativa no gráfico dos escores da boldina que está localizada na região menos negativa da CP1 no gráfico dos escores.

A CP3 consegue discriminar os extratos da fração intermediária no meio orgânico das folhas coletadas no outono, inverno e verão e a boldina que estão localizados na região positiva da CP3 dos extratos da fração intermediária no meio orgânico das folhas coletadas na primavera e da amostra comercial que estão localizados na região negativa da CP3 no gráfico dos escores.

O gráfico dos loadings das componentes 1 e 3 está representado na Figura 83.

**Figura 83** – Gráfico dos loadings das CP1 e CP3 dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração intermediária do extrato em meio orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano.



Os extratos da fração intermediária no meio orgânico de folhas coletadas nas quatro estações do ano e a amostra comercial, localizados na região mais negativa da CP1 no gráfico dos escores são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings negativos na CP1, ou seja, com tempos de retenção em torno de 1,66 minutos.

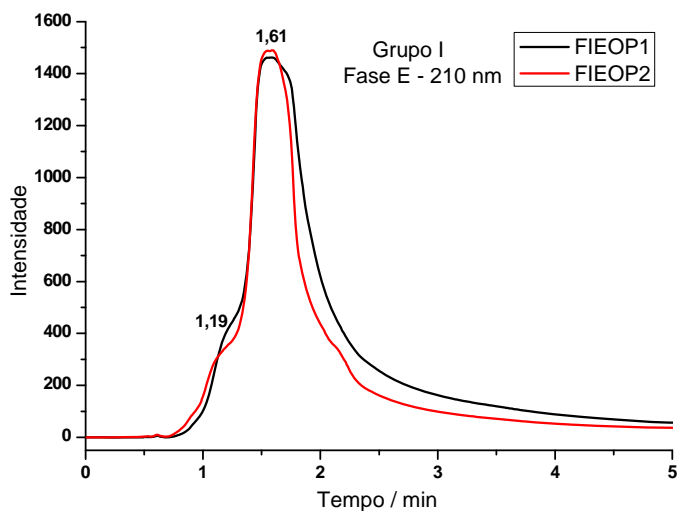
Os extratos da fração intermediária no meio orgânico de folhas coletadas no outono, inverno e verão e a boldina, que estão localizados na região positiva da CP3 no gráfico dos escores, são mais influenciados pelas variáveis que apresentam valores de loadings positivos na CP3, ou seja, com tempos de retenção em torno de 0,67; 1,08; 1,37 e 1,69 minutos.

Os tempos em torno de 0,61; 1,19; 1,53 e 1,82 minutos, localizados na região negativa da CP3 no gráfico dos loadings, tem maior influência na separação dos extratos da fração intermediária no meio orgânico de folhas coletadas na primavera e da amostra comercial, que estão localizados na região negativa da CP3 no gráfico dos escores.

Observa-se que os valores de 1,08 e 1,37 minutos são característicos das amostras coletadas no outono, inverno e verão e o valor de 1,67 minutos é característico da boldina. Sendo assim, a região positiva da CP3 mostra que há uma similaridade maior das amostras coletadas no outono, inverno e verão com a boldina.

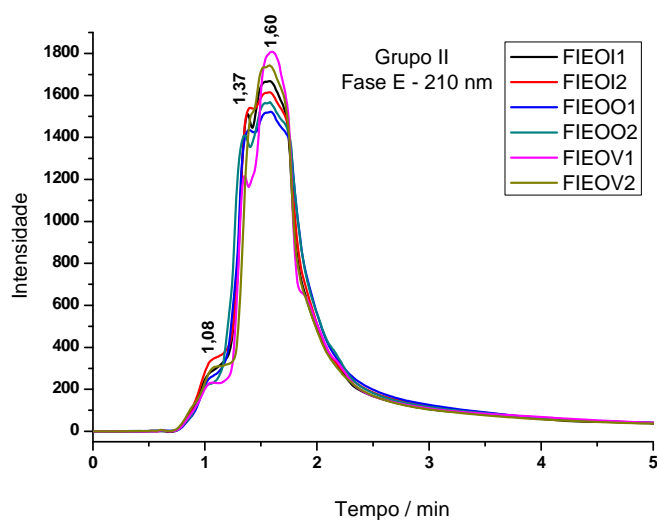
A Figura 84 mostra os cromatogramas das amostras do grupo I, que contém a FIEO de folhas coletadas na primavera.

**Figura 84** – Cromatograma das amostras do grupo I discriminada pela projeção dos escores da CP1 e CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



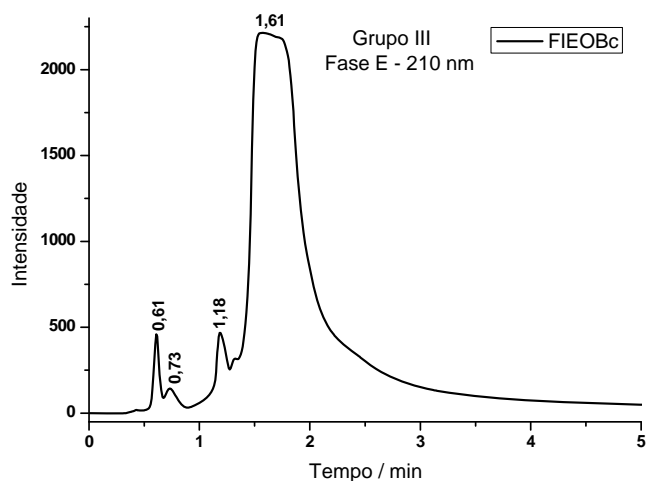
A Figura 85 mostra os cromatogramas das amostras do grupo II, que contém a FIEO das folhas coletadas no outono, inverno e verão.

**Figura 85** – Cromatograma das amostras do grupo II discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



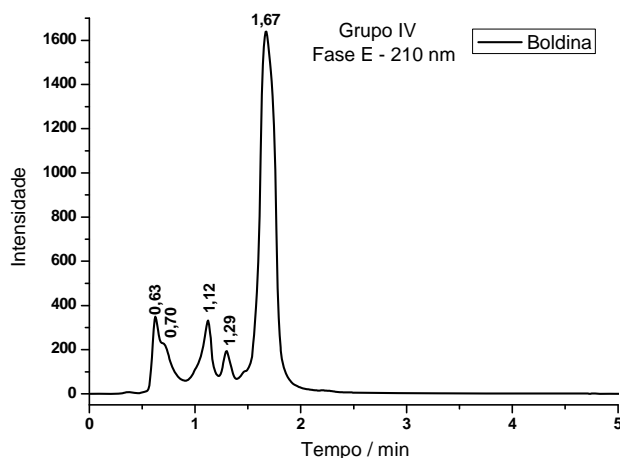
A Figura 86 mostra o cromatograma da amostra do grupo III, que é formado apenas pela amostra comercial de boldo.

**Figura 86** – Cromatograma da amostra do grupo III discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



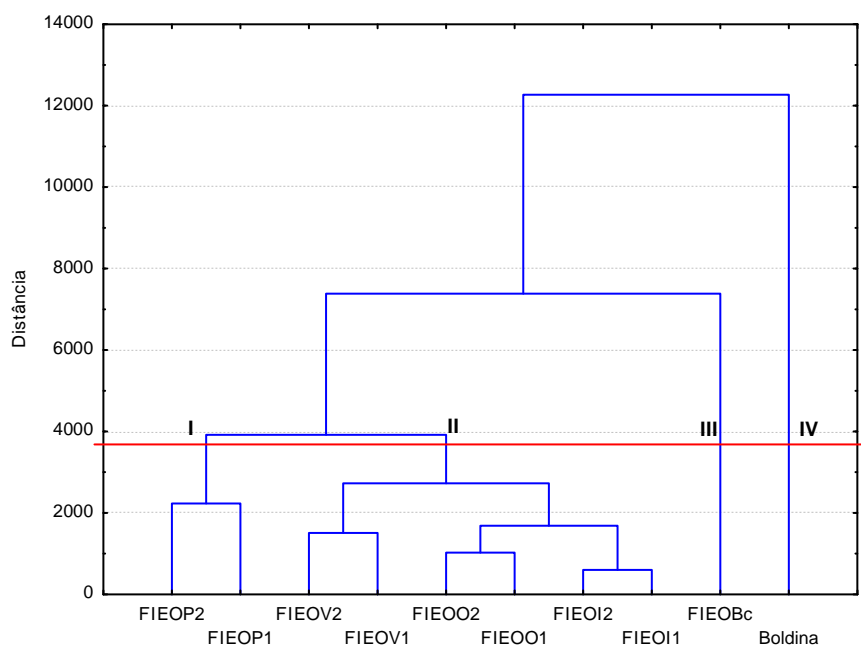
A Figura 87 mostra o cromatograma da amostra do grupo IV, que é composto apenas pela boldina.

**Figura 87** – Cromatograma da amostra do grupo IV discriminadas pela projeção dos escores da CP1 e CP3, obtido nas análises por CLAE utilizando a fase móvel E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada no comprimento de onda de 210 nm.



A Figura 88 mostra a análise hierárquica dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração intermediária do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano confirmando a formação de quatro grupos de composição química diferente.

**Figura 88** – Análise hierárquica dos dados cromatográficos da boldina e das 9 amostras da fração intermediária do extrato orgânico da amostra comercial de boldo e das folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas nas quatro estações do ano.

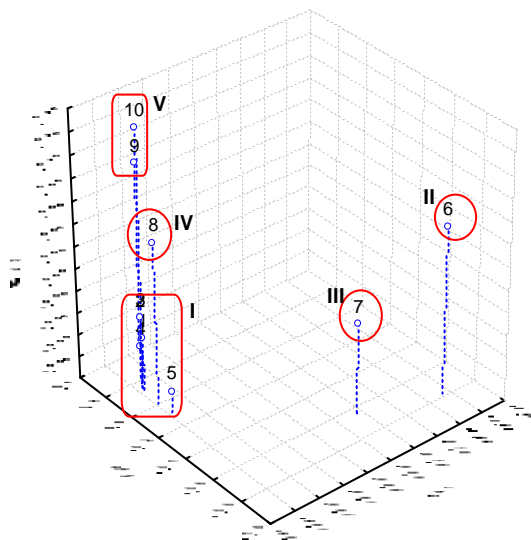


Os espectros UV dos picos nos cromatogramas das amostras FIEOBc (grupo III), FIEOO2 (grupo II), FIEOV1 (grupo II) e boldina (grupo IV) foram normalizados e submetidos à ACP para verificar a variedade de grupos de moléculas presentes nas amostras.

A amostra FIEOBc apresentou 10 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos do espectro foram dispostos em uma matriz de dados.

A Figura 89 mostra a separação dos 10 espectros obtidos dos 10 picos na análise por CLAE da amostra FIEOBc no gráfico dos escores da CP1, CP2 e CP3.

**Figura 89** – Gráfico dos escores das CP1, CP2 e CP3 que explicam 99,52 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FIEOBc mostrando a formação de 5 grupos.



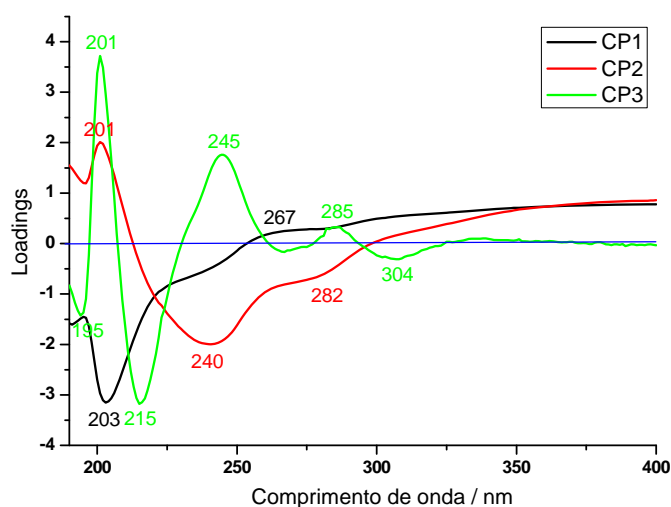
A Figura 90 mostra o gráfico dos loadings da CP1, CP2 e CP3 para os espectros obtidos na análise por CLAE da FIEOBc.

O valor de 267 nm na região positiva da CP1 no gráfico dos loadings influencia na separação dos grupos II e III que estão localizados na região menos negativa da CP1 no gráfico dos escores. Os grupos I, IV e V, localizados na região mais negativa da CP1 no gráfico dos escores, são discriminados pelo comprimento de onda em 203 nm, localizado na região negativa da CP1 no gráfico dos loadings.

O valor de 201 nm na região positiva da CP2 no gráfico dos loadings influencia na separação dos grupos I, IV e V que estão localizados na região positiva da CP2 no gráfico dos escores. Os grupos II e III na região negativa da CP2 no gráfico dos escores são discriminados pelos valores 240 e 282 nm localizados na região negativa da CP2 no gráfico dos loadings.

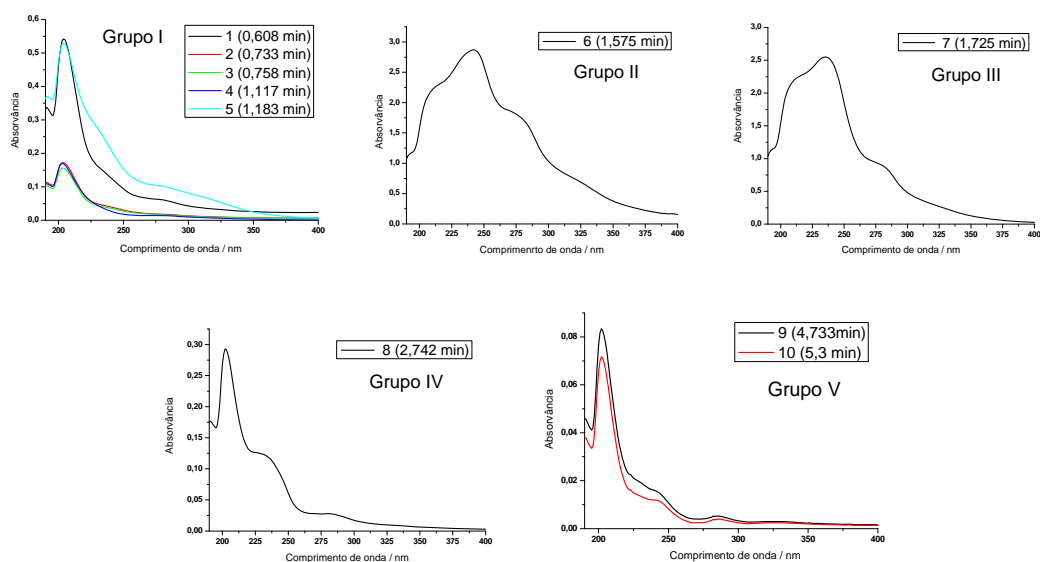
As bandas na região positiva da CP3 com comprimento de onda em 201, 245 e 285 nm têm maior influência na separação dos grupos II e V que estão localizados na região positiva da CP3 no gráfico dos escores. Os grupos I, III e IV que estão localizados na região negativa da CP3 no gráfico dos escores são influenciados pelos valores de 195, 215 e 304 nm do gráfico dos loadings.

**Figura 90** – Gráfico dos loadings da CP1, CP2 e CP3 para os espectros da FIEOBc obtidos por CLAE.



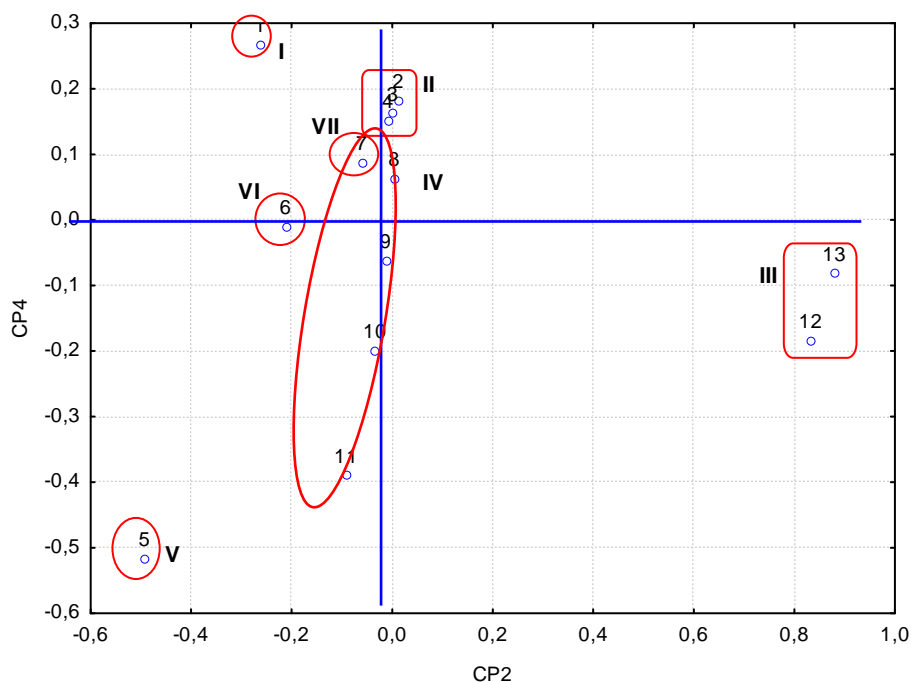
Na Figura 91 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos cinco grupos de compostos químicos presentes na FIEOBc.

**Figura 91** – Gráficos dos 5 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FIEOBc no comprimento de onda de 190 a 400 nm.



A amostra FIEOO2 apresentou 13 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos do espectro foram dispostos em uma matriz de dados. A Figura 92 mostra a separação dos 13 espectros obtidos dos 13 picos na análise por CLAE da amostra FIEOO2 no gráfico dos escores da CP2 e CP4.

**Figura 92** – Gráfico dos escores da CP2 e CP4 que explicam 19,27 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FIEOO2 mostrando a formação de 7 grupos.

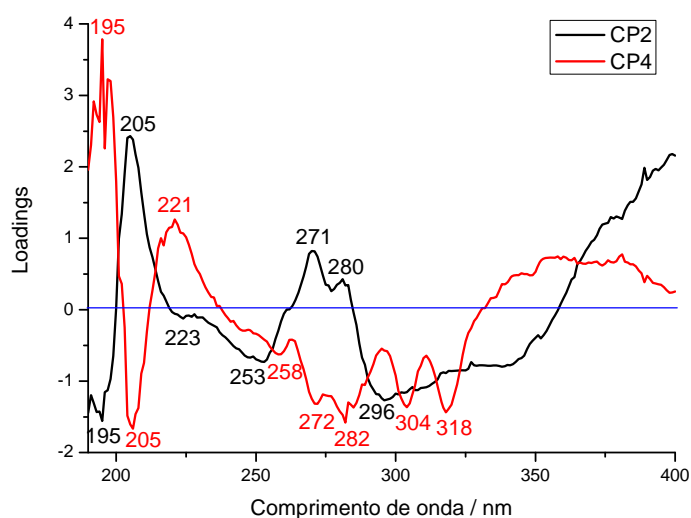


A Figura 93 mostra o gráfico dos loadings da CP2 e CP4 para os espectros obtidos na análise por CLAE da FIEOO2.

Os grupos I, II, IV, V, VI e VII que estão localizados na região negativa da CP2 são discriminados pela influência dos valores 195, 223, 253 e 296 nm na região negativa da CP2 no gráfico dos loadings. Os valores de 205, 271 e 280 nm influenciam a separação do grupo III que está localizado na região positiva da CP2 no gráfico dos escores.

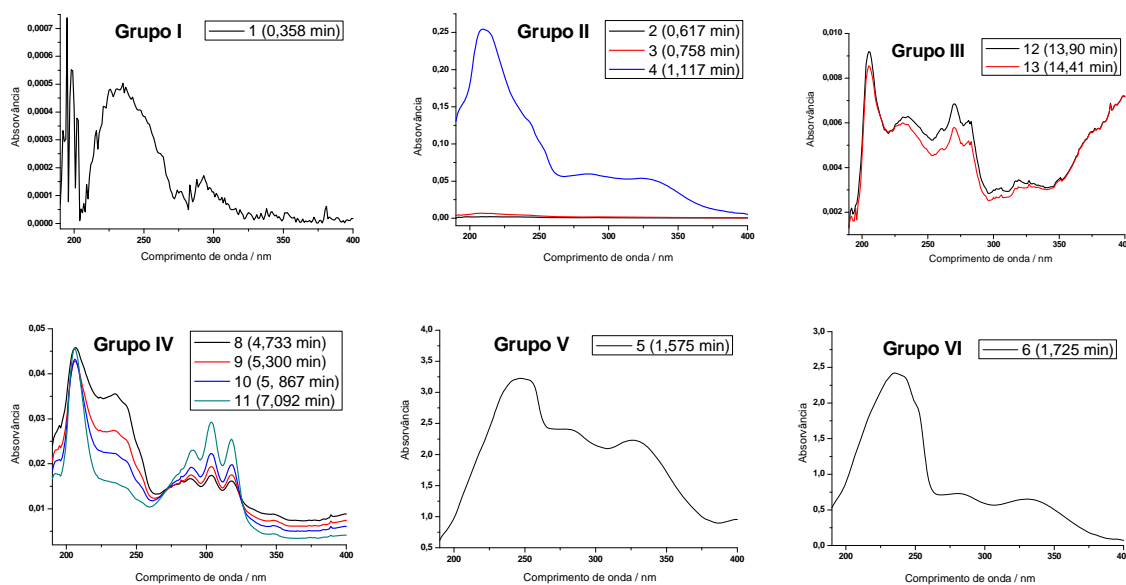
Os valores de 195 e 221 nm na região positiva da CP4 no gráfico dos loadings influenciam na separação dos grupos de espectros I, II, VI e VII que estão localizados na região positiva da CP4 no gráfico dos escores. As bandas na região negativa da CP4 com comprimento de onda em 205, 258, 272, 282, 304 e 318 nm têm maior influência na separação dos grupos de espectros III, IV e V que estão localizados na região negativa da CP4 no gráfico dos escores.

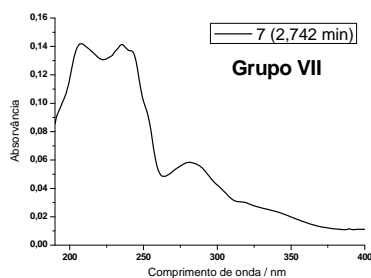
**Figura 93** – Gráfico dos loadings da CP2 e CP4 para os espectros da FIEOO2 obtidos por CLAE.



Na Figura 94 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos sete grupos de compostos químicos presentes na FIEOO2 obtido das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

**Figura 94** – Gráficos dos 7 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FIEOO2 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.

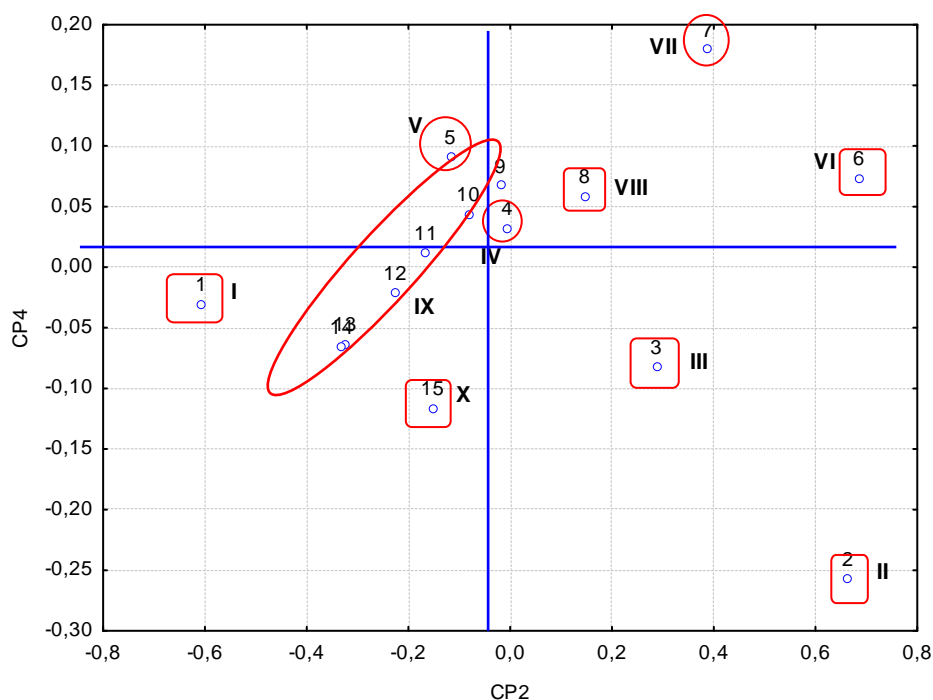




A amostra FIEOV1 apresentou 15 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos do espectro foram dispostos em uma matriz de dados.

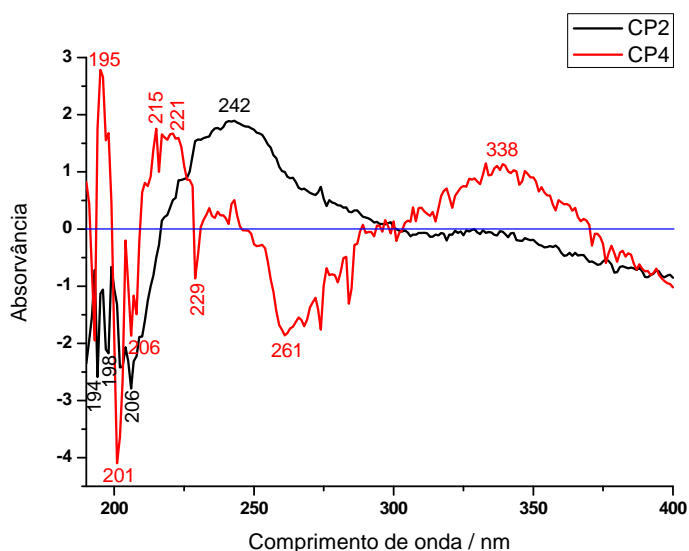
A Figura 95 mostra a separação dos 15 espectros obtidos dos 15 picos na análise por CLAE da amostra FIEOV1 no gráfico dos escores da CP2 e CP4.

**Figura 95** – Gráfico dos escores das CP2 e CP4 que explicam 13,50 % da variância total dos dados dos espectros da amostra FIEOV1 mostrando a formação de 10 grupos.



A Figura 96 mostra o gráfico dos loadings da CP2 e CP4 para os espectros obtidos na análise por CLAE da FIEOV1.

**Figura 96** – Gráfico dos loadings da CP2 e CP4 para os espectros da FIEOV1 obtidos por CLAE.

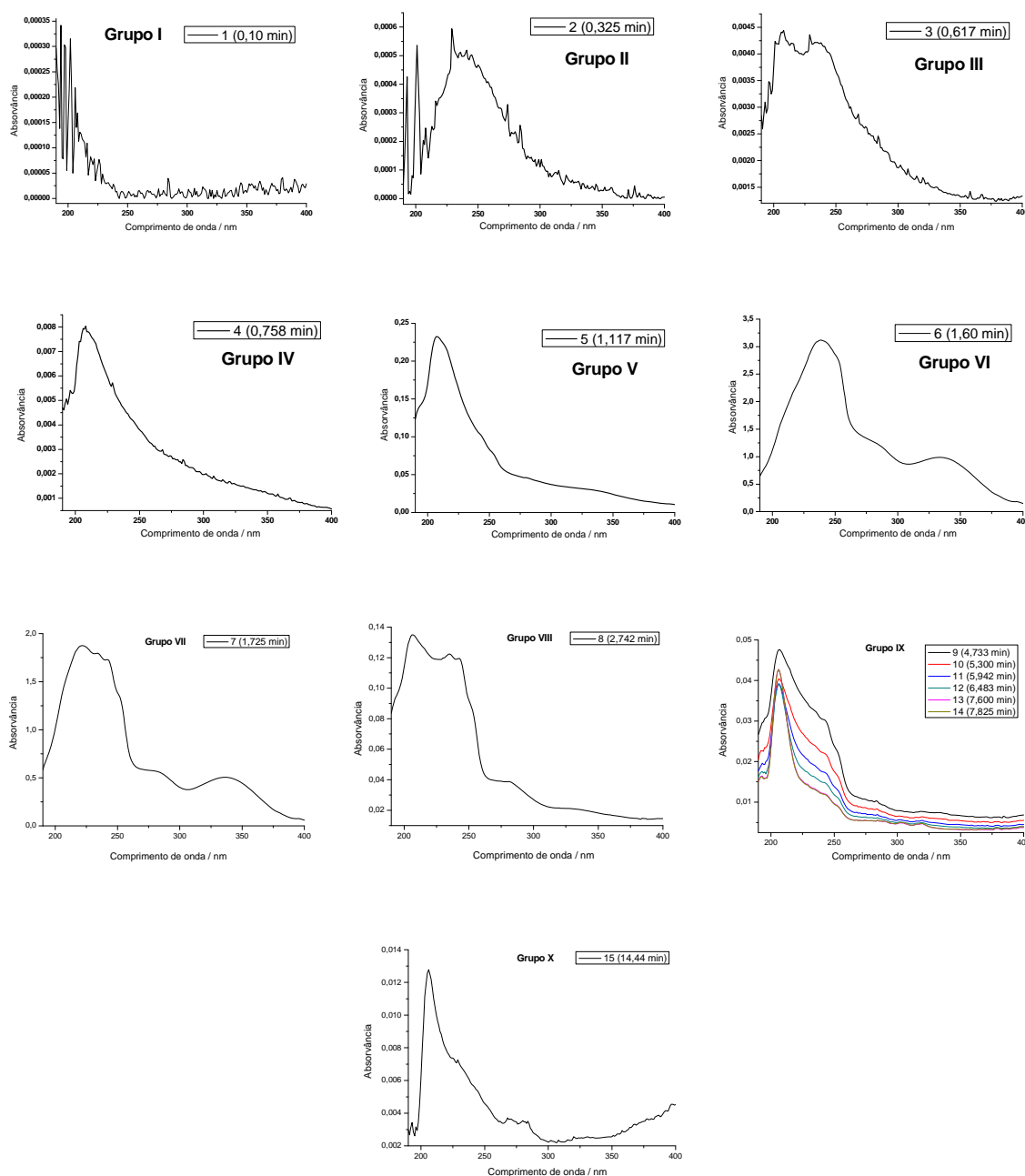


O valor de 242 nm na região positiva da CP2 no gráfico dos loadings influencia na separação dos grupos II, III, VI, VII e VIII que estão localizados na região positiva da CP2 no gráfico dos escores. As bandas na região negativa da CP2 com comprimento de onda em 194, 198 e 206 nm têm maior influência na separação dos grupos I, IV, V, IX e X que estão localizados na região negativa da CP2 no gráfico dos escores.

Os grupos IV, V, VI, VII e VIII localizados na região positiva da CP4 no gráfico dos escores são influenciados pelos comprimentos de onda em 195, 215, 221 e 338 nm localizados na região positiva da CP4 no gráfico dos loadings. As bandas em 201, 206, 229 e 261 nm, localizadas na região negativa da CP4 no gráfico dos loadings, têm mais influência na separação dos grupos I, II, III e X que estão localizados na região negativa da CP4 no gráfico dos escores.

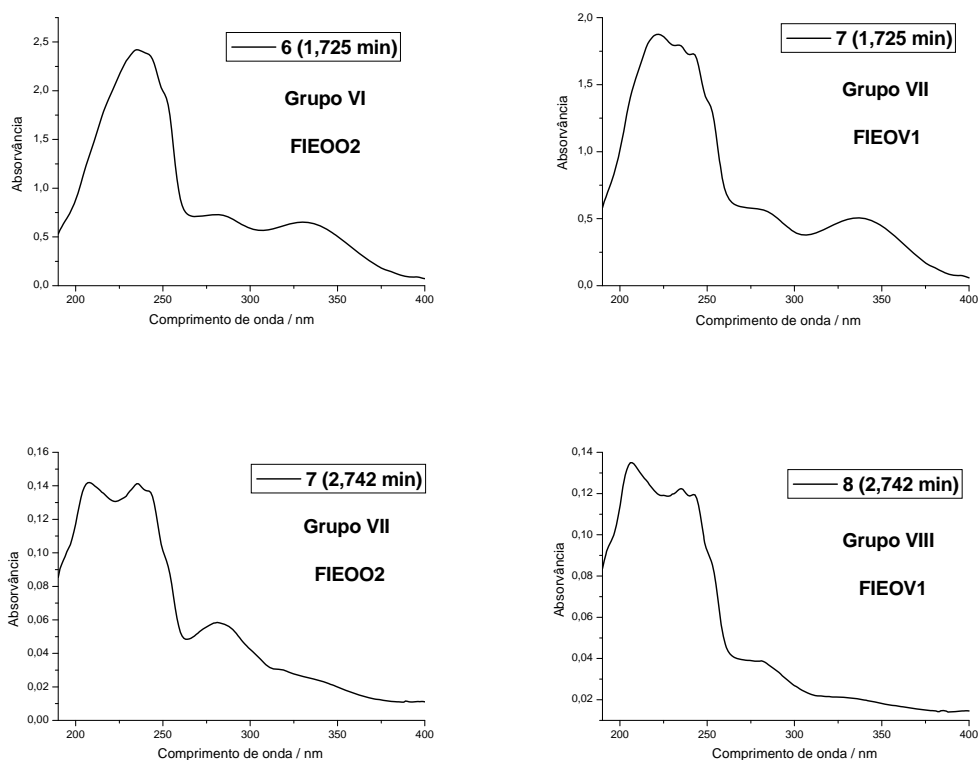
Na Figura 97 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos dez grupos de compostos químicos presentes na FIEOV1 obtido das folhas de *Vernonia condensata* Baker.

**Figura 97** – Gráficos dos 10 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da FIEOV1 no comprimento de onda de 190 a 400 nm.



Observa-se na Figura 98 que existem alguns espectros da FIEOO2 e da FIEOV1 que apresentam o mesmo perfil espectroscópico. Essa semelhança é visível quando relacionamos os espectros dos grupos VI e VII da FIEOO2 com os espectros dos grupos VII e VIII da FPEOV1 respectivamente, mostrando desta forma, que existem compostos da planta que são produzidos tanto no outono quanto no verão.

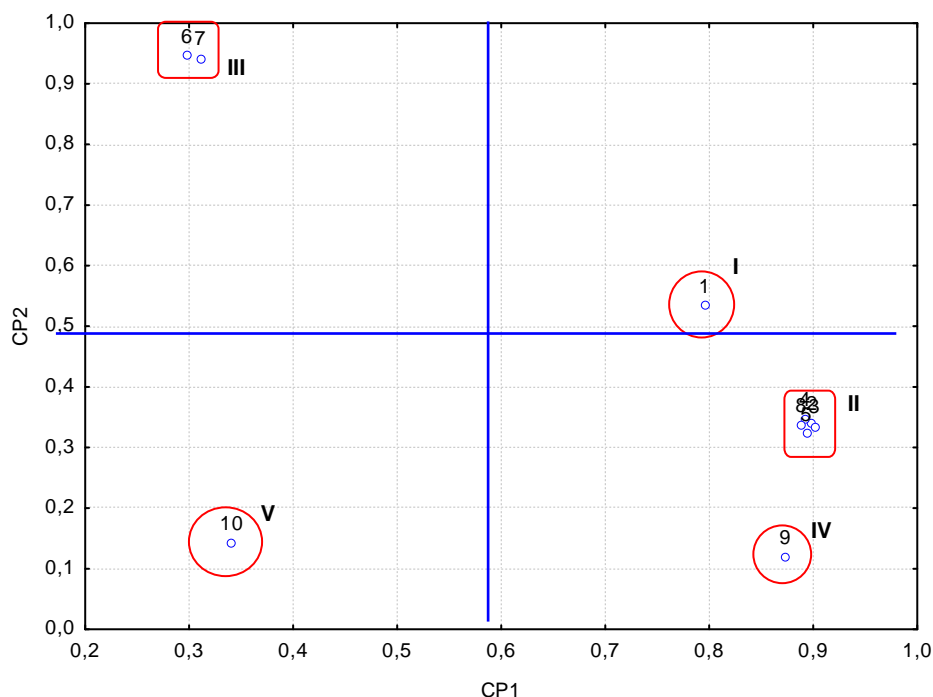
**Figura 98** – Gráfico dos espectros semelhantes obtidos pela análise por CLAE da FIEOO2 e FIEOV1.



A amostra da boldina apresentou 10 picos, cada pico formado por espectro com varredura de 190 a 400 nm, desta forma, os dados obtidos do espectro foram dispostos em uma matriz de dados.

A Figura 99 mostra a separação dos 10 espectros obtidos dos 10 picos na análise por CLAE da boldina no gráfico dos escores da CP1 e CP2.

**Figura 99** – Gráfico dos escores das CP1 e CP2 que explicam 91,15 % da variância total dos dados dos espectros da boldina mostrando a formação de 5 grupos.

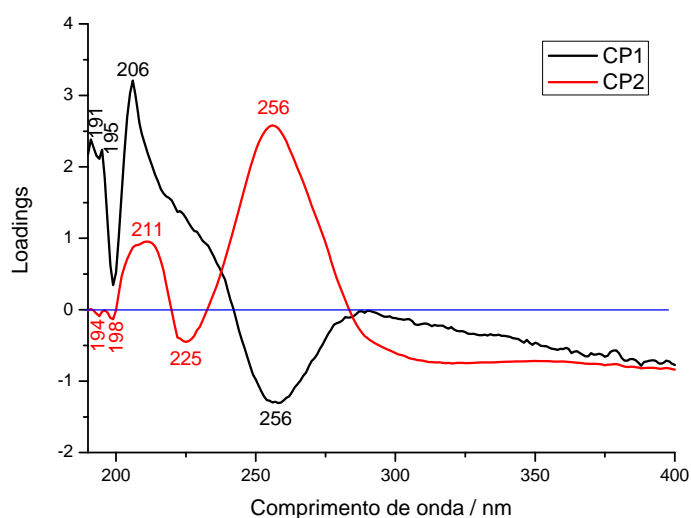


A Figura 100 mostra o gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para os espectros obtidos na análise por CLAE da boldina.

Os valores de 191, 195 e 206 nm na região positiva da CP1 no gráfico dos loadings influenciam na separação dos grupos I, II e IV que estão localizados na região mais positiva da CP1 no gráfico dos escores. Os grupos III e V, localizados na região menos positiva da CP1, são discriminados por influência do comprimento de onda em 256 nm da região negativa da CP1 no gráfico dos loadings.

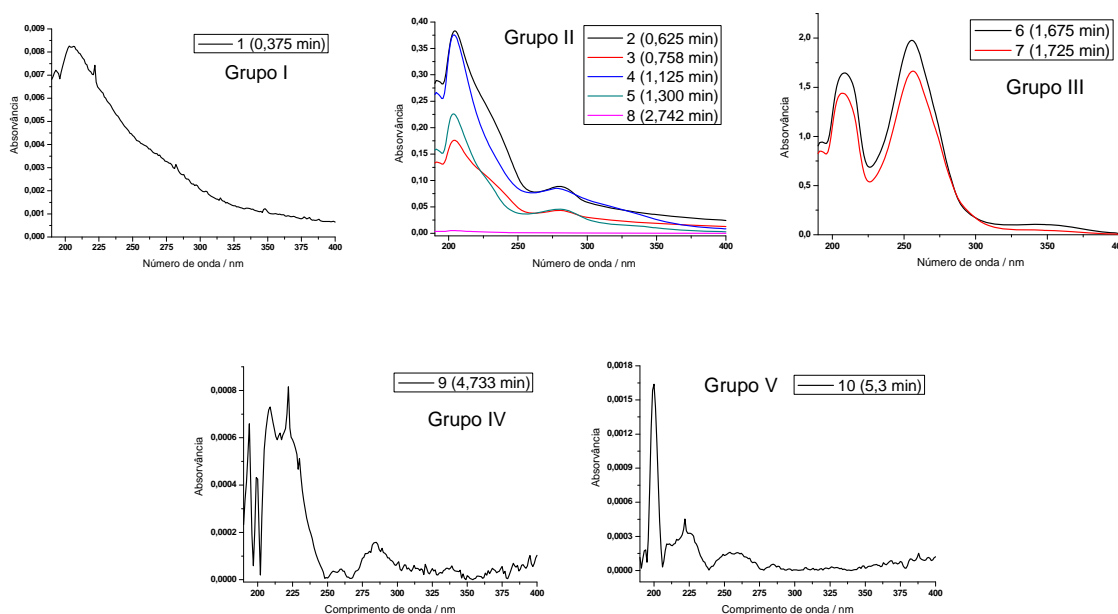
As bandas na região positiva da CP2 com comprimento de onda em 211 e 256 nm têm maior influência na separação dos grupos I e III que está localizado na região mais positiva da CP2 no gráfico dos escores. Os grupos II, IV e V que estão localizados na região menos positiva da CP2 no gráfico dos escores são discriminados pelos valores de 194, 198 e 225 nm do gráfico dos loadings.

**Figura 100** – Gráfico dos loadings da CP1 e CP2 para os espectros da boldina obtidos por CLAE.



Na Figura 101 podemos observar os gráficos dos espectros com seus respectivos tempo de retenção dos cinco grupos de compostos químicos presentes na boldina.

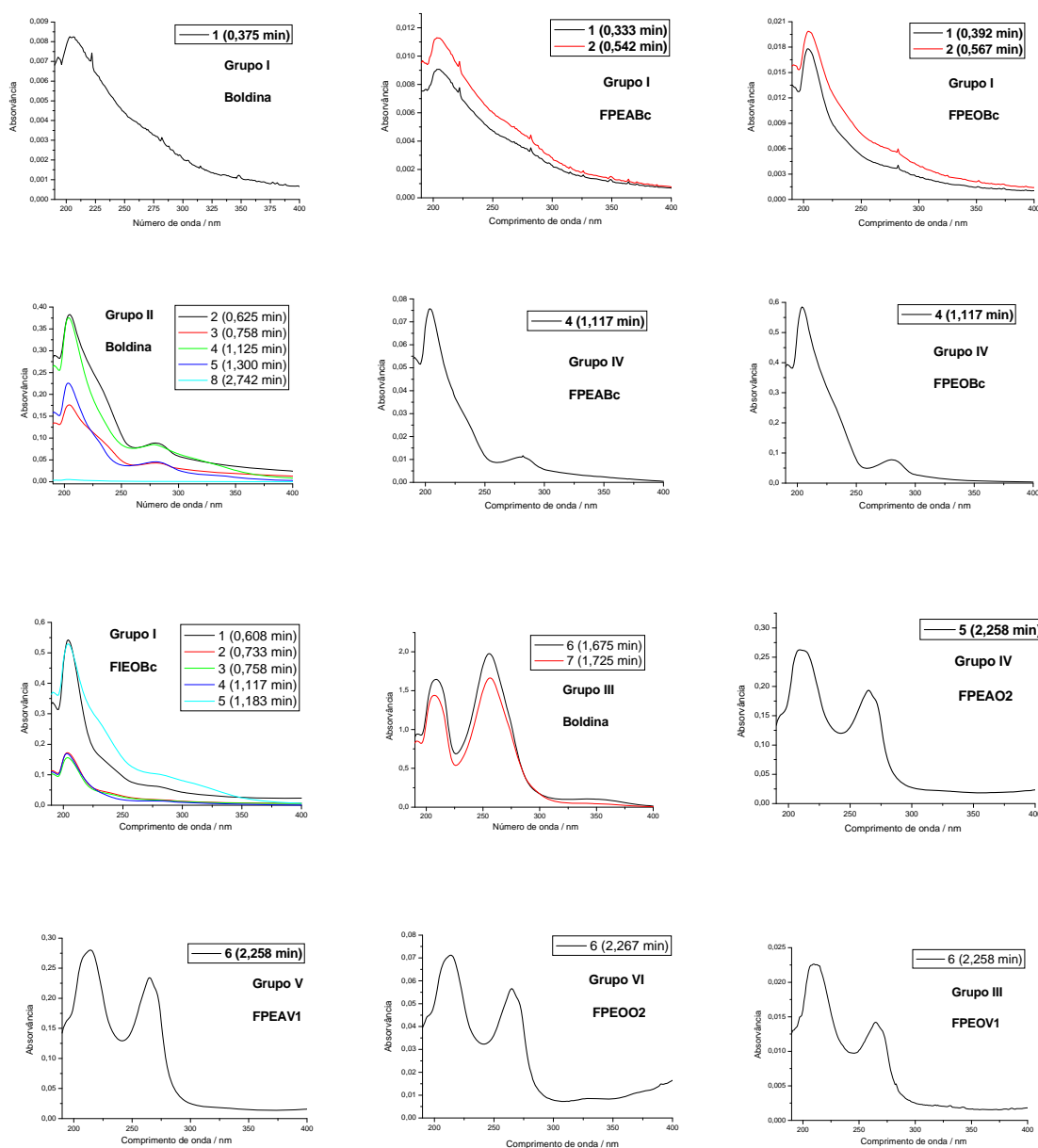
**Figura 101** – Gráficos dos 5 grupos de espectros dos picos obtidos da análise por CLAE da boldina no comprimento de onda de 190 a 400 nm.



Observa-se na Figura 102 que existem semelhanças no perfil espectroscópico da boldina com algumas amostras. Essa semelhança é visível quando

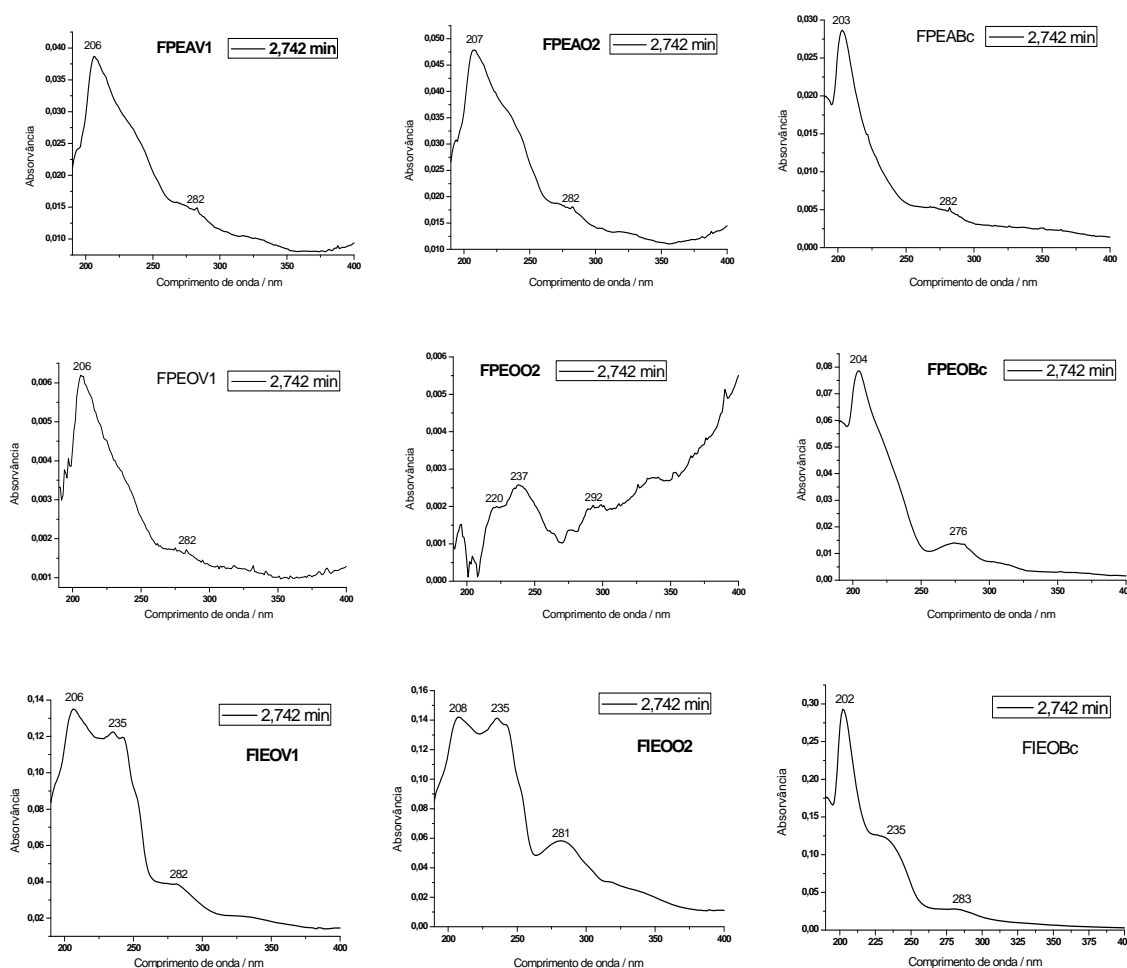
relacionamos os espectros do grupo I da boldina com os espectros do grupo I da FPEABc e grupo I da FPEOBc; espectros do grupo II da boldina com os espectros do grupo IV da FPEABc, grupo IV da FPEOBc e grupo I da FIEOBc; espectros do grupo III da boldina com os espectros do grupo IV da FPEAO2, grupo V da FPEAV1, grupo VI da FPEOO2 e grupo III da FPEOV1. Esses resultados indicam presença de boldina ou derivados tanto na amostra comercial quanto nas amostras de *Vernonia condensata* Baker coletadas no outono e verão.

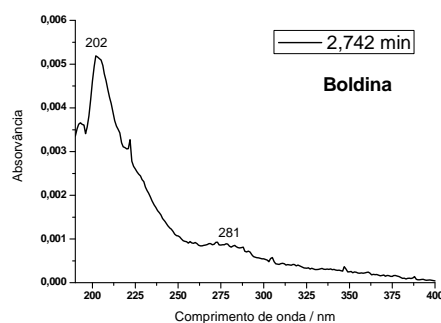
**Figura 102** – Gráfico dos espectros semelhantes obtidos pela análise por CLAE de todas as amostras em relação à boldina.



A Figura 103 mostra os espectros referente ao pico do cromatograma com tempo de retenção em 2,742 minutos da amostra comercial de boldo e das frações dos extratos de *Vernonia condensata* Baker. Algumas amostras estudadas mostraram ter o mesmo perfil espectroscópico da boldina neste tempo de retenção mostrando uma possível presença da boldina ou derivados, principalmente na fração polar do extrato em meio aquoso onde se encontra a maior quantidade de alcalóides da planta.

**Figura 103** – Espectros dos picos dos cromatogramas no tempo de retenção de 2,742 minutos da boldina, da amostra comercial e das frações dos extratos de *Vernonia condensata* Baker.

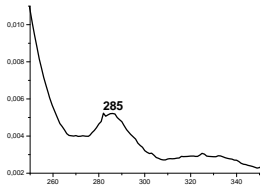
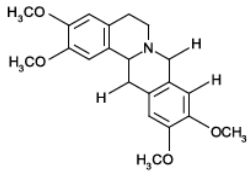
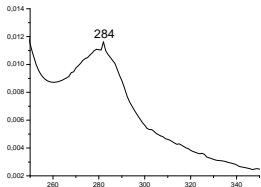
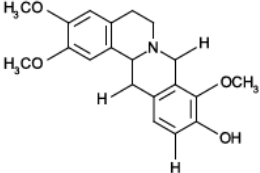
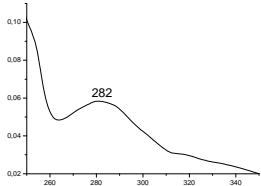
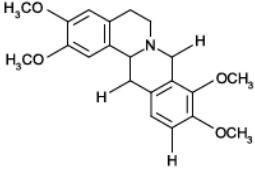


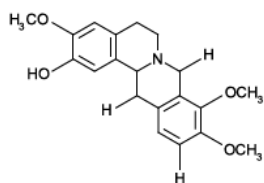
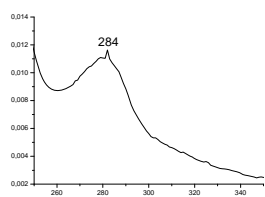


A Figura 104 mostra a relação entre alguns espectros obtidos nas análises por CLAE dos extratos com as estruturas moleculares de alguns compostos descritos na literatura<sup>65</sup>.

Esses compostos que apresentam o mesmo perfil espectroscópico dos extratos pertencem a classe dos alcalóides isoquinolinos, que é a mesma classe de alcalóides em que pertence a boldina, um poderoso antioxidante com propriedades anti-inflamatórias.

**Figura 104** – Relação entre os espectros dos cromatogramas dos extratos e as estruturas de alguns alcalóides encontrados na literatura.

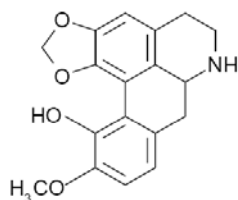
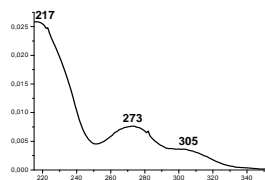
Espectro UV	Estrutura	Composto	$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$	Amostra
		Xilopinina	280 ~ 290	FPEOO FIEOBc
		Coridalmina	284	FPEABc FPEAO FPEAV FPEOV FIEOO
		Tetrahidropalmatina	282	FPEABc FPEOBc FIEOBc FIEOV



Tetrahydrocolumbamina

284

FPEABc  
 FPEAO  
 FPEAV  
 FPEOV  
 FIEOO



Launobina

223

270

309

FPEOBc



*Capítulo V*

*Conclusão*

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ O estudo da caracterização do material vegetal permitiu concluir que as folhas de *Vernonia condensata* Baker coletadas na estação do verão são as mais úmidas das quatro estações e o teor de cinzas totais ficou entre 10 e 11 % e independente da época da colheita.
  
- ✓ Os resultados mostraram que os rendimentos das frações dos extratos de *V. condensata* Baker sofrem alguma variação dependendo da estação do ano. Não houve diferença significativa no rendimento das frações básica (alcalóides) e polar (alcalóides quaternários e N-óxidos) do extrato em meio aquoso nas quatro estações do ano.
  
- ✓ Os testes farmacológicos realizados em camundongos com as frações polar aquosa e polar orgânica dos extratos de *V. condensata* Baker apresentaram baixa toxicidade aguda ( $DL_{50} > 2000$  mg/Kg). Na fração polar aquosa, a dose de 25 mg/kg das amostras provenientes de folhas coletadas no outono e verão foram estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, inibindo as contorções abdominais em camundongos. Na fração polar orgânica os testes também foram estatisticamente significativos em relação ao controle negativo, embora com dose maior que 100 mg/kg para as folhas coletadas nas três estações. Já na fração intermediária orgânica, a dose de 25 mg/kg e 400 mg/kg das amostras provenientes de folhas coletadas no outono e a dose de 100 mg/kg das amostras provenientes de folhas coletadas no verão foram estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, inibindo as contorções abdominais em camundongos. Para a fração polar aquosa, a dose mais eficaz foi de 25 mg/kg enquanto que para a fração polar orgânica, a dose mais eficaz foi 400 mg/kg. Isso pode ser explicado pelo baixo poder de extração do solvente na fração polar orgânica. Os testes mostraram que as folhas de *V. condensata* Baker não apresentam efeito antinociceptivo central, apenas periférico.
  
- ✓ Com a aplicação de métodos quimiométricos associados à análise dos espectros das frações dos extratos na região do ultravioleta-visível foi possível traçar o perfil das diferentes frações e identificar qualitativamente os grupos de composições químicas diferentes presentes nos extratos da planta.

✓ A aplicação de métodos quimiométricos associados à análise dos espectros das frações dos extratos na região do infravermelho foi possível traçar o perfil das diferentes frações identificando qualitativamente os grupos de composições químicas diferentes presentes na planta. Determinar as regiões dos grupos funcionais que apresentam maior influência para discriminar a composição química das diferentes frações. Por meio da análise dos grupos funcionais identifica-se a presença de lactonas sesquiterpênicas e alcalóides, podendo ser a boldina ou algum de seus derivados.

✓ A impressão digital dos espectros UV-VIS, infravermelho, bem como cromatográfica do extrato em solução aquosa é diferente daqueles em meio orgânico.

✓ A melhor fase móvel para separação dos metabólitos secundários presentes nas frações dos extratos da planta foi a fase E (26% ACN, 51% H<sub>2</sub>O, 23% MeOH) monitorada em 210 nm.

✓ A análise dos espectros UV-VIS de cada um dos picos cromatográficos das amostras coletadas no outono e verão sugeriram a presença de alguns alcalóides na fração polar do extrato em meio aquoso, fração polar do extrato em meio orgânico e fração intermediária em meio orgânico das folhas de *V. condensata* Baker.

✓ Embora os resultados tenham confirmado a presença de alcalóides com esqueletos semelhantes ao da boldina na *V. condensata* Baker e no *Peumus boldus*, não é possível afirmar que são os mesmos, uma vez que estas amostras estão sempre afastadas na análise de componentes principais e análise hierárquica.



*Referências*

*Bibliográficas*

## REFERÊNCIAS

- 1 MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA JR, V.F., GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares, **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.
- 2 SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2002.
- 3 BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL-FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.
- 4 GARCIA, C. M. **Determinação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química e biológica de *Phyllanthus niruri* e *Phyllanthus tenellus* Roxb.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.
- 5 BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.
- 6 SANDES, A.R.R.; DI BIASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.13, p.28-32, 2000.
- 7 CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.
- 8 VEIGA JR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.
- 9 YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária. 2001.
- 10 MONTEIRO, M.H.D.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSZWALB, I. CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.149-157, 2001.
- 11 FRUTUOSO, V.S.; GURJÃO M.R.R.; CORDEIRO R.S.B.; MARTINS M.A. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. **Planta Medica**, v.60, n.1, p.21-25, 1994.
- 12 LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- 13 IGANCI, J.R.V.; BOBROWSKI, V.L.; HEIDEN, G.; STEIN, V.C.; ROCHA, B.H.G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.79-82, 2006.

- 14 SCHWANZ, M. **Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação da boldina em *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae) e avaliação preliminar de sua estabilidade.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- 15 SOUZA, E.B.R.; SILVA, R.R.; AFONSO, S.; SCARMINIO, I.S. Enhanced extraction yields and mobile phase separations by solvent mixtures for the analysis of metabolites in *Annona muricata* L. leaves. **Journal of Separation Science**, v.32, n.23-24, p.4176-4185, 2009.
- 16 WECKWERTH, W.; MORGENTHAL, K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. **Drug Discovery Today**, v.10, n.22, p.1551-1558, 2005.
- 17 DUNN, W.B.; ELLIS, D.I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, n.4, p.285-294, 2005.
- 18 GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- 19 VALENTINI, C. M. A.; SILVA, L. E.; MACIEL, E. N.; FRANCESCHINI, E.; SOUSA JR, P. T. de; DALL'OGGIO, E. L.; COELHO, M. de F. B. Variação anual do rendimento e composição química dos compostos voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1506-1509, 2010.
- 20 SAKAMOTO, H.T.; GOBBO-NETO, L.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Quantitative HPLC Analysis of Sesquiterpene Lactones and Determination of Chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae), **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6B, p.1396-1401, 2005.
- 21 SOARES, P.K.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Statistical mixture design investigation of fractionated and total extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. **Journal of Separation Science**, v.32, n.4, p.644-652, 2009.
- 22 SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.
- 23 ARANTES, F. F. P. **Síntese e avaliação da fitotoxicidade de novas lactonas sesquiterpênicas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- 24 KIM, S. H.; SONG, J. H.; CHOI, B. G.; KIM, H.; KIM, T. S. Chemical modification of santonin into a diacetoxy acetal form confers the ability to induce differentiation of human promyelocytic leukemia cells via the down-regulation of NF- $\kappa$ B DNA binding activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.19, p.13117-13125, 2006.

- 25 SIEDLE, B.; GARCÍA-PIÑERES, A. J.; MURILLO, R.; SCHULTE-MÖNTING, J.; CASTRO, V.; RÜNGELER, P.; KLAAS, C. A.; COSTA, F. B. da; KISIEL, W.; MERFORT, I. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- $\kappa$ B. **Journal Medicinal Chemistry**, v.47, p.6040-6054, 2004.
- 26 CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v.55, n.2, p.217-225, 2007.
- 27 ALMELA, L.; MUÑOZ, B.S.; LÓPEZ, J.A.F.; ROCA, M.J.; RABE, V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography A**, v.1120, n.1-2, p.221-229, 2006.
- 28 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3<sup>a</sup> ed., Campinas: Editora UNICAMP, 2007.
- 29 KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p.412-430, 1959.
- 30 DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Fundação Editora UNESP, 1996.
- 31 LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, 597-652, 2001.
- 32 PIRES, P. de A.; MALVAR, D. do C.; BLANCO, L. das C.; VIGNOLI, T.; CUNHA, A. F. da; VIEIRA, E.; DANTAS, T. N. de C.; MACIEL, A. A. M.; CÔRTEZ, W. da S.; VANDERLINDE, F. A. Estudo das atividades analgésicas do extrato metanólico da *Capsicum frutescens* – Solanaceae (Pimenta Malagueta). **Revista da Universidade Rural - RJ**, v.24, n.2, p.129-134, 2004.
- 33 BLANCO, L. das C.; VIGNOLI, T.; REIS, G. M.; MALVAR, D. do C.; PIRES, P. de A.; SOUZA, P. A. de; LEITÃO, G. G.; MORAIS, A. A.; VANDERLINDE, F. A.; CÔRTEZ, W. da S. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de extratos brutos de *Stachytarpheta cayennensis* e *Pleurothyrium bahiense*. **Revista da Universidade Rural - RJ**, v.25, n.1, p.78-84, 2005.
- 34 LUCENA, J. E. X.; BISPO, M. D.; NUNES, R. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; TEIXEIRA-SILVA, F.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, A. R. Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.1, p.67-72, 2006.
- 35 ATTA, A. H.; EL-SOUD, K. A. The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.235-238, 2004.

- 36 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **Guideline for Testing of Chemicals: Acute oral toxicity – Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD, Guideline 423, 2001.
- 37 LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do Infravermelho. **Química Nova**, v.27, n.4, p.670-673, 2004.
- 38 SAHIN, S.; DEMIR, C.; GÜÇER, S. Simultaneous UV-vis spectrophotometric determination of disperse dyes in textile wastewater by partial least squares and principal component regression. **Dyes and Pigments**, v.73, p.368-376, 2007.
- 39 LI, B-Y.; HU, Y.; LIANG, Y-Z.; XIE, P-S.; DU, Y-P. Quality evaluation of fingerprints of herbal medicine with chromatographic data. **Analytica Chimica Acta**, v.514, p.69-77, 2004.
- 40 CAO, Y.; WANG, L.; YU, X.; YE, J. Development of the chromatographic fingerprint of herbal preparations Shuang-Huang-Lian oral liquid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.3, p.845-856, 2006.
- 41 ZHANG, J-L.; CUI, M.; HE, Y.; YU, H-L.; GUO, D-A. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, n.5, p.1029-1035, 2005.
- 42 SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2<sup>a</sup> ed. Canadá: Editora John Wiley & Sons Inc, 1997.
- 43 HANAI, T. **HPLC A Practical Guide**. Royal Society of Chemistry, 1999.
- 44 SNYDER, L. R., CARR, P. W., RUTAN, S. C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. **Journal of Chromatograph A**, v. 656, 537-547, 1993.
- 45 COENEGRACHT, P.M.J.; METTING, H.J.; SMILDE, A.K.; COENEGRACHT-LAMERS, P.J.M. A chemometric investigation of the selectivity of multisolvent mobile phase systems in RP-HPLC. **Chromatographia**, v.27, n.3-4, p.135-141, 1989.
- 46 SENA, M.M.; POPPI, R.J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v.23, n.4, p.547-556, 2000.
- 47 HOPKE, P.K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v.500, n.1-2, p.365-377, 2003.
- 48 HAIR JR., J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
- 49 SCARMINIO, I.S.; ISHIKAWA, D.N.; BARRETO, W.J.; PACZKOWSKI, E.L.; ARRUDA, I.C. Calibração Multivariada para Sistemas com Bandas Sobrepostas Através da Análise de Fatores Tipo-Q. **Química Nova**, v.21, n.5, p.590-596, 1998.

- 50 LONNI, A.A.S.G. **Caracterização e identificação química de carquejas do gênero *Baccharis* por métodos quimiométricos.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.
- 51 NEVADO, J.J.B.; FLORES, J.R.; LLERENA, M.J.V.; FARIÑAS, N.R. Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazine, patent blue V, and indigo in commercial products by partial least squares and principal component regression methods. **Talanta**, v.48, p.895-903, 1999.
- 52 MANLY, B. F. J. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução.** 3ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- 53 NETO, J.M.M.; MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química. Nova**, v.21, n.4, p.467-469, 1998.
- 54 DINIZ, A.; LONNI, A. A. S. G.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia prática: roteiro para controle de qualidade de drogas vegetais.** Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- 55 RISSO, W. E.; SCARMINIO, I. S.; MOREIRA, E. G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p.811-816, 2010.
- 56 LISBOA, S. F. S.; OLIVEIRA, P. E.; COSTA, L. C.; VENÂNCIO, E. J.; MOREIRA, E. G. Behavioral evaluation of male and female mice pups exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. **Pharmacology**, v.80, n.1, p.49-56, 2007.
- 57 LOUGH, W. J., WAINR, I. W., **High performance liquid chromatography**, Editora: Blackie Academic & Professional, London, 1995.
- 58 DELAROZA, F.; SCARMINIO, I.S. Mixture design optimization of extraction and mobile phase media for fingerprint analysis of *Bauhinia variegata* L. **Journal of Separation Science**, v.31, n.6-7, p.1034-1041, 2008.
- 59 HIDALGO, M. E.; ALARCÓN, M. G.; OJEDA, J. R.; FERNÁNDEZ, E. C.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E. M.; DE LA FUENTE, J. R. Spectroscopic and photochemical properties of some annulated boldine derivatives. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.21, n.12, p.2205-2210, 2010.
- 60 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 6ª ed. São Paulo: Editora LTC, 2000.
- 61 COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIERLY, S. E. **Introduction to infrared and raman spectroscopy.** New York: Academic Press, 1964.
- 62 ODIONGENYI, A. O.; ODOEMELAM, S. A.; EDDY, N. O. Corrosion inhibition and adsorption properties of ethanol extract of *Vernonia amygdalina* for the corrosion of mild steel in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v.27, n.1, p.33-45, 2009.

- 63 KOLOT, V.; GRINBERG, S. Vernonia oil-based acrylate and methacrylate polymers and interpenetrating polymer networks with epoxy resins. **Journal of Applied Polymer Science**, v.91, p.3835-3843, 2004.
- 64 RAGHAVAN, D.; EMEKALAM, A. Characterization of starch/polyethylene and starch/polyethylene/poly (lactic acid) composites. **Polymer Degradation and Stability**, v.72, p.509-517, 2001.
- 65 YAMAGUCHI, K. **Spectral data of natural products**. New York: Elsevier Publishing Company, v.1, p.543-545, 1970.
- 66 SRIVASTAVA, A.; TANDON, P.; AYALA, A. P.; JAIN, S. Solid state characterization of an antioxidant alkaloid boldine using vibrational spectroscopy and quantum chemical calculations. **Vibrational Spectroscopy**, 2010. doi:10.1016/j.vibspec.2010.08.001
- 67 DINIZ, A. **Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonóide**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.