



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REBEKA PRISCILA MARANHÃO MONTEIRO

Desenvolvimento de perfis cromatográficos típicos e quantificação de polifenóis das folhas e cascas de *Anacardium occidentale*

Recife
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de perfis cromatográficos típicos e quantificação de polifenóis das folhas e cascas de *Anacardium occidentale*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Recife

2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M775d Monteiro, Rebeqa Priscila Maranhão.
Desenvolvimento de perfis cromatográficos típicos e quantificação de polifenóis das folhas e cascas de *Anacardium occidentale* / Rebeqa Priscila Maranhão Monteiro. – 2016.
130 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências.

1. *Anacardium occidentale*. 2. Cromatografia. 3. Espectrofotometria. 4. Polifenóis. 5. Validação. I. Soares, Luiz Alberto Lira (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-266)

REBEKA PRISCILA MARANHÃO MONTEIRO

Desenvolvimento de perfis cromatográficos típicos e quantificação de polifenóis das folhas e cascas de *Anacardium occidentale*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 26/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Mariana Laundry Mesquita (Examinadora Externa)
Universidade de Brasília

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Dedico este trabalho aos meus pais,
José Paulo e Janeide, e minha avó
Maria Laura, pelo carinho e apoio
incondicional.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por está sempre me iluminando e dando forças para alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Alberto de Lira Soares**, pelos ensinamentos, paciência e pela oportunidade de atuar nessa área de pesquisa desde a iniciação científica.

A doutoranda do laboratório, **Magda Assunção** que também me orientou nessa pesquisa e mesmo quando estava distante se mostrou solícita. Meu muito obrigado!

Aos meus colegas do **Laboratório de Farmacognosia e da Central Analítica (NUDATEF)** pelo apoio e experiências compartilhadas, em especial a **Júlia, Isabelle e Renata** pela colaboração na execução desse trabalho.

Um especial agradecimento as minhas amigas mestrandas, **Hyalyne e Patrícia** que compartilharam comigo essa fase de mestrado, mas estão me apoiando desde a graduação. Obrigada meninas pelo carinho e amizade!

Aos meus amigos **Marcos Aurélio e Paulo Aires** por está sempre me ajudando nesta fase. Seus conselhos foram muito valiosos!

As minhas amigas e irmãs, **Aline Fernanda e Cinthia Pereira** pela eterna amizade e incentivo em todos os momentos da minha vida. Muito Obrigada!

Ao meu irmão **Dielton Paulo**, que apesar da distância sempre me incentivou no meu crescimento profissional. Obrigada, irmão!

Ao meu noivo e amigo **Felipe Rondinone Chalegre**, pela paciência, companheirismo e compreensão nos momentos difíceis. Sei que posso contar com você em tudo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida.

Ao **Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM)** e ao **Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT)** pela disponibilidade de equipamentos quando necessário.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Anacardium occidentale L., espécie frutífera conhecida como cajueiro, destaca-se por suas propriedades farmacológicas entre as quais antimicrobiana, antiparasitária e anticancerígena. Em razão de sua importância a espécie foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo de desenvolver metodologias analíticas para serem utilizadas como ferramentas na padronização de polifenóis das folhas e cascas de *Anacardium occidentale* L.. Para tanto, quatro amostras foram coletadas em diferentes cidades de Pernambuco (Recife, Limoeiro, Vitória e Bezerros) e uma amostra no Piauí (Floriano). Após coleta e confirmação da identidade, as amostras foram secas em estufa (40 °C), trituradas e submetidas a caracterização físico-química conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira. Os extratos fluidos a 20% das diferentes amostras dos farmacógenos foram submetidos a uma prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) para análise dos compostos fenólicos. A avaliação do método espectrofotométrico para o doseamento de polifenóis totais investigado or CCD indicou a presença de polifenóis do tipo taninos condensados e hidrolisáveis (para todas as u a influência de diferentes solventes (água, etanol e acetona) e respectivas proporções, assim como os métodos extrativos (refluxo, maceração e ultrassom). Os métodos desenvolvidos por espectrofotometria de absorção no visível (UV-Vis) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram validados aos parâmetros preconizados pela RE 899/2003 da ANVISA. Em seguida, os métodos foram aplicados para análise das diversas amostras. A caracterização físico-química das matérias primas indica que todas atendem as exigências estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira. A análise p amostras de ambos os farmacógenos), e flavonoides (para todas as amostras de folhas e apenas para as cascas oriundas do município de Limoeiro). As melhores condições extrativas para o doseamento de polifenóis totais nas folhas foram com etanol 30% e ultrassom; enquanto que para as cascas o melhor desempenho foi observado com etanol 30% e sob-refluxo. Os métodos analíticos validados foram considerados específicos, sensíveis, precisos, exatos e robustos. As análises quantitativas das amostras de diferentes localidades por UV-VIS e CLAE, mostraram que houve influência da localização geográfica na composição química para cada farmacógeno. Isso ocorre devido aos fatores ambientais peculiares de cada região, os quais afetam nessas variações. Além disso, os dados qualitativos por CCD e CLAE permitiram identificar perfis cromatográficos típicos para os farmacógenos. Desta forma, os resultados obtidos serão úteis no controle de qualidade da espécie vegetal estudada caso seja desenvolvido um medicamento fitoterápico da mesma.

Palavras chave: *Anacardium occidentale*. Cromatografia. Espectrofotometria. Polifenóis. Validação.

ABSTRACT

Anacardium occidentale L., fruit species known as cashew, stands out because of its pharmacological properties, including: antimicrobial, antiparasitic and anticancer. Due to its importance the species was included in the National List of Medicinal Plants of Interest to the SUS. In this context, this study aimed at developing analytical methodologies as tools for use in standardization of polyphenols from the leaves and bark of *Anacardium occidentale* L.. For this purpose, four samples were collected in different cities of Pernambuco (Recife, Limoeiro, Vitória and Bezerros) and a sample in Piauí (Floriano). After collection and confirmation of their identities, the samples were dried in an oven (40 ° C), crushed and subjected to physical and chemical characterization as recommended by the Brazilian Pharmacopoeia. The fluid extracts 20% from the different samples of pharmacogens were subjected to a phytochemical prospection via chromatography in thin layer (TLC) for analysis of phenolic compounds. The evaluation of the spectrophotometric method for the determination of total polyphenols investigated the influence of different solvents (water, ethanol and acetone) and their proportions, as well as extractive methods (reflux, maceration and ultrasound). The methods developed by the visible absorption spectrophotometry (UV-Vis) and by high-performance liquid chromatography (HPLC) were validated in the parameters recommended by the RE 899/2003 of ANVISA. Following this further, the methods were applied for the analysis of multiple samples. The physicochemical characterization of the starting material indicates that all of them meet the requirements established by the Brazilian Pharmacopoeia. TLC analysis indicated the presence of polyphenols like condensed tannins and hydrolysable (for all samples of both pharmacogens), and flavonoids (for all leaves samples and only in barks from the city of Limoeiro). The best extraction conditions for the determination of total polyphenols in the leaves were those with 30% ethanol and ultrasound; while for the barks it was observed better extraction conditions with 30% ethanol and under reflux. The validated analytical methods were considered to be specific, sensitive, accurate, precise and robust. Quantitative analysis of samples from different locations by UV-VIS and HPLC showed the influence of geographical location on chemical composition for each pharmacogens. This is due to the peculiar environmental factors in each region, which affect these variations. In addition, qualitative data by TLC and HPLC possible to identify typical chromatographic profile for pharmacogens. Thus, the results obtained will be useful in quality control of plant species studied if a herbal medicine is developed from it.

Keywords: *Anacardium occidentale*. Chromatography. Spectrophotometry. Polyphenols. Validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas químicas do ácido anacárdico e seus derivados.	24
Figura 2- Estrutura dos taninos hidrolisáveis. (A) ácido gálico, (B) ácido elágico, (C) galotanino, (D) elagitanino.	28
Figura 3- Estrutura química de um tanino condensado.	28
Figura 4- Histograma de distribuição granulométrica das amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	54
Figura 5- Histograma de distribuição granulométrica das amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	54
Figura 6- Curvas de retenção e passagem referentes às amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	55
Figura 7- Curvas de retenção e passagem referentes às amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	56
Figura 8- Cromatograma para avaliação da presença de taninos condensados em folhas de <i>A. occidentale</i> L., empregando como fase móvel AcOEt:HCOOH:H ₂ O (90:5:5), padrão catequina e revelador vanilina clorídrica.	61
Figura 9- Cromatogramas para avaliação da presença de taninos condensados em cascas de <i>A. occidentale</i> L. obtidos por CCD com fase móvel AcOEt:HCOOH:H ₂ O (90:5:5), padrão catequina e revelador vanilina clorídrica	62
Figura 10- Cromatograma para avaliação da presença de polifenóis e ácido gálico em folhas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:H ₂ O (90:5:5), padrão ácido gálico e revelador cloreto férrico metanólico a 1% (m/v).....	63
Figura 11- Cromatograma para avaliação da presença de polifenóis e ácido gálico em cascas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:H ₂ O (90:5:5), padrão ácido gálico e revelador cloreto férrico metanólico a 1% (m/v).....	63
Figura 12- Cromatograma para avaliação da presença de flavonoides em folhas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:H ₂ O (90:5:5), padrão: quercetina, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).	65
Figura 13- Cromatograma para avaliação da presença de flavonoides em cascas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:H ₂ O (90:5:5), padrão: quercetina, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).	65

Figura 14- Cromatograma para avaliação da presença de derivado cinâmico em folhas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O (100:2:11:4), padrão ácido caféico, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).....	66
Figura 15- Cromatograma para avaliação da presença de derivado cinâmico em cascas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel Tolueno:AcOEt:MeOH:HCOOH (75:25:40:6), padrão: ácido caféico, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).	66
Figura 16- Cromatograma para avaliação da presença de derivado cinâmico em folhas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O (100:11:11:26), padrão: ácido clorogênico, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).	67
Figura 17- Cromatograma para avaliação da presença de derivado cinâmico em cascas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O (100:11:11:26), padrão: ácido clorogênico, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).	67
Figura 18- Cromatograma para avaliação da presença de cumarina em folhas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel EtOEt:tolueno:AcOH10% (50:50:50), padrão cumarina e revelador KOH 10% (UV 365 nm).....	68
Figura 19- Cromatograma para avaliação da presença de cumarina em folhas de <i>A. occidentale</i> L., com fase móvel EtOEt:tolueno:AcOH10% (50:50:50), padrão cumarina e revelador KOH 10% (UV 365 nm).....	68
Figura 20- Perfil fitoquímico típico das folhas de <i>A. occidentale</i> L. por CCD.	69
Figura 21- Perfil fitoquímico típico das cascas de <i>A. occidentale</i> L. por CCD.	70
Figura 22- Cromatogramas e espectros de varedura para avaliação da presença de taninos em folhas e cascas de <i>A. occidentale</i> L. obtidos por CLAE.	72
Figura 23- Estrutura básica dos flavonoides.....	73
Figura 24- Cromatogramas e espectro de varedura para avaliação da presença de flavonoides das folhas de <i>A. occidentale</i> L. obtidos por CLAE.	74
Figura 25- Avaliação da diferentes solventes e proporções para as folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	78
Figura 26- Avaliação da diferentes solventes e proporções para as cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	80
Figura 27- Curvas média de linearidade para a solução amostra de folhas (1) e para a solução amostra de cascas (2).....	84
Figura 28- Curvas de calibração de pirogalol, ácido gálico e catequina.	84

Figura 29- Especificidade dos métodos espectrofotométricos propostos para doseamento polifenóis totais em folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	86
Figura 30- Especificidade dos métodos espectrofotométricos propostos para doseamento polifenóis totais em cascas do caule de <i>A. occidentale</i> L.....	87
Figura 31- Comparação dos espectros de absorção pelo método espectrofotométrico de caju folha (CJF).....	88
Figura 32- Comparação dos espectros de absorção pelo método espectrofotométrico de caju casca (CJC).....	88
Figura 33- Avaliação da especificidade do método por CLAE das folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	97
Figura 34- Cromatogramas obtidos para o ensaio de especificidade da amostra de folhas de <i>A. occidentale</i> L. por CLAE.....	98
Figura 35- Avaliação da especificidade do método por CLAE das cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	99
Figura 36- Cromatogramas obtidos para o ensaio de especificidade da amostra de cascas de <i>A. occidentale</i> L. por CLAE.	99
Figura 37- Curvas médias de calibração para as soluções dos padrões de ácido gálico (1) e catequina (2) e curvas média de linearidade do ácido gálico (3) e catequina (4) nas soluções amostras de folhas.....	100
Figura 38- Curva média de calibração para a solução padrão do ácido gálico (1) e curva média de linearidade do ácido gálico (2) nas soluções amostras de cascas.	101
Figura 39- Avaliação por espectrofotometria do teor de polifenóis totais nas amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.....	107
Figura 40- Avaliação por espectrofotometria do teor de polifenóis totais nas amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.	109
Figura 41- Cromatogramas obtidos por CLAE das amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.....	110
Figura 42- Espectros de varredura obtidos por CLAE-DAD dos picos das amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.	111
Figura 43- Cromatogramas obtidos por CLAE das amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.....	112
Figura 44- Espectros de varredura obtidos por CLAE-DAD dos picos das amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.....	113

Figura 45- Análise por CLAE das concentrações de ácido gálico e catequina nas amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L. oriundas de diferentes localidades.	115
Figura 46- Análise por CLAE das concentrações de ácido gálico nas amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L. oriundas de diferentes localidades.	116

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Atividades farmacológicas das folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	24
Quadro 2- Atividades farmacológicas das cascas de <i>A. occidentale</i> L..	25
Quadro 3- Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.	26
Quadro 4- Período de coleta das folhas e cascas de <i>A. occidentale</i> L.	37
Quadro 5- Sistemas cromatográficos empregados para obtenção do perfil fitoquímico típico das folhas e cascas de <i>A. occidentale</i> L.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Gradiente utilizado para análise de ácido gálico e catequina nas folhas de <i>A. occidentale</i> L.	48
Tabela 2- Gradiente utilizado para análise de ácido gálico nas cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	48
Tabela 3- Teores de umidade das amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L.	57
Tabela 4- Teores de umidade das amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	57
Tabela 5- Teores de cinzas totais das amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	58
Tabela 6- Teores de cinzas totais das amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	58
Tabela 7- Prospecção de compostos fenólicos por CCD do extrato metanólico das folhas de <i>A. occidentale</i> L.	60
Tabela 8- Prospecção de compostos fenólicos do extrato metanólico das cascas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.	60
Tabela 9- Avaliação de diferentes sistemas de solventes em folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	77
Tabela 10- Análise de variância ANOVA <i>one way</i> ($p < 0,05$) para avaliação de solventes (etanol 30%, acetona 30 e 50%) em folhas de <i>A. occidentale</i> L.	79
Tabela 11- Avaliação de diferentes sistemas de solventes em cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	80
Tabela 12- Avaliação de diferentes métodos extrativos em folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	82
Tabela 13- Análise de variância ANOVA <i>one way</i> ($p < 0,05$) para avaliação dos métodos extrativos (refluxo, maceração e ultrassom) em folhas de <i>A. occidentale</i> L.	82
Tabela 14- Avaliação de diferentes métodos extrativos em cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	83
Tabela 15- Análise de variância ANOVA <i>one way</i> ($p < 0,05$) para avaliação dos métodos extrativos (refluxo, maceração e ultrassom) em cascas de <i>A. occidentale</i> L.	83
Tabela 16- Equações da reta e coeficientes de correlação (R^2) das curvas médias de linearidade e dos padrões.	86

Tabela 17- Ensaio de repetibilidade para as amostras de folhas e cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	89
Tabela 18- Ensaio de precisão intermediária para a amostra de folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	90
Tabela 19- Ensaio de precisão intermediária para a amostra de cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	90
Tabela 20- Resultados dos ensaios de exatidão para as amostras de folhas e cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	92
Tabela 21- Ensaio de robustez das soluções amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L.....	94
Tabela 22- Ensaio de robustez das soluções amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	95
Tabela 23- Resultados do ensaio de precisão intermediária das soluções amostra de folhas por CLAE expressos em ácido gálico (AG) e catequina (CAT).	103
Tabela 24- Resultados do ensaio de precisão intermediária das soluções amostra de cascas por CLAE expressos em ácido gálico.....	103
Tabela 25- Resultados obtidos no teste de recuperação para o pico do ácido gálico na solução amostra de folhas e cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	105
Tabela 26- Ensaio de robustez nas soluções amostras de folhas cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	106
Tabela 27- Ensaio de robustez nas soluções amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L.....	106
Tabela 28- Análise do teor de polifenóis totais nas amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L. diferentes localidades.....	108
Tabela 29- Análise do teor de polifenóis totais nas amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.....	108
Tabela 30- Resultados obtidos para análise por CLAE das concentrações de ácido gálico e catequina nas amostras de folhas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.....	116
Tabela 31- Análise por CLAE das concentrações de ácido gálico nas amostras de cascas de <i>A. occidentale</i> L. de diferentes localidades.....	117

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 <i>Anacardium occidentale</i> Linnaeus.....	23
3.2 POLIFENOIS	25
3.2.1 Taninos	27
3.3 DETERMINAÇÃO DE POLIFENOIS	29
3.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	31
3.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	32
3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	37
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	38
4.2.1 Análise granulométrica por tamisação	38
4.2.2 Perda por dessecação – Método gravimétrico	38
4.2.3 Cinzas totais	39
4.3 PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS E CASCAS DE <i>A. occidentale</i>	39
4.3.1 Preparação das amostras	39
4.3.2 Sistema de eluição	40
4.3.2 Sistema cromatográfico por CCD	41
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS METODOLOGIAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS	42
4.4.1 Avaliação de solventes e métodos extrativos	42
4.4.2 Soluções amostra de padrão para doseamento de polifenóis totais	42

4.5 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	43
4.5.1 Linearidade	43
4.5.2 Limite de detecção e quantificação	44
4.5.3 Especificidade	44
4.5.4 Precisão	45
4.5.5 Exatidão	45
4.5.6 Robustez	46
4.6 AVALIAÇÃO DO TEOR DE POLIFENOIS TOTAIS NAS AMOSTRAS DE DIFERENTES LOCALIDADES	46
4.7 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR CLAE-DAD	47
4.7.1 Preparação das amostras	47
4.7.2 Preparação das soluções estoque dos padrões	47
4.7.3 Condições cromatográficas	47
4.8 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS POR CLAE-DAD	49
4.8.1 Especificidade	49
4.8.2 Linearidade	49
4.8.3 Limite de detecção e quantificação	50
4.8.4 Precisão	50
4.8.5 Exatidão	51
4.8.6 Robustez	51
4.9 AVALIAÇÃO DO TEOR DOS MARCADORES NAS AMOSTRAS DE DIFERENTES LOCALIDADES	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	53
5.1.1 Análise granulométrica	53
5.1.2 Perda por dessecação	57
5.1.3 Cinzas totais	58

5.2 PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	59
5.2.1 Cromatografia em camada em delgada (CCD)	59
5.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	70
5.3 AVALIAÇÕES DAS METODOLOGIAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS	74
5.3.1 Avaliação do líquido extrator	74
5.3.2 Avaliação dos métodos extrativos.....	81
5.4 VALIDAÇÕES DOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	83
5.4.1 Linearidade	83
5.4.2 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	85
5.4.3 Especificidade	85
5.4.4 Precisão.....	89
5.4.5 Exatidão	91
5.4.6 Robustez.....	93
5.5 MÉTODOS POR CLAE-DAD	96
5.5.1 Avaliação de metodologia	96
5.5.2 Validação das metodologias	96
5.5.2.1 Especificidade	96
5.5.2.2 Linearidade	100
5.5.2.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	102
5.5.2.4 Precisão	102
5.5.2.5 Exatidão	103
5.5.2.6 Robustez.....	106
5.6 AVALIAÇÃO DE POLIFENOIS NAS AMOSTRAS DE DIFERENTES LOCALIDADES.....	107
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
REFERÊNCIAS	120

1 INTRODUÇÃO

O uso tradicional das plantas medicinais para a prevenção e cura de enfermidades é uma das práticas mais antigas da civilização humana. No Brasil, o conhecimento popular sobre seu uso é oriundo de uma mistura de tradições dos povos Africanos, Europeus e Indígenas (SÁ; ELISABETSKY, 2012). Diante da biodiversidade da flora brasileira e as experiências relacionadas ao conhecimento popular das plantas medicinais, surge a necessidade de correlacionar, nesse âmbito, o saber popular com o científico, o qual é cada vez mais imperioso. (SANTOS et al., 2009; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010).

No Brasil, a fitoterapia vem recebendo amparo legal, com a implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares - SUS (PNPIC) (BRASIL, 2006), as quais visam regulamentar a atuação do governo na área de plantas medicinais e fitoterápicos, favorecendo o seu uso racional e seguro. E essas políticas contribuíram para o fortalecimento da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), além de promoverem a pesquisa e a indústria farmacêutica nessa área.

Segundo a RDC 48/2004, fitoterápico é um medicamento obtido de matérias-primas ativas vegetais, o qual possui segurança e eficácia comprovadas (BRASIL, 2004). Ademais, a padronização de sua matéria-prima é essencial, uma vez que garantem doses uniformes e atenta para os pré-requisitos de qualidade. Para este fim é imprescindível o emprego de métodos analíticos para identificação, quantificação e controle de fitocomplexos, os quais são substâncias oriundas do metabolismo primário e/ou secundário de uma planta medicinal, sendo responsável por seus efeitos biológicos (KLEIN et al., 2010; BRASIL, 2010; CARVALHO et al., 2014).

Diante disto, a impressão digital ou *fingerprint* vem ganhando destaque, pois permite avaliar a composição química dessas matrizes complexas (WANG, 2012; JOTHY; YENG; SASIDHARAN, 2013), através do uso de ferramentas, como a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A primeira técnica é mais simples e propicia resultados rápidos e reprodutíveis (NICOLETTI, 2011). Já a segunda tem como

vantagens possuir alta capacidade de separação, excelente sensibilidade e elevada resolução (YANG et al., 2011).

Outra técnica muito empregada para o doseamento de substâncias ou grupo de substâncias presentes em matrizes vegetais é a espectrofotometria no UV-Vis. Sendo uma ferramenta simples, de custo relativamente baixo, que permite resultados rápidos e dependendo da metodologia empregada apresenta seletividade e especificidade necessária (ABADI et al., 2012; KLEIN et al., 2010).

Em virtude das necessidades normativas no que se refere à regularização de fitoterápicos é obrigatório que o método analítico desenvolvido ou adaptado para determinação dos compostos de interesse da matéria prima vegetal tenha resultados reprodutíveis e confiáveis (BRASIL, 2004). Para isso, o mesmo deve ser validado de acordo com a Resolução Específica (RE) nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e com as normas estabelecidas pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH) (ICH,2005).

Com o intuito de ampliar a variedade de fitoterápicos, que serão disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde foi divulgada a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS), a qual apresenta 71 espécies vegetais com potencial farmacológico. Essa lista tem a finalidade de orientar as pesquisas para a elaboração de novos fitoterápicos disponíveis para a população, com segurança e eficácia comprovadas (BRASIL, 2009). Dentre as plantas dessa lista encontra-se *Anacardium occidentale* Linnaeus, conhecida popularmente como “cajuero”. Suas folhas já possuem atividades farmacológicas comprovadas, tais quais, antioxidante (JAISWAL et al., 2010); antiulcerogênica (KONAN; BACCHI, 2007); antimicrobiana (DAHAKI et al., 2009); anti-inflamatória (PAWAR et al., 2000) e antiviral (GONÇALVES et al., 2005). Quanto as suas cascas são atribuídas atividades antioxidante (ENCARNAÇÃO et al., 2016); hipoglicemiante (ELIAKIM-IKECHUKWU; OBRI; AKPA, 2009); antibacteriana (AREKEMASE; OYEYIOLA; ALIYU, 2011); anti-inflamatória e analgésica (VANDERLINDE et al. 2009).

Estudos já comprovam a presença de polifenóis na espécie, *A. occidentale* e também a relação dessa classe de metabólito secundário com a atividade antioxidante (CHAVES et al., 2010; ENCARNAÇÃO et al., 2016). Além disso, nas últimas décadas, tem-se aumentado o interesse por compostos de origem natural com capacidade antioxidante, devido ao seu potencial para prevenção e tratamento

do câncer, doenças cardiovasculares, crônicas e neurodegenerativas (GIL-CHÁVEZ et al., 2013).

Por sua vez, a composição de metabólitos secundários presentes nas plantas pode sofrer influência de fatores ambientais como, sazonalidade, índice pluviométrico, composição do solo, temperatura, altitude, dentre outros (AKULA; RAVISHANKAR, 2011; TLILI et al., 2015). Tendo em vista a importância biológica dos compostos fenólicos e a influência que o mesmo pode sofrer em relação a esses fatores extrínsecos se torna imprescindível estudos que inter-relacione as condições inerentes ao ambiente e a composição química de espécies vegetais. Pois desta forma, contribuem para a autenticidade, padronização dos constituintes e a qualidade dos insumos vegetais utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos (MONTEIRO et al., 2006; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar o perfil cromatográfico típico por CCD de folhas e cascas de *A. occidentale*, além de desenvolver métodos analíticos por CLAE e por Espectrofotometria no UV-Vis, para a quantificação de polifenóis. Por fim, empregar as técnicas analíticas para avaliar qualitativamente e quantitativamente a influência de diferentes localidades sobre a composição dos compostos fenólicos nas drogas vegetais de *A. occidentale*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias analíticas para serem utilizadas como ferramentas na padronização de polifenóis das folhas e cascas de *Anacardium occidentale* L..

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização físico-química das folhas e cascas de *A. occidentale*;
- Estabelecer perfil cromatográfico típico por CCD e CLAE dos polifenóis das folhas e cascas de *A. occidentale*;
- Avaliar a influência de diferentes métodos extrativos e solventes no teor de polifenóis totais por espectrofotometria por UV-Vis;
- Adaptar e validar metodologia analítica por espectrofotometria no UV-Vis para a quantificação de polifenóis em folhas e cascas de *A. occidentale*;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE para a quantificação de ácido gálico em folhas e catequina em cascas de *A. occidentale* L..
- Investigar a variabilidade qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos das folhas e cascas de *A. occidentale* L. coletadas em diferentes localidades.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Anacardium occidentale* Linnaeus

Anacardium occidentale L., espécie vegetal popularmente conhecida como cajueiro, pertence à família Anacardiaceae, que compreende 14 gêneros e 53 espécies no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2015). Essa planta é nativa das regiões Norte e Nordeste do Brasil, e também é largamente cultivada na Índia e África. Os Estados brasileiros que se destacam são o Ceará, como maior produtor de castanha e pseudofrutos de caju, seguido pelo Rio Grande do Norte e Piauí (VAUGHAN; GEISSLER, 2009; LEITÃO et al., 2013; ARAÚJO, 2015). A planta apresenta porte variado e se distingue em dois grupos: cajueiro comum (*Anacardium occidentale* L.) e cajueiro anão-precoce (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*). O primeiro grupo pode atingir de 12 a 14 m de altura, enquanto que o segundo pode atingir 4 m de altura (ARAÚJO, 2015).

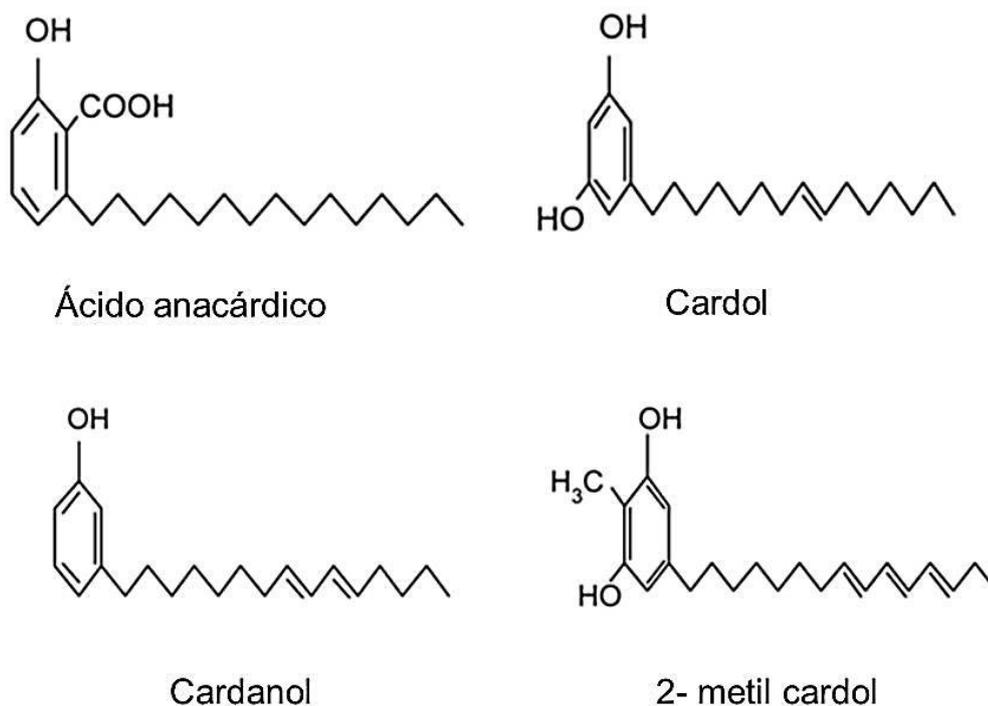
A espécie *A. occidentale* possui caule reto ou tortuoso; ramosa desde a base, com ramos sinuosos. Suas folhas são alternas, pecioladas, coriáceas e ovais. Quando jovens, as folhas são vermelho-arroxeadas, porém, ao se tornarem adultas adquirem coloração verde. As flores são pequenas, paniculadas ramificadas, terminais e verde esbranquiçada ou avermelhadas. O caju compreende um pedúnculo floral (pseudofruto) de coloração amarela, alaranjada ou vermelha, já o verdadeiro fruto, a castanha, possui forma reniforme de 2 cm. Sendo estes bastante consumidos pela população (MATTOS, 2007; ITF, 2008; ARAÚJO, 2015).

Na medicinal tradicional, os frutos e pseudofrutos de *A. occidentale* são utilizados para o tratamento de anemias, diabetes, queimaduras e úlceras. As cascas do caule são utilizadas para tratamento de aftas, afecções na garganta, tratamento de feridas, diarreia, hipertensão, diabetes, reumatismo, hemorróidas e disfunção sexual. Já as folhas são usadas para o tratamento de gastrites, diarreias, diabetes, hipertensão, dores de cabeça e como antiemético (GONÇALVES et al., 2005; MATTOS, 2007; AGRA et al., 2008; ITF, 2008; CHABI SIKI et al.; 2013; AJILEYE et al., 2015; ENCARNAÇÃO et al., 2016).

Algumas atividades comprovadas para a espécie tal como antimicrobiana, anticancerígena, antiparasitária e antiobesidade, já foram relacionadas à presença

do ácido anacárdico, um composto fenólico presente na castanha dessa espécie, o qual possui uma estrutura fundamental do ácido salicílico substituído com uma cadeia alquílica saturada ou insaturada. A figura 1 mostra a estrutura química dessa substância e alguns dos seus respectivos derivados. (HEMSHEKHAR et al., 2011).

Figura 1- Estruturas químicas do ácido anacárdico e seus derivados.



Fonte: HEMSHEKHAR et al., 2011

Algumas atividades farmacológicas já foram comprovadas para as folhas e cascas de *A. occidentale* e estão descritas nos quadros 1 e 2.

Quadro 1- Atividades farmacológicas das folhas de *A. occidentale* L..

Atividades	Referências
Antioxidante	JAISWAL et al., 2010
Antiulcerogênica	KONAN; BACCHI, 2007
Antimicrobiana	DAHAKÉ et al., 2009
Anti-inflamatória	PAWAR et al., 2000
Antiviral	GONÇALVES et al., 2005

Quadro 2- Atividades farmacológicas das cascas de *A. occidentale* L..

Cascas	Referências
Antioxidante	ENCARNAÇÃO et al., 2016
Hipoglicemiante	ELIAKIM-IKECHUKWU
Antibacteriana	AREKEMASE; OYEYIOLA; ALIYU, 2011
Analgésica/Anti-inflamatória	VANDERLINDE et al. 2009

Em relação à composição química da espécie, análises dos pseudofrutos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à detecção por espectrometria de massas revelaram a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (BRITO et al., 2007; MICHOU DJEHOUN-MESTRES et al., 2009). Estudos realizados por Chaves e colaboradores (2010), identificaram e isolaram através de cromatografia em coluna, a partir do extrato etanólico das cascas do caule obtido por maceração, mistura de esteroides e ácidos anacárdicos e no extrato etanólico do tegumento (castanha), também obtido por maceração, triterpenoides (lupeol e β -amirina) e monômeros de taninos condensados (catequina e epicatequina).

Análises realizadas por cromatografia em camada delgada nos extratos etanólicos e aquosos de folhas da referida espécie revelaram a presença de saponinas, flavonoides, alcaloides, taninos e compostos fenólicos (JAISWAL et al., 2012). Na triagem fitoquímica de extrato fluido e tintura a 20% das folhas de *A. occidentale* foram verificadas cumarinas, saponinas, flavonoides, triterpenos, compostos fenólicos e taninos (AGUILAR et al., 2012). Também foram obtidos por hidrodestilação, a partir das folhas de cajueiro, três tipos de óleos essenciais, sendo estes: β -ocimeno, α -copaeno e δ -cadineno (MAIA; ANDRADE; ZOGHBI, 2000).

3.2 POLIFENOIS

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, compreendem uma classe de metabólitos secundários sintetizados por diversos vegetais e a maioria dos microrganismos. Até o momento mais de 8000 estruturas fenólicas têm sido encontradas. Algumas de suas estruturas são simples e outras são mais complexas, mas caracteriza-se pela presença de em anel aromático substituído por um ou mais

grupamentos hidroxila. Esses compostos podem ser classificados de acordo com a estrutura do esqueleto principal, como pode ser observado no Quadro 1 (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010; LIU et al., 2015). Nos vegetais essas estruturas podem se apresentar na forma livre ou agrupada a açúcares – heterosídeos (ANGELO; JORGE, 2007). Sendo algumas delas amplamente distribuídas nos vegetais, como é o caso dos derivados dos ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010).

Quadro 3- Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides
C6-C4	Nafitoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antoquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides, isoflavonoides
(C6-C3) ₂	Lignanas
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

C6- anel benzênico; Cx = cadeia substituinte com x átomos de carbono. Fonte: (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010; ANGELO; JORGE, 2007).

Sobre sua biogênese, esses compostos podem ser originados por duas rotas biogênicas. Uma pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos, ou por meio da via do acetato, a partir do acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. Dependendo da rota pela qual se originam ocorre mudança do padrão de substituição desses compostos. Logo, a via do ácido chiquímico origina grupos hidroxila na posição orto. Já a via do acetato origina compostos com grupamentos hidroxila na posição meta. Vale a pena ressaltar, que os derivados fenólicos podem

ter rotas alternativas, ou seja, produzir um mesmo composto, por meio de diferentes intermediários (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010).

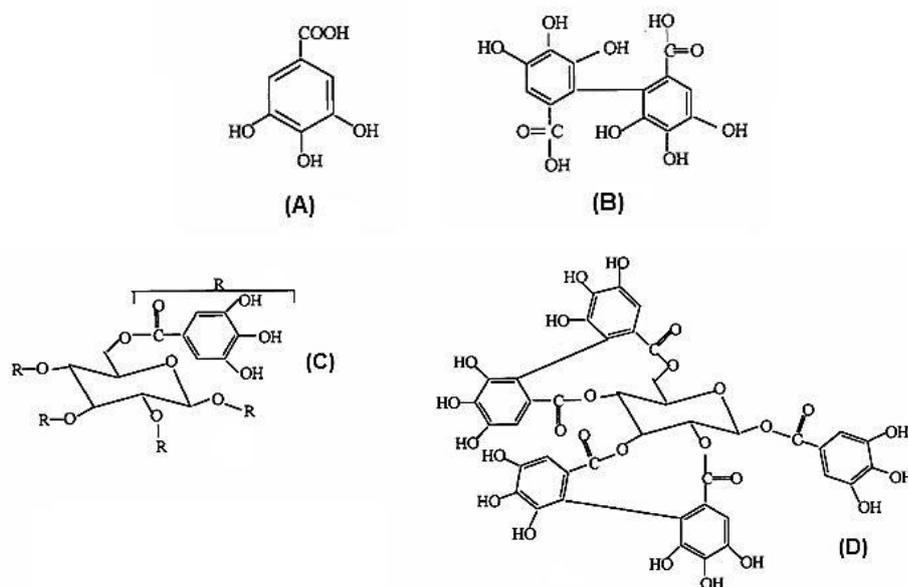
Os polifenóis desempenham papel importante nos vegetais, os protegendo contra patógenos, herbívoros e radiação ultravioleta. Essa classe de compostos tem sido estudada devido ao seu envolvimento na prevenção de doenças crônicas, tais como doença cardiovascular, câncer, osteoporose, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; NACZK; SHAHIDI, 2004; QUIDEAU et al., 2011; DAGLIA, 2012).

3.2.1 Taninos

Os taninos são compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, com massa molecular de 500 a 3000 Daltons, solúveis em água e com capacidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas. Essa ligação com as proteínas se dá através de seus grupos hidroxila (MONTEIRO et al., 2005; SANTOS; MELLO, 2010). Historicamente, as plantas que continham taninos eram utilizadas no curtimento do couro, o qual é um processo de tratamento que visa impedir a putrefação da carne e sua utilização posterior na indústria (NOZELLA, 2006; SANTOS; MELLO, 2010).

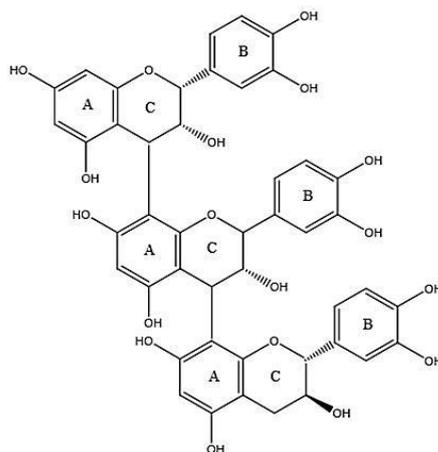
Esses compostos são originados a partir do metabolismo do ácido chiquímico e se dividem em dois grupos, que se distinguem de acordo com suas estruturas químicas, em taninos hidrolisáveis e condensados. O primeiro grupo é caracterizado pela presença de um poliálcool central, geralmente uma β -D-glicose, sendo suas hidroxilas esterificadas com ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagitaninos) (Figura 2). O segundo grupo são oligômeros e polímeros de unidades de flavan-3-ol, representada pela catequina ou epicatequina ou por unidades de flavan-3,4-diol, que são as leucoantocianidinas. Os taninos condensados são também denominados de proantocianidinas (Figura 3), por sua capacidade de formarem pigmentos avermelhados, da classe das antocianidinas na presença de ácido mineral diluído a quente (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001; BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; JANOVIK et al., 2009; SANTOS; MELLO, 2010; ARAPITSAS, 2012; SARTORI, 2012).

Figura 2- Estrutura dos taninos hidrolisáveis. (A) ácido gálico, (B) ácido elágico, (C) galotanino, (D) elagitanino.



Fonte: BLADT; SINGH; SHARMA, 1998.

Figura 3- Estrutura química de um tanino condensado.



Fonte: BERNARDES et al., 2011.

Os taninos hidrolisáveis possuem ligações éster-carboxila e podem sofrer hidrólise em meio ácido ou básico produzindo carboidratos e ácidos fenólicos. Os galotaninos possuem distribuição restrita no reino vegetal, tendo ocorrência nas famílias Leguminosae, Fabaceae, Combretaceae, Myrtaceae, inclusive Anacardiaceae (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; ARAPITSAS, 2012). Em relação aos taninos condensados, estes podem conter de duas a quarenta unidades

de flavonoides ligadas por ligações C₄-C₆ ou C₄-C₈ e são estruturas mais complexas e resistentes à hidrólise. Sendo a ocorrência destes compostos mais perceptível em angiospermas e gimnospermas, principalmente em plantas lenhosas (SANTOS; MELLO, 2010).

Na medicina tradicional, as plantas taníferas são utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades, tais como, diarreia, hipertensão, hemorragias, queimaduras, feridas, distúrbios gástricos e no sistema urinário e processos inflamatórios no geral. O seu uso para o tratamento de ferimentos, queimaduras e inflamações possuem uma estreita relação com a propriedade que os taninos têm de precipitar as proteínas das células de mucosa e tecido, formando uma barreira protetora nos locais lesionados contra a proliferação de microrganismos (PANSERA et al., 2003; SANTOS; MELLO, 2010).

Também possuem atividades antifúngica e antibacteriana, as quais estão relacionadas a três hipóteses. A primeira através da inibição das enzimas de bactérias e fungos e/ou a complexação dos substratos dessas enzimas. A segunda pressupõe a ação dos taninos sob as membranas dos microrganismos acarretando em alterações no seu metabolismo e a última hipótese estaria relacionada à complexação dos taninos com os íons metálicos, os quais são essenciais para o metabolismo dos microrganismos (SANTOS; MELLO, 2010).

Neste contexto, os taninos têm sido objeto de estudo, sendo amplamente empregados como marcadores para o controle de qualidade de matérias-primas vegetais. Sendo deste modo, notória a necessidade de padronização e validação de métodos analíticos para a quantificação desses compostos (VERZA et al., 2007; SANTOS; MELLO, 2010).

3.3 DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS

Para a determinação de polifenóis em matrizes vegetais, os mesmos devem ser extraídos adequadamente levando em consideração a escolha de condições ótimas. Logo se faz necessário a padronização das soluções extrativas obtidas durante o processo, a qual constitui o primeiro passo durante o desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos. Esta etapa tem objetivo de garantir ao produto final qualidade, segurança e eficácia (CUNHA et al., 2009). Para isso, devem-se levar em

consideração alguns fatores que podem contribuir para eficiência da extração, tais como as técnicas de extração, solventes, tempo, temperatura, proporção droga-solvente (SONAGLIO et al., 2010; KARABEGOVIĆ et al., 2014).

Nesse aspecto, a escolha do solvente extrator é fundamental para extração adequada dos componentes desejáveis da matéria prima vegetal. O mesmo deve ser o mais seletivo possível e possuir polaridade semelhante da substância, a qual se deseja extrair (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010). Na literatura existem relatos do uso de diversos sistemas de solventes para a extração de compostos fenólicos de matérias primas vegetais, dentre eles destaca-se água, acetona, etanol e metanol ou até mesmo mistura desses solventes (JUN et al., 2011; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; DENG et al., 2014; GHITESCU et al., 2015; ČUJIC et al., 2016). Segundo o estudo de DiCiaula e colaboradores (2014) a mistura ternária de solventes nas mesmas proporções (água, etanol e acetona) mostraram melhores rendimentos, tanto no teor de polifenóis, quanto na atividade antioxidante de extratos de *Schinus terebinthifolius*. Já a pesquisa realizada por Lonni e colaboradores (2012) comprovou que os maiores teores de polifenóis totais foram obtidos através do uso de misturas quaternárias (água, metanol, acetona e etanol) em cascas de *Trichilia catigua*.

Em relação à escolha do método extrativo adequado deve-se levar em consideração a natureza do material vegetal e da substância de interesse, assim como se torna necessário que os mesmos sejam economicamente viáveis, aplicáveis a indústria e possuam baixo consumo de energia (KARABEGOVIĆ et al., 2014). O uso de técnicas convencionais que utilizam aquecimento para extração de polifenóis possuem algumas limitações, devido ao longo período de análise que muitas vezes são requeridos, degradação dos compostos ativos termossensíveis, podendo resultar num baixo rendimento da extração. Em contrapartida, quando se deseja alguma substância (s) de material vegetal de natureza rígida o uso de métodos extrativos com aquecimento se faz necessário (MARQUES; VIGO, 2009). Além disso, outros métodos extrativos têm sido bastante aplicados para a extração de compostos fenólicos, como o ultrassom, técnica que age de maneira eficaz no rompimento das paredes celulares de matrizes vegetais, liberando os componentes ativos durante o processo de extração (LI; CHEN; YAO, 2005; DENG et al., 2015).

3.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Uma das técnicas aplicadas para determinação desses compostos é a espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis). A espectrofotometria está fundamentada na absorção e/ou emissão de energia eletromagnética nas regiões do espectro eletromagnético pelos átomos e moléculas (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). Sendo esta de vasta aplicação nos laboratórios de pesquisa e de controle de qualidade, pois permite quantificar determinada classe de compostos químicos e ainda se destaca por ser uma técnica simples, robusta e de custo relativamente baixo (ABADI et al., 2012).

Para o doseamento de polifenóis por espectrofotometria UV-Vis é necessário o uso de reagentes específicos, a fim de tornar esses compostos detectáveis por esta técnica. Vários métodos foram desenvolvidos para o doseamento de polifenóis em drogas vegetais, dentre eles o Folin-Denis e Folin-Ciocalteu. O primeiro é um método inespecífico, pois determina tanto os compostos fenólicos, quanto outras substâncias redutoras existentes na matéria-prima vegetal. Já o método de Folin-Ciocalteu tem sido mais utilizado, por ser mais sensível a redução pelos polifenóis e diminuir a tendência de precipitação, pois o reagente utilizado neste método contém sulfato de lítio, responsável por evitar este inconveniente (ÂNGELO; JORGE, 2007; VERZA, 2006).

O doseamento de polifenóis por ambos os métodos baseia-se no mesmo princípio, através de reações de oxidorredução. O reagente utilizado nestes métodos consiste numa mistura de ácidos fosfomolibdênio e fosfotúngstico, os quais na presença de ácidos fenólicos são reduzidos e formam-se um cromóforo azul (Fosfomolibdênio-fosfotúngstico). Para que esta reação ocorra, o pH deve estar alcalino, o qual é necessário para a manutenção do fenol na forma fenolato. Logo, a absorção máxima irá depender da concentração de polifenóis e do pH da solução (ÂNGELO; JORGE, 2007; VERZA et al., 2007; SOUSA et al., 2007; BUENO et al., 2012; DICIAULA et al., 2014).

3.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) é amplamente utilizada para determinação de compostos presentes em espécies vegetais, devido sua simplicidade, baixo custo e rapidez (LOPES, 2006). O uso dessa ferramenta permite a identificação de compostos fenólicos, por meio de luz ultravioleta e derivatização com o uso de reagentes específicos, tais como cloreto férrico, vanilina clorídrica, sais de ácido fosfomolibdico e aldeídos aromáticos em meio ácido (CARVALHO; GOSMANN; SCHENCKEL, 2010).

Com o avanço tecnológico surgiram outras técnicas cromatográficas, automatizadas e mais eficientes, que permitem melhor reprodutibilidade nas análises, como a Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) (NICOLETTI, 2011). Além disso, esta técnica também tem sido utilizada como ferramenta para realização do controle de qualidade de fitoterápicos (DEATTU; SUSEELA; NARAYANAN, 2013; VYAS et al., 2013; GUPTA et al., 2013; SHEIKH et al., 2015).

Estudos realizados por Das e colaboradores (2013) demonstraram por CCDAE a presença de compostos fenólicos em extratos de *Diplazium esculentum* Retz. Gulzemic e colaboradores (2015) desenvolveram e validaram um método por CCDAE para o extrato aquoso das flores de *Matricaria recutita* L. (camomila), utilizando apigenina 7-O-glicosídeo, marcador biológico da espécie. Esta pesquisa permitiu através desta técnica distinguir outras espécies que se assemelham a camomila. Análises realizadas por Kasote e colaboradores (2015) aplicaram a técnica de CCDAE acoplada a espectrometria de massas para identificar cinco polifenóis em extrato metanólico de *Apis mellifera* L. (propólis). Sija e colaboradores (2015) identificaram e quantificaram ácido anacárdico por CCDAE nos extratos metanólicos de diferentes partes do cajueiro. Já o estudo realizado por Jaiswal e colaboradores (2013) quantificaram por essa técnica, catequina em extrato aquoso e etanólico nas folhas de *A. occidentale*.

Outra técnica cromatográfica que merece destaque é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual emprega colunas empacotadas (fase estacionária) com micropartículas de 1 a 10 µm. Devido ao emprego de partículas extremamente pequenas, esta técnica utiliza bombas para líquidos de alta precisão e exatidão para

operações pressões de até 7348 psi. Esta ferramenta tem sido útil por sua alta capacidade de separação e quantificação, além de propiciar elevada resolução, eficiência e sensibilidade (CIOLA, 1998; CASS; DEGANI, 2009; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). O uso desta técnica tem sido realizada com o acoplamento a detectores ultravioleta (UV), arranjo de fotodiodos (DAD), detectores eletroquímicos – por fluorescência; com Espectrofotômetro de Massa ou Ressonância Magnética Nuclear. Com isso, tem se tornado possível análise de mistura complexas, como os extratos vegetais (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006; TISTAERT; DEJAEGER; HEYDEN, 2011; WYREPKOWSKI et al., 2014).

Estudos realizados por Barbosa e colaboradores (2014) permitiu detectar por CLAE-DAD compostos fenólicos em frações metanólica, etanólica e de aceto de etila das cascas do caule de *Anacardium microcarpum*. Enquanto Lopes et al (2010) desenvolveu e validou método analítico por CLAE para determinação de epicatequina em folhas de *Maytenus ilicifolia* (Schrad.), a fim de fornecer base científica para o controle de qualidade desta parte da planta da referida espécie.

O uso de técnicas cromatográficas tem como objetivo determinar os constituintes químicos de espécies vegetais (FALKENBERG; SANTOS; SMÕES, 2010). Desse modo, a utilização dessas ferramentas permite traçar um perfil característico da espécie vegetal a ser estudada, ou seja, verificam quais são as substâncias e/ou classe de substâncias que são comuns àquela espécie. Com isso, garante a autenticidade e controle de qualidade da matéria prima (TISTAERT; DEJAEGER; HEYDEN, 2011).

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O controle de qualidade, por meio de análises químicas de produtos naturais é uma etapa que se torna dificultosa, tendo em vista a complexidade química dos mesmos. Logo, a quantificação de todas as substâncias presentes nessas matrizes seria dispendioso e inviável para a aplicação na indústria farmacêutica. Diante disso, a comunidade científica tem adotado a estratégia de eleger uma substância marcadora presente no extrato indicando que se a mesma estiver presente em quantidade adequada, os demais componentes também estarão igualmente representados. Ademais, são aplicados métodos analíticos para a determinação de

um composto ou grupo de metabólitos, através da utilização de técnicas, tais como, espectrofotometria no UV-VIS, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, entre outros métodos de quantificação (ZENG et al. 2008; KLEIN et al., 2009; MARQUES et al., 2013).

A aplicação de métodos analíticos para o controle de qualidade de fitoterápico é necessário para a padronização dos seus princípios ativos. Além disso, quando não existe em compêndios oficiais um método para esta finalidade, o mesmo deve ser desenvolvido e validado, conforme as exigências legais, a fim de garantirem resultados confiáveis e eficazes (BRASIL, 2010; BATISTA et al., 2011).

Segundo a Resolução 899/2003 (BRASIL, 2003), a validação demonstra que o método é apropriado para a finalidade, a qual se pretende. Logo, a validação é um processo sistematizado, que permite que a execução do processo analítico siga os critérios estabelecidos pelas legislações vigentes, além de assegurar que os métodos sejam reprodutíveis em diferentes laboratórios, de forma precisa e exata, dentro dos limites de confiança (VERZA, 2006). Podendo este processo de validação ser aplicado quando um método já existente for modificado ou quando um método novo for desenvolvido (INMETRO, 2010).

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Para atestar a eficiência dos métodos na rotina laboratorial, alguns parâmetros são exigidos pela Resolução Específica (RE) nº 899/03 da ANVISA e recomendados pela *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005) para a validação, sendo eles:

- *Especificidade e seletividade*: analisa a capacidade do método de medir exatamente um composto na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e outros componentes da matriz. Em testes qualitativos demonstra a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Na análise quantitativa, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas/padrão e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (BRASIL, 2003).

- *Linearidade*: é a capacidade de uma metodologia demonstrar que o sinal analítico denominado de variável dependente (y), é diretamente proporcional à sua concentração denominada de variável independente (x), dentro de um intervalo específico. Sendo a equação matemática que descreve essa relação conhecida como curva de calibração (RIBEIRO et al., 2008). O coeficiente de determinação é calculado pela regressão linear através do método dos mínimos quadrados. Os dados obtidos devem ter o coeficiente de determinação $> 0,99$, indicando que 99% das variabilidades experimentais são explicadas pelos modelos matemáticos encontrados (BRASIL, 2003). Este parâmetro é avaliado, através da medição da amostra em diferentes concentrações, construindo uma curva de calibração. Sendo recomendadas no mínimo cinco concentrações variadas (CASS; DEGANI, 2009).
- *Limite de detecção*: é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).
- *Limite de quantificação*: é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).
- *Precisão*: representa a habilidade da metodologia analítica de reproduzir o mesmo resultado, sempre que o procedimento for executado. A precisão é subdividida em três etapas (CASS; DEGANI, 2009; BRASIL, 2003):
 - Repetibilidade (intracorrída): expressa a fidelidade dos resultados nas mesmas condições operacionais, aplicadas em um curto intervalo de tempo (BRASIL, 2003).
 - Precisão intermediária (intercorrída): expressa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para esta determinação é recomendado um mínimo de 2 (dois) dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003).
 - Reprodutibilidade: mede a precisão do método quando o mesmo é executado em laboratórios diferentes. Geralmente são aplicados à

padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em Farmacopeias (BRASIL, 2003).

- *Exatidão:* é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações num intervalo linear da metodologia, ou seja, em 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, em triplicata para cada concentração (BRASIL, 2003).

- *Robustez:* analisa a capacidade do método em resistir a pequenas variações nas condições experimentais. As mudanças acabam refletindo as alterações que podem acontecer quando o método for executado em outros laboratórios, com diferentes analistas e/ou equipamentos (BRASIL, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e cascas do caule de *Anacardium occidentale* L. foram coletadas em diferentes cidades de Pernambuco (Recife, Limoeiro, Vitória de Santo Antão e Bezerros) e uma no Piauí (Floriano). Os materiais vegetais foram coletados, conforme o quadro 2. As exsiccatas foram depositadas no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA-PE), sob nº 89991 (Recife); nº 90673 (Limoeiro); nº 90585 (Vitória de Santo Antão); nº 89990 (Bezerros) e nº 90584 (Floriano).

Na preparação da matéria-prima vegetal, tanto as folhas quanto as cascas foram submetidas à secagem em estufa (modelo 82/480, Lucadema[®]) a 40°C, durante 48 h, e posteriormente pulverizadas em moinho industrial (modelo 340, Adamo[®]).

Quadro 4- Período de coleta das folhas e cascas de *A. occidentale* L.

Localidades	Período da coleta
Folhas	
Recife	Julho/2014
Limoeiro	Setembro/2014
Vitória	Março/ 2015
Bezerros	Janeiro/ 2015
Piauí	Janeiro/2015
Cascas	
Recife	Junho/2015
Limoeiro	Novembro/2015
Vitória	Junho/2015
Bezerros	Maió/2015
Piauí	Agosto/2015

Fonte: Autoria própria.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Para o controle de qualidade físico-químico das amostras foram empregados métodos preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010). Os ensaios realizados foram: granulometria; determinação de umidade e cinzas totais da matéria-prima vegetal. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados expressos como média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

4.2.1 Análise granulométrica por tamisação

Para este ensaio, foram pesados cerca de 25 g de cada amostra e foram submetidas à passagem através de tamises, previamente tarados, com abertura de malha de 850, 600, 425, 250, 150 e 90 µm e a base sem abertura. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 min em tamisador (Bertel®). Logo após este processo, as frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas. Os dados foram analisados através de métodos gráficos, construindo-se um histograma de distribuição e curvas de retenção e passagem para determinação do diâmetro médio das partículas.

4.2.2 Perda por dessecação – Método gravimétrico

Foram pesados cerca de 1 g de cada amostra em pesa-filtros, previamente dessecados e tarados. Em seguida, foram colocados em estufa por 2 h à temperatura de 105°C. Os pesa-filtros contendo a amostra foram resfriados em dessecador por 30 min à temperatura ambiente e, em seguida pesados. Após isso, foram recolocados em estufa por mais 1 hora, resfriados e novamente pesados. O procedimento foi repetido até alcançar peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, segundo a equação 1:

$$PD = \frac{P1 - P2}{Pa} \times 100 \quad (1)$$

Onde: PD = Perda por Dessecação (%); P1 = Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g); P2 = Peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g); Pa = peso da amostra antes da dessecação (g).

4.2.3 Cinzas totais

Foram pesados cerca de 3 g de cada amostra em cadinhos, previamente incinerados e tarados. Em seguida os cadinhos foram submetidos ao seguinte gradiente de temperatura: 200 °C ± 25 °C durante 30 minutos, seguido de 400 °C ± 25 °C durante 60 minutos e 600 °C ± 25 °C durante 90 minutos. Após esse período, os cadinhos contendo a amostra foram retirados da mufla, resfriado em dessecador por 30 min à temperatura ambiente e pesados. Depois, os cadinhos foram recolocados na mufla à temperatura de 600 °C ± 25 °C por 1h e foram novamente resfriados e pesados. O procedimento foi repetido até alcançar peso constante. Os teores de cinzas foram calculados segundo a equação 2:

$$CT = \frac{C2 - C1}{Ca} \times 100 \quad (2)$$

Onde: CT = Teor de Cinzas (%); C2 = Peso do cadinho com a amostra após incineração (g); C1= Peso do cadinho vazio (g); Ca = Peso da amostra antes da incineração (g).

4.3 PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS E CASCAS DE *A. occidentale*

Os compostos fenólicos analisados por CCD foram: flavonoides, derivados cinâmicos, cumarinas, taninos hidrolisáveis e condensados.

Sendo a confirmação da presença de tanino hidrolisável (ácido gálico) e tanino condensado (catequina) e flavonoides realizadas pelo método desenvolvido por CLAE-DAD (item 4.7).

4.3.1 Preparação das amostras

As amostras das folhas foram preparadas utilizando 2 g de droga vegetal e 10 mL de metanol P.A. em erlenmeyer de 50 mL. A mistura foi submetida à extração em banho de ultrassom (modelo Ultracleaner 1600A, Unique[®]) por 30 minutos. Todo o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 20 mL e o volume completado com metanol P.A.. A mistura foi mantida em repouso para decantar, em seguida foi filtrada através de papel de filtro desprezando-se os primeiros 4 mL da solução e o restante do filtrado foi utilizado para realizar as análises em cromatografia em

camada delgada (CCD). As amostras de cascas do caule foram obtidas da mesma forma descrita anteriormente diferindo apenas, que o método extrativo foi sob refluxo (banho maria, modelo LUCA-150, Lucadema) à 85 °C.

As soluções dos padrões (catequina, ácido gálico, quercetina, ácido clorogênico, ácido caféico e cumarina) foram preparados a partir de 1 mg dos mesmos e dissolvidos em 1 mL de metanol P. A. obtendo desse modo, soluções a 1 mg/mL.

4.3.2 Sistemas de eluição

Os sistemas de eluição utilizados para cumarinas, taninos condensados e hidrolisáveis foram preparados baseando-se nos sistemas propostos por Wagner e Bladt (2001) e os demais sistemas foram otimizados no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Pernambuco, sendo alguns de acordo com as polaridades e os fatores de retenção (Rf) obtidos para os padrões de referência utilizados. No quadro 3 estão descritos os sistemas, padrões e reveladores utilizados.

Quadro 5- Sistemas cromatográficos empregados para obtenção do perfil fitoquímico típico das folhas e cascas de *A. occidentale* L.

Classe de metabólito	Sistema	Padrão	Revelador	Coloração
Tanino condensado	AcOEt:HCOOH: H ₂ O(90:5:5)	Catequina	Vanilina Clorídrica	Vermelho
Taninos hidrolisáveis	AcOEt:HCOOH:H ₂ O(90:5:5)	Ácido Gálico	Cloreto Férrico	Azul escuro
Flavonoide	AcOEt:HCOOH:H ₂ O(90:5:5)	Quercetina	NEU +PEG	Amarelo ou laranja
Derivado cinâmico	AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O (100:11:11:26)	Ác. clorogênico	NEU + PEG	Azul fluorescente
	AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O (100:11:11:26)			
	AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O (100:2:11:4)	Ác. caféico	NEU + PEG	Verde fluorescente
Tolueno:AcOEt:MeOH:HCOOH* (75:25:40:6)				
Cumarina	EtOEt:Tolueno:AcOH10%(50:50:50)	Cumarina	KOH + UV	Verde fluorescente

AcOEt = Acetato de etila; HCOOH = Ácido fórmico; H₂O = Água; AcOH = Ácido acético; MeOH = metanol; EtOEt = Éter etílico; NEU = ácido etilborilaminoéster a 1% em metanol; PEG = Propilenoglicol; UV = ultravioleta. (*) Utilizado para as análises de cascas. Fonte: Autoria própria.

4.3.3 Sistema cromatográfico por CCD

Foram aplicados 20 µL das amostras das cinco cidades e 7 µL dos padrões utilizados com o auxílio de um equipamento semi-automático modelo Linomat V (Camag®). Os cromatogramas foram desenvolvidos em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,2 mm de espessura adsorvida em suporte de alumínio (Macherey-Nagel®) com dimensões de 10 x 10 cm. A largura das bandas e a distância entre as mesmas foram padronizadas, sendo 1,00 cm e 1,48 cm, respectivamente. Antes de cada processo de separação a cuba cromatográfica CAMAG® (10x10 cm) foi saturada com o sistema de eluição. Por fim, os cromatogramas obtidos foram digitalizados após a revelação com auxílio de Fotodocumentador (UVP®) com câmera (modelo EOS1100D, Canon®).

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS METODOLOGIAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

4.4.1 Avaliação de solventes e métodos extrativos

As soluções extrativas das folhas e cascas (Recife - PE) foram obtidas sob refluxo com diferentes solventes (água, acetona e etanol) e misturas de acetona:água e etanol:água (30 e 50%, v/v), baseando-se no método da Farmacopeia Brasileira (2010) desenvolvido para a espécie - *Barbadetimani cortex*, sendo este método adaptado para a espécie estudada. A extração foi realizada utilizando 0,5 g de droga vegetal, em balão de fundo redondo e adicionando 30 mL dos solventes ou mistura dos solventes citados anteriormente. A solução foi mantida sob uma temperatura de 85 °C, durante 30 minutos e, em seguida, resfriada até temperatura ambiente. Todo o conteúdo foi transferido para balão volumétrico com capacidade para 50 mL e o volume ajustado com os solventes analisados. A mistura foi mantida em repouso para decantar, em seguida foi filtrada através de papel de filtro desprezando-se os primeiros 10 mL. O restante do filtrado constituiu a Solução Estoque (**SE** - 10 mg/mL).

Após escolha do solvente, foram avaliados os métodos extrativos: refluxo em banho maria (modelo LUCA-150, Lucadema[®]), maceração sob agitação (modelo RO15P, Agitador IKA[®]) e ultrassom (modelo Ultracleaner 1600A, Unique[®]). Sendo executados conforme a metodologia citada anteriormente. Os métodos de ultrassom e maceração foram executados a temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

4.4.2 Soluções amostra e padrão para o doseamento de polifenóis totais

Para preparação da amostra, 110 µL da **SE** das folhas e cascas foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de reagente Folin-Ciocalteu, 10 mL de água destilada e o volume completado com solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) a 29% (m/v). Após 30 minutos da adição do último reagente, a absorvância foi mensurada em espectrofotômetro ($\lambda = 760$ nm), utilizando água destilada para ajuste do zero (adaptado de FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os teores de polifenóis foram calculados e

expressos em g% de pirogalol, ácido gálico e catequina para as folhas e em g% de pirogalol e ácido gálico para as cascas.

$$TPT = \frac{FD \times A_1 \times m_2}{A_2 \times m_1} \quad (3)$$

Onde: *TPT* = teor de polifenóis totais em g% de pirogalol/ácido gálico/catequina; *FD* = Fator de diluição da amostra; *A*₁ = absorvância da solução amostra para polifenóis totais; *A*₂ = absorvância da solução padrão; *m*₁ = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água; *m*₂ = massa do padrão, em gramas.

Para o preparo das soluções padrões de pirogalol, ácido gálico e catequina era transferido 50 mg dos respectivos padrões para um balão volumétrico de 100 mL e adicionava água destilada quantitativamente até completar o volume (Solução padrão 1 – SP1 a 0,5 mg/mL). Desta solução foi retirado 5 mL e transferia para balão volumétrico de 100 mL e completava o volume com água destilada (Solução padrão 2 – SP2 a 0,025 mg/mL). Posteriormente, foi transferido 2 mL da SP2, 1 mL Folin e 10 mL de água destilada para balão volumétrico de 25 mL e completava o volume com solução de carbonato de sódio a 29% (m/v) (0,002 mg/mL) e determinava absorvância em 760 nm (*A*₂) após 30 minutos, utilizando água destilada para ajuste do zero.

4.5 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

O método extrativo que apresentou maior teor de polifenóis totais, tanto para folhas, quanto para cascas oriundas das cidade de Recife-PE foi validado de acordo com os parâmetros preconizados pelo *International Conference Harmonization* (ICH, 2005) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), utilizando como parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

4.5.1 Linearidade

A curva de linearidade para a amostra das folhas foi construída utilizando cinco concentrações na faixa de 0,015 a 0,055 mg/mL. Já a curva de linearidade

para a amostra das cascas foi construída utilizando cinco concentrações na faixa de 0,008 a 0,040 mg/mL.

As curvas de calibração para os padrões analisados foram construídas utilizando cinco concentrações: de 0,001 a 0,005 mg/mL para o pirogalol; 0,002 a 0,008 mg/mL para o ácido gálico e 0,002 a 0,007 mg/mL para a catequina. Essas soluções eram preparadas a partir da SP2 (Conforme item 4.4.2).

Todas as absorvâncias foram mensuradas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm, após adição de Folin, água destilada e de uma solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) a 29% (p/v).

As curvas foram construídas, a partir da média de três curvas de calibração e plotando-se os valores médios das absorvâncias em função da concentração. Os resultados para as curvas da amostra e dos padrões foram analisados estatisticamente através do teste de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados com o auxílio do Microsoft Excel[®] (2010).

4.5.2 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos, através da equação mostrada abaixo, conforme preconizado pela RE 899/2003:

$$\text{LD} = \frac{\text{DPa} \times 3}{\text{IC}} \quad (4) \quad \text{LQ} = \frac{\text{DPa} \times 10}{\text{IC}} \quad (5)$$

Onde, DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do y e IC = inclinação média das curvas de calibração. Todos os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$.

4.5.3 Especificidade

A especificidade foi estabelecida através da avaliação do paralelismo das retas obtidas a partir das curvas de especificidade e de calibração das amostras. Sendo as curvas de especificidade obtidas através das respectivas concentrações da curva de calibração da amostra de folhas (0,015 a 0,055 mg/mL), as quais foram contaminadas separadamente por uma quantidade fixa de pirogalol (1 mL - 0,001 mg/mL), catequina (2 mL - 0,002 mg/mL) e ácido gálico (2 mL - 0,002 mg/mL). Enquanto que as concentrações da curva de calibração da amostra de cascas

(0,008 a 0,040 mg/mL) foram contaminadas separadamente com pirogalol e ácido gálico na mesma quantidade e concentração citadas anteriormente.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2), sendo $R^2 > 0.99$, o mínimo aceitável. A especificidade dos métodos espectrofotométricos também foi avaliada através da sobreposição dos espectros de varredura da solução amostra e dos padrões, na faixa de 500 a 900 nm.

4.5.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrída), na qual foram analisadas seis amostras de mesma concentração (100%), no mesmo dia e pelo mesmo operador; e, precisão intermediária (intercorrída), na qual foram analisadas amostras em triplicata de concentração também 100%, por dois analistas e em dois dias diferentes. Os teores foram expressos em g% de pirogalol, ácido gálico e catequina para as folhas e em g% de pirogalol e ácido gálico para as cascas. Foram calculadas as médias e os desvios padrões relativos (DPR%) deste ensaio.

4.5.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas dos padrões às soluções amostras. Os valores de recuperação foram calculados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente e as concentrações teóricas correspondentes e expressos em porcentagem. As soluções amostras de folhas a 0,026 mg/mL foram fortificadas com alíquotas de pirogalol (0,001; 0,002 e 0,003 mg/mL); ácido gálico (0,002; 0,004 e 0,005 mg/mL) e catequina (0,002; 0,003 e 0,004 mg/mL). As soluções amostras de cascas a 0,024 mg/mL foram fortificadas com alíquotas de pirogalol e ácido gálico nas mesmas concentrações citadas anteriormente para folhas. Nesse experimento foram obtidas três soluções, com três réplicas cada e o doseamento foi realizado conforme o procedimento usual para determinação das

absorvâncias. Os resultados foram expressos utilizando a média e o desvio padrão relativo.

4.5.6 Robustez

Para avaliação da robustez foram realizadas variações nos seguintes parâmetros: influência da luminosidade (presença e ausência de luz); análises em diferentes equipamentos (Evolution 60S[®] e Micronal[®]); influência da temperatura (temperatura ambiente e sob refrigeração) e estabilidade da solução extrativa (1, 2 e 3 dias). Todos esses parâmetros foram analisados nas soluções amostra de folhas e cascas nas concentrações de 0,033 mg/mL e 0,024 mg/mL, respectivamente (concentração 100%).

As análises foram realizadas em triplicata e os efeitos das variações selecionadas foram avaliados através dos teores expressos em g% de pirogalol, ácido gálico e catequina nas soluções amostra de folhas e em g% de pirogalol e ácido gálico nas soluções amostra de cascas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão relativo.

4.6 AVALIAÇÃO DO TEOR DE POLIFENOIS TOTAIS NAS AMOSTRAS DE DIFERENTES LOCALIDADES

Foram preparadas soluções amostra de folhas e cascas a 0,033 mg/mL e 0,024 mg/mL, respectivamente, das diferentes amostras coletadas. Em seguida, as absorvâncias foram analisadas no espectrofotômetro ($\lambda=760$ nm), pelo método espectrofotométrico, o qual foi previamente desenvolvido e validado neste estudo. Os efeitos das localidades foram avaliados através dos teores expressos em g% de pirogalol, ácido gálico e catequina nas soluções amostra de folhas e em g% de pirogalol e ácido gálico nas soluções amostra de cascas. As análises foram realizadas em triplicata e foram calculadas as médias e o DPR%. Para avaliar a influência das localidades no TPT foram feitas uma análise de variância de Kruskal Wallis seguido por comparações múltiplas pelo teste de Dunn.

4.7 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS POR CLAE-DAD

4.7.1 Preparação das amostras

A amostra de folhas foi obtida a partir de 0,5 g de droga vegetal, a qual foi transferida para um erlenmeyer de 50 mL e adicionado 30 mL de água destilada. Esse sistema foi submetido ao ultrassom à temperatura ambiente (25 ± 1 °C), durante 30 minutos. Em seguida, este conteúdo foi transferido para balão volumétrico com capacidade para 50 mL e o volume ajustado com água destilada. A mistura foi mantida em repouso para decantar, em seguida foi filtrada através de papel de filtro desprezando-se os primeiros 10 mL. O restante do filtrado constituiu a Solução Estoque da Amostra (**SEA** - 10 mg/mL).

A solução extrativa de cascas foi obtida conforme o procedimento anterior, realizando modificação no processo extrativo, sendo realizada sob refluxo a 85°C, em balão de fundo redondo de 125 mL.

4.7.2 Preparação das soluções estoque dos padrões

Para as análises comparativas das soluções amostra de folhas foram preparadas soluções aquosas de ácido gálico e catequina. Dissolvendo-se 1 mg de ácido gálico em água destilada para balão volumétrico de 20 mL e 2 mg de catequina em água destilada para balão volumétrico de 10 mL. As soluções foram colocadas em banho de ultrassom por 15 minutos até completa solubilização. Em seguida, o volume de ambas as soluções foram ajustados, obtendo-se no final soluções estoques a 50 µg/mL e 200 µg/mL, para ácido gálico e catequina respectivamente. Para as análises comparativas das soluções amostra de cascas foi obtida apenas a solução aquosa de ácido gálico a 50 µg/mL, conforme descrito anteriormente.

4.7.3 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas para quantificação de ácido gálico e catequina nas soluções amostras de folhas e determinação de ácido gálico nas soluções

amostra de cascas foram conduzidas em cromatógrafo líquido (Modelo Ultimate 3000, ThermoScientific[®]) equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD) a 280 nm, degaseificador e sistema de injeção automático. O sistema foi controlado pelo programa computacional Chromeleon[®], que também gerencia a aquisição e tratamento dos dados. Foi empregado uma coluna C₁₈ Macherey-Nagel[®] (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), protegida por pré-coluna C₁₈ Phenomenex[®] (4mmx 2 mm). As análises foram processadas sob temperatura ambiente (25 ± 1 °C), controlada por ar condicionado.

Os padrões e as amostras foram eluídos através de um gradiente de fase móvel composta por água e ácido trifluoracético a 0,05% (A) e metanol e ácido trifluoracético a 0,05% (B) sob fluxo de 0,8 mL/min. Sendo ambas as fases degaseificadas e filtradas através de filtro com tamanho de poro de 0,45 µm (FilterPro[®]). As amostras e padrões foram filtradas em membranas com porosidade de 0,45 µm (Chromafil[®]) e injetadas 20 µL das mesmas em triplicata. O tempo total da análise cromatográfica foi de 30 minutos para o método das folhas e 28 minutos para o método das cascas (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1- Gradiente utilizado para análise de ácido gálico e catequina nas folhas de *A. occidentale* L..

Tempo (minutos)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0-10	90 → 75	10 → 25
10-20	75 → 50	25 → 50
20-25	50 → 25	50 → 75
25-28	25 → 50	75 → 50
28-30	50 → 90	50 → 10

Eluente A: água e ácido trifluoracético a 0,05%. Eluente B: metanol e ácido trifluoracético a 0,05%.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2- Gradiente utilizado para análise de ácido gálico nas cascas de *A. occidentale* L..

Tempo (minutos)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0-10	90 → 75	10 → 25
10-20	75 → 60	25 → 40
20-25	60 → 25	40 → 75
25-28	25 → 90	75 → 10

Eluente A: água e ácido trifluoracético a 0,05%. Eluente B: metanol e ácido trifluoracético a 0,05%.

Fonte: Autoria própria.

4.8 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS POR CLAE-DAD

Os métodos desenvolvidos para a quantificação de ácido gálico e catequina nos extratos de folhas de cajueiro e ácido gálico para os extratos de cascas de caule de cajueiro oriundas da cidade de Recife-PE foram validados de acordo com os parâmetros preconizados pelo *International Conference Harmonization* (ICH, 2005) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), utilizando como parâmetros: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

4.8.1 Especificidade

A especificidade dos métodos cromatográficos foi demonstrada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de ultravioleta das amostras e dos padrões, onde foi realizada a varredura de 190 nm a 400 nm. Os padrões utilizados foram ácido gálico e catequina para o estudo com a solução amostra de folhas e ácido gálico com a solução amostra de cascas.

4.8.2 Linearidade

As curvas de linearidade para as amostras de folhas e cascas foram construídas utilizando cinco concentrações diferentes na faixa de 1600 a 2400 µg/mL, a partir da **SEA** (descritas anteriormente, item 4.7.1).

As curvas de calibração dos padrões analisados pelo método obtido para as folhas foram construídas utilizando cinco concentrações diferentes de 0,958 a 1,438 µg/mL de ácido gálico e 4,664 a 7,200 µg/mL de catequina, obtidas a partir de soluções padrão descritas anteriormente (item 4.7.2). Já a curva de calibração do ácido gálico para o método desenvolvido para as cascas foi construída utilizando cinco concentrações diferentes de 0,662 a 0,994 µg/mL, a partir da solução estoque descrita anteriormente (item 4.7.2).

As curvas foram construídas, a partir da média de três curvas de calibração e plotando-se os valores médios das áreas em função da concentração. Os resultados para as curvas da amostra e dos padrões foram analisados estatisticamente através

do teste de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados com o auxílio do Microsoft Excel[®] (2010).

4.8.3 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos, através da equação mostrada abaixo, conforme preconizado pela RE 899/2003:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (6) \quad LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (7)$$

Onde, DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do y e IC = inclinação média das curvas de calibração. Todos os resultados foram expressos em µg/mL.

4.8.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrída), na qual foram analisadas seis amostras de mesma concentração (100%), no mesmo dia e pelo mesmo operador; e, precisão intermediária (intercorrída), na qual foram analisadas amostras em triplicata de concentração também 100%, por dois analistas e em dois dias diferentes. As concentrações de ácido gálico e catequina na amostra de folhas e de ácido gálico na amostra de cascas foram calculadas a partir da equação da reta obtida através da curva de calibração dos referidos padrões. Foram calculadas as médias e os DPR%.

4.8.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas dos padrões a soluções amostras. Os valores de recuperação foram calculados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente e as concentrações teóricas correspondentes e expressos em porcentagem. As soluções amostras de folhas e cascas a 2000 µg/mL (concentração 100%) foram contaminadas com alíquotas de padrões de concentrações conhecidas (80, 100 e 120%), sendo estes padrões, ácido gálico e catequina para as amostras de folhas e apenas ácido gálico para as amostras de cascas.

Nesse experimento foram obtidas três soluções com três réplicas cada e os resultados foram expressos utilizando a média e o DPR %.

4.8.6 Robustez

Os ensaios para a determinação da robustez foram realizados através de pequenas alterações no método. Foram utilizadas como variáveis os seguintes parâmetros: mudança de fluxo em nível baixo (0,790 mL/min) e alto (0,810 mL/min); mudança na concentração de ácido trifluoracético nas fases móvel A e B em nível baixo (0,04%) e alto (0,06%).

Os parâmetros foram analisados em triplicata, nas soluções amostra de folhas e cascas a 2000 µg/mL (concentração 100%). Os efeitos das variações selecionadas foram avaliados através das concentrações de ácido gálico e catequina nas soluções amostra de folhas e de ácido gálico nas soluções amostra de cascas. Também foram calculadas as médias e o DPR% deste ensaio.

4.9 AVALIAÇÃO DO TEOR DOS MARCADORES NAS AMOSTRAS DE DIFERENTES LOCALIDADES

Foram obtidas soluções aquosas amostra de folhas e cascas a 2000 µg/mL, respectivamente, de todas as amostras coletadas, a partir da **SEA**. Em seguida, as amostras foram analisadas pelos métodos desenvolvidos e validados por CLAE-

DAD. As análises foram realizadas em triplicata e foram calculadas as médias e os DPR%. A influência das localidades nas concentrações de ácido gálico e catequina nas soluções amostras das folhas e de ácido gálico nas soluções amostras de cascas foram feitas através do programa BioEstat 5.0, uma análise de variância de Kruskal Wallis seguido por comparações múltiplas pelo teste de Dunn.

As análises qualitativas foram realizadas pela avaliação dos espectros de varredura dos principais picos, considerando seus tempos de retenção .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

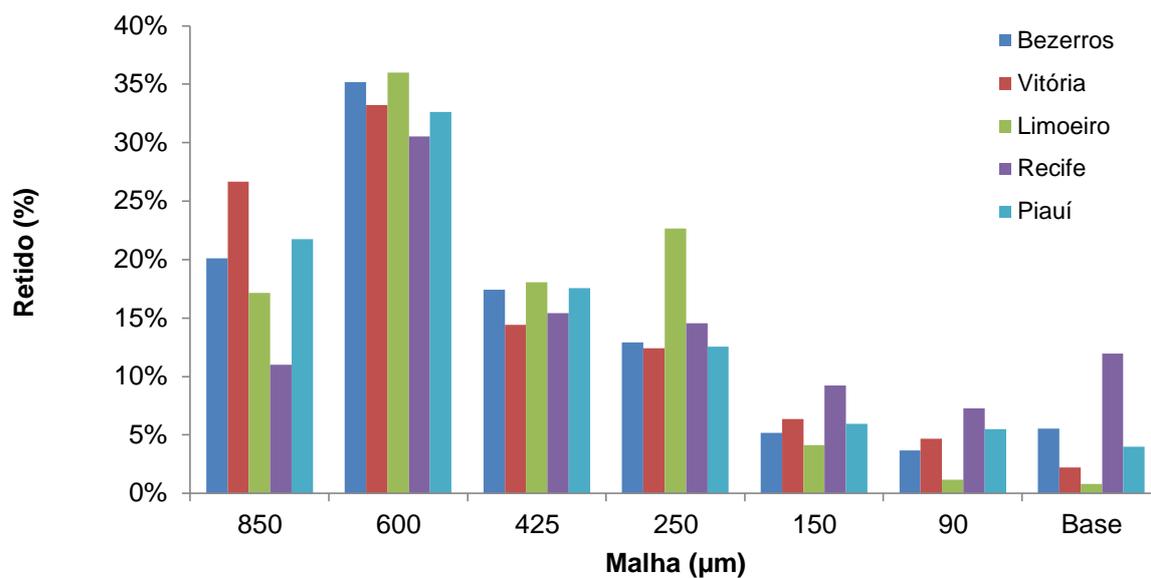
5.1.1 Análise granulométrica

A moagem consiste em uma operação que visa reduzir mecanicamente o tamanho das partículas. Este processo, por sua vez, aumenta a eficiência da extração dos componentes presentes na matéria prima vegetal, pois a diminuição das partículas proporciona um aumento na superfície de contato entre o material vegetal e o líquido extrator. Além disso, a homogeneidade do tamanho da partícula contribui para a reprodutibilidade do processo extrativo. Logo, a avaliação granulométrica do material moído é essencial, devido esta estreita relação entre o tamanho da partícula e o processo de extração (MIGLIATO et al., 2007; SONAGLIO et al., 2010).

Os resultados obtidos pela análise dos histogramas de distribuição granulométrica de todos os lotes de folhas de *Anacardium occidentale* L. demonstram que as partículas se distribuíram predominantemente no tamis de 600 μm , representando $33,52\% \pm 2,15$ de todo o material (Figura 4). As distribuições granulométricas dos lotes de cascas demonstram que as partículas também se distribuíram predominantemente no tamis de 600 μm ($27,26\% \pm 2,15$), exceto as amostras de Limoeiro e Piauí, os quais as partículas se distribuíram em sua maioria no tamis de 425 μm (26,33%) e 90 μm (21,81%), respectivamente (Figura 5). Essa diferença na granulometria nos pós das cascas pode ser explicada por situações inerentes aos fatores ambientais, que podem ter afetado na textura e/ou rigidez do material vegetal.

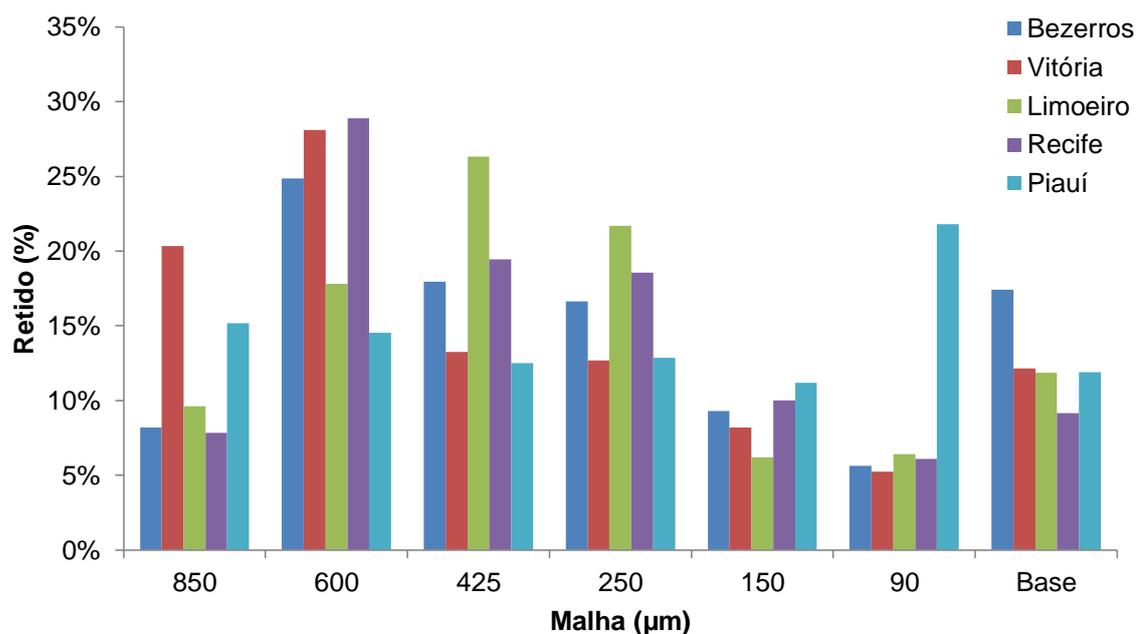
O tamanho médio das partículas foi determinado pelo ponto de interseção das curvas de retenção e passagem e foram de 618,10 $\mu\text{m} \pm 62,92 \mu\text{m}$ para as amostras folhas (Figura 6) e de 452,90 $\mu\text{m} \pm 97,90 \mu\text{m}$ para as amostras de cascas (Figura 7). Após moagem, todas as amostras de folhas foram consideradas como pós grossos segundo a classificação da Farmacopeia Brasileira (2010). Em relação às amostras das cascas, todas foram consideradas como pós grossos, exceto a amostra do Piauí que foi classificado como moderadamente grosso.

Figura 4- Histograma de distribuição granulométrica das amostras de folhas de *A. occidentale* L..



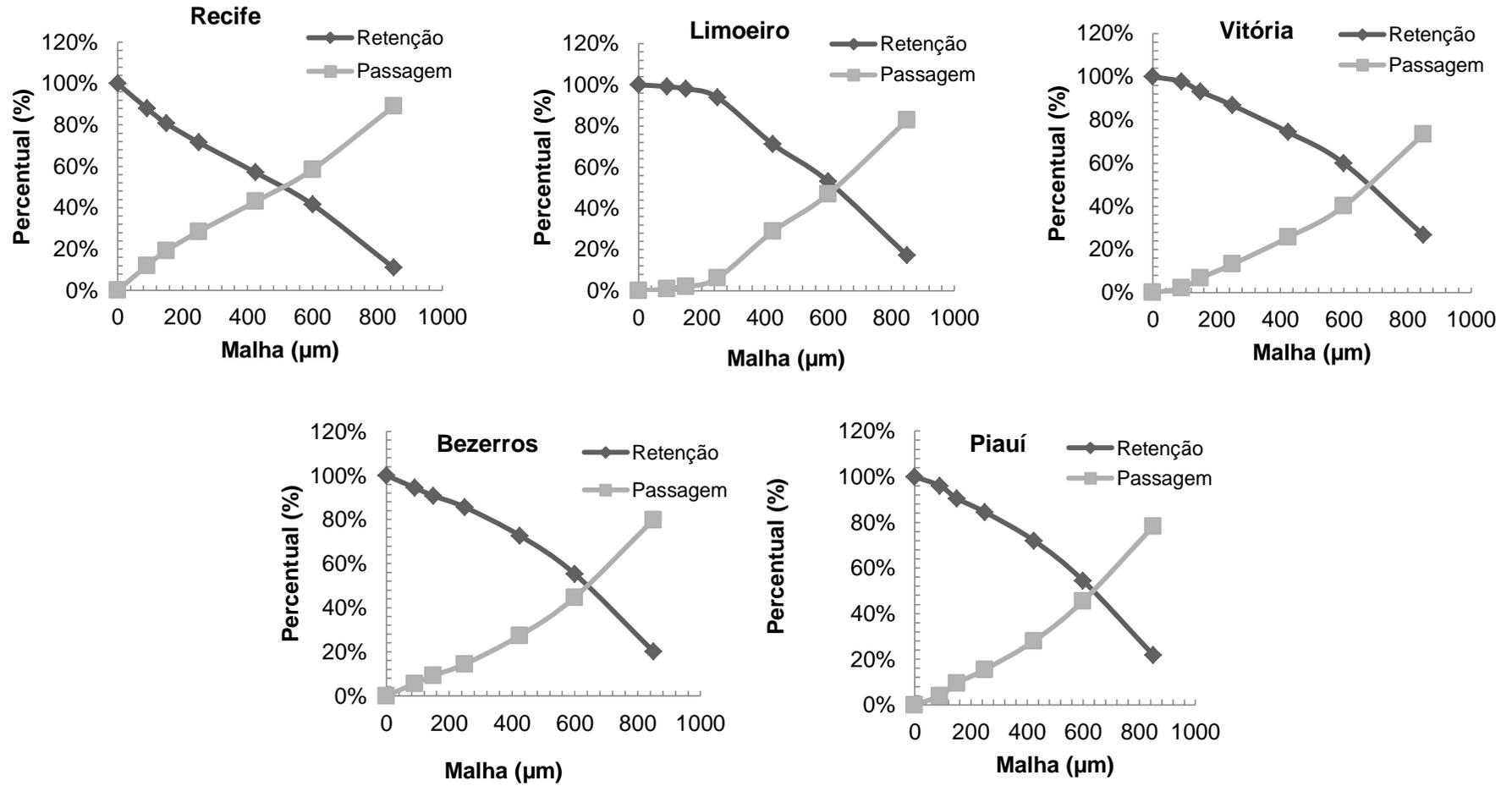
Fonte: Autoria própria.

Figura 5- Histograma de distribuição granulométrica das amostras de cascas de *A. occidentale* L..



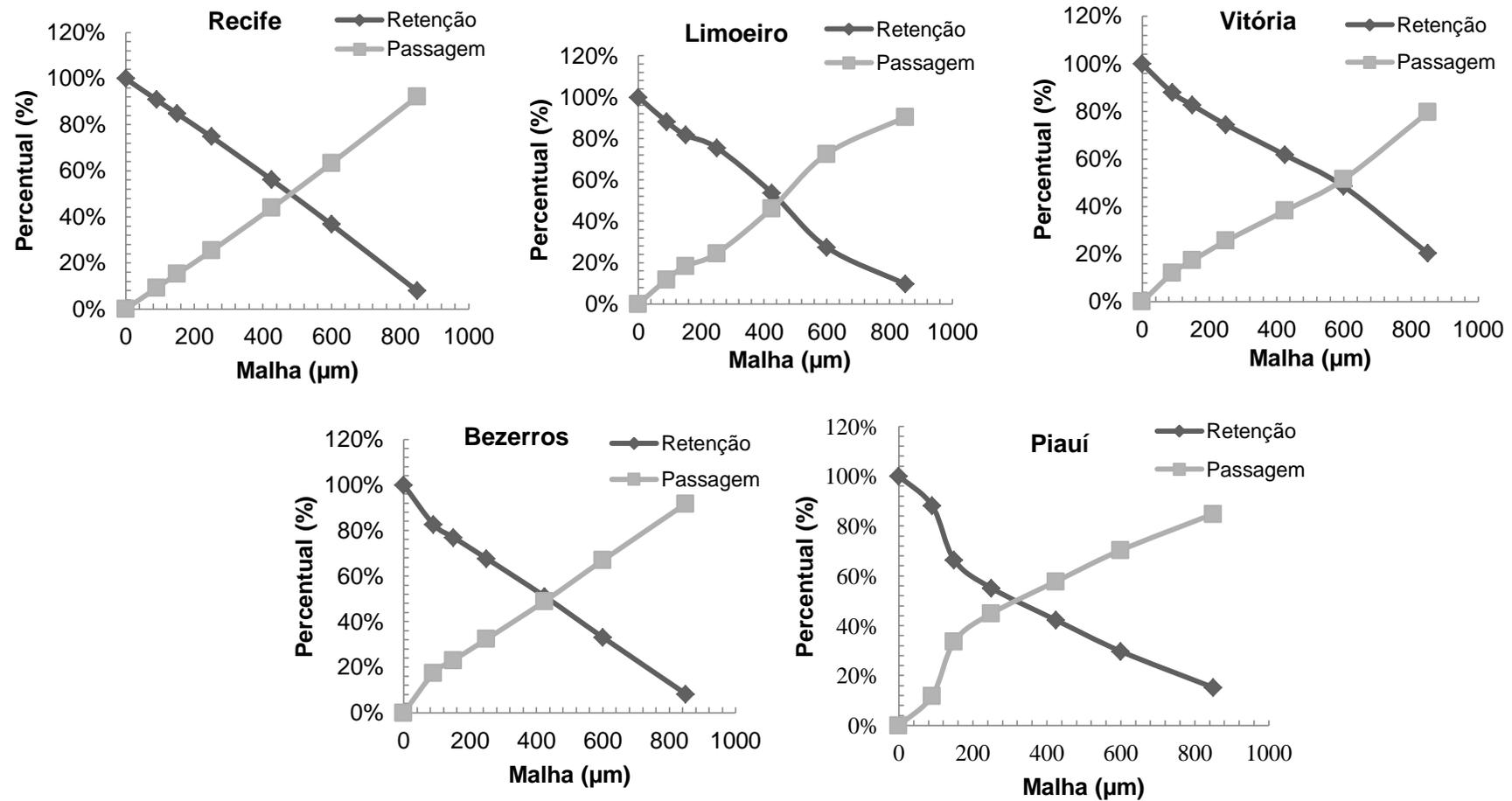
Fonte: Autoria própria.

Figura 6- Curvas de retenção e passagem referentes às amostras de folhas de *A. occidentale* L.



Fonte: Autoria própria.

Figura 7- Curvas de retenção e passagem referentes às amostras de cascas de *A. occidentale* L..



Fonte: Autoria própria.

5.1.2 Perda por dessecação

A perda por dessecação expressa o percentual de umidade residual da droga vegetal. A determinação deste parâmetro é essencial na padronização da matéria prima vegetal, uma vez que o excesso de água nesta matriz favorece a proliferação de microrganismos, reações de hidrólise e atividade enzimática, alterando desse modo os seus constituintes químicos (COUTO et al., 2009; FARIAS, 2010).

A Farmacopeia Brasileira (2010) preconiza um limite de umidade residual em drogas vegetais de 8 a 14%. Nas tabelas 3 e 4 pode ser observado que todas as amostras de folhas e cascas não ultrapassaram este limite, garantindo, deste modo, a estabilidade microbiológica e química das matérias-primas vegetais. Além disso, todos os desvios padrões relativos se mostraram inferiores a 5%, demonstrando assim que o ensaio foi realizado com precisão.

Tabela 3- Teores de umidade das amostras de folhas de *A. occidentale* L..

Localidades	Média ± DP (DPR%)
Recife	10,31 ± 0,1648 (1,60%)
Limoeiro	9,44 ± 0,1690 (1,79%)
Vitória	12,73 ± 0,0974 (0,77%)
Bezerros	12,01 ± 0,2156 (1,80%)
Piauí	10,82 ± 0,2752 (2,54%)

DP= desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4- Teores de umidade das amostras de cascas de *A. occidentale* L..

Localidades	Média ± DP (DPR%)
Recife	12,11 ± 0,1851 (1,53%)
Limoeiro	10,37 ± 0,3368 (3,25%)
Vitória	13,78 ± 0,2927 (2,12%)
Bezerros	11,80 ± 0,1703 (1,44%)
Piauí	11,95 ± 0,5335 (4,46%)

DP= desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

Fonte: Autoria própria.

5.1.3 Cinzas totais

A determinação de cinzas totais permite verificar impurezas inorgânicas não voláteis obtidas por incineração, as quais podem estar presentes na própria espécie vegetal (cinzas fisiológicas) ou serem de origem terrosa (cinzas não fisiológicas) (FARIAS, 2010; FB5, 2010; LUCCA et al., 2010). Em diversas monografias, a Farmacopeia Brasileira preconiza um limite de 14% de cinzas totais. E caso o limite exceda a 8% é necessário realizar a determinação de cinzas insolúveis em ácido, a fim de quantificar os materiais silicosos presentes na droga vegetal.

Neste ensaio, todas as amostras de folhas e cascas apresentaram teores de cinzas inferiores a 14%, o que representa quantidade adequada de material inorgânico nas matérias-primas analisadas, indicando que as mesmas não possuem excesso de terra e/ou areia. De acordo com os valores de cinzas totais obtidos, não houve a necessidade de realizar a determinação de cinzas insolúveis em ácido, uma vez que os teores não ultrapassaram o limite preconizado de 8% (Tabela 5 e 6).

Tabela 5- Teores de cinzas totais das amostras de folhas de *A. occidentale* L..

Localidades	Média ± DP (DPR%)
Recife	2,78 ± 0,1008 (3,62%)
Limoeiro	4,80 ± 0,1473 (3,03%)
Vitória	3,25± 0,1387 (4,26%)
Bezerros	3,74 ± 0,1784 (4,76%)
Piauí	3,01 ± 0,1408 (4,67%)

DP= desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.
Fonte: Autoria própria.

Tabela 6- Teores de cinzas totais das amostras de cascas de *A. occidentale* L..

Localidades	Média ± DP (DPR%)
Recife	2,14 ± 0,0317 (1,48%)
Limoeiro	4,81 ± 0,0451 (0,94%)
Vitória	2,22 ± 0,0306 (1,38%)
Bezerros	2,60 ± 0,0269 (1,03%)
Piauí	2,64 ± 0,1311 (4,47%)

DP= desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.
Fonte: Autoria própria.

5.2 PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A utilização de técnicas cromatográficas permite a identificação dos constituintes químicos presentes em drogas vegetais. A cromatografia em camada delgada é uma técnica qualitativa, simples, rápida e proporciona uma caracterização prévia dos constituintes de uma amostra vegetal (NICOLETTI, 2011). Porém, técnicas cromatográficas hífenadas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores espectrofotométricos de UV-Visível (DAD) são essenciais na confirmação fitoquímica, uma vez que essa ferramenta pode predizer o grupo químico presentes em matrizes complexas, como os vegetais (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Na prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos das folhas de *A. occidentale* L. foi possível inferir sobre a presença de polifenóis, do tipo taninos condensados, taninos hidrolisáveis e flavonoides em todos as amostras analisadas (Tabela 7). Esses resultados corroboraram com o estudo de Santos (2011) que relatou tais compostos no extrato etanólico das folhas do cajueiro através da observação de mudança de cor ou formação de precipitado, após a adição de reagentes específicos. Leitão e colaboradores (2013) também identificaram por cromatografia em camada delgada a presença de flavonoides em extratos de folhas obtidos por diferentes métodos extrativos e solventes.

Tabela 7- Prospecção de compostos fenólicos por CCD do extrato metanólico das folhas de *A. occidentale* L..

Classe de metabólito	Piauí	Recife	Limoeiro	Bezerros	Vitória
TC	+	+++	+	+	++
Polifenóis	+	+	+	+	+
TH	+	+	+	+	+
Flavonoide	+	+++	+	++	++
Ác. caféico	-	-	-	-	-
Ác. clorogênico	-	-	-	-	-
Cumarina	-	-	-	-	-

TC: Tanino condensado; TH: Tanino hidrolisável; (+/++/+++): intensidade da banda relativa da classe de metabólitos; (-): ausência. Fonte: Autoria própria.

Em relação à prospecção fitoquímica dos extratos metanólicos das cascas de *A. occidentale* L. foi possível observar a presença de polifenóis em todas as amostras analisadas. Porém, apenas a amostra oriunda de Limoeiro apresentou flavonoide (Tabela 8). Esses resultados estão de acordo com o estudo de Santos (2011) que identificou taninos condensados e compostos fenólicos no extrato etanólico das cascas; e, o estudo de Costa e colaboradores (2015) que detectou taninos hidrolisáveis em extrato etanólico das cascas de caju. Bouzada e colaboradores (2007) também identificaram nos extratos metanólicos das cascas a presença de flavonoides, o que explica a presença desse metabólito na amostra obtida em Limoeiro e também detectou a presença de taninos e a ausência de cumarina.

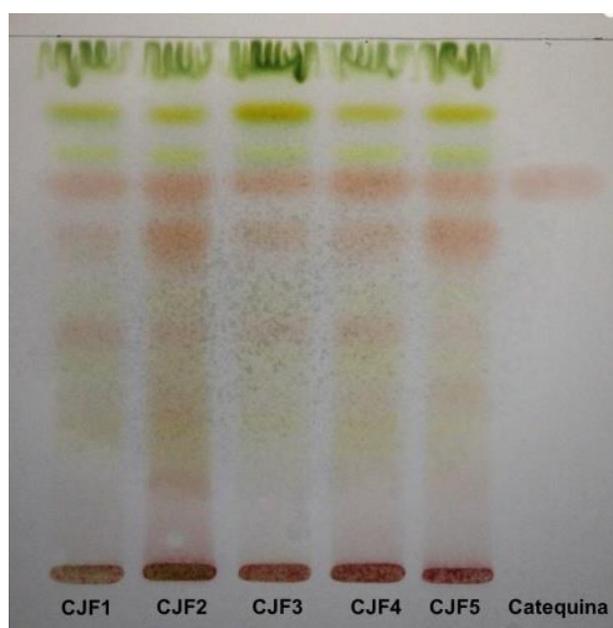
Tabela 8- Prospecção de compostos fenólicos do extrato metanólico das cascas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.

Classe de metabólito	Piauí	Recife	Limoeiro	Bezerros	Vitória
TC	++	+	+	+++	++
Polifenóis	++	+++	+	++	+
TH	++	++	+	++	+
Flavonoide	-	-	+	-	-
Ác. caféico	-	-	-	-	-
Ác. clorogênico	-	-	-	-	-
Cumarina	-	-	-	-	-

TC: Tanino condensado; TH: Tanino hidrolisável; (+/++/+++): intensidade da banda relativa da classe de metabólitos; (-): ausência. Fonte: Autoria própria.

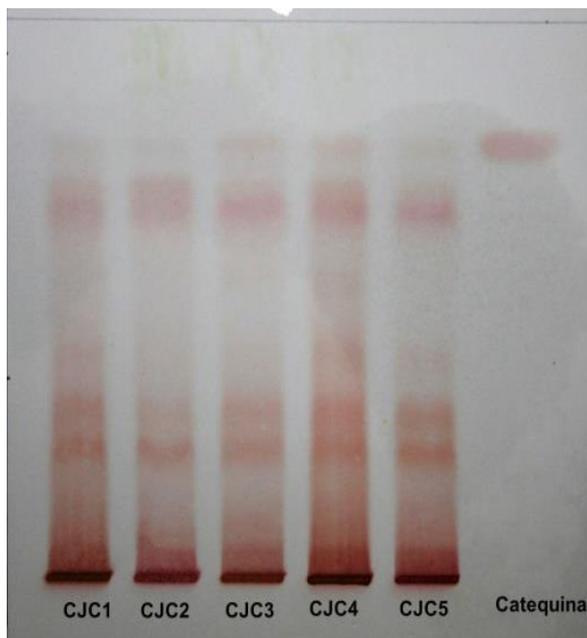
Em relação aos taninos condensados presentes nas amostras de folhas e cascas, os dados permitiram observar bandas de mesma coloração e *Rf* que a solução padrão de catequina. Porém, nas amostras de folhas as bandas coincidentes com o padrão se mostraram mais intensas em comparação com as amostras de cascas (Figura 8 e 9). Também foi possível verificar a existência de outras bandas de coloração avermelhada sugerindo a presença de outros taninos condensados ou derivados da catequina, além de variações na intensidade da cor e/ou quantidade de bandas entre as amostras de diferentes localidades.

Figura 8- Cromatograma para avaliação da presença de taninos condensados em folhas de *A. occidentale* L., empregando como fase móvel AcOEt:HCOOH:H₂O (90:5:5), padrão catequina e revelador vanilina clorídrica.



CJF1: Piauí; CJF2: Recife; CJF3: Limoeiro; CJF4: Bezerros; CJF5: Vitória.
Fonte: Autoria própria.

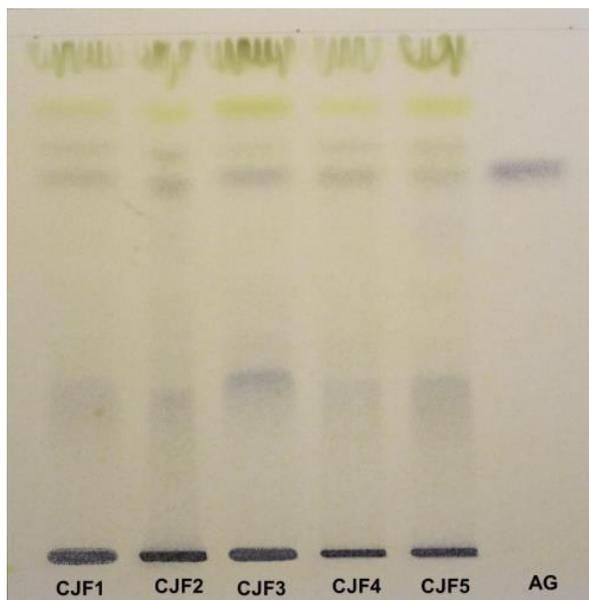
Figura 9- Cromatogramas para avaliação da presença de taninos condensados em cascas de *A. occidentale* L. obtidos por CCD com fase móvel AcOEt:HCOOH:H₂O (90:5:5), padrão catequina e revelador vanilina clorídrica



CJC1: Piauí; CJC2: Recife; CJC3: Limoeiro; CJC4: Bezerros; CJC5: Vitória. Fonte: Autoria própria.

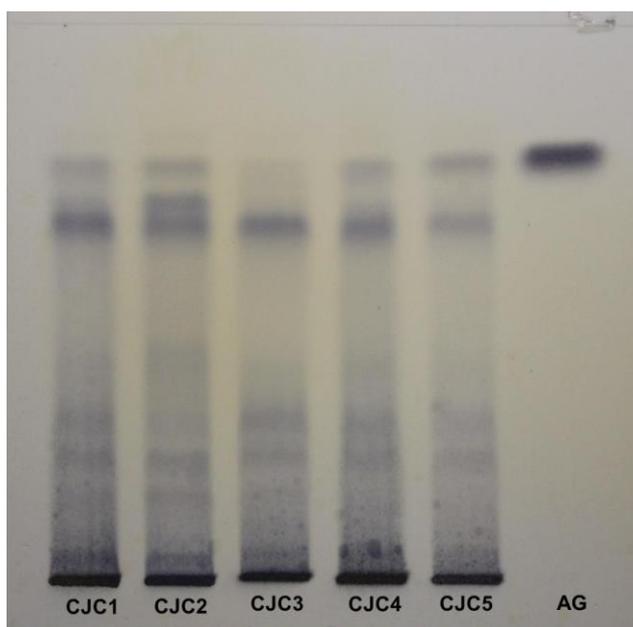
Quanto à avaliação de polifenóis nas diferentes amostras de folhas e cascas foi possível observar que as amostras das cascas do cajueiro apresentaram maior quantidade de bandas com coloração azul escura sugerindo uma maior quantidade de compostos fenólicos nas cascas em comparação as folhas. Ademais, foi observado que tanto nas folhas, quanto nas cascas é possível inferir sobre a presença de ácido gálico (monômero de tanino hidrolisável), tendo em vista que as amostras apresentaram mesma coloração e *R_f* deste padrão (Figuras 10 e 11). Vale ressaltar que entre as amostras de cascas algumas apresentaram variações de intensidade da cor e quantidade de bandas azuladas, ao contrário das amostras de folhas que foram mais uniformes nesse aspecto (Figura 11).

Figura 10- Cromatograma para avaliação da presença de polifenóis e ácido gálico em folhas de *A. occidentale* L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:H₂O (90:5:5), padrão ácido gálico e revelador cloreto férrico metanólico a 1% (m/v).



CJF1: Piauí; CJF2: Recife; CJF3: Limoeiro; CJF4: Bezerros; CJF5: Vitória; AG: ácido gálico. Fonte: Autoria própria.

Figura 11- Cromatograma para avaliação da presença de polifenóis e ácido gálico em cascas de *A. occidentale* L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:H₂O (90:5:5), padrão ácido gálico e revelador cloreto férrico metanólico a 1% (m/v).

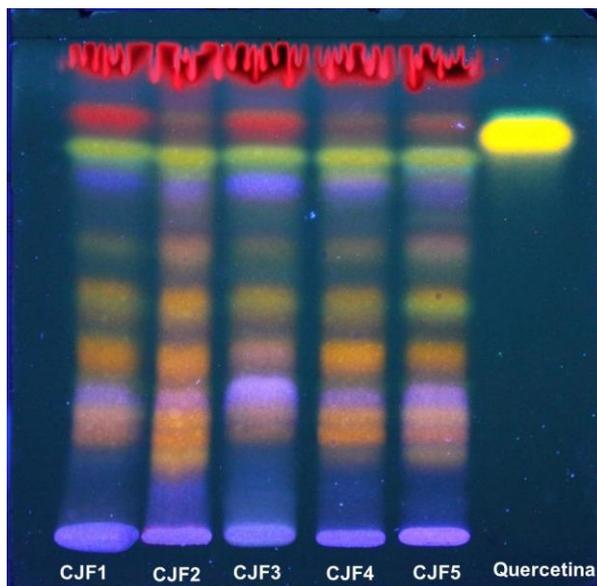


CJC1: Piauí; CJC2: Recife; CJC3: Limoeiro; CJC4: Bezerros; CJC5: Vitória; AG: ácido gálico. Fonte: Autoria própria.

As figuras 12 e 13 mostram os resultados das análises de flavonoides nas amostras de folhas e cascas, respectivamente. Sendo notável que nessa

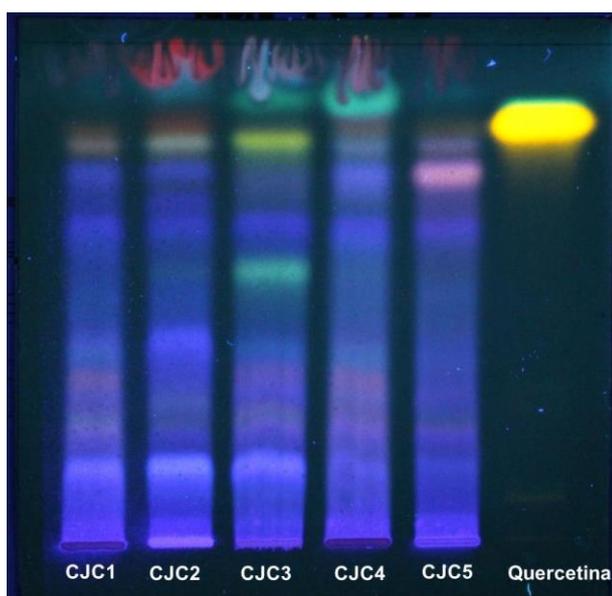
concentração não foi possível visualizar quercetina nas folhas e cascas de caule de cajueiro, pois as amostras não tinham banda com o mesmo *Rf* desta substância. Entretanto, em todas as amostras de folhas é possível inferir a cerca da presença de outros flavonoides devido à presença de bandas com coloração característica desta classe de metabólito (amarelo e amarelo alaranjado) e antocianidinas (coloração avermelhado). Em relação às cascas, apenas a amostra de Limoeiro apresentou uma banda característica de flavonoide. Essa mudança pode está relacionado com os meses de coleta das amostras das cinco cidades, os quais foram diferentes.

Figura 12- Cromatograma para avaliação da presença de flavonoides em folhas de *A. occidentale* L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:H₂O (90:5:5), padrão: quercetina, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).



CJF1: Piauí; CJF2: Recife; CJF3: Limoeiro; CJF4: Bezerros; CJF5: Vitória. Fonte: Autoria própria.

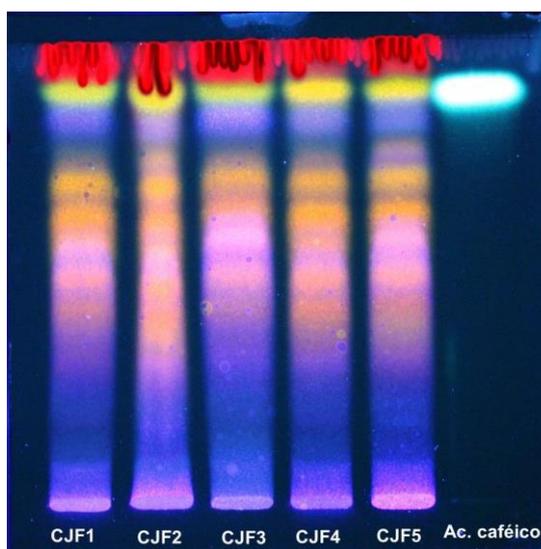
Figura 13- Cromatograma para avaliação da presença de flavonoides em cascas de *A. occidentale* L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:H₂O (90:5:5), padrão: quercetina, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).



CJC1: Piauí; CJC2: Recife; CJC3: Limoeiro; CJC4: Bezerros; CJC5: Vitória. Fonte: Autoria própria.

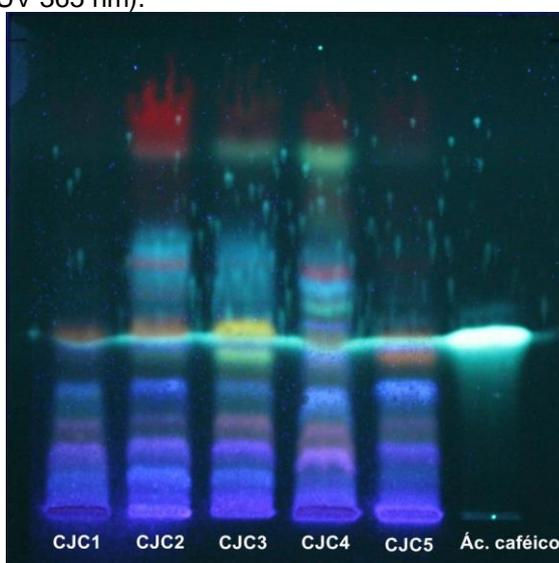
Quanto às análises para a pesquisa de derivados cinâmicos, as amostras de folhas e casca não apresentaram nem ácido caféico e nem ácido clorogênico (Figuras 14 a 17). No entanto, as amostras de cascas de Bezerros e Limoeiro sugeriram a presença de algum derivado de ácido caféico, pois apresentaram bandas de coloração semelhante a este composto (verde fluorescente) (Figura 15).

Figura 14- Cromatograma para avaliação da presença de derivado cinâmico em folhas de *A. occidentale* L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:AcOH:H₂O (100:2:11:4), padrão ácido caféico, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).



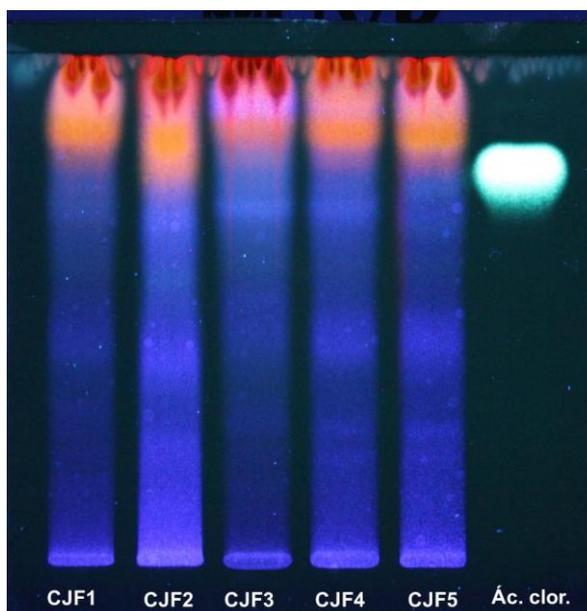
CJF1: Piauí; CJF2: Recife; CJF3: Limoeiro; CJF4: Bezerros; CJF5: Vitória. Fonte: Autoria própria.

Figura 15- Cromatograma para avaliação da presença de derivado cinâmico em cascas de *A. occidentale* L., com fase móvel Tolueno:AcOEt:MeOH:HCOOH (75:25:40:6), padrão: ácido caféico, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).



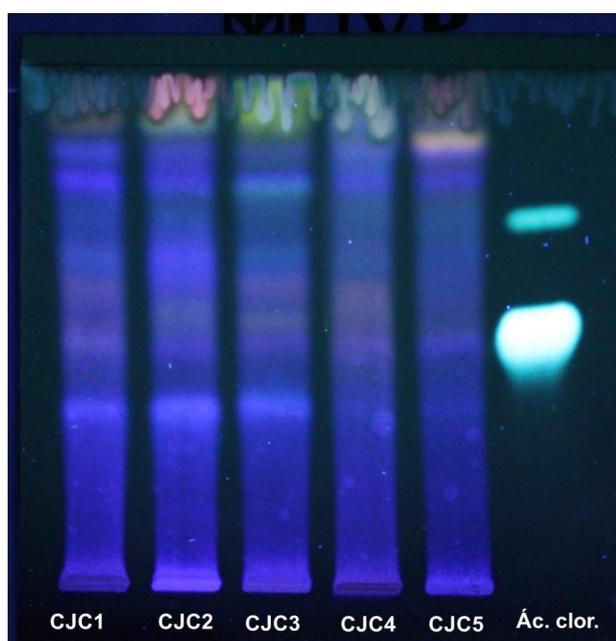
CJC1: Piauí; CJC2: Recife; CJC3: Limoeiro; CJC4: Bezerros; CJC5: Vitória. Fonte: Autoria própria.

Figura 16- Cromatograma para avaliação da presença de derivado cinâmico em folhas de *A. occidentale* L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:AcOH:H₂O (100:11:11:26), padrão: ácido clorogênico, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).



CJF1: Piauí; CJF2: Recife; CJF3: Limoeiro; CJF4: Bezerros; CJF5: Vitória; Ác. clor.: ácido clorogênico. Fonte: Autoria própria.

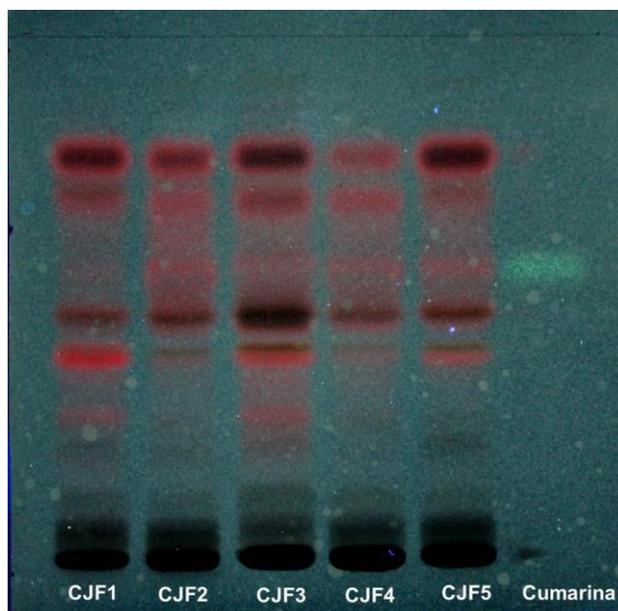
Figura 17- Cromatograma para avaliação da presença de derivado cinâmico em cascas de *A. occidentale* L., com fase móvel AcOEt:HCOOH:AcOH:H₂O (100:11:11:26), padrão: ácido clorogênico, reveladores: NEU e PEG (UV 365 nm).



CJC1: Piauí; CJC2: Recife; CJC3: Limoeiro; CJC4: Bezerros; CJC5: Vitória; Ác. clor.: ácido clorogênico. Fonte: Autoria própria.

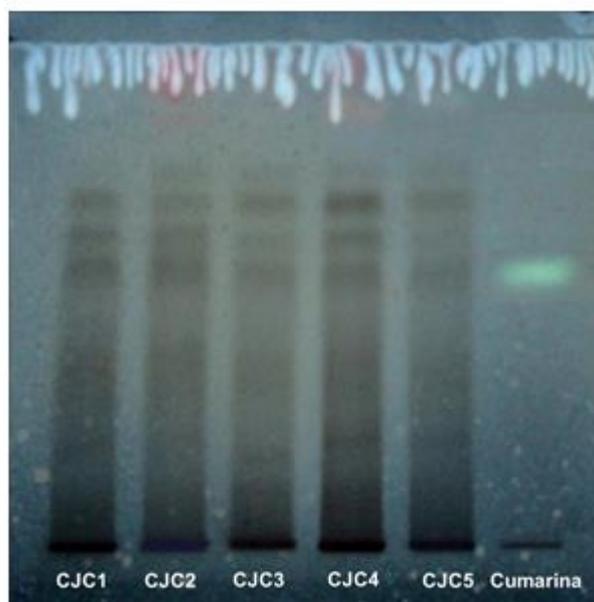
Os cromatogramas obtidos para a pesquisa não detectaram a presença de cumarina, uma vez que não verificaram nas amostras bandas características deste padrão – verde fluorescente (Figuras 18 e 19).

Figura 18- Cromatograma para avaliação da presença de cumarina em folhas de *A. occidentale* L., com fase móvel EtOEt:tolueno:AcOH 10% (50:50:50), padrão cumarina e revelador KOH 10% (UV 365 nm).



CJF1: Piauí; CJF2: Recife; CJF3: Limoeiro; CJF4: Bezerros; CJF5: Vitória. Fonte: Autoria própria.

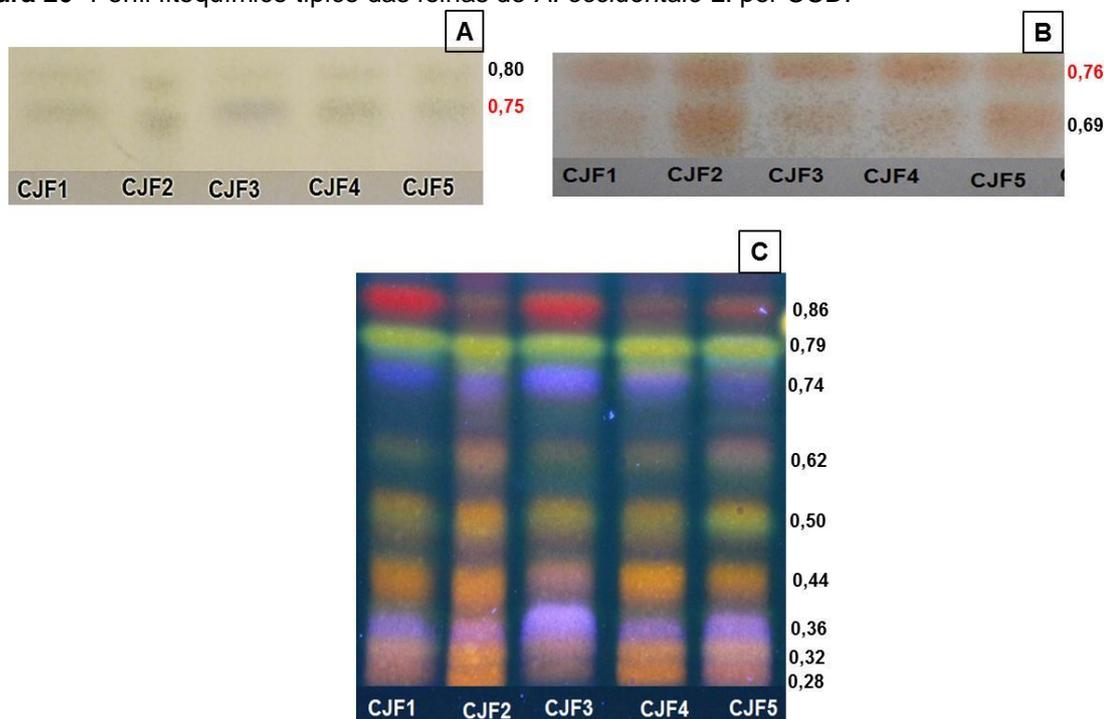
Figura 19- Cromatograma para avaliação da presença de cumarina em cascas de *A. occidentale* L., com fase móvel EtOEt:tolueno:AcOH 10% (50:50:50), padrão cumarina e revelador KOH 10% (UV 365 nm).



CJC1: Piauí; CJC2: Recife; CJC3: Limoeiro; CJC4: Bezerros; CJC5: Vitória. Fonte: Autoria própria.

Nas análises dos cromatogramas acima foi possível verificar um perfil fitoquímico característico das folhas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades. A figura 20 A é possível observar duas bandas de polifenóis de fatores de referência (*Rf*) de aproximadamente 0,75 e 0,80, sendo a primeira banda correspondente ao ácido gálico. Também foram verificadas duas bandas de taninos condensados de *Rfs* de aproximadamente 0,69 e 0,76, sendo a última banda correspondente a um monômero de tanino condensado - catequina (Figura 20 B). As bandas de flavonoides foram visualizadas em *Rfs*: 0,28; 0,32; 0,44; 0,50; 0,62 e 0,79 (bandas amareladas e alaranjadas), enquanto que os taninos hidrolisáveis foram observados em *Rfs* de 0,36 e 0,74 (azuis fluorescentes) e uma banda característica de antocianidina (avermelhadas) com *Rf* de aproximadamente 0,86 (Figura 20 C).

Figura 20- Perfil fitoquímico típico das folhas de *A. occidentale* L. por CCD.

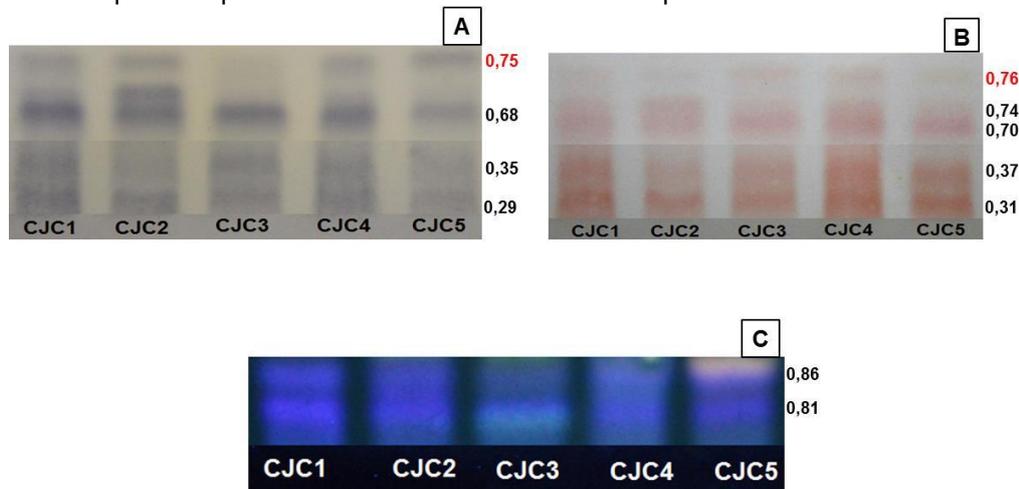


(A) Retirado do cromatograma obtido da figura 10. (B) Retirado do cromatograma da figura 8. (C) Retirado do cromatograma da figura 12. Fonte: Autoria própria.

As amostras de cascas de diferentes locais também foram possíveis traçar um perfil fitoquímico característico. A figura 21 A é possível observar quatro bandas de polifenóis de fatores de referência (*Rf*) de aproximadamente: 0,29; 0,35; 0,68 e 0,75, sendo esta última banda correspondente ao *Rf* do ácido gálico. Além disso, foram verificadas cinco bandas de taninos condensados de *Rfs* de

aproximadamente: 0,31; 0,37; 0,70; 0,74 e 0,76, sendo esta última correspondente ao *Rf* da catequina (Figura 21 B). Ademais, duas bandas de taninos hidrolisáveis podem ser observadas com *Rfs* de 0,81 e 0,86 (Figura 21 C).

Figura 21- Perfil fitoquímico típico das cascas de *A. occidentale* L. por CCD.



(A) Retirado do cromatograma obtido da figura 11. (B) Retirado do cromatograma da figura 9. (C) Retirado do cromatograma da figura 17.

Fonte: Autoria própria.

Apesar das amostras de folhas e cascas de *A. occidentale* L. apresentarem um perfil fitoquímico típico de polifenóis, o que garante a autenticidade das amostras estudadas, algumas mudanças foram relatadas anteriormente. Isso se deve aos fatores ambientais que podem afetar a composição química das plantas. Segundo Gobbo Neto e Lopes (2007), fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, idade ou estágio de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade de água, radiação UV, estímulo mecânico e ataque de patógenos, podem influenciar na quantidade e natureza dos constituintes ativos na planta.

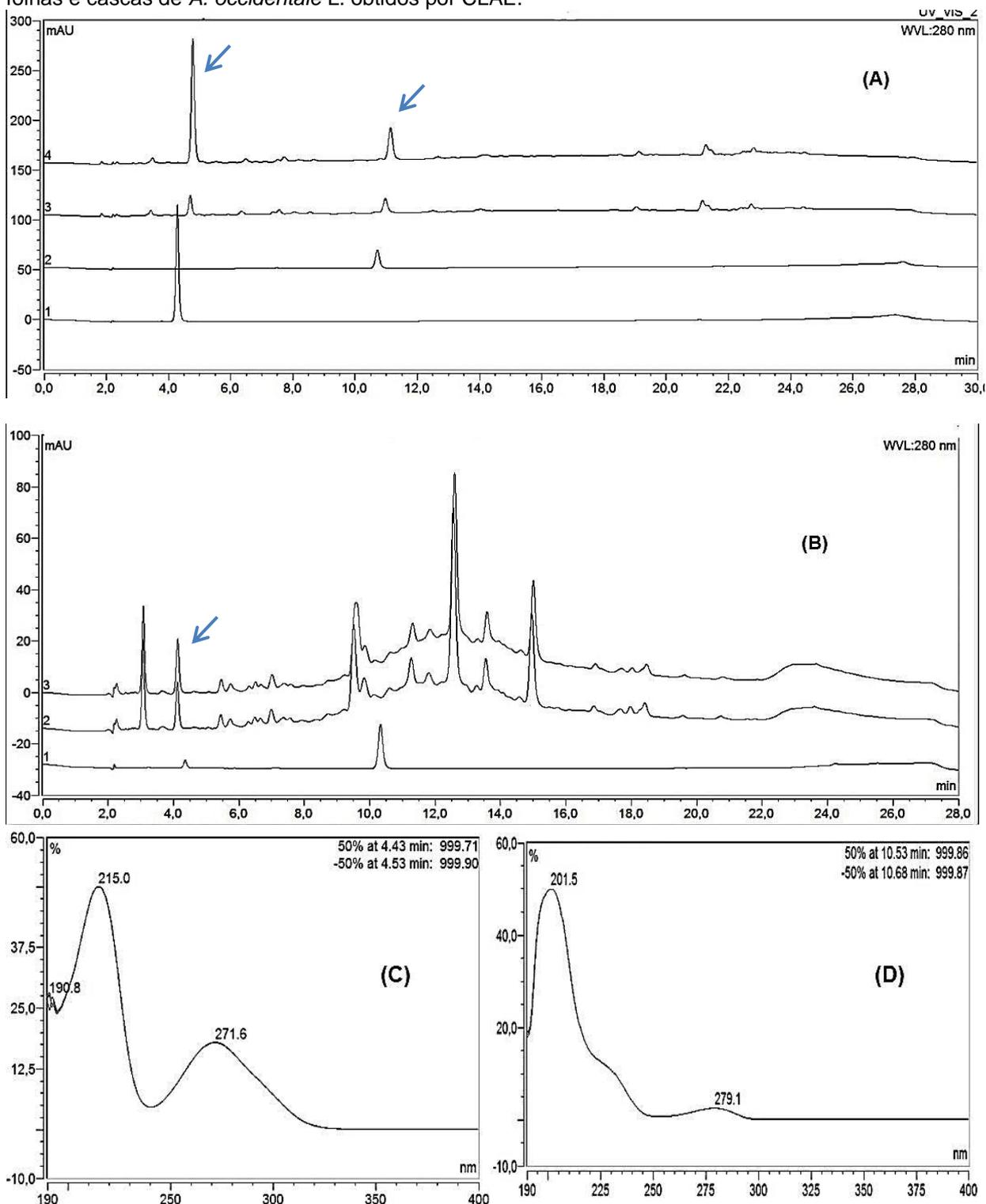
5.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A figura 22 mostra os resultados da análise das amostras de folha e casca para confirmar a presença de ácido gálico e catequina por CLAE-DAD, através da avaliação dos picos destes compostos, em relação aos tempos de retenção, espectros de varredura e áreas. Nas amostras de folhas constatou-se a presença de ácido gálico e catequina, uma vez que os picos correspondentes a esses compostos na amostra apresentaram os mesmos tempos de retenção dos respectivos padrões

de aproximadamente 4,5 minutos para o ácido gálico e 10,5 para a catequina (Figura 22 A), além dos espectros de varredura característico do ácido gálico e catequina (Figura 22 C e 22 D). Ademais, ao contaminar a amostra de folha com soluções de concentrações conhecidas de ácido gálico (Área \cong 12,97 mUA*min) e catequina (Área \cong 3,03 mUA*min) houve um aumento da área do pico correspondente ao ácido gálico de 2,34 mUA*min para 15,03 mUA*min. Enquanto que para a catequina houve um aumento de 2,31 mUA*min para 5,36 mUA*min. Logo esses aumentos nas áreas dos picos estudados foram correspondentes as soluções destes padrões.

Em relação à amostra de casca, só foi possível verificar a presença de ácido gálico por CLAE-DAD, pois o cromatograma da amostra apresentou um pico no mesmo tempo de retenção desse padrão, além do espectro de varredura característico do mesmo (Figura 22 B a 22 C). Também, ao contaminar a amostra de casca com soluções dos padrões estudados houve, apenas, aumento na área do pico correspondente ao ácido gálico de 1,98 mUA*min para 2,31 mUA*min; sendo este incremento na área correspondente a solução do padrão, o qual tinha área de 0,35 mUA*min. Já o mesmo não pode ser observado com a catequina.

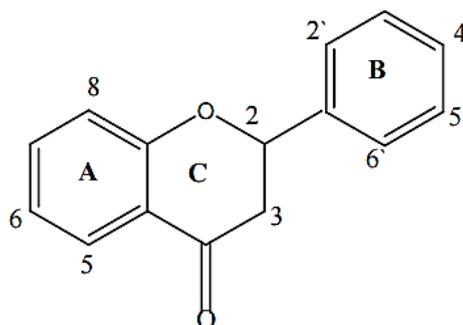
Figura 22- Cromatogramas e espectros de varredura para avaliação da presença de taninos em folhas e cascas de *A. occidentale* L. obtidos por CLAE.



(A) 1. Ácido gálico (10 µg/mL); 2. catequina (10 µg/mL); 3. Solução amostra de folha de cajueiro (2 mg/mL); 4. Solução da amostra de folha fortificada com os padrões. **(B)** 1. Ácido gálico (1,2 µg/mL) e catequina (6 µg/mL); 2. Solução amostra de casca de cajueiro (2 mg/mL); 3. Solução da amostra de casca fortificada com os padrões. **(C)** Espectro de varredura do ácido gálico **(D)** Espectro de varredura da catequina. Fonte: Autoria própria.

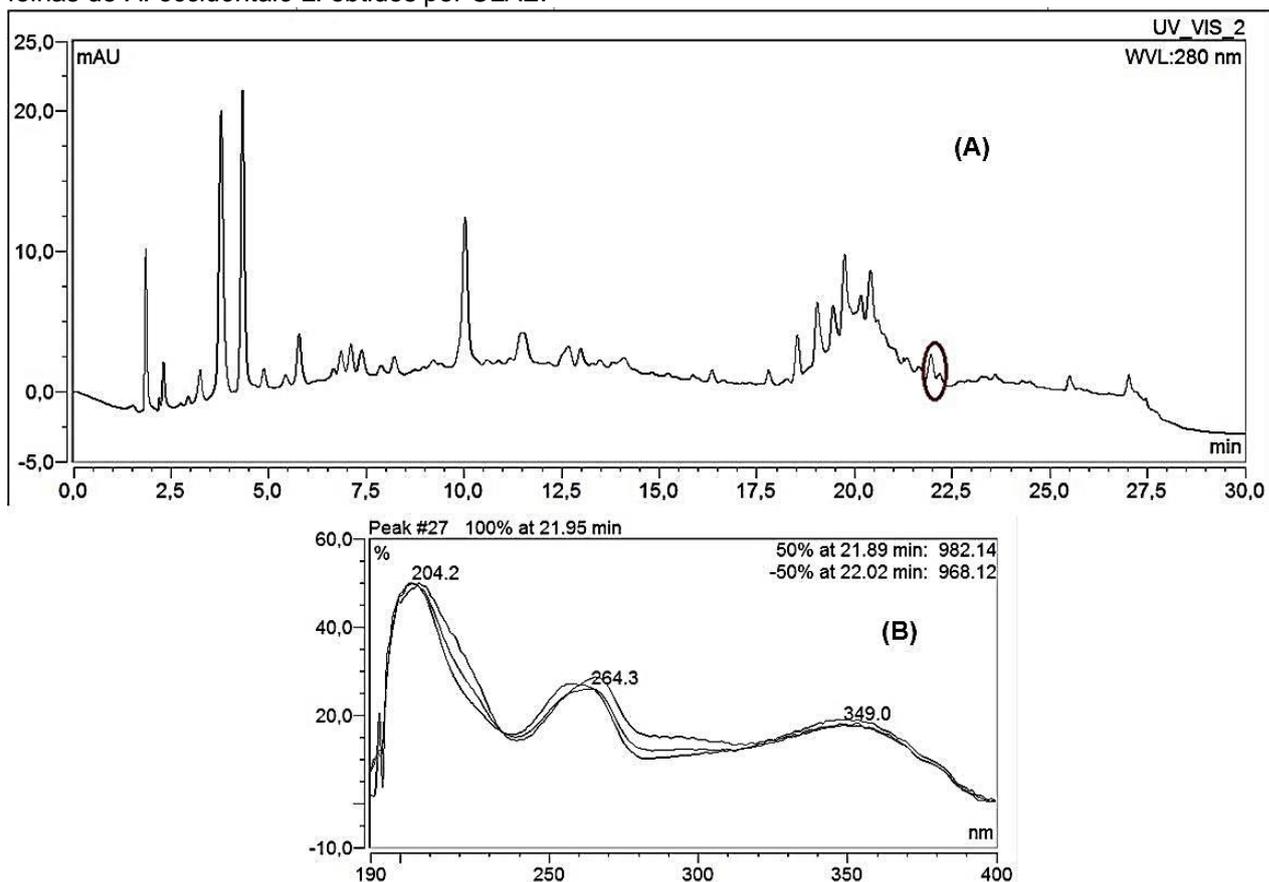
Em relação aos flavonóides os mesmos apresentam um espectro de absorção típico no ultravioleta, com dos máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e um segundo no intervalo 300-550 nm (banda I). Podendo considerar a banda II referente ao anel A e a banda I do anel B (Figura 23) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010; SAIT et al., 2015). Tendo em vista essa característica, foi realizada a confirmação da presença dessa classe de polifenóis por CLAE-DAD nas amostras de folha e casca de *A. occidentale* L.. Nas amostras de folhas constatou-se a presença de flavonoide, uma vez que foi encontrado um pico com espectro de varredura característico de flavonoide com o tempo de retenção de 21,95 minutos (Figura 24). Já nas amostras de casca não foi possível detectar nenhum pico característico dessa classe de composto. Isso se deve ao fato de que o solvente extrator utilizado para as análises em CLAE-DAD foi a água e não metanol ou etanol que são mais específicos para a extração dessa classe de composto (XIE et al., 2015). Por isso na análise por CCD sugeriu maior quantidade de flavonoides nas amostras de folhas e uma banda característica de flavonoide na amostra de Limoeiro, pois os extratos foram obtidos utilizando metanol.

Figura 23- Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: DORNAS et al., 2007

Figura 24- Cromatogramas e espectro de varredura para avaliação da presença de flavonoides das folhas de *A. occidentale* L. obtidos por CLAE.



(A) Cromatograma da solução amostra de folha de *A. occidentale* L. (2 mg/mL). **(B)** Espectro de varredura do flavonoide presente na amostra de folha.

Fonte: Autoria própria.

5.3 AVALIAÇÕES DAS METODOLOGIAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS

5.3.1 Avaliação do líquido extrator

Devido à inexistência de métodos farmacopeicos para o doseamento de polifenóis das folhas e cascas de *Anacardium occidentale* L. se torna imprescindível o seu desenvolvimento e validação, a fim de garantir resultados confiáveis. Deste modo, o presente estudo adaptou o método de doseamento de polifenóis totais de *Stryphnodendron adstringens* da Farmacopeia Brasileira (2010), a fim de escolher as melhores condições extrativas.

A escolha do líquido extrator para preparação da amostra é uma etapa imprescindível no desenvolvimento de um método analítico, uma vez que esta variável afeta fortemente o rendimento dos metabólitos presentes na droga vegetal.

Para uma extração eficiente deve se levar em consideração a natureza química da substância, a qual se deseja extrair. Desse modo, a polaridade do solvente deve apresentar alguma afinidade pelas substâncias de interesse (SONAGLIO et al., 2010; DICIAULA et al., 2014). Levando em conta esse aspecto foram selecionados três solventes (água, etanol e acetona) e suas respectivas proporções a fim de escolher aquele que apresentasse o melhor rendimento com base no teor de polifenóis totais.

A escolha desses solventes se baseiou através de dados na literatura que correlacionam os seus usos na extração de polifenóis (JUN et al., 2011; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; DENG et al., 2014; GHITESCU et al., 2015; ČUJIĆ et al., 2016). Além disso, alguns estudos já comprovaram algumas atividades farmacológicas da espécie estudada, a partir de extratos aquosos, etanólicos ou acetônicos. Em relação às folhas de *A. occidentale* L., Jaiswal e colaboradores (2010) verificaram forte atividade antioxidante, nos seus estudos *in vivo*, de extratos aquosos e etanólicos. Já Pawar e colaboradores (2000) observaram, através de estudos *in vivo*, efeitos antiinflamatórios e analgésicos mais pronunciados na fração solúvel em acetona obtidos de extratos metanólicos do que os extratos utilizando éter de petróleo e clorofórmio. Outros estudos comprovaram atividade antiviral em extrato aquoso (GONÇALVES et al., 2005); atividade antimicrobiana (DAHAKI et al., 2009) e antiulcerogênica em extratos hidroetanólicos (KONAN; BACCHI, 2007).

Em relação às cascas de *A. occidentale* L., Encarnação et al (2016) observaram, *in vitro*, atividade antioxidante em extratos aquosos. Também foram comprovadas, *in vivo*, atividade hipoglicemiante em extratos com etanol a 80% (ELIAKIM-IKECHUKWU; OBRI; AKPA, 2009) e atividades analgésica e anti-inflamatória em extratos acetônicos (VANDERLINE et al., 2009). Isso explica que os solventes com natureza mais polares são mais adequados para extração dos componentes bioativos das folhas e cascas dessa espécie, justificando assim, as escolhas dos solventes analisados nesse estudo.

Na tabela 9 e figura 25 estão demonstrados os resultados obtidos nas análises de diferentes sistemas de solventes nas amostras de folhas, revelando que os melhores teores de polifenóis totais, expressos em g% de pirogalol (P), ácido gálico (AG) e catequina (C) foram com etanol 30% (P: 9,86 g%; AG: 14,25 g%; C:

12,10 g%), acetona 30% (P: 10,5 g%; AG: 15,18g%; C: 12,88 g%) e acetona 50% (P: 9,91 g%; AG: 14,33 g%; C: 12,16 g%).

Tabela 9- Avaliação de diferentes sistemas de solventes em folhas de *A. occidentale* L..

Solventes	Teor (g% de P) ± DP (DPR%)	Teor (g% de AG) ± DP (DPR%)	Teor (g% de C) ± DP (DPR%)
Água	7,18 ± 0,0473 (0,66%)	10,39 ± 0,2732 (2,63%)	8,81 ± 0,2320 (2,63%)
Etanol	7,99 ± 0,1419 (1,78%)	11,56 ± 0,4259 (3,69%)	9,81 ± 0,2698 (2,75%)
Acetona	3,63 ± 0,1054 (2,90%)	5,25 ± 0,2503 (4,77%)	4,45 ± 0,1636 (3,67%)
Etanol 30%	9,86 ± 0,1264 (1,28%)	14,25 ± 0,3642 (2,56%)	12,10 ± 0,3707 (3,06%)
Etanol 50%	9,00 ± 0,2611 (2,90%)	13,00 ± 0,4766 (3,67%)	11,03 ± 0,2237 (2,03%)
Acetona 30%	10,50 ± 0,1973 (1,88%)	15,18 ± 0,5084 (3,35%)	12,88 ± 0,4877 (3,79%)
Acetona 50%	9,91 ± 0,1557 (1,57%)	14,33 ± 0,5197 (3,63%)	12,16 ± 0,4246 (3,49%)

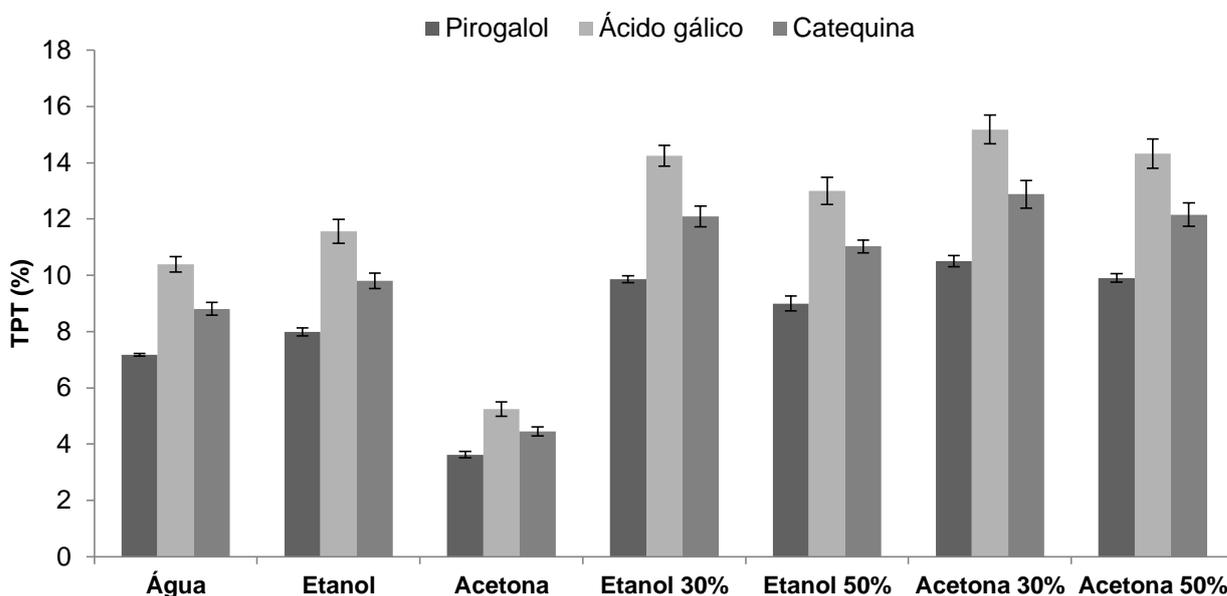
AG = ácido gálico; C = catequina; P= pirogálico; DP= desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo.

Fonte: Autoria própria.

Na tabela 10 estão apresentados os resultados da análise de variância dos teores de polifenóis obtidos na extração com etanol 30%, acetona 30 e 50% e constatou-se que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) apenas para os teores de pirogalol, pois o valor de F_{cal} foi maior que o $F_{crítico}$, enquanto que os demais teores expressos em ácido gálico e catequina não houve diferença significativa ($p < 0,05$), já que apresentou valores de F_{cal} menores que os valores de $F_{crítico}$.

Mesmo apresentando uma diferença estatística para os teores de pirogalol, o etanol 30% foi escolhido em razão das dificuldades de obtenção de acetona, pois é controlada pela polícia federal tornando a sua aquisição restrita, de acordo com a ação regulamentada pela lei 10357/2001. Além disso, o etanol é menos poluente ao meio ambiente e apresenta menor custo.

Figura 25- Avaliação de diferentes solventes e proporções na extração de polifenóis das folhas de *A. occidentale* L..



TPT= Teor de polifenóis totais.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10- Análise de variância ANOVA *one way* ($p < 0,05$) para avaliação de solventes (etanol 30%, acetona 30 e 50%) em folhas de *A. occidentale* L..

Pirogalol	SQ	gl	MQ	F	F_{crítico}
Entre os grupos	0,7618	2	0,3809	14,3895	5,1432
Dentro dos grupos	0,1588	6	0,0265		
Total	0,9207	8			
Ácido gálico					
Entre os grupos	1,5994	2	0,7972	3,6170	5,1433
Dentro dos grupos	1,3223	6	0,2204		
Total	2,9167	8			
Catequina					
Entre os grupos	1,1512	2	0,5756	3,1080	5,1433
Dentro dos grupos	1,1112	6	0,1852		
Total	2,2623	8			

SQ = soma quadrática, gl = grau de liberdade, MQ = média quadrática.

Fonte: Autoria própria.

Na tabela 11 e figura 26 estão apresentados os resultados obtidos para a análise das soluções obtidas para as cascas. Os dados evidenciam que os sistemas de solventes que resultaram em maior eficiência com maiores rendimentos para as amostras de cascas, foram àquelas preparadas com etanol 30% (P: 14,85 g%; AG: 22,37 g%) e etanol 50% (P: 14,83 g%; AG: 22,36 g%).

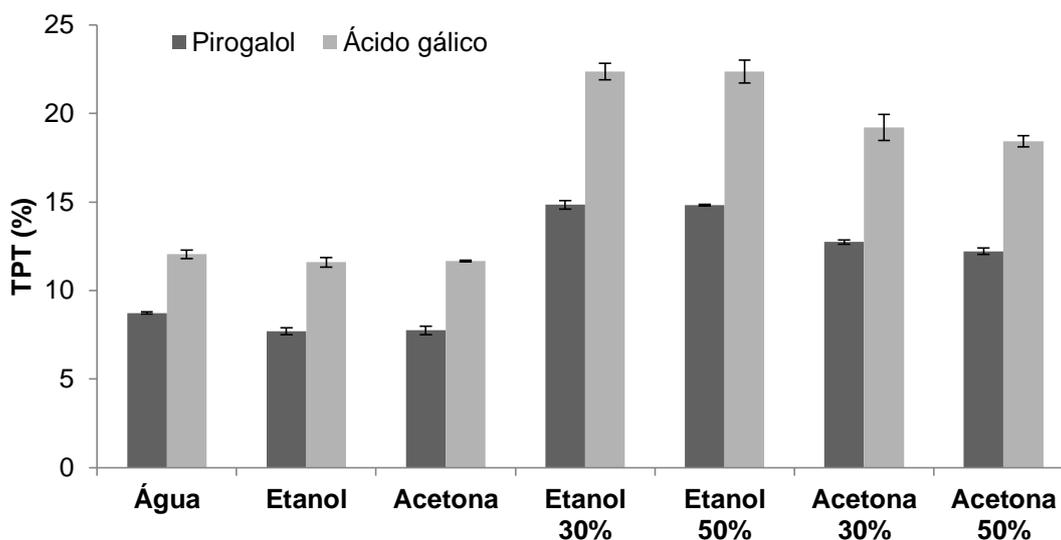
Tabela 11- Avaliação de diferentes sistemas de solventes em cascas de *A. occidentale* L..

Solventes	Teor (g% de P) ± DP (DPR%)	Teor (g% de AG) ± DP (DPR%)
Água	8,74 ± 0,0656 (0,79%)	12,05 ± 0,2485 (2,06%)
Etanol	7,70 ± 0,1928 (2,51%)	11,60 ± 0,2766 (2,39%)
Acetona	7,75 ± 0,2312 (2,98%)	11,67 ± 0,0346 (0,30%)
Etanol 30%	14,85 ± 0,2431 (1,64%)	22,37 ± 0,4730 (2,11%)
Etanol 50%	14,83 ± 0,0512 (0,34%)	22,36 ± 0,6502 (2,91%)
Acetona 30%	12,74 ± 0,1141 (0,90%)	19,21 ± 0,1295 (3,80%)
Acetona 50%	12,22 ± 0,1739 (1,42%)	18,42 ± 0,3121 (1,69%)

P= pirogalol; DP= desvio padrão; DPR%= desvio padrão relativo; AG= ácido gálico.

Fonte: Autoria própria.

Figura 26- Avaliação de diferentes solventes e proporções na extração de polifenóis das cascas de *A. occidentale* L..



Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Avaliação dos métodos extrativos

A escolha de método extrativo a partir de drogas vegetais irá depender da substância e/ou grupo de substância de interesse do estudo e deve evitar a sua modificação química, a fim de se obter um rendimento ótimo no final do processo (CUJIC et al., 2016). Por sua vez, a eficiência da extração está inteiramente relacionada com fatores intrínsecos do processo, tais quais, temperatura; tempo de contato da droga com o líquido extrator; renovação do solvente; velocidade de agitação, entre outros. Desse modo, a sua avaliação é de suma importância, a fim de obter métodos extrativos que sejam simples, seguros, reprodutíveis e de baixo custo (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010; VONGSAK et al., 2013).

Ao analisar a influência dos diferentes métodos extrativos nas amostras de folhas foi verificado que a técnica por ultrassom foi a que apresentou os maiores teores de polifenóis totais (P: 9,89 g%; AG: 14,30 g%; C: 12,14 g%) (Tabela 12). Logo foi escolhido este método extrativo, pelo fato de ser uma técnica que não utiliza aquecimento e assim faz com que haja maior preservação das substâncias de interesse e, também pelo baixo consumo de energia deste processo. Apesar da análise de variância (ANOVA *one way*) dos diferentes métodos extrativos verificar diferença significativa para um para os teores expressos em pirogalol, os demais (ácido gálico e catequina) não houve diferença significativa, uma vez que os valores de F_{cal} foram menores que os valores de $F_{critico}$ (Tabela 13). Isso significa que os três métodos extrativos não influenciam no teor de polifenóis expressos em ácido gálico e catequina. Mas a escolha do método ultrassom sobressai pelas suas vantagens já citadas anteriormente.

Durante a extração por essa técnica, as ondas ultrassônicas geram bolhas de vácuo que aumentam de tamanho e entram em colapso rapidamente, devido a flutuação da pressão que ocorre durante esse processo denominado de cavitação acústica. Este processo acelera a ruptura das paredes celulares; reduzem o tamanho das partículas e melhora a penetração de solventes nas matrizes vegetais (DENG et al., 2015).

Tabela 12- Avaliação de diferentes métodos extrativos em folhas de *A. occidentale* L..

Métodos extrativos	Teor g%		
	Pirogalol	Ácido gálico	Catequina
Refluxo	9,86 ± 0,1264 (1,28)	14,25 ± 0,3642 (2,56)	12,10 ± 0,3707 (3,06)
Maceração	9,32 ± 0,2341 (2,51)	13,47 ± 0,3451 (2,56)	11,43 ± 0,4294 (3,76)
Ultrassom	9,89 ± 0,1140 (1,15)	14,30 ± 0,4560 (3,19)	12,14 ± 0,3765 (3,10)

Os resultados foram expressos como: média ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13- Análise de variância ANOVA *one way* ($p < 0,05$) para avaliação dos métodos extrativos (refluxo, maceração e ultrassom) em folhas de *A. occidentale* L..

Pirogalol	SQ	gl	MQ	F	F _{crítico}
Entre os grupos	0,6268	2	0,3134	14,2204	5,1433
Dentro dos grupos	0,1676	6	0,0279		
Total	0,7944	8			
Ácido gálico					
Entre os grupos	1,3193	2	0,6597	4,3052	5,1433
Dentro dos grupos	0,9194	6	0,1532		
Total	2,2387	8			
Catequina					
Entre os grupos	0,9435	2	0,4717	3,0534	5,1433
Dentro dos grupos	0,9270	6	0,1545		
Total	1,8704	8			

SQ = soma quadrática, gl = grau de liberdade, MQ = média quadrática.

Fonte: Autoria própria.

Em relação aos métodos extrativos analisados para as amostras de cascas o que apresentou maior rendimento foi o método por refluxo (P: 14,85 g%; AG: 22,37 g%) (Tabela 14). Na análise de variância (ANOVA *one way*) dos diferentes métodos extrativos verificou que houve diferença significativa nos teores de polifenóis totais expressos em g% de pirogalol e ácido gálico, uma vez que os valores de F_{cal} foram superiores aos valores de $F_{crítico}$ (Tabela 15). Logo foi escolhido o método por refluxo por ser o que obteve os maiores teores de polifenóis totais. Isso se deve ao fato que métodos extrativos que utiliza aquecimento são mais adequados para extração de componentes ativos de partes rígidas da planta, como a casca (LEITE, 2009).

Tabela 14- Avaliação de diferentes métodos extrativos em cascas de *A. occidentale* L.

Métodos extrativos	Teor (g%)	
	Pirogalol	Ácido gálico
Refluxo	14,85 ± 0,2815 (1,90)	22,37 ± 0,2774 (1,24)
Maceração	14,13 ± 0,1963 (1,39)	21,29 ± 0,4242 (1,99)
Ultrassom	14,15 ± 0,2267 (1,60)	21,32 ± 0,3750 (1,76)

Os resultados foram expressos como: média ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 15- Análise de variância ANOVA *one way* ($p < 0,05$) para avaliação dos métodos extrativos (refluxo, maceração e ultrassom) em cascas de *A. occidentale* L..

Pirogalol	SQ	gl	MQ	F	F _{crítico}
Entre os grupos	1,0049	2	0,5024	8,9100	5,1433
Dentro dos grupos	0,3383	6	0,0564		
Total	1,3432	8			

Ácido gálico	SQ	gl	MQ	F	F _{crítico}
Entre os grupos	2,2713	2	1,1356	8,5707	5,1433
Dentro dos grupos	0,7950	6	0,1325		
Total	3,0663	8			

SQ = soma quadrática, gl = grau de liberdade, MQ = média quadrática.

Fonte: Autoria própria.

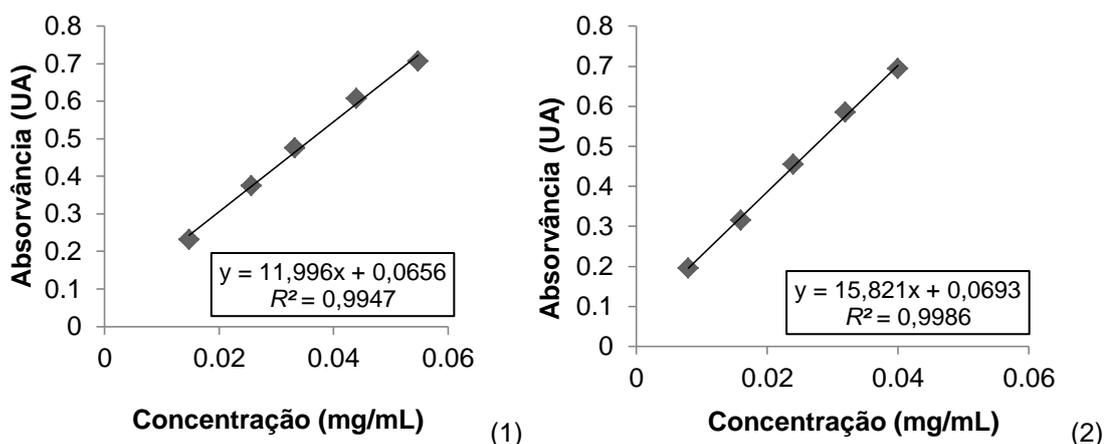
5.4 VALIDAÇÕES DOS MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

5.4.1 Linearidade

A equação da regressão linear média obtida a partir das três curvas de linearidade foram $y = 11,996x + 0,0656$ (folhas) e $y = 15,821x + 0,0693$ (cascas) (Figura 27). Quanto às curvas de calibração dos padrões pirogalol, ácido gálico e catequina, os modelos matemáticos encontrados foram $y = 138,07x + 0,0215$; $y = 102,52x + 0,0072$ e $y = 101,94x + 0,0401$, respectivamente (Figura 28). Para todas as equações, y é a absorvância (U.A.) e x a concentração da solução amostra (mg/mL). Os coeficientes de determinação das curvas obtidas das soluções amostras de folhas e cascas foram $R^2 = 0,9947$ e $R^2 = 0,9986$, respectivamente. Em relação à curva de calibração obtida para os padrões pirogalol, ácido gálico e

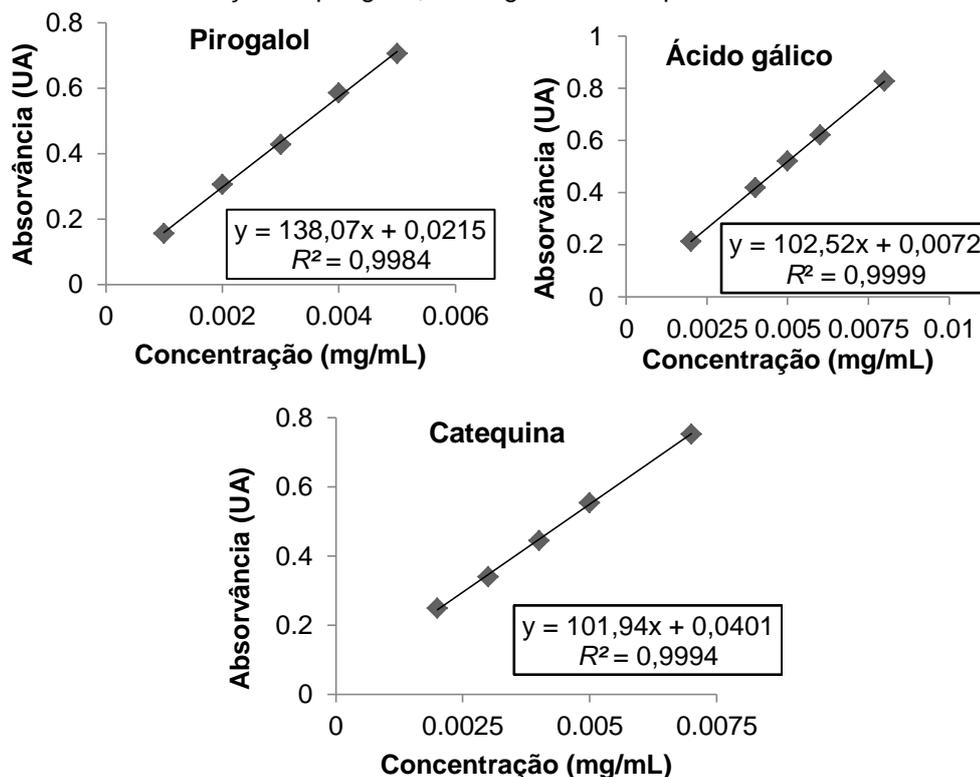
catequina, os coeficientes de determinação (R^2) foram, respectivamente, 0,9984; 0,9999 e 0,9994. Deste modo, os métodos foram considerados lineares dentro das faixas de concentrações utilizadas, uma vez que ambas as curvas médias de calibração apresentaram $R^2 > 0,99$ como preconizado pela RE 899 (2003) e ICH (2005).

Figura 27- Curvas média de linearidade para a solução amostra de folhas (1) e para a solução amostra de cascas (2).



Fonte: Autoria própria.

Figura 28- Curvas de calibração de pirogalol, ácido gálico e catequina.



Fonte: Autoria própria.

5.4.2 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através das curvas de calibração dos padrões. No método (folha) foram encontrados valores de LD de 0,10 µg/mL; 0,16 µg/mL e 0,31 µg/mL para o pirogalol, ácido gálico e catequina, respectivamente. Já para os valores de LQ foram encontrados 0,34 µg/mL; 0,54 µg/mL e 1,03 µg/mL para o pirogalol, ácido gálico e catequina, respectivamente. Para o método (casca) foram encontrados os mesmos valores de LD e LQ para o pirogalol e ácido gálico. Com esses resultados fica notável que os métodos possuem alta sensibilidade para detectar e quantificar os compostos fenólicos, sem interferência significativa de fatores relacionados ao equipamento.

5.4.3 Especificidade

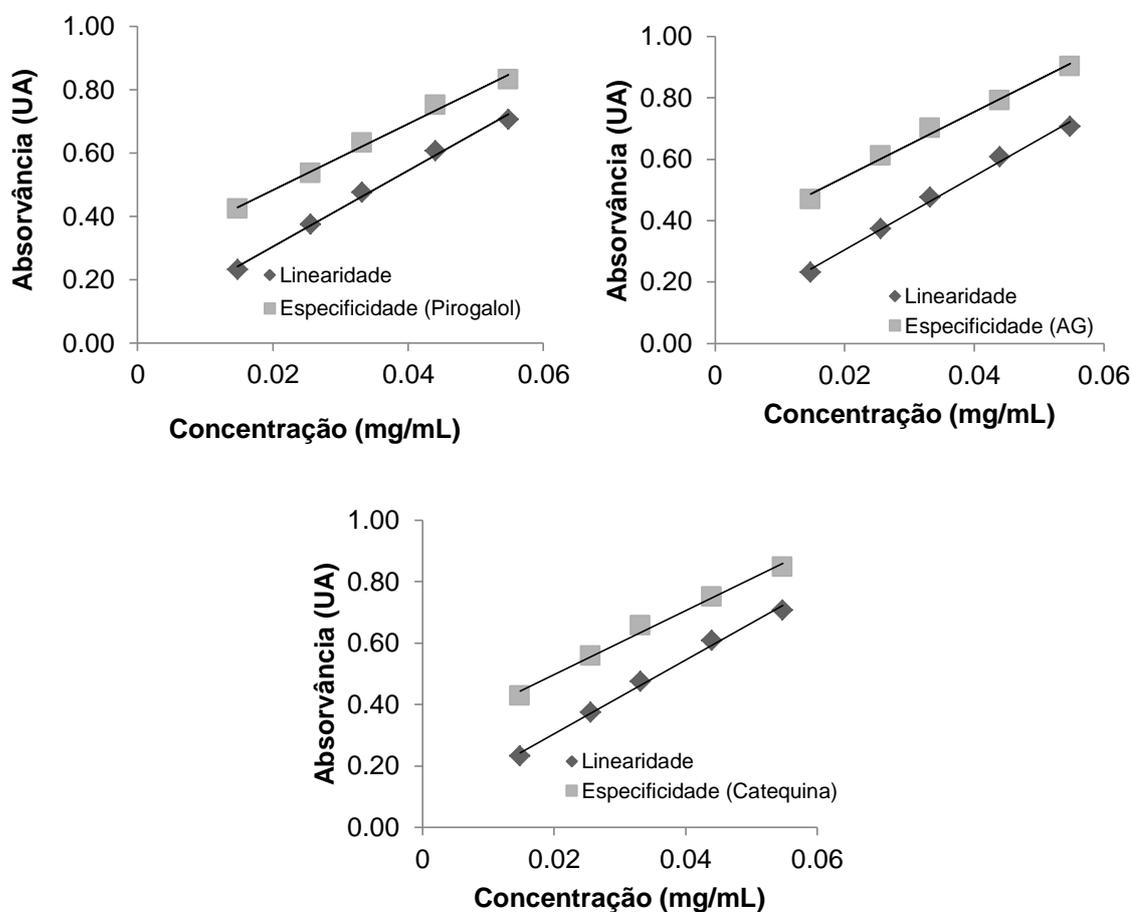
As figuras 29 e 30 mostram as curvas médias obtidas para as soluções amostras de folhas e cascas (curvas de linearidade) e para as soluções das mesmas enriquecidas com os padrões analisados (curvas de especificidade), sendo estes: pirogalol, ácido gálico e catequina para as amostras de folhas e apenas os dois primeiros padrões para as amostras de cascas. Na tabela 16 estão apresentadas as equações da reta das referidas curvas e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2), na análise deste último parâmetro verificou que as curvas se mostraram lineares, sendo comprovado pelos $R^2 > 0,99$. Na análise dessas curvas pode-se observar que as mesmas se mostraram paralelas entre si, comprovando desse modo a especificidade dos métodos espectrofométricos.

Tabela 16- Equações da reta e coeficientes de correlação (R^2) das curvas médias de linearidade e dos padrões.

Curvas	Equações da reta	R^2
Linearidade CJF	$y = 11,996x + 0,0656$	0,9947
Especificidade (CJF+P)	$y = 10,433x + 0,2751$	0,9938
Especificidade (CJF+AG)	$y = 10,629x + 0,3290$	0,9919
Especificidade (CJF+C)	$y = 10,427x + 0,2889$	0,9915
Linearidade CJC	$y = 15,821x + 0,0693$	0,9986
Especificidade (CJC+P)	$y = 14,088x + 0,2208$	0,9971
Especificidade (CJC+AG)	$y = 14,475x + 0,2389$	0,9916

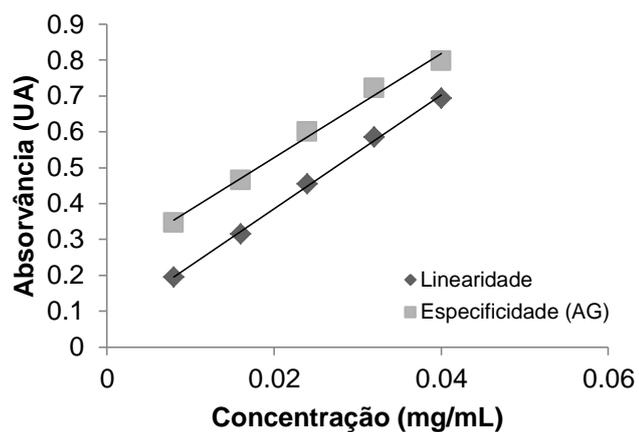
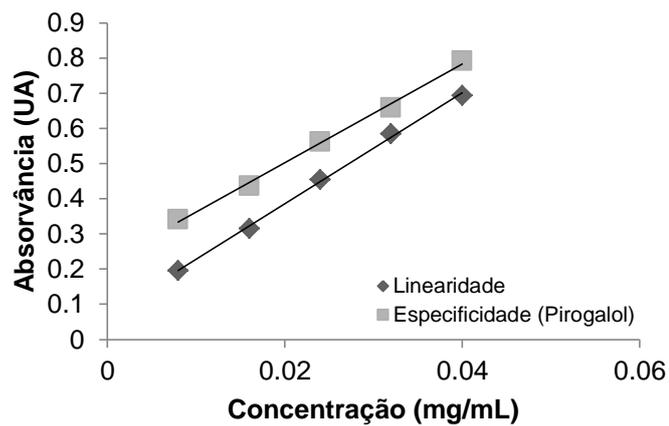
CJF: caju folha; P: pirogalol; AG: ácido gálico; C catequina; CJC: caju casca.
Fonte: Autoria própria.

Figura 29- Especificidade dos métodos espectrofotométricos propostos para doseamento polifenóis totais em folhas de *A. occidentale* L..



Fonte: Autoria própria.

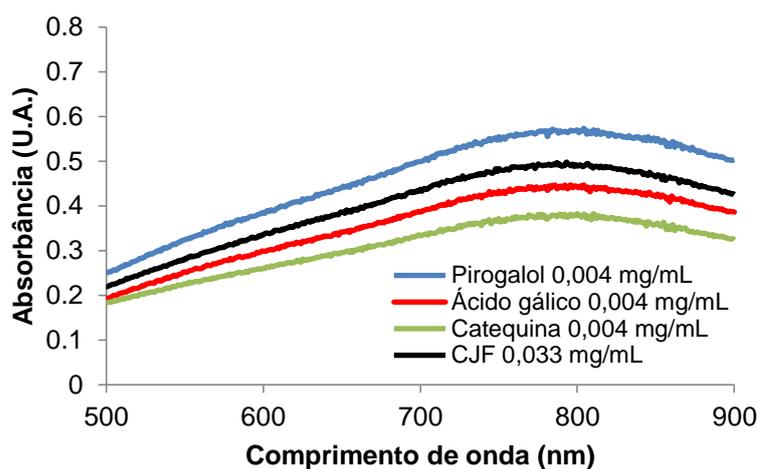
Figura 30- Especificidade dos métodos espectrofotométricos propostos para doseamento polifenóis totais em cascas do caule de *A. occidentale* L..



Fonte: Autoria própria.

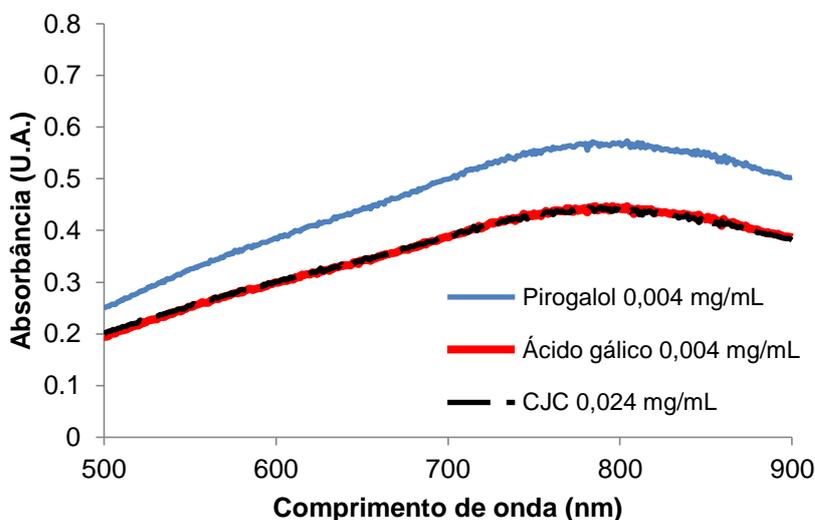
Outra proposta que se aplicou para a análise da especificidade foi por meio da sobreposição dos espectros de varredura (500-900 nm) das soluções dos padrões e das soluções amostras de folhas e cascas de *A. occidentale* L.. Nas figuras 31 e 32 pode-se observar que o máximo de absorção dos padrões e das soluções amostra de folhas e cascas foi no comprimento de onda de 760 nm, confirmando assim que os métodos espectrofométricos são capazes de medir exatamente os compostos de interesse, polifenóis (BRASIL, 2003).

Figura 31- Comparação dos espectros de absorção pelo método espectrofotométrico de caju folha (CJF).



Fonte: Autoria própria.

Figura 32- Comparação dos espectros de absorção pelo método espectrofotométrico de caju casca (CJC).



Fonte: Autoria própria.

5.4.4 Precisão

A tabela 17 mostra os resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade das soluções amostras de folhas à 0,033 mg/mL e as soluções amostras de cascas à 0,024 mg/mL. Neste ensaio todos os desvios padrões relativos (DPR%) foram inferiores a 5%, limite pelo qual é estabelecido pela RE 899/2003 (BRASIL, 2003). Nesse contexto, os métodos espectrofotométricos desenvolvidos podem ser considerados como precisos para o doseamento de polifenóis totais para as partes estudadas nesse trabalho.

Tabela 17- Ensaios de repetibilidade para as amostras de folhas e cascas de *A. occidentale* L..

Amostras	Teor g%		
	Pirogalol	Ácido gálico	Catequina
Folhas	10,48 ± 0,2886 (2,75)	15,23 ± 0,5754 (3,78)	12,91 ± 0,4676 (3,62)
Cascas	13,28 ± 0,2749 (2,07)	20,07 ± 0,2810 (1,40)	-

Os resultados foram expressos como: média ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).

Fonte: Autoria própria.

Em relação aos ensaios de precisão intermediária, todos os desvios padrões relativos obtidos também foram inferiores ao valor máximo especificado (5%). Os dados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA *two way*), em nível de confiança de 95%, os dados indicaram que os métodos foram precisos para analistas diferentes no mesmo dia e em dias diferentes, conforme os valores obtidos para o F_{cal} serem inferiores aos valores do $F_{crítico}$ (Tabela 18 e 19).

Tabela 18- Ensaio de precisão intermediária para a amostra de folhas de *A. occidentale* L..

	Operadores	Dia 1	Dia 2	Analista	Dia
PIROGALOL	Analista 1	10,70 ± 0,2479 (2,32)	10,72 ± 0,1118 (1,04)	$F= 3,15$	$F= 4,92$
	Analista 2	10,70 ± 0,1397 (1,31)	10,52 ± 0,1950 (1,85)	$F_{crítico}= 19,00$	$F_{crítico}= 19,00$
ÁCIDO GÁLICO	Analista 1	15,47 ± 0,6897 (4,46)	15,50 ± 0,4921 (3,17)	$F= 1,69$	$F= 1,96$
	Analista 2	15,46 ± 0,5300 (3,43)	15,20 ± 0,5981 (3,93)	$F_{crítico}= 19,00$	$F_{crítico}= 19,00$
CATEQUINA	Analista 1	13,13 ± 0,5112 (3,89)	13,15 ± 0,3786 (2,88)	$F= 1,83$	$F= 1,82$
	Analista 2	13,11 ± 0,3783 (2,88)	12,89 ± 0,4832 (3,75)	$F_{crítico}= 19,00$	$F_{crítico}= 19,00$

Os resultados foram expressos como: média em g% ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 19- Ensaio de precisão intermediária para a amostra de cascas de *A. occidentale* L..

	Operadores	Dia 1	Dia 2	Analista	Dia
PIROGALOL	Analista 1	13,31 ± 0,2639 (1,98)	13,40 ± 0,2390 (1,78)	$F= 1,68$	$F= 1,22$
	Analista 2	12,59 ± 0,2034 (1,62)	12,73 ± 0,2455 (1,93)	$F_{crítico}= 19,00$	$F_{crítico}= 19,00$
ÁCIDO GÁLICO	Analista 1	20,05 ± 0,4243 (2,12)	20,19 ± 0,2702 (1,34)	$F= 1,04$	$F= 2,47$
	Analista 2	18,75 ± 0,4164 (2,22)	18,97 ± 0,1931 (1,02)	$F_{crítico}= 19,00$	$F_{crítico}= 19,00$

Os resultados foram expressos como: média em g% ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).

Fonte: Autoria própria.

5.4.5 Exatidão

A tabela 20 apresenta os resultados dos ensaios de exatidão. Para a recuperação em amostras de folhas, os dados revelaram faixa de exatidão entre 85,01% a 100,32%. Cujas médias foram de 98,09%; 88,34% e 92,64%, para pirogalol, ácido gálico e catequina, respectivamente. Considerando as amostras de cascas do cajueiro, os valores de recuperação se localizaram entre 86,34% e 95,02%. Cujas médias foram de 90,16% e 92,87% para pirogalol e ácido gálico, respectivamente. Diante desses resultados, foi possível verificar que os métodos aplicados para as folhas e cascas de caule de *A. occidentale* L. podem ser considerados como exatos, pois apresentaram desempenho dentro dos limites preconizados pelos compêndios oficiais, os quais são de 80 a 120% pela RE 899/2003 (BRASIL, 2003) e de 85 a 115% (ICH, 2005).

Tabela 20- Resultados dos ensaios de exatidão para as amostras de folhas e cascas de *A. occidentale* L..

Farmacógeno	Padrões	80%	100%	120%	Média
Folha	Pirogalol	100,32 ± 0,2975 (0,30)	95,57 ± 1,1181 (1,17)	98,37 ± 1,7794 (0,30)	98,09 ± 2,3248 (2,37)
	Ác. gálico	89,88 ± 0,2592 (0,29)	85,01 ± 0,1919 (0,23)	90,14 ± 0,2315 (0,26)	88,34 ± 2,5104 (2,84)
	Catequina	87,21 ± 0,8908 (1,02)	93,03 ± 0,8929 (0,96)	97,68 ± 0,2531 (0,26)	92,64 ± 4,5907 (4,96)
Casca	Pirogalol	91,99 ± 0,1781 (0,19)	86,34 ± 0,1207 (1,39)	92,16 ± 1,297 (1,39)	90,16 ± 2,9988 (3,33)
	Ác. gálico	95,02 ± 0,3635 (0,38)	94,25 ± 0,2448 (0,26)	89,33 ± 0,6627 (0,74)	92,87 ± 2,6986 (2,91)

Os resultados foram expressos como: média em % ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).

Fonte: Autoria própria.

5.4.6 Robustez

Segundo a legislação vigente na validação de métodos analíticos, para que o método seja considerado robusto, ou seja, tenha capacidade de resistir a pequenas e deliberadas modificações, o mesmo não pode apresentar variação da resposta analítica maior que 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Com base nisso, foram realizadas algumas modificações de alguns parâmetros considerados críticos nos métodos propostos, sendo eles: luminosidade (exposição ou não a radiação luminosa); equipamentos (Evolution 60S[®] e Micronal[®]); temperatura (temperatura ambiente e sob refrigeração) e estabilidade da solução amostra (1, 2 e 3 dia).

Nas tabelas 21 e 22 estão apresentados os resultados obtidos neste ensaio, sendo possível observar que os desvios padrões relativos (DPR) obtidos a partir dos teores calculados para as soluções amostra de folhas e cascas de caule de *A. occidentale* L. foram menores que 4,46% e 2,78%, respectivamente, podendo considerar o método robusto nestas condições uma vez que os valores de DPR foram menores do que 5% em todos os casos conforme exigido pela legislação.

Tabela 21- Ensaio de robustez das soluções amostras de folhas de *A. occidentale* L..

Parâmetros	Variáveis	Pirogalol	Ácido gálico	Catequina
Luminosidade	Ausência de luz	10,70 ± 0,2479 (2,32)	15,47 ± 0,6897(4,46)	13,13 ± 0,5112 (3,89)
	Presença de luz	10,21 ± 0,0820 (0,80)	14,76 ± 0,4193(2,84)	12,53 ± 0,3464 (2,76)
Equipamentos	Evolution 60S [®]	10,60 ± 0,2522 (2,38)	15,33 ± 0,6850 (4,47)	13,01 ± 0,5522 (4,24)
	Micronal [®]	10,70 ± 0,2479 (2,32)	15,47 ± 0,6897(4,46)	13,13 ± 0,5112 (3,89)
Temperatura	T.A.	10,70 ± 0,2479 (2,32)	15,47 ± 0,6897(4,46)	13,13 ± 0,5112 (3,89)
	Geladeira	10,64 ± 0,1650 (1,55)	15,38 ± 0,4626 (3,01)	13,05 ± 0,4486 (3,44)
Estabilidade	1º dia	10,26 ± 0,1606 (1,56)	14,84 ± 0,5502 (3,71)	12,59 ± 0,4126 (3,28)
	2º dia	10,70 ± 0,2479 (2,32)	15,47 ± 0,6897 (4,46)	13,13 ± 0,5112 (3,89)
	3º dia	10,72 ± 0,1118 (1,04)	15,50 ± 0,4921 (3,17)	13,16 ± 0,3786 (2,88)

T.A.: temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como: média em g% ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 22- Ensaio de robustez das soluções amostras de cascas de *A. occidentale* L..

Parâmetros	Variáveis	Pirogalol	Ácido gálico
Luminosidade	Ausência de luz	13,26± 0,3427 (2,59)	19,97 ± 0,1506 (0,75)
	Presença de luz	13,39 ± 0,0914 (0,68)	20,18 ± 0,5112 (2,53)
Equipamentos	Evolution 60S	13,05 ± 0,1299 (1,00)	19,66 ± 0,4244 (2,16)
	Micronal	13,26 ± 0,3427 (2,59)	19,97 ± 0,1506 (0,75)
Temperatura	T.A.	13,26 ± 0,3427 (2,59)	19,97 ± 0,1506 (0,75)
	Geladeira	13,29 ± 0,3526 (2,65)	20,02 ± 0,1097 (0,55)
Estabilidade	1º dia	12,78 ± 0,1421 (1,10)	19,41 ± 0,4859 (2,50)
	2º dia	12,76 ± 0,0420 (0,33)	19,24 ± 0,5353 (2,78)
	3º dia	12,89 ± 0,2191 (2,78)	19,42 ± 0,2192 (1,44)

T.A.: temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como: média em g% ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).

Fonte: Autoria própria.

5.5 MÉTODOS POR CLAE-DAD

5.5.1 Avaliação de metodologia

Para as análises, foram injetadas, separadamente, 20 μ L das soluções padrão e soluções amostra de folhas e cascas, em triplicata. Os cromatogramas foram registrados e as áreas dos picos foram medidas. O tempo total de análise foi de 30 minutos para as folhas e 28 minutos para as cascas. No método desenvolvido para as soluções amostra das folhas foi observado um tempo de retenção de aproximadamente 4,5 minutos para o ácido gálico e 10,5 minutos para a catequina. Já para o método desenvolvido para as soluções amostra de cascas de caule de *A. occidentale* L. foi observado um tempo de retenção de aproximadamente 4,3 minutos para o ácido gálico.

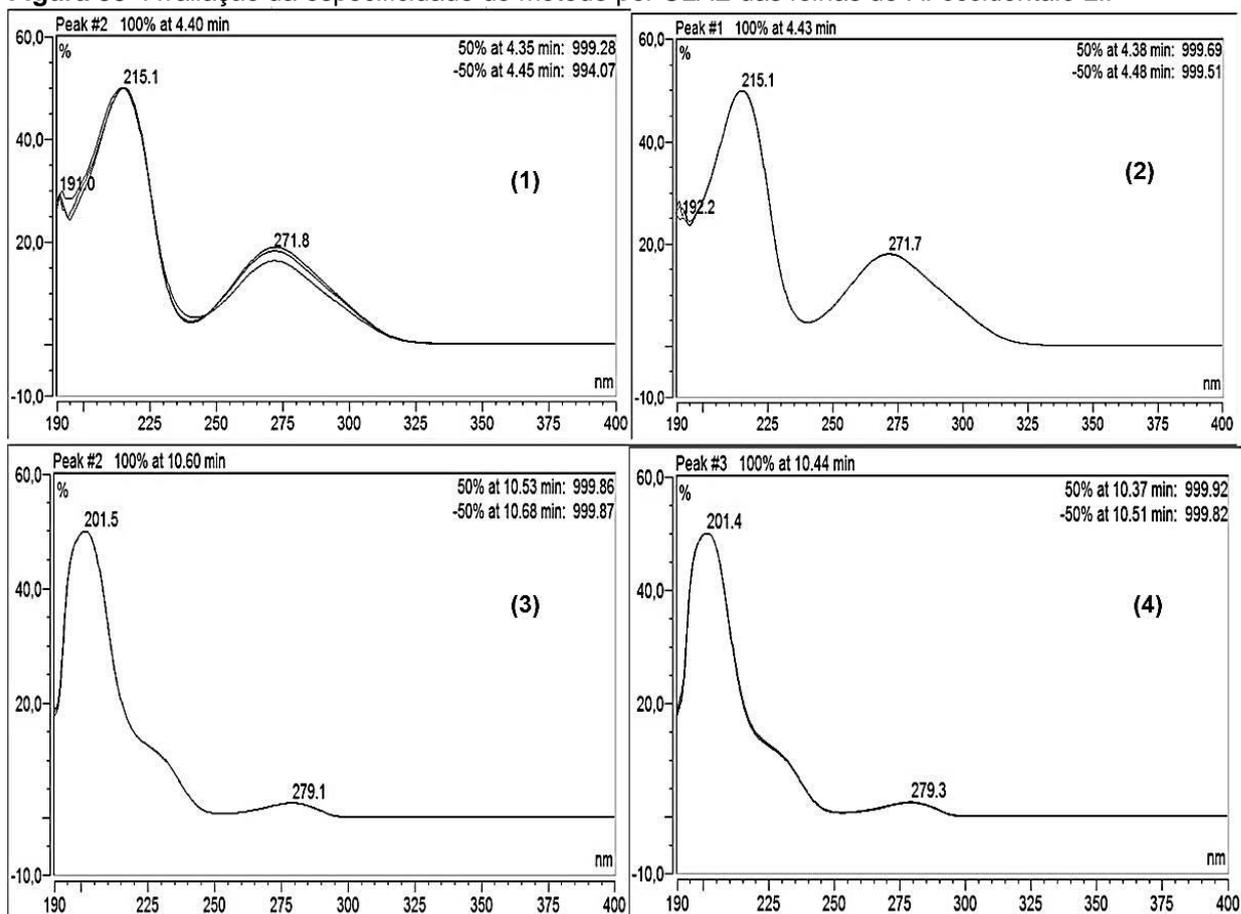
5.5.2 Validação das metodologias

5.5.2.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada através da comparação dos espectros de varredura e dos tempos de retenção dos padrões de ácido gálico e catequina no cromatograma da amostra de folhas, e do padrão ácido gálico e na amostra das cascas.

Os espectros de varredura dos picos correspondentes às soluções padrão do ácido gálico e da catequina, assim como os espectros dos picos correspondentes aos marcadores na amostra das folhas estão apresentados na figura 33. Sendo os máximos de absorvância de aproximadamente 272 nm e 279 nm para o ácido gálico e catequina, respectivamente. A figura 34 apresenta os cromatogramas obtidos para a amostra de folha e para os padrões: ácido gálico e catequina. Os dados mostram que os tempos de retenção dos padrões foram de 4,4 minutos para o ácido gálico (a) e de 10,6 para a catequina (b), os quais são coincidentes com os picos c e d do cromatograma da amostra.

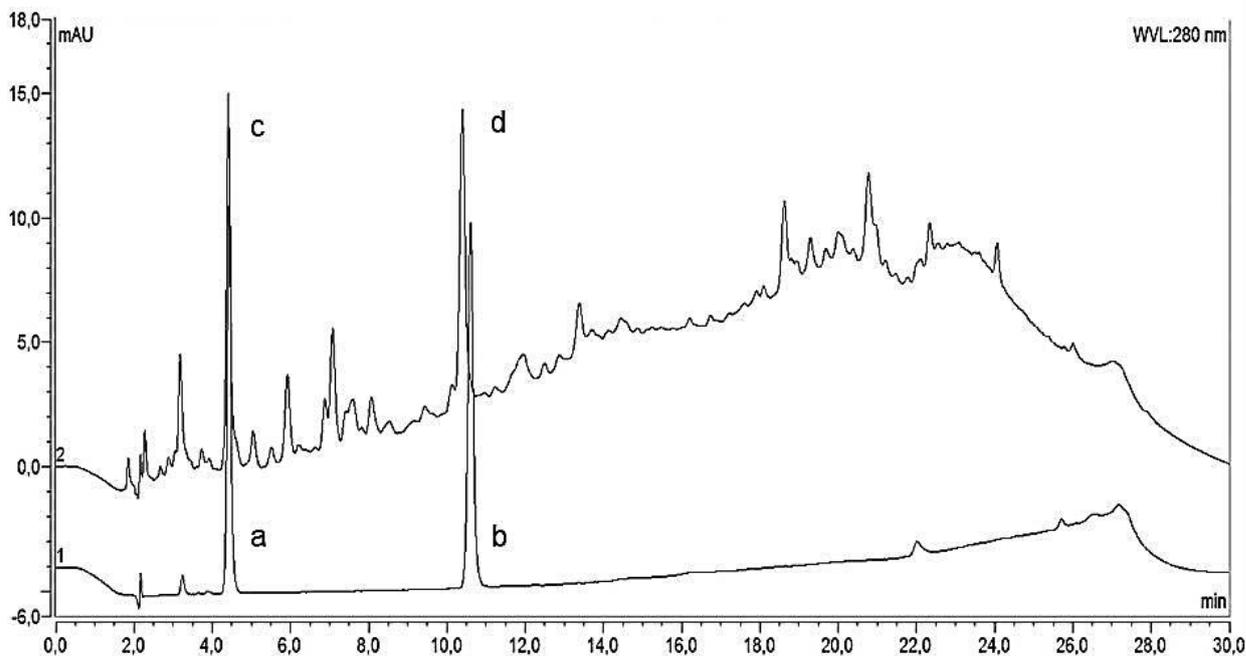
Figura 33- Avaliação da especificidade do método por CLAE das folhas de *A. occidentale* L..



(1) Espectro de varredura do pico do padrão de ácido gálico. (2) Espectro de varredura do pico correspondente ao ácido gálico na solução amostra de folha. (3) Espectro de varredura do pico do padrão de catequina. (4) Espectro de varredura do pico correspondente à catequina na solução amostra de folha.

Fonte: Autoria própria.

Figura 34- Cromatogramas obtidos para o ensaio de especificidade da amostra de folhas de *A. occidentale* L. por CLAE.

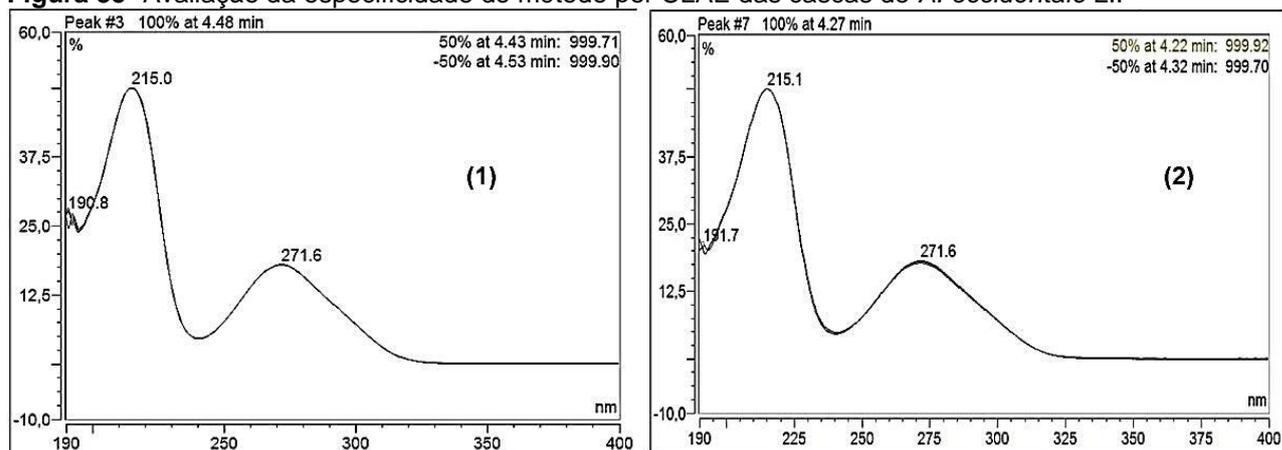


1. Padrões: ácido gálico (a) e catequina (b); 2. Amostra folha: ácido gálico (c) e catequina (d)

Fonte: Autoria própria.

Em relação ao método desenvolvido para as cascas, a figura 35 apresenta os espectros de varredura do pico correspondente a solução padrão do ácido gálico, bem como o espectro do pico correspondente ao marcador na amostra de casca. Sendo os máximos de absorvância de aproximadamente 272 nm. A figura 36 apresenta os cromatogramas obtidos para a amostra e para o padrão ácido gálico. Os dados mostram que os tempos de retenção do padrão foram de aproximadamente 4,5 minutos para o ácido gálico, o qual é coincidente com o pico (a) do cromatograma da amostra.

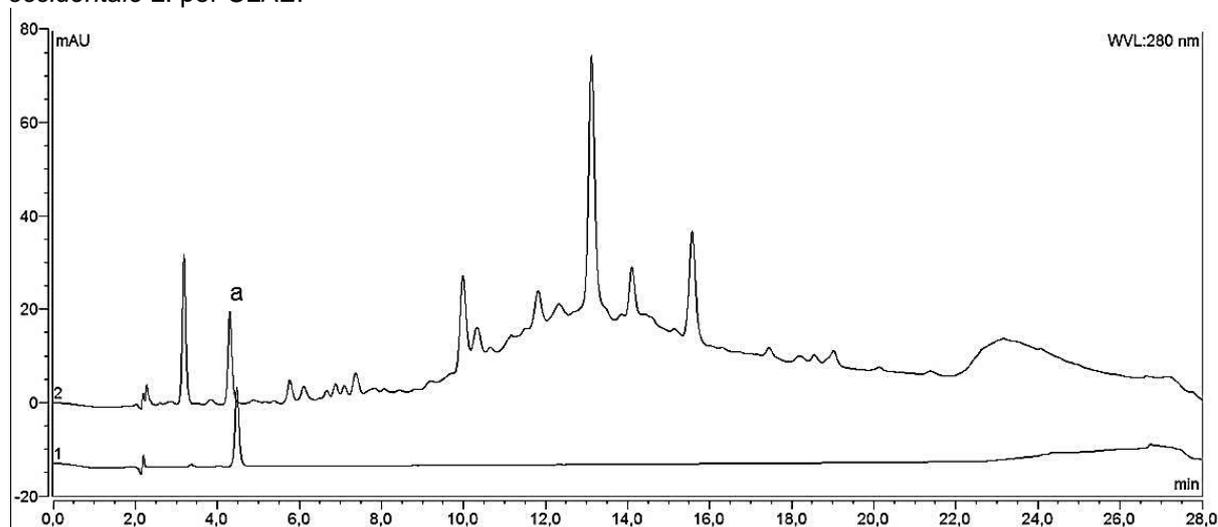
Figura 35- Avaliação da especificidade do método por CLAE das cascas de *A. occidentale* L..



(1) Espectro de varredura do pico do padrão de ácido gálico. (2) Espectro de varredura do pico correspondente ao ácido gálico na solução amostra de casca.

Fonte: Autoria própria.

Figura 36- Cromatogramas obtidos para o ensaio de especificidade da amostra de cascas de *A. occidentale* L. por CLAE.



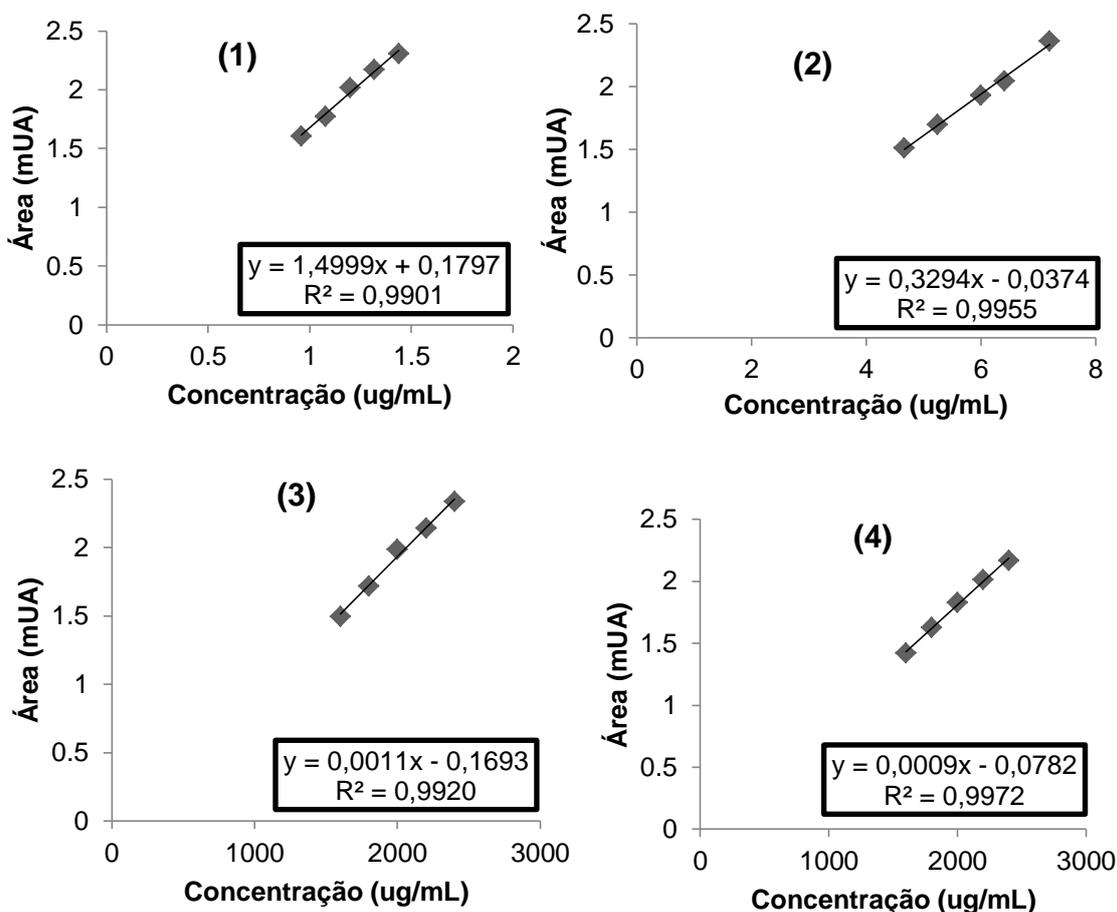
1. Padrão: ácido gálico; 2. Amostra casca: ácido gálico (a).

Fonte: Autoria própria.

5.5.2.2 Linearidade

Em relação à análise das folhas, a figura 37 mostra as curvas de calibração média obtida das soluções dos padrões ácido gálico e catequina, além das curvas médias de linearidade das soluções amostra. As equações da reta obtida pela regressão linear, assim como os coeficientes de correlação para as soluções dos padrões ácido gálico e catequina foram iguais a $y = 1,4999x + 0,1797$ ($R^2 = 0,9901$) e $y = 0,3294x - 0,0374$ ($R^2 = 0,9955$), respectivamente. Já as equações da reta e os coeficientes de determinação da curva média de linearidade das soluções amostra para os padrões ácido gálico e catequina foram igual a $y = 0,0011x - 0,1693$ ($R^2 = 0,9920$) e $y = 0,0009x - 0,0782$ ($R^2 = 0,9972$), respectivamente.

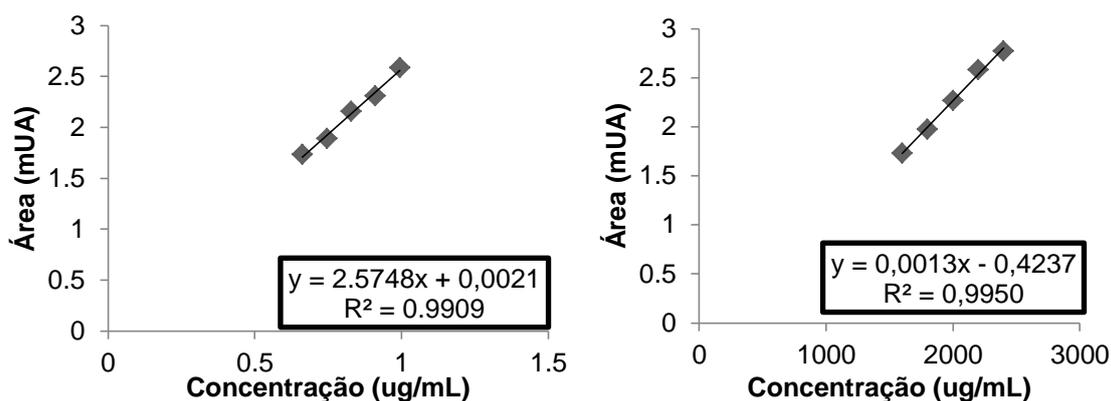
Figura 37- Curvas médias de calibração para as soluções dos padrões de ácido gálico (1) e catequina (2) e curvas média de linearidade do ácido gálico (3) e catequina (4) nas soluções amostras de folhas.



Fonte: Autoria própria.

Já para as cascas, na figura 38 estão as curvas de calibração média obtida das soluções do padrão ácido gálico e a curva de linearidade média das soluções amostra. As equações da reta obtida pela regressão linear, assim como os coeficientes de determinação para as soluções do padrão ácido gálico e soluções amostra foram iguais a $y = 2,5748x + 0,0021$ ($R^2 = 0,9909$) e $y = 0,0013x - 0,4237$ ($R^2 = 0,9950$), respectivamente.

Figura 38- Curva média de calibração para a solução padrão do ácido gálico (1) e curva média de linearidade do ácido gálico (2) nas soluções amostras de cascas.



Fonte: Autoria própria.

Diante dos resultados obtidos pode-se comprovar uma relação satisfatória entre as concentrações do analito e suas respectivas áreas dos picos, atendendo assim aos requisitos preconizados pela legislação em vigor para análise desse parâmetro ($R^2 > 0,99$). Isto indica que 99% das variabilidades experimentais são explicadas pelos modelos matemáticos encontrados, ou seja, quanto mais próximo de 1 (um) o coeficiente de correlação (R^2) melhor será o ajuste da função matemática obtida na curva de calibração. A equação da reta obtida ($y = ax + b$) dessa curva fornece os valores dos coeficientes angulares (a) e lineares (b), os quais podem ser utilizados para prever a concentração (x) do analito em novas amostras a partir do seu sinal analítico (y) (RIBEIRO et al., 2008)

5.5.2.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através das curvas de calibração dos padrões. No método (folha) foram encontrados valores de LD de 0,32 µg/mL e 0,48 µg/mL para o ácido gálico e catequina, respectivamente. Já para os valores de LQ foram encontrados 1,07 µg/mL e 1,60 µg/mL para o ácido gálico e catequina, respectivamente. Para o método (casca) foram encontrados valores de LD de 0,10 µg/mL e LQ de 0,34 µg/mL, apenas para o ácido gálico. Com esses resultados fica notável que os métodos possuem sensibilidade, sem interferência significativa de fatores relacionados ao equipamento. A partir dessas concentrações é possível detectar e quantificar o analito de forma precisa e segura sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

5.5.2.4 Precisão

O ensaio de repetibilidade ou precisão intra-corrída é de suma importância, pois irá verificar se o método analítico sofre variações significativas em um curto período de tempo com o mesmo analista. Já o ensaio de precisão intermediária ou intercorrida também possui sua relevância, uma vez que analisa se o método sofre influência com mudanças de operadores e dias (BRASIL, 2003).

Os métodos mostraram-se precisos nos dois níveis analisados: repetibilidade e precisão intermediária. Em relação ao parâmetro repetibilidade nas soluções amostras de folhas encontrou-se 1,21 µg/mL de ácido gálico e 7,17 µg/mL de catequina, tendo como desvios padrões relativos (DPR) de 1,51 e 4,09%, respectivamente. Já nas soluções amostras de cascas encontrou-se 0,91 µg/mL de ácido gálico e DPR de 1,89%. Nos ensaios de precisão intermediária, mostrados nas tabelas 23 e 24 realizados por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes, também foi possível verificar baixos valores de desvios padrões relativos, os quais foram inferiores ao limite especificado pela legislação vigente (5%), indicando assim, a precisão dos métodos.

Tabela 23- Resultados do ensaio de precisão intermediária das soluções amostra de folhas por CLAE expressos em ácido gálico (AG) e catequina (CAT).

Operador	Padrão	Dia 1	Dia 2	Interdia
1	AG	1,21 ± 0,0047 (0,39%)	1,23 ± 0,0170 (1,37%)	1,22 ± 0,0186 (1,52%)
	CAT	7,09 ± 0,0914 (1,29%)	7,12 ± 0,0778 (1,19%)	7,10 ± 0,0784 (1,10%)
2	AG	1,21 ± 0,0092 (0,76%)	1,27 ± 0,0700 (5,48%)	1,24 ± 0,0577 (4,64%)
	CAT	7,03 ± 0,0186 (0,26%)	7,15 ± 0,0166 (0,23%)	7,09 ± 0,0670 (0,94%)

Os resultados foram expressos como: média em µg/mL ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %)
Fonte: Autoria própria.

Tabela 24- Resultados do ensaio de precisão intermediária das soluções amostra de cascas por CLAE expressos em ácido gálico.

Operador	Dia 1	Dia 2	Interdia
1	0,906 ± 0,0171 (1,89%)	0,889 ± 0,0119 (1,34%)	0,898 ± 0,0161 (1,79%)
2	0,906 ± 0,0034 (0,37%)	0,869 ± 0,0184 (2,12%)	0,887 ± 0,0234 (2,64%)

Os resultados foram expressos como: média em µg/mL ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).
Fonte: Autoria própria.

5.5.2.5 Exatidão

A tabela 25 mostra os resultados do ensaio de exatidão após a contaminação das soluções amostras de concentração fixa (2 mg/mL) com soluções de concentrações conhecidas dos padrões de ácido gálico e catequina em amostra de folhas; e, apenas ácido gálico em amostras de cascas. Os valores de concentração teórica foram comparados com as concentrações obtidas experimentalmente, sendo estes dados obtidos através das equações da reta da curva de calibração dos padrões.

Nos ensaios de exatidão realizados nas soluções amostra de folhas com o ácido gálico, valores de recuperação ficaram entre 85,52 a 91,58%, cuja média foi de 88,93%. Enquanto que, para a catequina esses valores ficaram entre 98,50 a 99,36%, cuja média foi de 99,01%. Em relação, ao ensaio de exatidão nas soluções amostra de cascas com ácido gálico, estes valores ficaram entre 91,26 a 95,93%, cuja média foi de 93,86% (Tabela 25). Diante desses resultados, foi possível verificar

que os métodos aplicados para as folhas e cascas de caule de *A. occidentale* L. por CLAE podem ser considerados como exatos, pois apresentaram desempenho dentro dos limites preconizados pelos compêndios oficiais, os quais são de 80 a 120% pela RE 899/2003 (BRASIL, 2003) e de 85 a 115% (ICH, 2005).

Quando um método analítico é considerado exato representa a concordância entre o valor obtido experimentalmente e o estimado pelo processo ou valor real. Nesse estudo o ensaio de exatidão foi feito através de um ensaio de recuperação, o qual as amostras são fortificadas com quantidades conhecidas de soluções padrão. A quantidade de analito recuperado no processo é comparada com a quantidade real ou teórica presente na amostra. Isto, por sua vez reflete a exatidão, o qual representa o erro sistemático percentual relacionado ao processo. Este erro acontece devido à perda da substância, devido a problemas inerentes a recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou a presença na amostra de substâncias interferentes (BRITO et al., 2003).

Tabela 25- Resultados obtidos no teste de recuperação para o pico do ácido gálico na solução amostra de folhas e cascas de *A. occidentale* L..

Amostra	Padrões	80%	100%	120%	Média
Folhas	Ác. gálico	91,58 ± 0,8065 (0,88)	89,71 ± 0,1592 (0,18)	85,52 ± 0,2360 (0,28)	88,93 ± 2,7224 (3,06)
	Catequina	99,18 ± 0,4317 (0,44)	98,51 ± 0,1049 (0,11)	99,36 ± 0,2241 (0,23)	99,01 ± 0,4631 (0,47)
Cascas	Ác. gálico	95,93 ± 1,0098 (1,05)	94,39 ± 1,9154 (2,03)	91,26 ± 2,4779 (2,72)	93,86 ± 2,6376 (2,81)

Fonte: Autoria própria.

5.5.2.6 Robustez

As tabelas 26 e 27 apresentam os resultados das pequenas variações, as quais os métodos foram submetidos, assim como os valores obtidos nas condições normais (em negrito). Em relação ao método aplicado para as soluções amostras de folhas de *A. occidentale* L. foi possível verificar que os desvios padrões relativos (DPR) dos resultados das variáveis foram menores que 1,83% e 1,19%, para o ácido gálico e catequina, respectivamente. Quanto ao método aplicado para as soluções amostras de cascas foi possível verificar que os DPR dos resultados das variáveis foram menores que 1,12% para o ácido gálico. Diante desses resultados, os métodos podem ser considerados como robustos, uma vez que, os valores de DPR foram menores do que 5% em todos os casos conforme exigido pela legislação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 26- Ensaio de robustez nas soluções amostras de folhas de *A. occidentale* L..

Parâmetro	Variáveis	Ácido gálico*	Catequina*
Fluxo (mL/min)	0,79	1,174 ± 0,0057 (0,49)	6,602 ± 0,0213 (0,32)
	0,80	1,198 ± 0,0218 (1,82)	6,555 ± 0,0367 (0,56)
	0,81	1,189 ± 0,0218 (1,83)	6,502 ± 0,0469 (0,72)
TFA (%)	0,04	1,190 ± 0,0201 (1,69)	7,075 ± 0,0845 (1,19)
	0,05	1,198 ± 0,0218 (1,82)	6,555 ± 0,0367 (0,56)
	0,06	1,162 ± 0,0115 (0,99)	7,063 ± 0,0761 (1,08)

*Resultados expressos como: média em µg/mL ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 27- Ensaio de robustez nas soluções amostras de cascas de *A. occidentale* L..

Parâmetro	Variáveis	Ácido gálico*
Fluxo (mL/min)	0,79	0,918 ± 0,0091 (1,00)
	0,80	0,906 ± 0,0171 (1,89)
	0,81	0,899 ± 0,0079 (0,87)
TFA (%)	0,04	0,883 ± 0,0099 (1,11)
	0,05	0,906 ± 0,0171 (1,89)
	0,06	0,907 ± 0,0101 (1,12)

* Resultados expressos como: média em µg/mL ± desvio padrão (desvio padrão relativo,%).

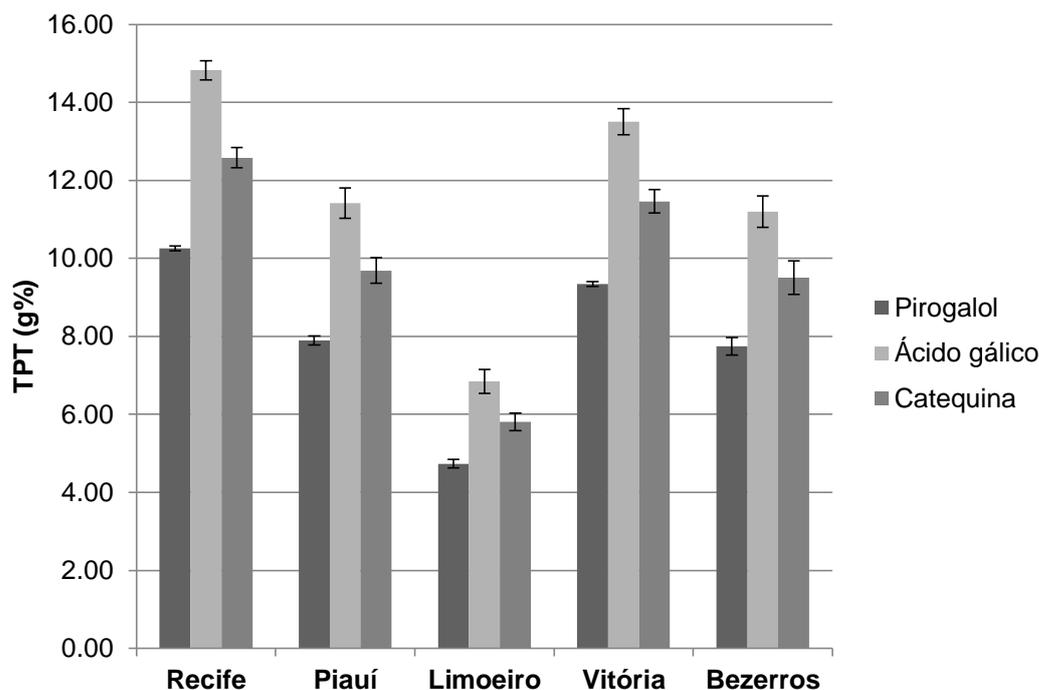
Fonte: Autoria própria.

5.6 AVALIAÇÃO DE POLIFENOIS NAS AMOSTRAS DE DIFERENTES LOCALIDADES

Após a avaliar e validar os métodos das amostras de folhas e cascas de *A. occidentale* L. foi possível realizar a comparação do teor de polifenóis totais nas amostras de diferentes localidades por espectrofotometria. Assim como, analisar quali e quantitativamente a influência da mudança de localização geográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os resultados da determinação de polifenóis totais pelo o método espectrofotométrico nas amostras de folhas podem ser observados na Figura 39. Os valores médios foram expressos em porcentagem e foi possível verificar que a amostra que obteve maiores teores de polifenóis totais foi a amostra da cidade de Recife-PE com médias de 10,26%, 14,82% e 12,58%, expressos em g% de pirogalol, ácido gálico e catequina, respectivamente. Por sua vez, essa amostra não apresentou diferença significativa nos TPT, entre as amostras de Vitória, Bezerros e Piauí, apenas diferindo estatisticamente entre a amostra de Limoeiro (Tabela 28).

Figura 39- Avaliação por espectrofotometria do teor de polifenóis totais nas amostras de folhas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 28- Análise do teor de polifenóis totais nas amostras de folhas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.

Localidades	Pirogalol	Ácido gálico	Catequina
Recife	10,26 ± 0,0678 (0,66) b	14,82 ± 0,2477 (1,67) b	12,58 ± 0,2556 (2,03) b
Limoeiro	4,73 ± 0,1104 (2,33) a	6,84 ± 0,3063 (4,48) a	5,81 ± 0,2288 (3,94) a
Vitória	9,34 ± 0,0642 (0,69) ab	13,50 ± 0,3316 (2,46) ab	11,46 ± 0,2998 (2,62) ab
Bezerros	7,75 ± 0,2243 (2,90) ab	11,20 ± 0,4035 (3,60) ab	9,51 ± 0,4303 (4,53) ab
Piauí	7,90 ± 0,1112 (1,41) ab	11,42 ± 0,3879 (3,40) ab	9,69 ± 0,3265 (3,37) ab

Os resultados foram expressos como: média em g% ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %). Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskal Wallis (seguido de Dunn), $p < 0,05$.

Fonte: Autoria própria.

Já os resultados das análises das amostras de cascas de diferentes localidades podem ser observados na figura 40. Na tabela 29 foi possível notar que as amostras que obtiveram maiores teores de polifenóis totais nas cascas foi a amostra da cidade de Piauí com médias de 14,91% e 22,47%, expressos em g% de pirogalol e ácido gálico, respectivamente. Por sua vez, essa amostra não apresentou diferença significativa nos TPT, entre as amostras de Recife, Vitória e Bezerros, apenas diferindo estatisticamente entre a amostra de Limoeiro (Tabela 29). Também foi verificado que os maiores teores de polifenóis expressos em pirogalol e ácido gálico foram encontrados nas cascas de *A. occidentale* L. (Tabelas 28 e 29).

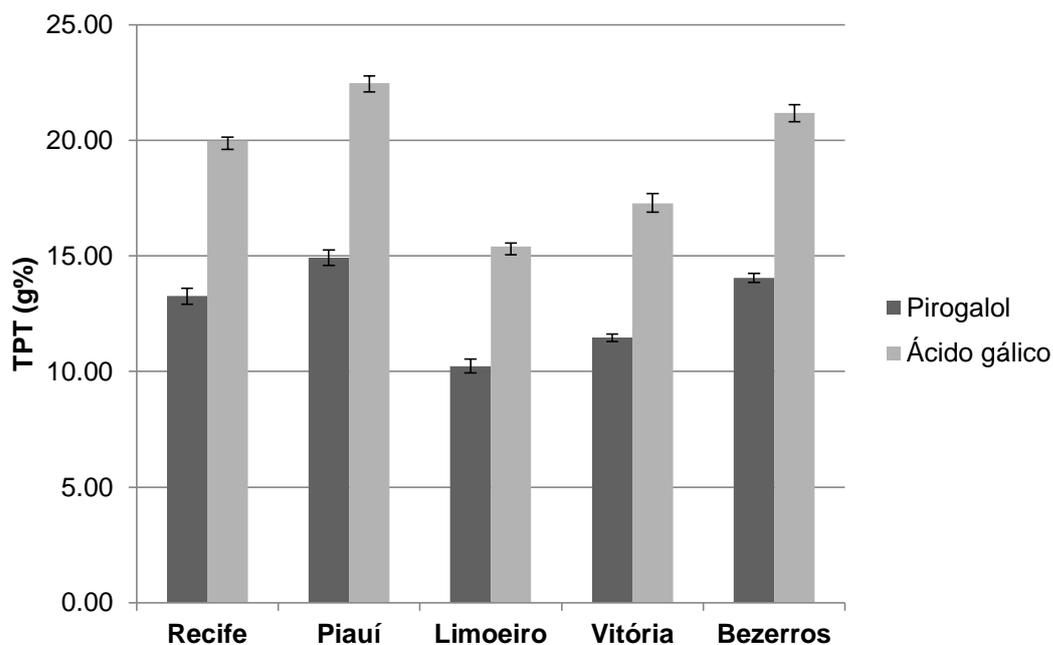
Tabela 29- Análise do teor de polifenóis totais nas amostras de cascas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.

Localidades	Pirogalol	Ácido gálico
Recife	13,26 ± 0,3427 (2,59) ab	19,97 ± 0,1506 (0,75) ab
Limoeiro	10,23 ± 0,3044 (2,98) b	15,41 ± 0,1380 (0,90) b
Vitória	11,46 ± 0,1567 (1,37) ab	17,27 ± 0,4159 (2,41) ab
Bezerros	14,05 ± 0,1872 (1,33) ab	21,17 ± 0,3764 (1,78) ab
Piauí	14,91 ± 0,3303 (2,21) a	22,47 ± 0,3122 (1,39) a

Os resultados foram expressos como: média em g% ± desvio padrão (desvio padrão relativo, %). Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskal Wallis (seguido de Dunn), $p < 0,05$.

Fonte: Autoria própria.

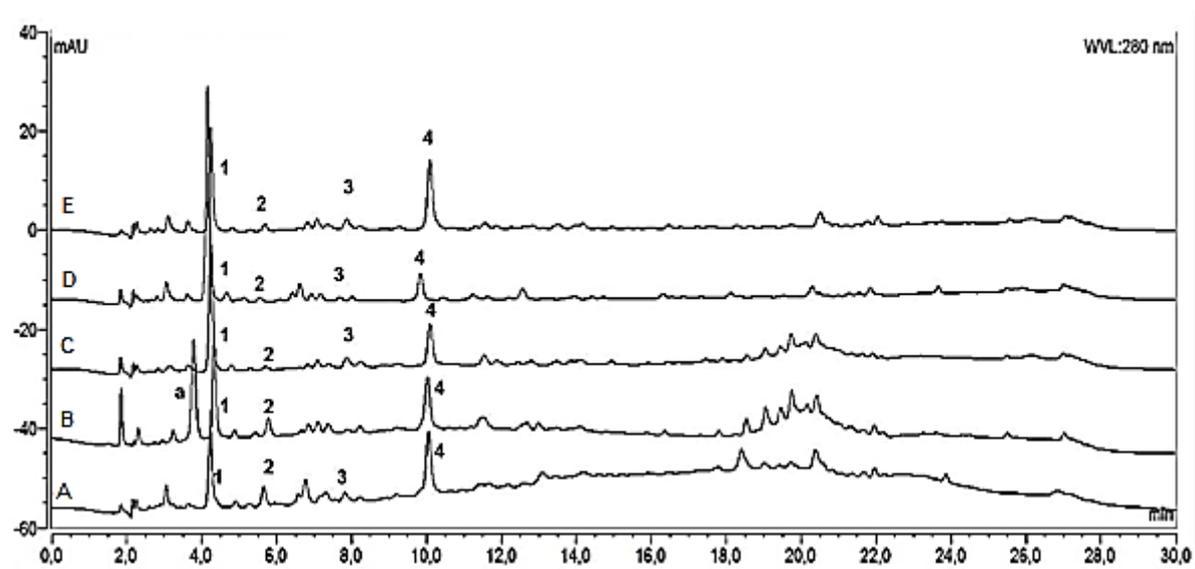
Figura 40- Avaliação por espectrofotometria do teor de polifenóis totais nas amostras de cascas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.



Fonte: Autoria própria.

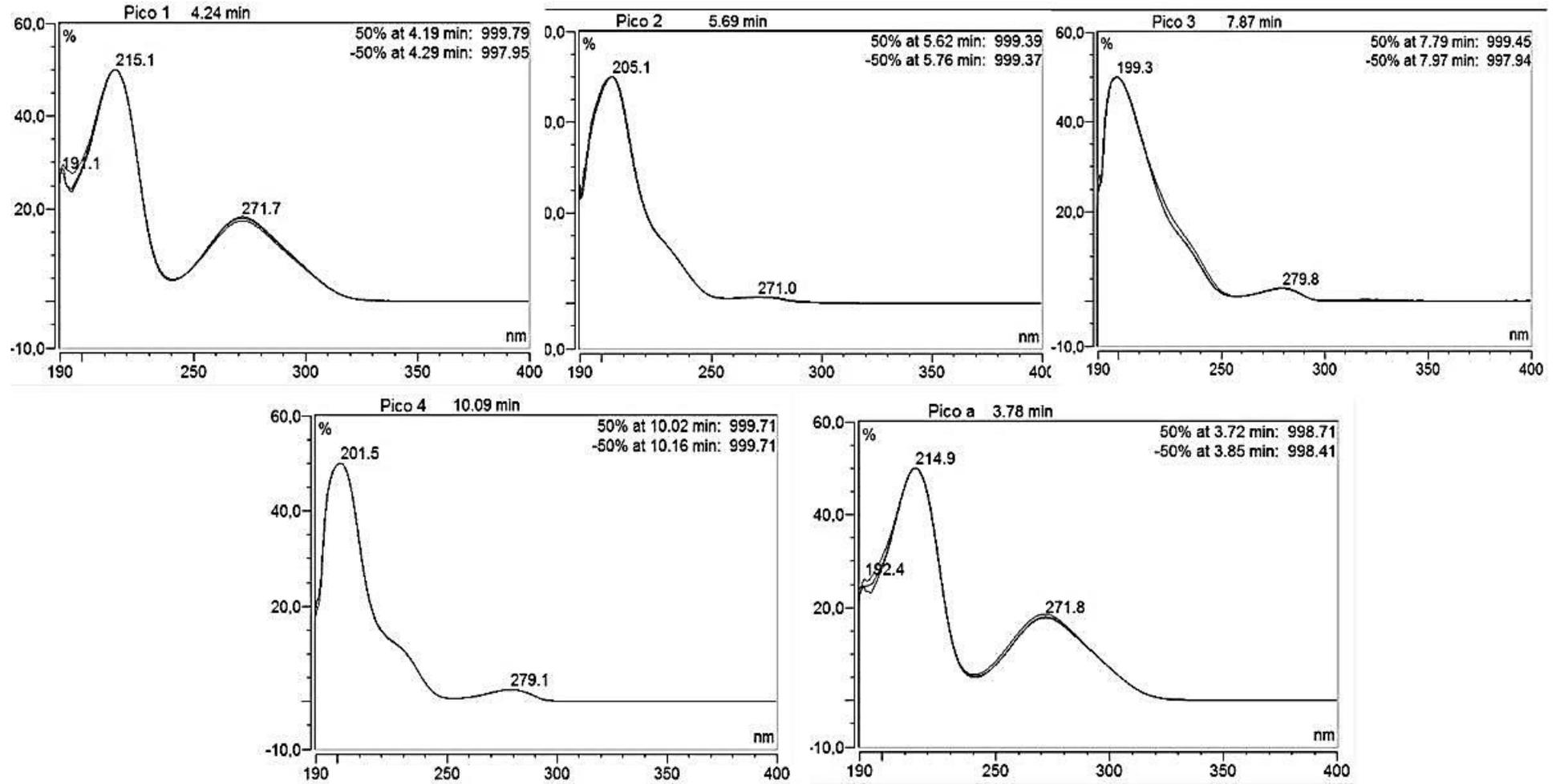
Ao avaliar qualitativamente por CLAE, os espectros dos picos das amostras de folhas de *A. occidentale* L. foram possíveis traçar um perfil característico entre as mesmas, as quais apresentaram em comum os picos 1 ($t_r = 4,24$ min); 2 ($t_r = 5,69$ min) e 4 ($t_r = 10,09$ min). Sendo o primeiro correspondente ao ácido gálico, o segundo a um tanino condensado e o último à catequina. O pico “a”, típico de um tanino hidrolisável só foi verificado, apenas na amostra de Vitória. Sendo o pico 3, típico de tanino condensado, observado em todas as amostra, exceto Vitória (Figuras 41 e 42).

Figura 41- Cromatogramas obtidos por CLAE das amostras de folhas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.



A. Recife; B. Vitória; C. Piauí; D. Limoeiro; E. Bezerros.
Fonte: Autoria própria.

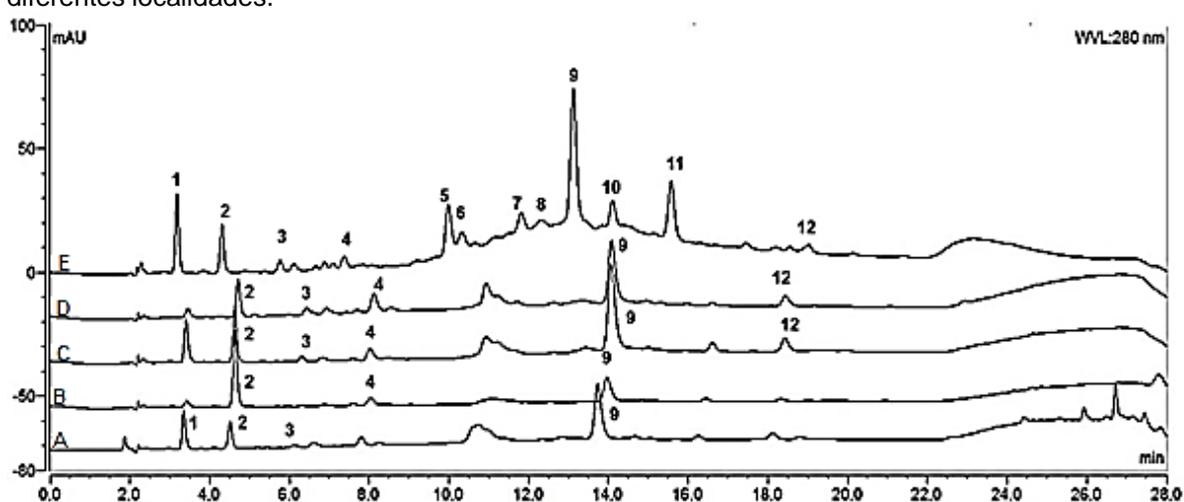
Figura 42- Espectros de varredura obtidos por CLAE-DAD dos picos das amostras de folhas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.



Fonte: Autoria própria.

Em relação à avaliação dos espectros de varredura dos picos das amostras de cascas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades, foi possível verificar que a amostra de Recife apresentou 3 (picos) picos característicos de taninos hidrolisáveis (1, 2 e 10) e os demais de taninos condensados. Também foram observadas similaridades entre algumas amostras. O pico 1 pode ser observado nas amostras de Recife e Limoeiro. O pico 3 em todas as amostras, exceto na amostra de Vitória. O pico 4 em todas as amostras, exceto na amostra de Limoeiro. O pico 12 foi observado nas amostras de Piauí, Bezerros e Recife. A partir desses dados foi possível traçar um perfil característico das amostras de casca de *A. occidentale* L. de diferentes locais, pois em todas as amostras foi verificado os picos 2 ($t_r = 4,41$ min) e 9 ($t_r = 13,12$ min) correspondentes ao ácido gálico e um tanino condensado, respectivamente (Figuras 43 e 44).

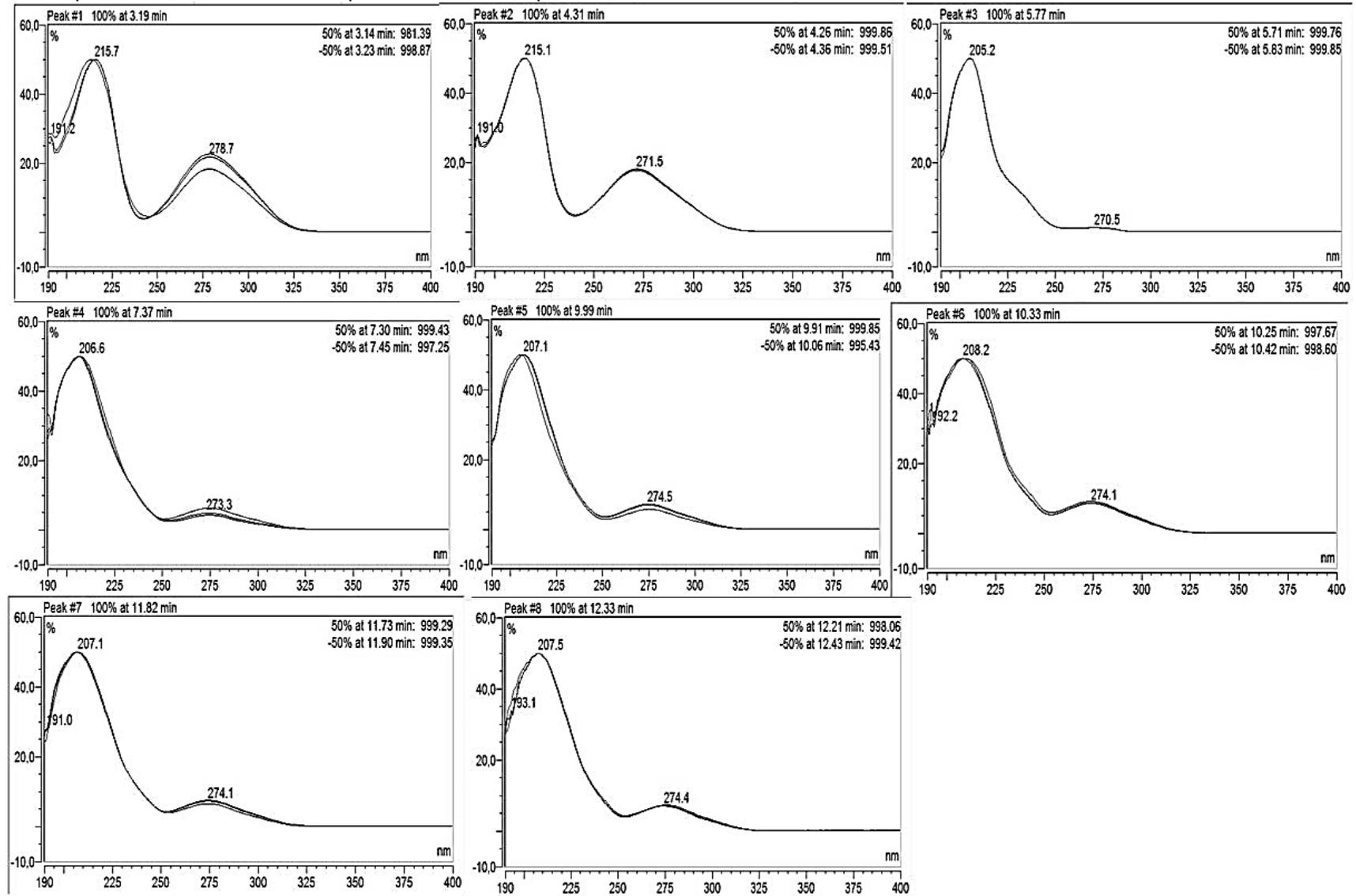
Figura 43- Cromatogramas obtidos por CLAE das amostras de cascas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.

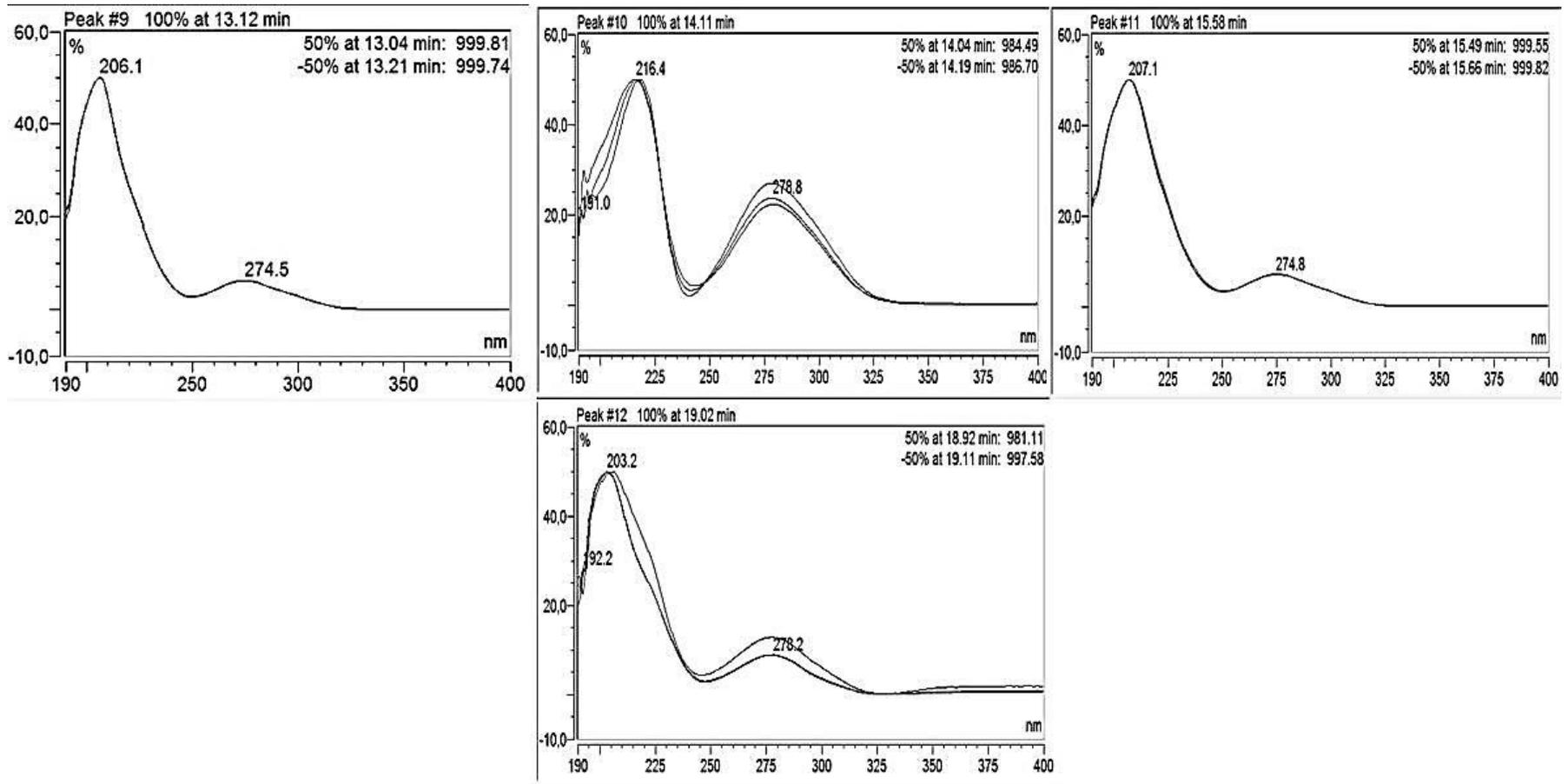


A. Limoeiro; B. Vitória; C. Piauí; D. Bezerros; D. Recife.

Fonte: Autoria própria.

Figura 44- Espectros de varredura obtidos por CLAE-DAD dos picos das amostras de cascas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.

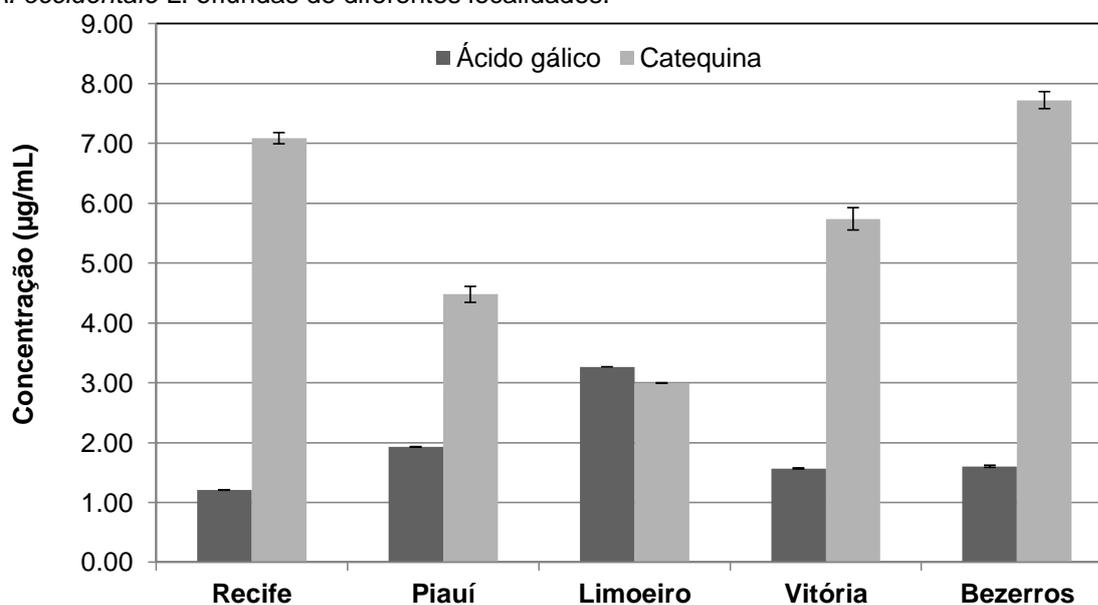




Fonte: Autoria própria.

Nas análises quantitativas por CLAE das amostras de folhas de diferentes localidades foi possível observar que a maior concentração média de ácido gálico foi obtida na amostra da cidade de Limoeiro (3,266 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 45 e Tabela 30). Por sua vez, a concentração de ácido gálico nessa amostra não apresentou diferença significativa entre Vitória, Bezerros e Piauí, apenas diferindo estatisticamente entre Recife (Tabela 30). No entanto, a amostra da cidade de Bezerros foi a que obteve a maior concentração média de catequina (7,721 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 45 e Tabela 30). Sendo que a concentração de catequina nessa amostra não apresentou diferença significativa, em relação às amostras de Recife, Vitória e Piauí, porém diferiu estatisticamente entre a amostra de Limoeiro (Tabela 30).

Figura 45- Análise por CLAE das concentrações de ácido gálico e catequina nas amostras de folhas de *A. occidentale* L. oriundas de diferentes localidades.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 30- Resultados obtidos para análise por CLAE das concentrações de ácido gálico e catequina nas amostras de folhas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.

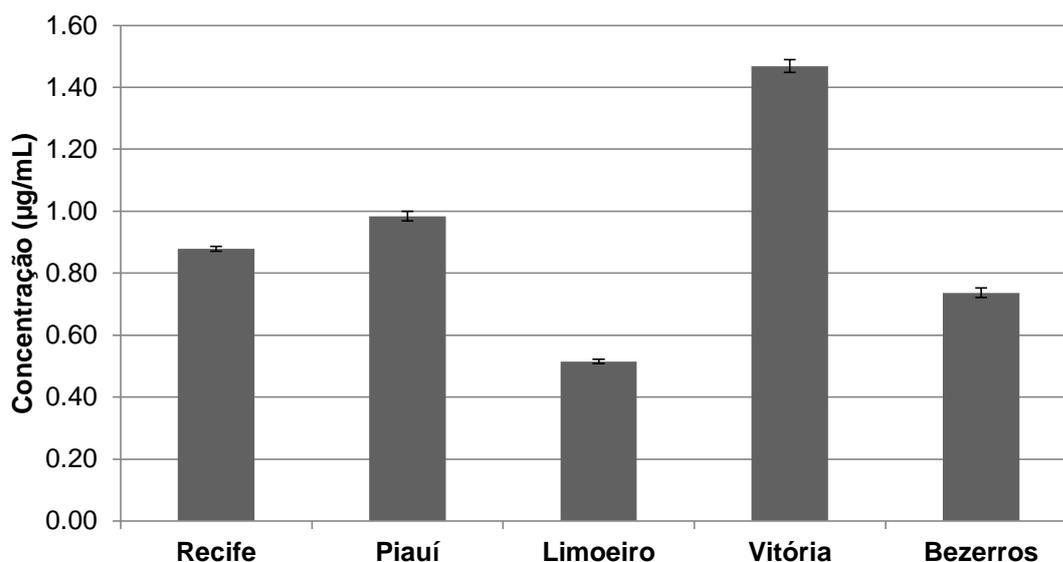
Localidades	Ácido gálico	Catequina
Recife	1,211 ± 0,0047 (0,39) b	7,090 ± 0,0914 (1,29) ab
Limoeiro	3,266 ± 0,0009 (0,03) a	2,997 ± 0,0073 (0,24) a
Vitória	1,565 ± 0,0091 (0,58) ab	5,739 ± 0,1834 (3,20) ab
Bezerros	1,604 ± 0,0207 (1,29) ab	7,721 ± 0,1408 (1,82) b
Piauí	1,927 ± 0,0028 (0,14) ab	4,478 ± 0,1332(2,97) ab

Resultados expressos como: média em µg/mL ± desvio padrão (desvio padrão relativo,%). Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskal Wallis (seguido de Dunn), $p < 0,05$.

Fonte: Autoria própria.

Em relação às análises quantitativas por CLAE das amostras de cascas de diferentes localidades foi possível observar que a maior concentração média de ácido gálico foi obtida na amostra da cidade de Vitória (1,469 µg/mL) (Figura 46 e Tabela 31). Por sua vez, a concentração de ácido gálico nessa amostra não apresentou diferença significativa entre Recife, Bezerros e Piauí, apenas diferindo estatisticamente entre a amostra de Limoeiro (Tabela 31).

Figura 46- Análise por CLAE das concentrações de ácido gálico nas amostras de cascas de *A. occidentale* L. oriundas de diferentes localidades.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 31- Análise por CLAE das concentrações de ácido gálico nas amostras de cascas de *A. occidentale* L. de diferentes localidades.

Localidades	Ácido gálico
Recife	0,878 ± 0,0077 (0,87) ab
Limoeiro	0,515 ± 0,0071 (1,37) b
Vitória	1,469 ± 0,0202 (1,38) a
Bezerros	0,736 ± 0,0150 (2,04) ab
Piauí	0,984 ± 0,0149 (1,51) ab

Resultados expressos como: média em µg/mL ± desvio padrão (desvio padrão relativo,%). Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme Kruskal Wallis (seguido de Dunn), $p < 0,05$.

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar comparativamente por CLAE a composição química dos diferentes farmacógenos foi possível verificar que os mesmos tiveram mudanças na sua composição química. Nas amostras de folhas foi possível verificar maiores concentrações de ácido gálico em relação às cascas (Tabelas 30 e 31). Assim como a presença de ácido e catequina nas folhas e apenas ácido gálico nas cascas. Isso se deve ao fato que a natureza fitoquímica das espécies vegetais pode sofrer variações de acordo com as partes da planta (PICCIRILLO et al.; 2013; DENG et al., 2015).

A avaliação quantitativa por espectrofotometria e CLAE das amostras de folhas e casca de diferentes localidades revelou que houve influência da localização geográfica nos teores analisados para cada farmacógeno. Isso ocorre devido à diversidade química e de papéis fisiológicos dos compostos fenólicos, os quais contribuem para ocorrência dessas variações nos seus teores, em virtude dos fatores ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; CAMARGO et al., 2011; TLILI et al., 2015)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na caracterização físico-química das matérias primas das folhas e das cascas de *Anacardium occidentale* L. mostraram que as mesmas atendem as exigências estabelecidas pela 5ª edição da Farmacopeia Brasileira. Deste modo, garantem os requisitos mínimos de qualidade e estabilidade para que possam ser utilizadas em estudos posteriores.

A avaliação dos métodos espectrofotométricos verificou que os fatores operacionais influíam no teor de polifenóis totais. Sendo que as melhores condições extrativas para o doseamento de polifenóis totais nas folhas foram encontradas com etanol 30% e ultrassom; enquanto que para as cascas o melhor desempenho foi observado com etanol 30% e sob-refluxo.

A análise por CCD indicou a presença de polifenóis do tipo taninos condensados e hidrolisáveis (para todas as amostras de ambos os farmacógenos), e flavonoides (para todas as amostras de folhas e apenas para as cascas oriundas do município de Limoeiro). Quando possível, a presença dos metabólitos (ácido gálico, catequina e flavonoides) foi confirmada com o auxílio de CLAE-DAD empregando padrões e pela avaliação dos espectros de varredura. O emprego desta última técnica na confirmação desses metabólitos foi imprescindível, uma vez que a mesma apresenta maior especificidade, pois fornece informações complementares, como os espectros de varredura, os quais são peculiares de cada substância.

As metodologias desenvolvidas por espectrofotometria no UV-Vis para quantificação de polifenóis totais e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresentaram adequação aos parâmetros de validação estabelecidos pela RE nº 899/03 da ANVISA e pelo ICH (2005), o que permitiu que fossem considerados como métodos específicos, sensíveis, precisos, exatos e robustos para análise quantitativa de polifenóis totais por espectrofotometria ou quantificação de ácido gálico e catequina por CLAE em folhas e polifenóis totais e ácido gálico em cascas de *A. occidentale* L..

Ademais, foram observadas diferenças na composição química de diferentes farmacógenos. Tais mudanças também foram notadas nas análises por espectrofotometria e CLAE entre as amostras de diferentes locais. Essas diferenças

detectadas estão relacionadas com as condições ambientais peculiares de cada região geográfica que podem inferir no conteúdo de polifenóis.

Apesar das mudanças na composição química foi possível traçar perfis químicos típicos, através de análises qualitativas por CCD e CLAE nas amostras de folhas e cascas de *A. occidentale* L. Esta avaliação é imprescindível, pois contribui para a autenticidade da espécie estudada e permite delinear os posteriores estudos farmacológicos.

REFERÊNCIAS

- ABADI, M. D. M.; ASHRAF, N.; CHAMSAZ, M.; SHEMIRANI, F. An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV–Vis spectrophotometry. **Talanta**, v. 99, p. 1-12, 2012.
- AGUILAR, Y. M.; RODRÍGUEZ, F. S.; SAAVÉDRO, C. M. A.; YERO, O. M. Secondary metabolites and in vitro antibacterial activity of extracts from *Anacardium occidentale* L. (Cashew tree) leaves. **Revista Cubana de plantas medicinales**, v. 17, n. 4, p. 320-329, 2012.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region North east of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AJILEYE, O.O.; OBUOTOR, E. M.; AKINKUNMI, E. O.; ADEROGBA, M. A. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University**, v. 27, n. 3, p. 244-252, 2015.
- AKULA, R.; RAVISHANKAR, A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, v. 22, n. 9, p. 1041-1047, 2002.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ARAPITSAS, P. Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1708- 1717, 2012.
- ARAÚJO, J. P. P. **Caju: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015.
- AREKEMASE, M. O.; OYEYIOLA, G. P.; ALIYU, M. B. Antibacterial activity of *Anacardium occidentale* on some enterotoxin producing bacteria. **International Journal of Biology**, v. 3, n. 4, 2011.
- BARBOSA-FILHO, V. M. B.; WACZUK, E. P.; KAMDEMB, J. P.; ABOLAJI, A. O.; LACERDA, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; ALINE AUGUSTI BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T.; POSSER, T. Phytochemical constituents, antioxidant activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 280-288, 2014.
- BATISTA, A. N. L.; COLOMBO, R.; PASCOLI, I. C.; TELES, H. L.; SILVA, G. H.; BOMFIM, G. C. C.; BURGOS, R. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; REIMBERG, M. C. H. Development and validation of a HPLC

method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 402-406, 2011.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; NUNES, C. R.; PESSANHA, F. F.; MICHELLE FRAZÃO MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. Quantificação dos teores de taninos e fenóis totais e avaliação da atividade antioxidante dos frutos de aroeira. **Vértices**, v. 13, n. 3, p. 117-128, 2011.

BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins – A current perspective. **Biodegradation**, v. 9, n. 5, p. 343-357, 1998.

BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; DUARTE, G. G.; SCIO, E. Busca de novas drogas antimicrobianas a partir de vegetais. **Revista Principia**, v.11; 2007.

BRASIL. RE nº 48 de Março de 2004. Dispõe sobre o Registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. DOU de 18/03/2004.

BRASIL. RE nº 899, de 29 de Maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. DOU de 02/06/2003.

BRASIL. RE nº 14 de Março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. DOU de 05/04/2010.

BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; LONG-ZE, L.; HARNLY, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1112–1118, 2007.

BRITO, N. M.; AMARANTE- JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUENO, F. G.; MACHARETH, M. A. D.; PANIZZON, G. P.; LOPES, G. C.; MELLO; J. C. P.; LEITE-MELLO, E. V. S. Development of a uv/vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 822-826, 2012.

CAMARGO, V. B.; COLPO, A. Z. C.; ROSA, H. S.; MACHADO, M.; FOLMER, V.; MENDEZ, A. S. L. Determinação de Compostos Fenólicos Totais em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.). **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 3, n. 2, 2011.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used semi-arid northeastern Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p.326-342, 2010.

CARVALHO, A. C.B.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. O.; PERFEITO, J. P. S. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 503-506, 2014.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: EDUFSC, 2010. p. 519-535.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EduFSCar, 2009. 77 p.

CHABI SIKA, K.; ADOUKONOU-SAGBADJA, H.; AHOTON, L. E.; ADEBO, I.; ADIGOUN, F. A.; SAIDOU, A.; KOTCHONI, S. O.; AHANCHEDE, A.; BABAMOUSA, L. Indigenous knowledge and traditional management of cashew (*Anacardium occidentale* L.) genetic resources in benin. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 1, n. 5, p. 375-382, 2013.

CHAVES, M. H.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, A. D.; COSTA, D. A.; OLIVEIRA, C. A. A.; COSTA, A. F.; BRITO-JÚNIOR, F. E. M. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 106-112, 2010.

CIOLA, R. Cromatografia. Em: **Fundamentos da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. p. 2-7.

COSTA, N. C.; GOMES, L. M.; COSTA, T. M.F.; FIGUEIREDO, P. M. S.; SCHEIDT, G. N. Prospecção fitoquímica básica dos componentes fenólicos da casca do cajueiro. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, 2015.

COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* de. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 196, p. 177-91, 2009.

CUJIC, N.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIĆ, T.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D.; ZDUNIĆ, G.; IBRIĆ, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, p. 135-142, 2016.

CUNHA, F. P.; COSTA, L. J. L.; FERNANDES, A. J. D.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Development and optimization of extractives from *Astronium urundeuva* (allemão) Engl. by factorial design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 647-652, 2009.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-182, 2012.

DAHAKA, A. P.; JOSHI, V. D.; JOSHI, A. B. Antimicrobial screening of different extract of *Anacardium occidentale* Linn. leaves. **International Journal of Chem Tech Research**, v. 1, n. 4, p. 856-858, 2009.

DAS, B.; PAUL, T.; APTE, K. G.; CHAUHAN, R.; SAXENA, R. C. Evaluation of antioxidant potential e quantification of polyphenols of *Diplazium esculentum* Retz. with emphasis on its HPTLC chromatography. *Journal of Pharmacy Research*, v. 6, p. 93-100, 2013.

DEATTU, N.; SUSEELA, L.; NARAYANAN, N. Chromatographic analysis of polyherbal extract and formulation by HPTLC and GC-MS methods. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 1, p. 6-10, 2013.

DENG, Y.; YANG, J.; QUIAN, B.; LIU, Z.; WANG, D.; ZHONG, Y.; ZHAO, Y. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blue berry leaf extracts. **Food Control**, v. 38, p. 184-191, 2014.

DENG, Y.; ZHAO, Y.; PADILLA-ZAKOUR, O.; YANG, G. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 803-809, 2015.

DICIAULA, M. C.; LOPES, G. C.; SCARMINIO, I. S.; MELLO, J. C. P. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a uv-vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 1-6, 2014.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

ELIAKIM-IKECHUKWU, C.; OBRI, A.; AKPA, O. Phytochemical and micronutrient composition of *Anacardium occidentale* Linn (cashew) stem-bark hydroethanolic extract and its effect on the fasting blood glucose levels and body weight of diabetic wistar rats. **The Internet Journal of Nutrition and Wellness**, v. 10, n.1, p. 1-6, 2009.

ENCARNAÇÃO, S.; MELLO-SAMPAYO, C. M.; GRAÇA, N. A. G.; CATARINO, L.; SILVA, I. B. M.; LIMA, B. S.; SILVA, O. M. D. Total phenolic content, antioxidant activity and pre-clinical safety evaluation of na *Anacardium occidentale* stem bark Portuguese hypoglycemic traditional herbal preparation. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 171-178, 2016.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: EDUFSC, 2010. p. 229-246.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: EDUFSC, 2010. p. 263-288.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 5. ed. Brasília, 2010.

GHITESCU, R. E.; VOLF, I.; CARAUSU, C.; BÜHLMANN, A. M.; GILCA, I. A.; POPA, V. I. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 535-541, 2015.

GIL-CHÁVEZ, G. J.; VILLA, J.A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; HEREDIA, J. B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 12, p. 5-23, 2013.

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.

GONÇALVES, J. L. S.; LOPES, R. C.; OLIVEIRA, D. B. ; COSTA, S. S.; MIRANDA, M. M. F. S.; ROMANOS, M. T. V.; SANTOS, N. S. O.; WIGG, M. D. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 403-407, 2005.

GUPTA, A.; SHETH, N. R.; PANDEY, S.; SHAH, D. R.; YADAV, J. S. Determination of ursolic acid in fractionated leaf extracts of *Ocimum gratissimum* Linnand in developed herbal hepatoprotective tablet by HPTLC. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 4, p. 156-162, 2013.

GUZELMERIC, E.; VOVK, I.; YESILAD, E. Development and validation of an HPTLC method for apigenin 7-O-glucoside in chamomile flowers and its application for fingerprint discrimination of chamomile-like materials. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, p. 108-118, 2015.

HEMSHEKHAR, M.; SANTHOSH, M. S.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Emerging roles of anacardic acid and Its derivatives: a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122-132, 2011.

ICH, **International Conference on Harmonization of Technical Requiriments for Registration on Pharmaceuticals for Human Use Q2A**. "Text on Validation of Analytical Procedures" March, 1995; Genebra, 1994. 2005.

Índice terapêutico fitoterápico (ITF). 1. ed. Petrópolis, RJ: EPUB, 2008.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03 – Fev/ 2010. DOQ-CGCRE-008. Disponível em < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 10 out 2015.

JAISWAL, Y.; NAIK, V.; TATKE, P.; GABHE, S.; VAIDYA, A. Pharmacognostic and preliminary phytochemical investigations of *Anacardium occidentale* (Linn.) leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 625-631, 2012.

JAISWAL, Y.; TATKE, P.; GABHE, S.; VAIDYA, A. Rapid high performance thin layer chromatographic method for quantitation of catechin from extracts of cashew leaves – a short report. **Polish Journal of Food And Nutrition Sciences**, v. 63, n. 1, p. 49-54, 2013.

JAISWAL, Y. S.; TAKE, P. A.; GABHE, S. Y.; VAIDYA, A. Antioxidant activity of various extracts of leaves of *Anacardium occidentale* (Cashew). **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 1, p. 112-119, 2010.

JANOVIK, V.; BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; PEREIRA, D. F.; FROHLICH, J. K.; ATHAYDE, M. L. Doseamento de polifenóis, flavonóides e taninos no extrato bruto e frações de *Cariniana domestica* (Mart.) Miers. **Revista Saúde Santa Maria**, v. 35, n. 2, p. 25-28, 2009.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Em: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Orgs.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Unicamp, 2006. p. 273-398.

JOTHY, S. L.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Chromatographic and spectral fingerprinting of *Polyalthia longifolia*, a source of phytochemicals. **Bioresources**, v. 8, n. 4, p. 5102-5119, 2013.

JUN, XI; DEJI, S.; YE, L.; RUI, Z. Comparison of in vitro antioxidant activities and bioactive componentes of green tea extracts by diferent extraction methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v.408, n. 1/2, p. 97-101, 2011.

KARABEGOVIĆ, I. T.; STOJICEVIC, S. S.; VELICKOVIC, D. T.; TODOROVIC, Z. B.; NIKOLIC, N. C.; LAZIC, M. L. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 142-148, 2014.

KASOTE, D.; AHMAD, A.; CHEN, W.; COMBRINCK, S.; VILJOEN, A. HPTLC-MS as an efficient hyphenated technique for the rapid identification of antimicrobial compounds from propolis. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 326-331, 2015.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P.; Fitoterápicos: um Mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

KONAN, N. A.; BACCHI, E. M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 237-242, 2007.

LEITÃO, N. C. M. C. S.; PRADO, G. M. C.; VEGGI, M. A. A.; PEREIRA, C. G. *Anacardium occidentale* L. leaves extraction via SFE: global yields, extraction kinetics, mathematical modeling and economic evaluation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 78, p. 114-123, 2013.

LI, H.; CHEN, B.; YAO, S. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv.(*E. ulmoides*). **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 12, n. 4, p. 295-300, 2005.

LI, J.; HE, X.; LI, M.; ZHAO, W.; LIU, L.; KONG, X. Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. **Food Chemistry**, v.176, p. 7-11, 2015.

LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. **Analytica Chimica Acta**, v. 719, p. 57-60, 2012.

LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. Em: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Orgs.). **Fundamentos de Cromatografia**. 4. ed. Campinas, SP: Unicamp, 2006. p. 67-86.

LOPES, G. C.; BLAINSKI, A.; SANTOS, P. V. P.; DICIAULA, M. C.; MELLO, J. C. P. Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 5, p. 789-795, 2010.

LUCCA, P.S.R.; ECKERT, R.G.; SMANHOTTO, V.; KUHN, L.M.; MINANTI, L.R. Avaliação farmacognóstica e microbiológica da droga vegetal camomila (*Chamomilla recutita* L.) comercializada como alimento em Cascavel – Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 153-156, 2010.

MAIA, J. G.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B. Volatile constituents of the leaves, fruits and flowers of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 3, p. 227-232, 2000.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARQUES, L. C.; VIGO, C. L. S. Preparação e padronização de extratos vegetais. Em: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Ateneu, 2009. p. 169-204.

MATTOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plants usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

MICHODJEHOUN-MESTRES, L.; SOUQUET, J. M., FULCRAND, H.; BOUCHUT, C.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Food Chemistry**, v. 112, p.851–857, 2009.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium*

cumini (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos estratégicos. 2006. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 15 de jan 2015.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM, E. L. C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 3, p. 338-344, 2006.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NICOLETTI, M. HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of Botanicals. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 5, p. 818-823, 2011.

NOZELLA, E. F. **Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos**. 2006. 100 f. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PAWAR, S. P.; SATHWANE, P. N.; METKAR, B. R.; PAL, S. C.; KASTURE, V. S.; KASTURE, S. B. Anti-Inflammatory and analgesic activity of *Anacardium occidentale* Leaf Extracts. **Ancient Science of Life**, v. 19, n. 3/4, p. 168-173, 2000.

PICCIRILLO, C.; DEMIRAY, S.; FERREIRA, A. C. S.; PINTADO, M. E.; CASTRO, P. M. L. Chemical composition and antibacterial properties of stem and leaf extracts from *Ginja cherry* plant. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 562–569, 2013.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586-621, 2011.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

ROCHA, F. R.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

SÁ, I. M.; ELISABETSKY, E. Medical knowledge exchanges between Brazil and Portugal: An ethnopharmacological perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 762-768, 2012.

SAIT, S.; HAMRI-ZEGHICHI, S.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; MADANI, K.; RIGOU, P.; BRIGHENTI, V.; PRENCIPE, F. P.; BENVENUTI, S.; PELLATI, F. HPLC-UV/DAD and ESI-MSⁿ analysis of flavonoids and antioxidant activity of an Algerian medicinal plant: *Paronychia argentea* Lam.. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 231-240, 2015.

SANTOS, E. B.; DANTAS, G. S.; SANTOS, H. B.; DINIZ, M. F. F. M.; SAMPAIO, F. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 321-324, 2009.

SANTOS, F. O. **Atividades biológicas de *Anacardium occidentale* (Linn)**. 2011. 57 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-árido) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Centro da Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: EDUFSC, 2010. p. 615-656.

SARTORI, C. J. **Avaliações dos teores de compostos fenólicos nas cascas de *Anadenanthera peregrina* (angico vermelho)**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1/2, p. 21-40, 2001.

SHEIKH, Z. A.; SHAKEEL, S.; GUL, S.; ZAHOOR, A.; KHAN, S. S.; ZAIDI, F. H.; USMANGHANI, K. A novel HPTLC method for quantitative estimation of biomarkers in polyherbal formulation. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 11, p. 885-976, 2015.

SIJA, S. L.; POTTY, V. P.; SANTHOSHLAL, P. S. Pharmacological evaluation and detection of anacardic acid in callus culture and various plant parts of *Anacardium occidentale* L.. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 7, n. 3, p. 251-258, 2015.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V. P.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.

SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J. R. *Anacardiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB44>>. Acesso em: 03 Set. 2015.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: EDUFSC, 2010. p. 289-326.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

TISTAERT, C., DEJAEGHER, B., HEYDEN, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, n. 2, p. 148-161, 2011.

TLILI, N.; MEJRI, H.; ANOUER, F.; SAADAOU, E.; KHALDI, A.; NASRI, N. Phenolic profile and antioxidant activity of *Capparis spinosa* seeds harvested from different wild habitats. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 930-935, 2015.

VANDERLINDE, F. A.; LANDIM, H. F.; COSTA, E. A.; GALDINO, P. M.; MACIEL, M. A. M.; ANJOS, G. C.; MALVAR, D. C.; CÔRTEZ, W. C.; ROCHA, F. F. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L.. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 437-442, 2009.

VAUGHAN, J. G.; GEISLER, C. A. Oil seeds and fruits. Em: **The new oxford book of food plants**. New York: Oxford University Press, 2009. p. 24-39.

VERZA, S. G. **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona**. 2006. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

VERZA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS V.; HENRIQUES, A. T.; ORTEGA, G. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para a determinação do teor de taninos totais. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VONGSAK, B.; SITHISARN, P.; MANGMOOL, S.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y.; GRITSANAPAN, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566-571, 2013.

VYAS, J.; ITANKAR, P.; TAUQEER, M.; KELKAR, A.; AGRAWAL, M. Development of HPTLC method for estimation of piperine, guggulsterone E and Z in polyherbal formulation. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 6, p. 259-264, 2013.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer - Verlag, 2001.

WANG, P.; LI, L.; YANG, H.; CHENG, S.; ZENG, Y.; NIE, L.; ZANG, H. Chromatographic fingerprinting and quantitative analysis for the quality evaluation of *Xinkeshu tablete*. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 6, p. 422-430, 2012.

WYREPKOWSKI, C. C.; COSTA, D. L. M. G.; SINHORIN, A. P.; VILEGAS, W.; GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; SANTOS, L. C. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16039-16057, 2014.

XIE, J.; DONG, C.; NIE, S.; LI, F.; WANG, Z.; SHEN, M.; XIE, Y. Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Ilinskaja leaves. **Food Chemistry**, v. 186, p. 97-105, 2015.

YANG, D.; AN, Y.; JIANG, X.; TANG, D.; GAO, Y.; ZHAO, H.; WU, X. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional chinese medicine preparation. **Talanta**, v. 85, n. 2, p. 885–890, 2011.

ZENG, Z.; CHAU, F. T.; CHAN, H. Y.; CHEUNG, C. Y.; LAU, T. Y.; WEI, S.; MOK, D. K.; CHAN, C.; LIANG, Y. Recent advances in the compound-oriented and pattern-oriented approaches to the quality control of herbal medicines. **Chinese medicine**; v.3, n. 9. 2008.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: EDUFSC, 2010. p. 577-614.