



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

**HYALYNE BERNADETE DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NOS PERFIS QUALI E QUANTITATIVO DE  
POLIFENÓIS DAS CASCAS E FOLHAS DE *Libidibia ferrea* (Mart.exTul.) L.P.  
Queiroz (JUCÁ)**

**Recife**

**2016**

**HYALYNE BERNADETE DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NOS PERFIS QUALI E QUANTITATIVO DE  
POLIFENOIS DAS CASCAS E FOLHAS DE *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P.  
Queiroz (JUCÁ)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Bioativos.

**Orientador(a):** Prof. Dr. Luiz Alberto Lira  
Soares

**Recife  
2016**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S237i Santos, Hyalyne Bernadete dos.  
Influência da sazonalidade nos perfis quali e quantitativo de polifenóis das cascas e folhas de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Jucá) / Hyalyne Bernadete dos Santos. – 2016.  
84 f.: il.; tab.; 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. Controle de qualidade. 2. Sazonalidade. 3. Taninos. 4. Validação. I. Soares, Luiz Alberto Lira (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-009)

**HYALYNE BERNADETE DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NOS PERFIS QUALI E QUANTITATIVO DE  
POLIFENÓIS DAS CASCAS E FOLHAS DE *Libidibia ferrea* (Mart.exTul.) L.P.  
Queiroz (JUCÁ)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 29/02/2016

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Orientador e Presidente da Banca)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Severino Grangeiro Júnior (Membro Externo)  
Faculdade Pernambucana de Saúde

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariana Laundry de Mesquita (Membro Externo)  
Universidade Federal de Brasília

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

**REITOR(A)**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR(A)**

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Emani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

**COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

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

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdecir Barboza e Cleidemar Santos, pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões e escolhas, por acreditarem em mim, quando eu mesma não acreditei. Mesmo longe fisicamente, sempre estiveram presentes com amor e apoio incondicional. A eles, o meu amor e o meu muito obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus primeiramente, por estar sempre ao meu lado me dando forças, me guiando e me amparando em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Alberto de Lira Soares, pela orientação, paciência, confiança e todas as oportunidades concedidas a mim durante minha graduação e pós-graduação.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Farmacognosia, em especial à equipe da central analítica (NUDATEF) pela convivência maravilhosa, experiências compartilhadas e apoio. Agradeço, principalmente, a Magda Rhayanny Assunção, que mesmo longe me ajudou em muitos momentos e Rebeka Monteiro, que compartilhou e esteve comigo em todos os momentos difíceis desses dois anos. Obrigada pela colaboração e valiosa contribuição para a realização do trabalho. É muito bom trabalhar com vocês. Muito obrigada.

Aos meu queridos amigos Marcos Galvão e Patrícia Neri, pelo incentivo, pelas tardes pós coleta e por se fazerem presentes na minha vida.

Aos meus velhos e novos amigos, Aline Fernanda, Hellen Cunha, Alamisne Gomes, Camila Jessica, Rivetila Édipo, Carla Nascimento, Renata Amaral, Arthur Hipólito, Acácia Monteiro e Ayanne Frazão por todos os momentos de descontração que compartilhamos, por todo o incentivo nesta caminhada e pela amizade verdadeira.

Ao meu namorado e amigo Osnan Sávio Mendes, por toda a ajuda, pela paciência nos momentos difíceis nessa fase tão importante da minha vida e por me apoiar e sempre me levantar quando eu pensava que não podia mais. Sei que posso contar com você em tudo. Muito obrigada!

À minha família, que me apoia em todos os momentos difíceis da minha trajetória de vida, a minha querida mãe Cleidemar, por sempre ser o meu porto seguro, ao meu pai Valdecir Barboza, e a minha irmã Ingryd Hayara. Sem eles, meus sonhos seriam mais difíceis de serem alcançados.

“É preciso força pra sonhar e perceber,  
Que a estrada vai além do que se vê”

(Los Hermanos)

## RESUMO

*Libidibia ferrea* (Mart. exTul.) L.P. Queiroz, popularmente conhecida como jucá ou pau ferro, é uma planta medicinal nativa do bioma caatinga, comumente encontrada na região Nordeste do Brasil e bastante utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e hipoglicemiante. Considerando a diversidade de propriedades biológicas e a relação dessas com a presença de ácido gálico em seus tecidos, a avaliação deste composto tem papel importante na manutenção da eficácia da espécie. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral investigar a influência sazonal sobre a variabilidade qualitativa e quantitativa de ácido gálico e polifenóis obtidos por CLAE, UV/Vis e por CCD. Para tanto, amostras de folhas e cascas de um mesmo indivíduo de *L. ferrea* (8°3' 30''S 34°54' 12'' W) foram coletadas mensalmente no período de setembro de 2014 a agosto de 2015. Após secagem e moagem, as amostras foram submetidas à caracterização físico-química segundo metodologias farmacopeicas (FB5, 2010), cromatografadas em CCD e as metodologias analíticas desenvolvidas por CLAE-DAD, foram validadas segundo parâmetros estabelecidos pela RE/2003, e por último, tiveram o teor de polifenóis avaliado por espectrofotometria no UV/Vis. Os resultados demonstraram que as drogas avaliadas estão dentro dos limites especificados pelo compêndio, tal como teor de cinzas totais (< 6,5 %) e umidade residual abaixo do limite preconizado (<14%). A análise fitoquímica qualitativa por CCD confirmou a presença de taninos hidrolisáveis nas amostras tanto das folhas quanto das cascas de *L. ferrea*, podendo-se observar a presença desses durante todo o período de estudo, porém variações importantes na intensidade das bandas ocorreu entre as coletas. A quantificação dos polifenóis totais por espectrofotometria empregando o reagente de Folin-Ciocalteu revelou que, tanto folhas como cascas, apresentam maior teor de polifenóis nos meses com baixa precipitação, referentes à primavera (SET-NOV). Por outro lado, o declínio no teor de polifenóis foi observado quando houve altas precipitações, no outono (MAR-MAI) e no inverno (JUN-AGO) para as folhas e as cascas, respectivamente. Em relação ao doseamento de ácido gálico por CLAE nas folhas e cascas *L. ferrea*, pode-se observar que nas folhas a maior concentração de ácido gálico foi na primavera (baixas precipitações), e a menor concentração no outono (altas níveis de precipitação), coincidindo com os resultados do método espectrofotométrico para doseamento de polifenóis nas folhas. Já nas cascas a maior concentração de ácido gálico foi observada no inverno, enquanto as menores concentrações foram na primavera, havendo nenhuma relação com os resultados encontrados para o doseamento de polifenóis. Diante do exposto, pode-se estabelecer a melhor época de coleta para os farmacógenos estudados, bem como levantar indícios de fatores que colaboram ou não para o aumento no teor dos compostos estudados.

**Palavras-chave:** Controle de qualidade. Sazonalidade. Taninos. Validação.

## ABSTRACT

*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, best known as jucá or pau ferro (Brazilian Ironwood or leopard tree), is a native medicinal plant of the Caatinga biome, commonly found in northeastern Brazil and widely used in folk medicine, as anti-inflammatory and hypoglycaemic. Taking into consideration the diversity of biological properties and its relation with the presence of gallic acid in their tissues, the evaluation of these compounds play an important role in maintaining the effectiveness of the species. The present study aimed to investigate the seasonal influence on the qualitative and quantitative variability of gallic acid and polyphenols obtained by HPLC, UV/Vis and by TLC. To that end, samples of leaves and barks of the same individual *L. ferrea* (8°3' 30''S 34°54' 12'' W) were collected monthly from September 2014 to August 2015. After drying and grinding, the samples were subjected to physical and chemical characterization by pharmacopoeic methodologies (FB5, 2010), chromatographed on TLC and methodologies by HPLC-DAD have been validated using parameters by RDC/2003, and finally had the polyphenol content assessed by spectrophotometry. The results showed that the drugs are evaluated within the limits specified by the compendium, such as the levels of total ash (<6.5%) and residual moisture below the recommended limit (<14%). The phytochemical qualitative TLC analysis confirmed the presence of hydrolyzable tannins in the leaves of both samples as the shells of *L. ferrea*. The presence of compounds was observed during the whole period, but significant variation in intensity of bands occurred between collections. The quantification of total polyphenols spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent revealed that both leaves and bark, have higher polyphenol levels in months with low rainfall, associated to spring (September to November). Moreover, the decrease in polyphenols levels was observed when there was high rainfall, in autumn (March to May) or in winter (July to August) to the leaves and bark respectively. Regarding the determination of gallic acid by HPLC on leaves and bark *L. ferrea*, it can be observed that in the leaves the higher concentration of gallic acid was during spring (low rainfall) and the lowest concentration during fall (high levels of precipitation) agreeing with the results of the spectrophotometric method for determination of polyphenols in the leaves. As for the bark, the highest concentration of gallic acid was observed during winter, while the lowest concentrations were in the spring, with no relation to the results for the determination of polyphenols. Given the above, one can establish the best time of collection for the study pharmacogens and raise evidence of factors that contribute or not to increase the content of the studied compounds.

**Key-words:** Quality Control. Seasonality. Tannins. Validation.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de fase móvel utilizado para a análise de ácido gálico nas folhas de <i>L. ferrea</i> .	36
Tabela 2 - Gradiente de fase móvel utilizado para a análise de ácido gálico nas cascas de <i>L. ferrea</i> .	36
Tabela 3—Caracterização físico-química das folhas de <i>L. ferrea</i> .	43
Tabela 4—Caracterização físico-química das cascas de <i>L. ferrea</i> .	44
Tabela 5 - Resultados dos limites de detecção e quantificação calculados para o ácido gálico nas folhas e cascas de <i>L. ferrea</i> .	58
Tabela 6 - Resultados do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de ácido gálico nas folhas e cascas de <i>L. ferrea</i> por CLAE.	59
Tabela 7 - Resultados do ensaio de precisão intermediária de ácido gálico.	60
Tabela 8 - Resultados obtidos no teste de recuperação para o pico de ácido gálico na solução amostra de folhas e cascas de <i>L.ferrea</i> .	60
Tabela 9 - Ensaio de robustez nas folhas e cascas de <i>L. ferrea</i> por CLAE.	61
Tabela 10- Análise das condições climáticas e evolução sazonal da quantificação de polifenóis totais nas folhas e cascas de <i>L. ferrea</i> por Espectroscopia no UV-Visível.	63
Tabela 11 - ANOVA de Uma entrada para a avaliação da variabilidade sazonal sobre o teor de polifenóis totais nas folhas de <i>L. ferrea</i> para os diferentes meses do ano.	65
Tabela 12 - ANOVA de Uma entrada para a avaliação da variabilidade sazonal sobre o teor de polifenóis totais nas cascas de <i>L. ferrea</i> .	65
Tabela 13 - Análise das condições climáticas e evolução sazonal da quantificação de ácido gálico (TAG) nas folhas e cascas de <i>L. ferrea</i> por HPLC.	67
Tabela 14 - ANOVA de Uma entrada para a avaliação da variabilidade sazonal sobre o teor de ácido gálico nas folhas de <i>L. ferrea</i> .	71
Tabela 15 - - ANOVA de Uma entrada para a avaliação da variabilidade sazonal sobre o teor de ácido gálico nas cascas de <i>L. ferrea</i> .	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Distribuições granulométricas referentes aos lotes das folhas de <i>L. ferrea</i> .	46
Figura 2 - Distribuições granulométricas referentes às amostras das cascas de <i>L. ferrea</i> .	47
Figura 3 - Curvas de retenção e passagem referentes às amostras das folhas de <i>L. ferrea</i> .	48
Figura 4 - Curvas de retenção e passagem referentes Aos lotes das cascas de <i>L. ferrea</i> .	50
Figura 5–Cromatograma obtido por CCD para avaliação de presença de taninos hidrolisáveis nas folhas de <i>L. ferrea</i> .	52
Figura 6–Cromatograma obtido por CCD para avaliação de presença de taninos hidrolisáveis nas cascas de <i>L. ferrea</i> .	53
Figura 7 - Espectro de varredura do pico do padrão de ácido gálico (1) e espectro de varredura do pico correspondente ao ácido gálico na amostra de folhas (2) e de cascas (3).	54
Figura 8 -Cromatograma da solução extrativa das folhas de <i>L. ferrea</i> (2) e do ácido gálico (1).	55
Figura 9 - Cromatograma da solução extrativa das cascas de <i>L. ferrea</i> (2) e do ácido gálico (1).	55
Figura 10 - Curva de calibração média para a solução padrão de ácido gálico obtida para o método aplicado às folhas.	56
Figura 11 - Curva de calibração média para a solução padrão de ácido gálico obtida para o método aplicado às cascas.	56
Figura 12 - Curva de linearidade média para a solução da amostra das folhas de <i>L. ferrea</i> .	57
Figura 13 - Curva de linearidade média para a solução da amostra das cascas de <i>L. ferrea</i> .	57
Figura 14 – Estudo de sazonalidade para o teor polifenóis totais (UV/VIS) expressos em ácido gálico em amostras de folha de <i>L. ferrea</i> .	64
Figura 15 - Estudo de sazonalidade para o teor polifenóis totais (UV/VIS) expressos em ácido gálico em amostras de casca de <i>L. ferrea</i> .	64
Figura 16 - Perfil cromatográfico das amostras de folha de <i>L. ferrea</i> em diferentes meses do ano, através de CLAE.	68
Figura 17 - Perfil cromatográfico das amostras de casca de <i>L. ferrea</i> em diferentes meses do ano, através de CLAE.	69
Figura 18 - Perfil de distribuição de ácido gálico nas amostras de folha de <i>L. ferrea</i> ao longo do ano, através de CLAE.	70
Figura 19 - Perfil de distribuição de ácido gálico nas amostras de casca de <i>L. ferrea</i> ao longo do ano, através de CLAE.	71

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
3.1 FAMÍLIA FABACEAE .....	16
3.2 GÊNERO <i>Caesalpinia</i> .....	16
3.3 A ESPÉCIE <i>Libidibia ferrea</i> (Mart.exTul.) L.P. Queiroz.....	17
3.4 POLIFENOIS.....	19
3.5 TANINOS.....	22
3.6 ANÁLISE DE POLIFENOIS EM DROGAS VEGETAIS .....	23
3.6.1 Espectrofotometria no Visível.....	23
3.6.2 Cromatografia em Camada Delgada.....	24
3.6.3 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE).....	25
3.7QUALIDADE DE DROGAS VEGETAIS .....	26
3.7.1 <i>Fingerprint</i> .....	26
3.8 SAZONALIDADE .....	28
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	32
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MATERIAL VEGETAL.....	32
4.2.1 Determinação da perda por dessecação .....	32
4.2.2 Determinação de Cinzas Totais.....	33
4.2.3 Análise granulométrica por tamisação.....	33
4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	34
4.3.1 Obtenção dos extratos.....	34
4.3.2 Padrão e revelador utilizados.....	34
4.3.3 Sistema cromatográfico (CCD) .....	34
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENOIS TOTAIS POR UV-VIS NAS FOLHAS E NAS CASCAS DE <i>L.ferrea</i> .....	34
4.4.1 Preparação da Solução estoque.....	34
4.4.2 Solução amostra para Polifenóis Totais (PFT).....	35

4.5QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO POR CLAE-DAD NAS FOLHAS E CASCAS DE <i>L. ferrea</i> .....	35
4.5.1 Condições cromatográficas .....	35
4.5.2 Preparação de Soluções.....	36
4.5.2.1 Análise das folhas de <i>L. ferrea</i> . ....	36
4.5.2.2 Análise das cascas de <i>L. ferrea</i> .....	37
4.5.3 Validação dos métodos por CLAE .....	38
4.5.3.1 Especificidade.....	38
4.5.3.2 Linearidade .....	39
4.5.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	39
4.5.3.4 Precisão.....	39
4.5.3.5 Exatidão.....	40
4.5.3.6 Robustez.....	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	41
5.1.1 Perda por dessecação – Método gravimétrico .....	41
5.1.2 Determinação de cinzas totais .....	41
5.1.3 Análise granulométrica por tamisação .....	45
5.2 INVESTIGAÇÃO DE TANINOS HIDROLISÁVEIS NAS AMOSTRAS .....	52
5.3VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR CLAE .....	54
5.3.1 Especificidade .....	54
5.3.2 Linearidade.....	55
5.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	58
5.3.4 Precisão .....	58
5.3.5 Exatidão .....	60
5.3.6 Robustez.....	61
5.4 INFLUÊNCIA SAZONAL NO MARCADOR QUÍMICO.....	62
5.4.1 Polifenóis por UV/VIS.....	62
5.4.2 Quantificação do ácido gálico por CLAE.....	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no combate à enfermidades consta em umas das práticas mais antigas da humanidade. Desde os tempos mais remotos o poder de cura das plantas medicinais tem sido aproveitado e passado ao longo das civilizações, sendo importantes como fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos, uma vez que, o reino vegetal possui a maior contribuição para desenvolvimento de novos medicamentos. Hoje, mesmo com o amplo mercado de medicamentos sintéticos, o uso de plantas medicinais e/ou fitomedicamentos ainda é mais acessível à população (YUNES et al., 2001; MACIEL et al., 2002; MINISTERIO DA SAÚDE, 2012; BAYDOUN et al., 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 80% da população mundial, utilize plantas para suprir a falta de assistência médica, e que aproximadamente 25% das prescrições, apresentem como compostos ativos derivados de plantas. Não existem dados oficiais sobre o tamanho desse mercado no Brasil, as estimativas variam entre 350 a 550 milhões de dólares ao ano (OMS, 2002; SIMÕES, 2002; MIOTO, 2010).

Dentre as espécies de interesse medicinal, a *Libidibia ferrea*, popularmente conhecida como pau ferro ou jucá, é uma espécie amplamente distribuída no Nordeste brasileiro, principalmente na região da caatinga. Consiste em uma árvore de grande porte, e apresenta grande importância econômica. Suas folhas servem para forragem; a madeira é empregada em construções civis e marcenaria em geral, podendo ainda ser utilizada no paisagismo (AVELINO et al., 2012).

Entre as suas propriedades farmacológicas podem ser citadas atividade anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana e hipoglicemiante. Suas cascas são utilizadas no tratamento da asma, tosse crônica, e como cicatrizantes. Diversas partes da planta, como folhas, frutos e casca são usadas no tratamento da leishmaniose. Na medicina popular há relatos do seu uso como antidiarreico, antimicótico, tratamento de úlceras e afecções nos pulmões (VASCONCELOS et al., 2009; CAVALHEIRO et al., 2009; DUARTE, 2010; FERREIRA; SOARES, 2015).

Devido ao seu grande emprego na medicina popular, essa espécie foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao sistema único de saúde (Rennisus), em fevereiro de 2009 (ALVES, S.F.2014). A Rennisus consiste uma lista com espécies vegetais que apresentam grande potencial farmacológico, o seu

principal objetivo é subsidiar pesquisas científicas estimulando a produção nacional de produtos derivados de espécies nativas e a introdução de práticas complementares de assistência à saúde pelo SUS (MARQUES et al., 2012).

Embora as plantas medicinais estejam ganhando um grande destaque no cenário mundial, o controle de qualidade realizado na maioria dos casos não é eficiente, principalmente devido a grande complexidade dos insumos vegetais, o que resulta em problemas como fraudes e adulterações. Além disso, condições como sazonalidade, operações de coleta e tratamentos empregados para estabilização destes materiais, contribuem para a variação de metabólitos secundários. A padronização química de medicamentos fitoterápicos garante a sua eficácia e segurança, para isso, técnicas como CLAE e CCD auxiliam no controle de qualidade através da identificação de marcadores químicos, que contribuem na autenticidade bem como o estabelecimento de protocolos para o controle de qualidade de fitoterápicos (BRAGA et al., 2003; CHABARIBERI et al., 2008).

Segundo Gobbo-Neto e colaboradores (2007), a época em que uma planta é coletada é um dos fatores de maior importância no controle de qualidade de drogas vegetais, pois o ambiente desempenha um papel importante no desenvolvimento e crescimento dos vegetais, e conhecer a variabilidade química é essencial para a padronização de medicamentos fitoterápicos (CASTRO et al., 2005; YARIWAKE et al., 2005).

Ao acompanhar a variação sazonal de taninos hidrolisáveis nas folhas de *Eugenia uniflora*, Santos (2006) pode constatar que, além da influência climática, fatores como floração, frutificação e ataques de herbívoros tem grande importância na variação da composição de metabólitos secundários. Outros trabalhos como o de Santos e colaboradores (2009), observaram a relação entre o estresse hídrico e a produção de polifenóis, denotando assim a necessidade de se realizar estudos que possam acompanhar os fatores que tem influência na variabilidade dos metabólitos secundários.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo investigar a variabilidade sazonal dos perfis quali e quantitativos de polifenóis nas cascas e folhas de *L. ferrea*, utilizando técnicas espectrofotométricas (UV/Vis), e cromatográficas (CLAE-DAD e CCD), afim de estabelecer um marcador químico para a espécie *L. ferrea*, auxiliando então no controle de qualidade da espécie.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência da sazonalidade nos perfis quali e quantitativo de polifenóis nas cascas e folhas de *Libidibia ferrea*, bem como caracterizar padrões físico-químicos, para aplicação no controle de qualidade da espécie.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a variabilidade sazonal para a espécie, de acordo com as impressões digitais estabelecidas.
- Verificar parâmetros de qualidade físico-químicos para a espécie vegetal *Libidibia ferrea*;
- Adequar metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de ácido gálico;
- Estabelecer impressões digitais para o ácido gálico presente na espécie por , CLAE e CCD.
- Quantificar polifenóis totais por UV/Vis.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 FAMÍLIA FABACEAE

As leguminosas são amplamente distribuídas no planeta, com exceção dos pólos. Elas podem ocupar desertos, florestas tropicais e até mesmo ambientes aquáticos (FERNANDES; GARCIA, 2008). No Brasil ocorrem 2.807 espécies (1.508 endêmicas) em 222 gêneros (LIMA et al., 2015). Podem ser encontradas na forma de trepadeiras, arbustos, ervas anuais ou perenes e árvores de pequeno, médio e grande porte (FERNANDES e GARCIA, 2008).

A família Fabaceae, a terceira maior família entre as angiospermas, e a segunda economicamente mais importante (BRITO; PINHEIRO; SAZIMA, 2010). Apresentando cerca de 619 gêneros e aproximadamente 17.815 espécies, a família Fabaceae é tradicionalmente dividida em três subfamílias: Ceasalpinoideae, Faboideae e Mimosoideae (MOREIRA-CONEGLIAN; OLIVEIRA, 2006).

A subfamília *Caesalpinioideae*, compreende cerca de 150 gêneros, podendo-se destacar: *Cassia* (ex.: boi gordo), *Bauhinia* (ex.: unha-de-vaca), *Copaifera* (ex.: cobaípa), *Hymenaea* (ex.: jatobá) e *Cesalpineia* que tem como espécies muito conhecidas o pau brasil e o pau ferro (CARVALHO, 2004).

Os frutos são geralmente do tipo legume, apresentando variações do tipo bacóide, nucóide e samaróide, e também lomento, folículo, sâmara e drupa (BARROSO et al., 1999).

#### 3.2 GÊNERO *Caesalpinia*

O Gênero *Caesalpinia* apresenta cerca de 500 espécies, sendo essas amplamente distribuídas nas zonas tropicais e subtropicais, e algumas espécies estão restritas a determinados locais, como é o caso da *Caesalpinia echinata* restrita ao Brasil, e a *Caesalpinia pulcherrima* restrita a América Central (ZANIN et al., 2012). Este gênero constitui-se de espécies arbóreas ou arbustivas com estípulas caducas ou ausentes, folhas, às vezes, glandular-punctadas na face inferior, flores zigomorfas com sépalas denteadas e estigma terminal ou subterminal; legumes

glabros com tricomas simples, glandulares, glandular-peltados ou ramificados (BORTOLUZZI et al., 2007; FERNANDES; GARCIA, 2008).

Algumas substâncias já foram isoladas do gênero *Caesalpinia*, podendo-se citar: isoflavonas nas folhas de *Cesalpinia pulcherrima* (DAS et al., 2009), aminoácidos das sementes de *Caesalpinia tinctoria* (ZANIN et al., 2012,) e algumas classes de metabólitos secundários como flavonoides, taninos, diterpenos e esteróis (ZANIN et al., 2012). Em relação às atividades farmacológicas, esse gênero apresenta atividades anti-inflamatória (CARVALHO, 2004), antiulcerosa, antimicrobiana, anti-helmíntico, antipirético (ZANIN et al., 20012).

### 3.3 A ESPÉCIE *Libidibia ferrea* (Mart.exTul.) L.P. Queiroz

*Libidibia ferrea*, também conhecida como jucá ou pau ferro, apresenta como basinônimo *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (FLORA DO BRASIL, 2015). É uma espécie amplamente distribuída no Norte e Nordeste do Brasil, e pertence à família Fabaceae (MARREIRO et al., 2014).

É uma árvore de grande porte, podendo variar de 10 a 15 metros de altura, o tronco curto de 40 a 60 cm de diâmetro com bifurcações quando isolado, apresenta uma copa arredondada, fechada e densa. Cascas lisas, finas e acinzentadas com manchas brancas irregulares que contrastam com o fundo marrom do tronco. Suas folhas são compostas, bipinadas, com flores amarelo-brilhante, pequenas reunidas em panícula terminal de até 20 cm de comprimento. Seu fruto é um legume preto-avermelhado, que ao amadurecer torna-se negro e chocalhante, porque as sementes se soltam dentro de cada lóculo na vargem. Cada fruto contém 2 a 10 sementes elipsoides, amarelas ou marrons de consistência bastante dura (LORENZI, 2002; MACHADO, 2006).

Nascimento e colaboradores (2002), já haviam relatado a utilização de *L.ferrea* como uma espécie forrageira, além disso, pode-se observar o seu emprego na arborização de ruas devido à grande resistência a seca e a sua copa pouco densa, na construção civil com o fornecimento de madeira de boa qualidade, e na ornamentação de ambientes (CRUZ,1979; CARVALHO, 2004).

A espécie tem uma floração que ocorre na estação seca até início da estação chuvosa, e a frutificação vai do final da estação seca e se prolonga até a estação

chuvosa, apresentando alta produção de frutos anualmente (GALDINO; MESQUITA; FERRAZ, 2007).

No que diz respeito à composição química, Ueda e colaboradores (2001) já identificaram por CLAE os ácidos gálico e elágico de extratos etanólicos dos frutos secos de *L.ferrea*. Nakamura e colaboradores (2002) isolaram do extrato acetato de etila dos frutos de *L.ferrea* o ácido gálico e o galato de metila. Segundo Carvalho (2004), em extratos benzênicos dos frutos pode-se isolar sitosterol, ácidos palmíticos e octacosanóico. Gonzalez (2004) descreveu a presença de saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas e esteroides nos extratos hidroalcoólicos das folhas e cascas.

Em 2006, Dias e colaboradores realizaram um estudo utilizando extração com CO<sub>2</sub> em estado supercrítico nos frutos da espécie. A partir desse estudo, foi possível identificar seis compostos diferentes, sendo eles: ácido linoleico, ácido palmítico, ácido elágico, gama-sitosterol, ácido stearático e lupenoina.

Matos (2007) identificou ácido gálico, ácido elágico, e o éster metílico do ácido elágico, como as principais substâncias responsáveis pelas atividades biológicas nos frutos dessa espécie vegetal.

Sampaio em 2009 descreveu a presença de um alto teor de polifenóis no extrato bruto dos frutos de *L. ferrea*, e atribuiu a esses a atividade antimicrobiana descrita para a espécie.

Araújo e colaboradores (2014) confirmam a presença de polifenóis, tais como ácido gálico e catequina, em extratos aquosos e extratos água-acetona nas cascas de *L. ferrea*.

O uso do caule da espécie na medicina popular, tem sido relatado para tratar afecções bronco-pulmonares, distúrbios gastrointestinais, reumatismo, diarreias e na cicatrização (OLIVEIRA et al., 2010).

Na região amazônica a *L.ferrea* apresenta uma ampla aplicação medicinal. As suas folhas podem ser utilizadas para tratar hemorroidas, amebíase e problemas hepáticos. A infusão das folhas junto com os frutos é útil para tratar inflamações do fígado e no tratamento de tuberculose. A casca é usada na preparação de um xarope contra asma e bronquite (Di STASI, 2002).

Ueda e colaboradores (2001) constataram a atividade hipoglicemiante dos frutos da espécie, através da inibição da aldose redutase. Em 2011, Vasconcelos e colaboradores também relataram atividade hipoglicemiante da casca do caule da

espécie, propondo-a como um tratamento alternativo promissor para condições diabéticas.

Nakamura e colaboradores (2002) relataram atividades analgésicas e antiinflamatória para os extratos aquosos dos frutos, além de atividade antiulcerosa, antitussígena e cicatrizante.

Carvalho (2004) realizou estudos para comprovar as ações antiinflamatórias e analgésicas de *L. ferrea*. O estudo foi realizado através de administração do extrato bruto aquoso das cascas da espécie por via intraperitoneal e via oral em ratos.

Nozaki e colaboradores (2007) isolaram uma chalcona responsável pela inibição da topoisomerase II, no caule da espécie, sendo então responsável por uma atividade anticancerígena.

Dias e colaboradores (2013) confirmaram atividade anti-inflamatória para os frutos e casca da espécie. Silva e colaboradores (2013) relataram o uso de *L. ferrea* para desordens renais, estresse, fadiga e dor de cabeça.

Também Foi possível observar que a utilização do chá feito a partir das cascas é empregado para perda de peso e clareamento de lesões. Os frutos são frequentemente utilizados para tratar anemia, doenças pulmonares, asma e diabetes (FERREIRA; SOARES, 2015).

Além das atividades já citadas, outras atividades farmacológicas foram atribuídas para a espécie, podendo-se mencionar atividade antimicrobiana contra patógenos orais nos frutos (SAMPAIO et al., 2009), atividades celulásica, amilásica, anticoagulante e larvicida contra *A. aegypti*, nas sementes, revelando a presença de compostos de interesse farmacológico e industrial (CAVALHEIRO et al., 2009).

### 3.4 POLIFENOIS

Os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos, e que este seja substituído com no mínimo um grupamento hidroxila. Os compostos fenólicos apresentam grande variedade estrutural, englobando desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Entre os compostos fenólicos que apresentam maior destaque estão os flavonoides, taninos e ácidos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2006; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010).

Tendo origem a partir do metabolismo secundário das plantas, os compostos fenólicos possuem grande importância no crescimento e reprodução dos vegetais, na proteção contra os raios UV, proteção contra patógenos e herbívoros e contra vários estresses causados pelo meio (ANGELO; JORGE, 2006; DAGLIA, 2012). Com uma grande distribuição no meio ambiente, eles podem ser classificados de acordo com a sua ocorrência no reino vegetal, podendo ser: compostos amplamente distribuídos, compostos de distribuição restrita e polímeros. Os compostos de ampla distribuição geralmente englobam os flavonoides, as cumarinas e os derivados dos ácidos benzoicos e ácidos cinâmicos. No grupo dos compostos de distribuição restrita estão os fenóis simples, hidroquinona e o resorcinol. E no grupo dos polímeros estão os fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, como as ligninas e taninos (ANGELO; JORGE, 2006; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010).

As principais fontes de compostos fenólicos incluem frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras como ameixa, cereja, mamão e maçã; incluem também cereais, vegetais e legumes como pimenta, brócolis e tomate. Algumas bebidas como chás, café e sucos de frutas também são ótimas fontes de polifenóis (ANGELO; JORGE, 2006; KHODDAMI et al., 2013).

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se em grande parte a grande variedade de combinações que pode acontecer na natureza, as combinações resultantes são chamadas de polifenóis e podem ser divididas em classes, de acordo com o tipo de esqueleto principal, conforme demonstrado no quadro 1 (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010).

**Quadro 1** – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	$C_6$
Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6-C_1$
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	$C_6-C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	$C_6-C_3$
Naftoquinonas	$C_6-C_4$
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010.

Devido a grande distribuição dessa classe de metabólitos, e da sua importância frente a atividades biológicas, é necessário técnicas eficientes que possam otimizar e melhorar o rendimento desses metabólitos. Diante disso, trabalhos como o de Cujíc e colaboradores (2015), otimizaram a extração de polifenóis de extratos secos dos frutos de *Aronia melanocarpa*, usando técnicas de maceração tradicional. Outros trabalhos como o de Nayak e colaboradores (2015) e Zlotek e colaboradores (2015) demonstraram a importância de se investigar parâmetros que possam maximizar as respostas da extração de polifenóis.

Além de estabelecer boas condições experimentais, é de fundamental importância conhecer a variabilidade dos metabólitos, uma vez que muitos fatores podem interferir no seu rendimento. Logo, é necessário não só desenvolver boas condições analíticas, mas também usa-las para acompanhar a variabilidade dos metabolitos, e assim, garantir maior eficiência no seu controle de qualidade.

### 3.5 TANINOS

Segundo Mello e colaboradores (2010), os taninos são compostos fenólicos, solúveis em água, com massa molecular entre 500 e 3000 Dalton, que apresentam como característica principal a formação de complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas.

Há mais de 200 anos essa classe de metabólitos é utilizada com a função de curtimento do couro; seus usos mais recentes na indústria incluem adesivos, floculantes, modificadores de viscosidade, na indústria alimentícia tem emprego como antioxidante nos sucos de frutas e clarificantes em vinhos (PANSERA, 2003; ARAPTSAS, 2012; BASTOS et al., 2015).

Dependendo da sua estrutura química, os taninos podem ser classificados em hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são derivados do chiquimato, e constituem em ésteres de ácido gálico (galotaninos) e ácido elágico (elagitaninos), apresentando geralmente como poliol central a glicose. Comparado a outras classes, os taninos hidrolisáveis tem uma distribuição muito restrita, ficando restritos as dicotiledôneas (ARAPTSAS, 2012; HASLAN, 2007; MELLO; SANTOS, 2010).

Taninos condensados são também chamados de proantocianidinas, devido a formação de pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas após degradação com ácido. São polímeros formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do fenilpropanol. As unidades de protoancianidinas tais como catequina e epicatequina são unidas por ligações covalentes entre os carbonos C<sub>4</sub> e C<sub>8</sub> ou carbono C<sub>4</sub> e C<sub>6</sub> (HASLAN, 1996; MELLO; SANTOS, 2010).

Uma das principais propriedades dos taninos vem do fato deles formarem complexos com proteínas, isso ocorre devido à formação de ligações de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas. Um mol de taninos pode se ligar a até 12 moles de proteínas; baseando-se nessa propriedade, pode-se identificar taninos através de testes de precipitação com proteínas, além do mais, a precipitação com proteínas salivares atribui aos taninos um caráter adstringente, facilmente reconhecido em vinhos (MONTEIRO et al., 2005; KYRALEOU et al., 2015).

As propriedades biológicas dos taninos estão relacionadas principalmente com sua característica de adstringência. Foram observadas atividade anti-séptica,

antidiarreica, hemolíticas, e em alguns casos de intoxicação podem agir como antídoto, no tratamento de afecções da mucosa bucal e orofaríngeas, no tratamento de hemorroidas e diarreias (MONTEIRO et al., 2005; MELLO; SANTOS, 2010).

Ao precipitar proteínas os taninos propiciam um efeito antifúngico (MONTEIRO et al., 2005). Buzzini e colaboradores (2008), demonstraram o potencial antimicrobiano dos taninos hidrolisáveis.

Outras atividades atribuídas aos taninos como bactericida, fungicida, antitumoral e no tratamento da arteriosclerose e artrite reumatoide tem sido atribuídas em parte a capacidade de complexação ou captação de radicais livres, originando assim radicais livres e estáveis inibindo a peroxidação de lipídios e outras substâncias (VERZA, 2006; VERZA et al., 2007).

### 3.6 ANÁLISE DE POLIFENOIS EM DROGAS VEGETAIS

#### 3.6.1 Espectrofotometria no Visível

A espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) existe há mais de 40 anos, e é uma técnica bastante popular e comumente utilizada em laboratórios devido a sua simplicidade, versatilidade, baixo custo e rapidez nas análises (SHOKOUFI; SHEMIRANI; ASSADI, 2007; ABADI et al., 2012; MARQUES et al., 2013).

Segundo Shokoufi (2013), espectrofotometria é a medição quantitativa das propriedades de reflexão ou de transmissão de um material como uma função do comprimento de onda. É uma técnica rotineiramente utilizada em química analítica para quantificação de diferentes analitos tais como metais de transição e compostos orgânicos altamente conjugados (ABADI et al., 2012).

Embora esta técnica seja amplamente utilizada, a pouca seletividade ainda é o seu principal desafio para analisar matrizes complexas como extratos vegetais, pois a espectrofotometria direta pode ocasionar em sobreposição de bandas impedindo a absorção do composto de interesse (MARQUES et al., 2012). Diante disso, os métodos espectrofotométricos mais aceitos para a determinação do teor de polifenóis envolvem reações de óxido-redução com formação de complexo. Os

métodos de óxido-redução baseiam-se na formação de um complexo azul devido à redução do reagente pelas hidroxilas fenólicas (VERZA, 2006; VERZA et al., 2007).

O método de doseamento de fenóis totais de Folin-Ciocalteu (1927) é o mais aceito atualmente. Neste método ocorre a redução dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, presentes no reagente, pelas hidroxilas presentes nos compostos fenólicos, a óxido de tungstênio e óxido de molibdênio em meio alcalino. Estes óxidos formados apresentam coloração azulada, sendo possível a quantificação da absorvância da solução na região do visível (760nm) (CRUZ, 2008).

Bueno e colaboradores (2012), otimizaram as condições do método de Folin-Ciocalteu (concentração de carbonato de sódio, temperatura e tempo) no doseamento de polifenóis totais, em extratos brutos das cascas de *Caesalpinia peltophoroides* Bent. Abadi e colaboradores (2012), destacou a importância da espectrofotometria no (UV-VIS) como técnica importante na rotina laboratorial, e chamou atenção para os avanços nos detectores, que estão cada vez mais sensíveis permitindo a determinação de vários compostos em diferentes matrizes.

Já estudos como o de Di Ciaula e colaboradores (2014), investigaram o efeito dos solventes e da mistura dos mesmos no doseamento de polifenóis totais nas cascas de *Schinustere binthifolius*, utilizando o método de Folin-Ciocalteu e espectrofotometria no (UV-VIS).

### **3.6.2 Cromatografia em Camada Delgada**

As técnicas cromatográficas são de grande importância no controle de qualidade de matérias primas vegetais. A cromatografia em camada delgada (CCD) em especial, consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Essa técnica apresenta uma ampla utilização nos laboratórios, uma vez que é uma técnica simples, rápida e de baixo custo (LOPES, 2011).

Os avanços tecnológicos na área da cromatografia, criaram técnicas cada vez mais sensíveis, resultando em técnicas mais confiáveis e com maior reprodutibilidade. A cromatografia em camada delgada de alta eficiência utiliza um menor diâmetro de partículas na sílica gel, apresentando um menor tempo de análise, menor volume de aplicação, e um maior número de amostras por placa.

Trata-se de uma técnica completamente ou parcialmente automatizada, garantindo maior resolução e reprodutibilidade (LOPES, 2011; COLLINS, 2010).

Halkina e Sherma (2006) compararam alguns aspectos entre CCD e CCD-AE, demonstrando que os resultados para CCD-AE foram mais promissores, principalmente no que diz respeito a resolução e ao tempo de eluição. O uso de partículas menores pela CCD-AE, possibilita a obtenção de separações mais eficientes, e conseqüentemente, maior resolução e tempo de eluição (LOPES, 2011).

Rathe e colaboradores (2011) quantificaram stigmasterol e lupeol através de CCD-AE acoplada a um densitômetro, mostrando o valor desta técnica como técnica quali e quantitativa.

O presente trabalho utilizou placas de CCD com um sistema semi-automático de aplicação para análise qualitativa de taninos hidrolisáveis nas cascas e folhas de *L. ferrea* ao longo do ano.

### **3.6.3 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE)**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a técnica de separação mais empregada dos últimos tempos; ela consegue separar misturas que contem um grande número de compostos similares, em uma escala de tempo muito pequena (JARDIM, 2011). Além disso, atualmente os aparelhos de CLAE são automatizados, o que diminui a quantidade de erros que eventualmente poderia se ter com um operador. É uma técnica que apresenta alta resolução, seletividade e sensibilidade (TISTAERT; DEJAEGHER; HEYDEN, 2011).

Outra importante característica que se pode mencionar desta técnica, é a sua alta versatilidade, podendo ser empregada para separação, identificação e quantificação de substâncias, inclusive de matrizes complexas como extratos vegetais. Tonhin e colaboradores (2002) relataram a importância da CLAE estimando-se que aproximadamente 90% dos laboratórios espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método que emprega a modalidade de CLAE em fase reversa. A fase reversa é uma fase estacionária que apresenta menor polaridade, logo apresenta a vantagem de poder utilizar solventes menos tóxicos e de custo mais baixo, como metanol e água (CASS, 2009).

Wyrepkowski e colaboradores (2014) comprovaram a eficiência da CLAE na identificação e quantificação de compostos a partir de um extrato etanólico das cascas de *Libidibia ferrea*.

Embora a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência apresente muitas vantagens, o alto custo do aparelho ainda é um dos principais desafios enfrentados.

### 3.7 QUALIDADE DE DROGAS VEGETAIS

#### 3.7.1 *Fingerprint*

Segundo Farias (2010), entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina. O estabelecimento de critérios de qualidade das matérias primas vegetais é um fator determinante para que se possa obter um fitoterápico de qualidade, principalmente devido ao fato desses insumos vegetais apresentarem uma grande complexidade em suas composições (CHABARIBERI et al., 2008; BARNI; FILHO; COUTO, 2009; FARIAS, 2010).

Tendo em vista que o controle de qualidade de plantas medicinais ainda apresenta muitos desafios, tem sido crescente a utilização de técnicas para a construção de impressões digitais espectrais ou cromatográficas, uma vez que podem oferecer soluções úteis principalmente para obstáculos como a diversidade química e variabilidade, que as drogas de origem vegetal apresentam (TOLEDO et al., 2003).

O controle de qualidade de drogas vegetais e produtos derivados é fundamentado no uso tradicional ou quantificação de marcadores. Para identificar e determinar quantitativamente os marcadores, normalmente são eleitas uma ou duas substâncias farmacologicamente importantes presentes na amostra. Sendo assim, os métodos analíticos mostram-se de extrema importância para a quantificação e controle da manutenção dos constituintes químicos ativos ou de referência, presentes na matéria prima vegetal, produtos intermediários e produto final, permitindo assim, a avaliação da qualidade do produto, promovendo a garantia de uma ação terapêutica constante e a segurança de sua utilização. Sendo requisitos indispensáveis, portanto, ao seu registro no Brasil (TOLEDO et al., 2003; ZENG et al., 2008).

Nesse sentido, Tistaert e colaboradores (2011), definiram *fingerprint* como sendo um perfil característico que reflete a composição química complexa da amostra analisada, e que pode ser obtido por meios espectroscópicos, por técnicas cromatográficas como CLAE, a cromatografia gasosa (GC), cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE), cromatografia em contra corrente (CCC), entre outras, ou então por técnicas eletroforéticas. Dessa forma, o *fingerprint* quando comparado a padrões pode auxiliar tanto na identificação dos compostos de referência, quanto em substâncias utilizadas para adulterações (GOMES, 2009; NI et al., 2009; GIRI et al., 2010; LIANG et al., 2010; GARZA-JUÁREZ et al., 2011).

A técnica de impressão digital (*fingerprint*) cromatográfica foi introduzida e aceita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como estratégia para avaliação de produtos naturais (WORLD, 2000); também é recomendada por outras entidades como a *Chinese State Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA) (FDA, 2004; EMA, 2006; GIRI et al., 2010).

Garza-Juárez e colaboradores (2009), desenvolveram e validaram uma metodologia para obtenção de fingerprints por CLAE a partir de extratos das folhas e caules de *Turnera diffusa*, bem como produtos comercializados a base da planta. Ni e colaboradores (2009), confirmaram a importância de técnicas cromatográficas através do desenvolvimento de uma técnica por CLAE para obtenção de *fingerprints* de *Cassia seed*. Gomes (2009) realizou um trabalho demonstrando a importância do *fingerprint* através da realização de impressões digitais das folhas de *Lippia gracilis* utilizando CLAE.

Mariswamy e colaboradores (2012) estabeleceram os biomarcadores para *Aerva lanata* L. a partir de extratos metanólicos das folhas e raízes, utilizando CCD-AE. Jothy e colaboradores (2013), estabeleceram o *fingerprint* cromatográfico para *Polyalthia longifolia*, relatando a importância para o controle de qualidade da espécie.

### 3.8 SAZONALIDADE

Os metabólitos secundários sofrem interferência de diversos fatores ambientais, e dependendo dos estímulos causados pelo meio ambiente, uma espécie vegetal é capaz de sintetizar diferentes compostos, através do redirecionamento das rotas metabólicas. Sendo assim, é necessário avaliar as condições a que as plantas são expostas, afim de conhecer a variabilidade dos seus constituintes ativos. Entre os fatores ambientais críticos ao desenvolvimento do metabolismo vegetal pode-se citar: local de cultivo, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes disponíveis, altitude, poluição atmosférica e sazonalidade. A variabilidade sazonal tem forte influência sobre as características químicas das plantas, uma vez que, a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes não é constante ao longo do ano (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; CARNEIRO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2014).

Gobbo-Neto e colaboradores (2007), relataram a variação de praticamente todas as classes de metabólitos secundários como óleos essenciais, lactônicas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos.

Um dos principais desafios para a padronização de medicamentos fitoterápicos está na reprodutibilidade lote a lote da sua ação terapêutica, devido grande variabilidade nas concentrações dos marcadores, logo, conhecer a variabilidade química das matérias primas vegetais, é essencial para obtenção de um produto final com segurança. Além de garantir a qualidade das drogas vegetais, analisar a influência da sazonalidade na composição química de insumos vegetais, pode evitar a coleta indiscriminada, visando o manejo sustentável de plantas medicinais, principalmente as espécies com importância comercial (MEDEIROS, 2006).

Yariwake e colaboradores (2005), observaram a variabilidade nas concentrações de flavonoides, triterpenos e polifenóis totais, nas folhas de *Maytenus aquifolium*, após dois anos de estudos, identificando as estações do ano em que houve maior e menor concentração dos metabólitos. Medeiros (2006), analisou a variação sazonal dos constituintes do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus* e da cumarina em *Mikania glomerata* por meio de Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Santos (2013), estudou a época do ano (verão, primavera, outono e inverno) em que o Khusimel,

composto importante na *Vetiveria zizanioides*, apresentava maior porcentagem. Outros trabalhos, como o de Coutinho e colaboradores (2010), analisaram a influência sazonal nas concentrações de flavonoides nas folhas de *Campomanesia adamantium*.

Castro e colaboradores (2005) avaliaram a influência sazonal na produção da enzima fenilalanina amônia-liase, dos fenois totais e dos taninos nas cascas de *Byrsonima verbascifolia* Rich, considerando a precipitação e temperatura como fatores importantes nas variações.

Castellani e colaboradores (2006), estudaram a produção de óleos essenciais em *Trichilia catigua* e *Siparuna guianensis*, baseado nas estações do ano e nas partes do vegetal (folhas e galhos). Trabalhos como o de Guo e colaboradores (2010), analisaram as variações causadas pela sazonalidade nos perfis metabólicos dos frutos de *Ligustrum lucidum*.

Figueiredo e colaboradores (2014) realizaram caracterizações físico-químicas e anatômicas das folhas de *Thuja occidentalis*, e acompanharam a influência sazonal nos teores de flavonoides durante um ano, levando em consideração fatores como umidade relativa do ar, temperatura e precipitação .

Já Afonso e colaboradores (2015), estabeleceram fingerprint para as cascas de *Vernonia condensada*, e analisaram a influência sazonal na atividade farmacológica da espécie.

Além de variações durante o ano é cada vez mais crescente os estudos que apontam variações na composição dos metabólitos secundários no ciclo dia e noite. Essas variações estão principalmente relacionadas aos óleos voláteis, sendo indicado realizar a sua coleta na parte da manhã ou a noite. Como exemplo, pode-se citar o elginol que varia cerca de 80% entre os horários do dia (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Sabendo-se que a variabilidade química tem influência direta no controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos, tem crescido o número de estudos que tentam isolar substâncias para que estas possam servir como padrão de qualidade. Segundo a Anvisa, marcador é uma substância ou classe de compostos químicos presentes na matéria-prima vegetal, (de preferência que tenha relação com o efeito terapêutico) que possa ser usada como referência no controle de qualidade da matéria-prima ou medicamento fitoterápico (BRASIL, 2003).

Um marcador químico, é um componente que ao ser identificado e quantificado, pode ser utilizado posteriormente como parâmetro de qualidade para medicamentos fitoterápicos, uma vez que, assume-se que se a mesma está presente em uma quantidade apropriada, as demais componentes necessários estão sendo representados. Assim, existe uma garantia maior que os diversos lotes de medicamentos fitoterápicos apresentem composição qualitativa e quantitativa semelhantes (GUIMARÃES, 2007; DAVID et al., 2004).

Diante do exposto, faz-se necessário realizar um estudo aprofundado a cerca da relação entre a sazonalidade e o teor dos principais marcadores em espécies que apresentem importância econômica e terapêutica para a região Nordeste, como é o caso de *Libidibia ferrea*.

### 3.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Diante da necessidade de estabelecer a qualidade de drogas vegetais, é de extrema importância que sejam adotadas medidas que possam assegurar a confiabilidade do processo de garantia da qualidade. Sendo assim, para que metodologias analíticas forneçam informações seguras, é necessário que elas sejam submetidas a uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004; ALVES et al., 2010).

Segundo Cass (2006), validação é um processo que fornece evidências documentadas de que o método em questão é confiável ao que se aplica. Trata-se de uma série de procedimentos que visam assegurar credibilidade no uso rotineiro as medidas obtidas (RIBANI et al., 2004; CASS, 2006).

A validação de uma metodologia analítica é um ponto fundamental para assegurar a capacidade analítica da metodologia. Associado a isto, para se obter respostas que comprovem a veracidade do método, é importante a utilização de ferramentas estatísticas (COSTA, 2012).

A Resolução Específica (RE) nº 899/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece os seguintes parâmetros para a realização da validação: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de quantificação e detecção, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

A especificidade/seletividade desempenham um papel importante na análise de matrizes complexas como as de drogas vegetais e seus derivados. Trata-se da

capacidade que o método possui em medir exatamente um composto na presença de outros componentes tais como impurezas, produtos e degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003; ARAÚJO et al., 2013).

Na linearidade recomenda-se a realização de no mínimo cinco análises de concentrações diferentes variando entre 80% e 120%, da concentração teórica do teste para determinação quantitativa do analito em matérias primas e formas farmacêuticas. O critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação dever ser 0,99 (BRASIL, 2003).

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. Já o 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. Os baixos limites de Detecção e Quantificação indicam que o método não sofre interferência importante da técnica instrumental (BRASIL, 2003).

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. É considerada em três níveis: Repetibilidade, que apresenta no mínimo 6 determinações a 100% da concentração do teste; Precisão intermediária, que precisa obter uma concordância dos resultados obtidos entre dias e operadores diferentes; e, Reprodutibilidade, a qual representa haver concordância que deve existir entre os resultados obtidos por laboratórios diferentes (BRASIL, 2003).

Segundo Ribeiro e colaboradores (2008), a exatidão reflete a proximidade entre o valor medido e o valor de referência, considerado verdadeiro.

Por último a robustez pode ser definida como a sensibilidade de um método frente a pequenas variações nas condições analíticas. Estas pequenas mudanças refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos. Portanto, a robustez de um método pode ser estimada variando-se os parâmetros analíticos e comparando a precisão obtida em casa determinação (BRASIL, 2003; RIBEIRO et al., 2008).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os lotes de folha e caule de *L. ferrea* foram coletadas do mesmo indivíduo durante o período de um ano, todos os meses, no município de Recife–PE e levados para identificação no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), onde foi depositada uma exsicata sob tombamento 89419. Depois de coletadas, as amostras foram submetidas à secagem em estufa, a temperatura de 45 °C durante 96 horas, e em seguida pulverizadas em moinho de facas da marca Adamo (modelo Wiley®).

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MATERIAL VEGETAL

#### 4.2.1 Determinação da perda por dessecação

Foram pesadas cerca de 2,0 g do material vegetal pulverizado e transferidos para pesa-filtros previamente dessecados e tarados. Os lotes foram colocadas na estufa, com temperatura igual a  $105 \pm 2$  °C durante 2 horas, seguidas de resfriamento em dessecador por 30 minutos antes da pesagem em balança analítica (Shimadzu®). A operação foi repetida em ciclos de uma hora até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, pela média de três determinações, segundo a equação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010):

$$PD = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Em que:

PD = perda por dessecação; Pa = peso da amostra (g); Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g); Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

#### 4.2.2 Determinação de Cinzas Totais

Foram pesados cerca de 3,0 g do material vegetal e transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e tarados. As amostras foram incineradas em mufla por 3 horas, sob gradiente crescente de temperatura (30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 ± 25 °C). Em seguida foram arrefecidos por 30 minutos em dessecador, pesados e colocados de volta ao aquecimento de 600 °C ± 25 °C até obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos pela média de três determinações, segundo a equação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010):

$$\text{Cinzas totais (\%)} = \frac{C_{di} - C}{Pa} \times 100$$

Em que:

$C_{di}$ : peso do cadinho contendo a amostra após incineração (g);  $C$ : peso do cadinho sem a amostra (g);  $Pa$ : Peso da amostra (g); 100: fator de porcentagem.

#### 4.2.3 Análise granulométrica por tamisação

Foram pesados cerca de 25 g do material vegetal pulverizado e submetidos à passagem através de tamises, previamente tarados, com abertura de malha de 850, 650, 425, 250, 150 e 75 µm. A operação foi realizada sob 60 vibrações por segundo durante 15 minutos (Tamisador Bertel®). As frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas, e os dados foram analisados graficamente através do histograma da distribuição granulométrica e de curvas de retenção e passagem. O diâmetro médio das partículas foi determinado a partir da intersecção das curvas de retenção e passagem. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

### 4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

#### 4.3.1 Obtenção dos extratos

Os lotes de folhas foram preparadas por extração sob decocção de 1g da matéria-prima vegetal e utilizando 10 mL de metanol como solvente, já as amostras de cascas foram preparadas sob refluxo, utilizando 1g de droga 20 mL metanol como solvente (Wagner e Bladt, 2001) .

#### 4.3.2 Padrão e revelador utilizados

O sistema de eluição foi preparado de acordo com Wagner e Bladt (2001) e sua polaridade ajustada de acordo com o fator de retenção (Rf) obtido para o padrão utilizado. O sistema de eluição utilizado foi o 90:5:5 (acetato de etila: ácido fórmico: água), o padrão de referência utilizado foi o ácido gálico 1mg/mL diluído com metanol, e as placas cromatográficas foram reveladas com o reagente cloreto férrico em metanol a 1% (p/v).

#### 4.3.3 Sistema cromatográfico (CCD)

Foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> com 0,2 mm de espessura adsorvida em suporte de alumínio (Merck®) de dimensões 20 x 10 cm. Para aplicação das amostras nas cromatoplasmas, foi utilizado um sistema semi-automático de aplicação (Linomat V, Camag®), equipado com seringa de 100 µL (CAMAG). A cuba/câmara cromatográfica (Camag®) com as dimensões 20 x 10 cm foi saturada com o solvente de eluição e uso de papel de filtro contra a parede, por pelo menos 1 hora antes de cada processo de análise.

### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS POR UV-VIS NAS FOLHAS E NAS CASCAS DE *L.ferrea*.

#### 4.4.1 Preparação da Solução estoque

A determinação dos teores de polifenóis totais dos lotes seguiu uma metodologia desenvolvida e validada previamente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia da UFPE e preconizadas pelos códigos oficiais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2014). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Ao final da coleta os lotes foram analisados, pesando-se cerca de 0,5 g da droga moída (cascas e folhas) que foi transferida para um balão de fundo redondo com capacidade para 250 mL e adicionado de 150,0 mL de água destilada. A mistura foi mantida sob refluxo em banho-maria durante 30 minutos e, em seguida, resfriada até temperatura ambiente. Todo o conteúdo foi transferido para balão volumétrico com capacidade para 250 mL e o volume completado com água destilada. A mistura foi deixada em repouso para decantar, em seguida foi filtrada através de papel de filtro desprezando-se os primeiros 50 mL. O restante do filtrado constituiu a Solução Estoque (SE - 0,002 g/mL).

#### **4.4.2 Solução amostra para Polifenóis Totais (PFT)**

Para preparação da amostra, 5,0 mL da solução estoque foram tomados e diluídos com água destilada em balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, 2,0 mL desta solução, 1,0 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com solução de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 29% (m/v). Após 25 minutos, a absorvância correspondente aos polifenóis totais (PFT) foi mensurada em 760 nm ( $A_{760}$ ) utilizando água destilada para ajuste do zero.

### **4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO POR CLAE-DAD NAS FOLHAS E CASCAS DE *L. ferrea***

#### **4.5.1 Condições cromatográficas**

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Modelo Ultimate 3000, ThermoScientific®) equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD), degaseificador e sistema de injeção automática. O sistema foi controlado pelo programa Chromeleon®, que também gerencia a aquisição e tratamento dos dados.

A separação cromatográfica foi realizada com coluna C<sub>18</sub>(250 mm x 4.6 mm; 5 µm) equipada com pré-coluna (C<sub>18</sub>, 4 mm x 3.9 µm). As separações foram realizadas com temperatura do forno da coluna a 25 °C. A fase móvel consistiu em água ultrapura(A) e metanol (B) ambos acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético, degaseificadas e filtradas através de filtro de tamanho de poro de 0,45 µm (Filterpro®) com fluxo de 0,8 mL/min.

O tempo total das análises (folha e casca) cromatográficas foi de aproximadamente 31 minutos para a folha e 32 minutos para a casca. Os programas gradientes utilizados para a análise das folhas e das cascas, seguem nas tabelas abaixo.

**Tabela 1** - Gradiente de fase móvel utilizado para a análise de ácido gálico nas folhas de *L. ferrea*.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Eluente A (%)</b>	<b>Eluente B (%)</b>	<b>Eluição</b>
0-10	87,5 → 75,0	12,5 → 25,0	gradiente linear
10-15	75,0 → 60,0	25,0 → 40,0	gradiente linear
15-25	60,0 → 25,0	40,0 → 75,0	gradiente linear
25-30	25,0 → 25,0	75,0 → 75,0	Isocrático
30-31	25,0 → 87,5	75,0 → 12,5	Gradiente linear

Fonte: Próprio Autor.

**Tabela 2** - Gradiente de fase móvel utilizado para a análise de ácido gálico nas cascas de *L. ferrea*.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Eluente A (%)</b>	<b>Eluente B (%)</b>	<b>Eluição</b>
0-10	80,0 → 77,5	20,0 → 22,5	gradiente linear
10-20	77,5 → 60,0	22,5 → 40,0	gradiente linear
20-25	60,0 → 25,0	40,0 → 75,0	gradiente linear
25-28	25,0 → 80,0	75,0 → 20,0	gradiente linear
28-32	80,0	20,0	Isocrático

Fonte: Próprio Autor.

## 4.5.2 Preparação de Soluções

### 4.5.2.1 Análise das folhas de *L. ferrea*.

#### a) Solução Estoque

Cerca de 1,0 g do material vegetal pulverizado e pesado foi transferido para balão de fundo de 250 mL com boca esmerilhada e adicionados 30 mL de água. A mistura foi levada ao refluxo por 30 minutos, a uma temperatura de 85°C no banho maria, em seguida resfriada até temperatura ambiente. Todo o conteúdo foi filtrado com auxílio de um algodão, para um balão volumétrico de 50 mL e aferido com água destilada.

#### **b) Solução amostra**

Para preparação da amostra, uma alíquota de 10 mL da solução estoque foi diluída para um balão volumétrico de 20 mL, e o volume aferido com água destilada. Ao final, as amostras foram filtradas diretamente para os vials, através de filtros de PVDF com 0,45 µm de diâmetro de poro.

#### **c) Solução Padrão**

Para a preparação da solução do padrão, uma massa exatamente pesada de ácido gálico foi dissolvida em água, para obter uma solução a 1000 µg/mL. Em seguida, procedeu-se com as diluições necessárias. Ao final, as amostras foram filtradas diretamente para os vials, através de filtros de PVDF com 0,45 µm de diâmetro de poro.

#### *4.5.2.2 Análise das cascas de L. ferrea.*

#### **a) Solução Estoque**

Ao final das coletas, os lotes de casca foram analisados, para isso, foi pesado cerca de 4 g da droga pulverizada e transferidos para um balão de fundo redondo de 250 mL com boca esmerilhada. Foram adicionados 60 mL de água destilada, a mistura foi mantida em banho-maria durante 30 minutos à temperatura de 85 °C. Ao final, a mistura foi resfriada em água corrente e transferida para balão volumétrico de 100 mL. O balão de fundo redondo foi lavado e as soluções resultantes da lavagem com todo conteúdo de droga vegetal foram transferidos para o mesmo balão volumétrico. O volume foi completado com água destilada e após decantação, o

líquido sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e desprezando-se os primeiros 20 mL do filtrado.

#### **b) Solução amostra**

Para a preparação da solução amostra, uma alíquota de 5,0 mL da solução estoque foi diluída para um balão volumétrico de 10 mL, e o volume completado com água destilada. Filtradas diretamente para os vials, através de filtros de PVDF com 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro..

#### **c) Solução do Padrão**

Para a preparação da solução do padrão, uma massa exatamente pesada de ácido gálico foi dissolvida em água, para obter uma solução a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida, procedeu-se com as diluições necessárias. Ao final, as amostras foram filtradas diretamente para os vials, através de filtros de PVDF com 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro.

### **4.5.3 Validação dos métodos por CLAE**

Para a validação dos métodos aplicados a folha e casca, foi escolhido um único lote para realizar a validação, em seguida, após a validação dos métodos, aplicou-se a metodologia para o restante dos lotes. O lote escolhido foi o referente ao mês de outubro, tanto para folha como para casca.

#### *4.5.3.1 Especificidade*

A especificidade do método cromatográfico foi demonstrada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de ultravioleta dos picos presentes na amostra e no padrão, onde foi realizada a varredura de 190 nm a 400 nm.

#### 4.5.3.2 Linearidade

A linearidade da amostra foi analisada utilizando-se cinco diferentes concentrações na faixa de 8000 a 12000 µg/mL para o método da folha, e de 16000 a 24000 µg/mL para o método casca. Já a linearidade do padrão foi analisada com a solução do padrão de ácido gálico em cinco concentrações diferentes, na faixa de 12 a 18 µg/mL para a folha, e na faixa de 5,44 a 8,16 mµ/mL para a casca.

As curvas foram construídas utilizando-se a 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 avaliados estatisticamente através do teste de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados com o auxílio do Microsoft Excel® (2010).

#### 4.5.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Foram utilizados os dados da regressão da curva analítica média do ácido gálico para efetuar os cálculos dos limites de detecção e quantificação. As equações abaixo foram utilizadas para a determinação dos limites de detecção e quantificação dos métodos analíticos, conforme preconizadas pelo ICH (2005) e BRASIL (2003).

$$LD = 3 \cdot \left( \frac{DPa}{IC} \right) \quad LQ = 10 \cdot \left( \frac{DPa}{IC} \right)$$

Onde o DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC = inclinação da curva.

#### 4.5.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetitividade (precisão intracorrída), na qual foram examinadas, em um único dia pelo mesmo analista, seis determinações individuais para amostras a 100% da concentração teste, obtidas a partir de soluções amostras diferentes; e, pela precisão intermediária (precisão intercorrída), a qual foi determinada em triplicata, por dois analistas em dois dias consecutivos, para amostras também na concentração de 100%. Os teores de ácido

gálico foram expressos em g%, considerando a perda por dessecação em todos os cálculos.

#### 4.5.3.5 *Exatidão*

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas do padrão (ácido gálico) a amostras a 100% da concentração teste. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem foram determinados através da razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente e as concentrações teóricas correspondentes. Para o método cromatográfico, nas soluções amostras a 10 mg/mL foram adicionadas alíquotas de 1 mL da solução de ácido gálico em três níveis crescentes de concentrações a 80, 100 e 120%. Foram obtidas três soluções com três réplicas cada e os resultados foram expressos utilizando a média e o DPR (%).

#### 4.5.3.6 *Robustez*

Os ensaios para a determinação da robustez foram realizados através de pequenas alterações no método. Para o método cromatográfico foram utilizadas como variáveis os seguintes parâmetros: mudança de fluxo em nível baixo (0,79 mL/min) e alto (0,81 mL/min); mudança no pH da fase móvel A em nível baixo (pH 3,0/4,0) e alto (pH 2,0/3,0).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

#### 5.1.1 Perda por dessecação – Método gravimétrico

A avaliação da perda por dessecação se destina a avaliar a quantidade de umidade residual contida na amostra (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). A presença de uma quantidade excessiva de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de fungos e bactérias, além de favorecer a ação de enzimas que pode acarretar em degradação dos constituintes químicos. O teor de umidade está diretamente ligado a eficiência de secagem e armazenamento da droga vegetal. Uma baixa umidade indica uma maior eficiência no processo de secagem e armazenamento, consequentemente um produto com maior estabilidade (AMARAL, et al., 2003; MIGLIATO et al., 2009; COUTO et al., 2009).

Os lotes de folhas apresentaram um percentual de umidade médio de 10,19%  $\pm$  0,89% e para as cascas foi obtido o teor médio de umidade de 10,84%  $\pm$  0,44%. Os resultados encontram-se nas tabelas 3 e 4. Nas folhas pode-se observar que o mês em que houve maior umidade corresponde ao mês de julho, enquanto o mês com menor teor foi o mês de outubro. Para as cascas, o mês de maior e menor umidade foram os meses de setembro e agosto respectivamente.

#### 5.1.2 Determinação de cinzas totais

A determinação de cinzas totais destina-se a avaliar as impurezas inorgânicas não voláteis, que podem estar presentes como constituintes intrínsecos (cinzas intrínsecas) e como substâncias aderentes de origem terrosa (cinzas extrínsecas), ou como contaminantes na droga vegetal (BRAGA et al., 2007; MIGLIATO et al., 2007; COUTO et al., 2009).

A farmacopeia brasileira preconiza um limite máximo de 14% para o teor de cinzas totais, no entanto, caso as amostras apresentem um teor maior de 8%, é recomendado que elas sejam submetidas a um ensaio de determinação de cinzas insolúveis em ácido para a determinação de materiais silicosos presentes na droga vegetal (BRAGA et al., 2007; SIMÕES et al., 2010). Dessa forma, o maior e menor

teor de cinzas totais encontrados para a folha, correspondem ao meses de novembro e outubro respectivamente. Já para as cascas o maior e menor teor correspondem aos meses de novembro e janeiro. Para nenhum dos lotes, tanto os de folhas quanto os de cascas, não houve necessidade de realizar o ensaio de determinação de cinzas insolúveis em ácido, estando todos os lotes com

No ensaio foram obtidos os teores de cinzas totais médio de  $4,95\% \pm 1,51\%$  nas folhas e  $5,31\% \pm 1,10\%$  nas cascas. Os resultados encontram-se nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3**–Caracterização físico-química das folhas de *L. ferrea*.

Análise	Folhas						Especificação
	SET/14	OUT/14	NOV/14	DEZ/14	JAN/15	FEV/15	
<b>Umidade (%)</b>	10,12±0,4899 (4,8%)	8,73 ± 0,5335 (6,0%)	11,11 ± 0,4373 (3,9%)	10,27 ± 0,5128 (4,9%)	10,28 ± 0,4319 (4,1%)	10,78 ± 0,4574 (4,2%)	8-14% m/m
<b>Cinzas totais (%)</b>	4,00 ± 0,3161 (4,7%)	2,60 ± 0,0269 (1,0%)	6,63 ± 0,5654 (4,83%)	6,17 ± 0,0422 (0,6%)	4,69 ± 0,0987 (1,7%)	6,39 ± 0,1373 (2,1%)	<14% m/m
	MAR/15	ABR/15	MAI/15	JUN/15	JUL/15	AGO/15	
<b>Umidade (%)</b>	9,33 ± 0,0231 (0,2%)	9,56 ± 0,0986 (1,0%)	10,88 ± 0,1136 (1,0%)	10,20 ± 0,1251 (1,2%)	12,19 ± 0,1147 (0,9%)	8,92 ± 0,3066 (3,4%)	8-14% m/m
<b>Cinzas totais (%)</b>	6,43 ± 0,2560 (3,9%)	4,29 ± 0,1450 (3,3%)	7,01 ± 1,68 (5,3%)	3,25 ± 0,1387 (4,2%)	4,85 ± 0,1241 (2,5%)	3,25 ± 0,1387 (4,2)	<14% m/m

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

Fonte: Próprio Autor.

**Tabela 4**–Caracterização físico-química das cascas de *L. ferrea*.

Análise	Cascas						Especificação
	SET/14	OUT/14	NOV/14	DEZ/14	JAN/15	FEV/15	
<b>Umidade (%)</b>	11,50 ± 0,5293 (4,6%)	11,13 ± 0,3835 (3,4%)	10,75 ± 0,3635 (3,3%)	10,36 ± 0,1344 (1,2%)	10,33 ± 0,5916 (5,7%)	10,35 ± 0,0879 (0,8%)	8-14% m/m
<b>Cinzas totais (%)</b>	4,91 ± 0,0317 (0,6%)	4,83 ± 0,1026 (2,1%)	7,37 ± 1,0369 (5,4%)	5,54 ± 0,1188 (2,4%)	3,90 ± 0,1626 (4,1%)	6,24 ± 0,1545 (3,7%)	<14% m/m
	MAR/15	ABR/15	MAI/15	JUN/15	JUL/15	AGO/15	
<b>Umidade (%)</b>	11,25 ± 0,5911 (5,2%)	11,33 ± 0,1865 (1,6%)	10,96 ± 0,4470 (4,0%)	11,13 ± 0,2143 (1,9%)	10,82 ± 0,3572 (3,2%)	10,17 ± 0,5065 (4,9%)	8-14% m/m
<b>Cinzas totais (%)</b>	5,11 ± 0,0342 (0,6%)	6,01 ± 0,1049 (1,7%)	4,76 ± 0,0315 (0,6%)	3,25 ± 0,1387 (4,2%)	5,67 ± 0,0706 (1,2%)	6,15 ± 0,2302 (3,7%)	<14% m/m

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

Fonte: Próprio Autor.

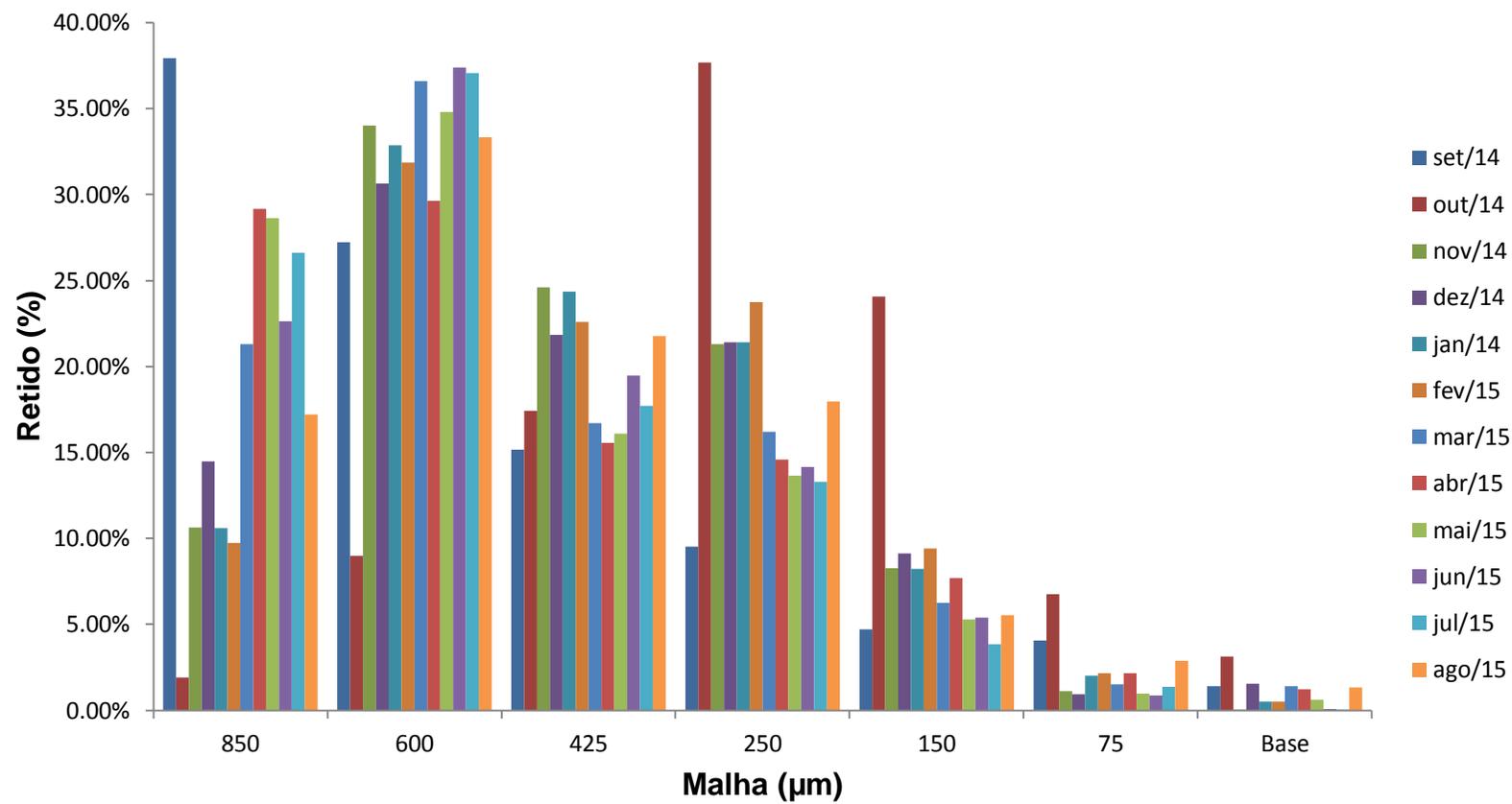
### 5.1.3 Análise granulométrica por tamisação

O ensaio de granulometria consiste na determinação das dimensões das partículas que constituem as amostras e no tratamento estatístico dessa informação. É de extrema importância, pois destina-se a padronização do tamanho do pó da droga vegetal, parâmetro que está diretamente relacionado a homogeneidade e reprodutibilidade dos processos extrativos (MARQUES et al., 2012).

O grau de divisão de um material vegetal age diretamente na eficiência dos métodos extrativos, uma vez que, diminuindo o tamanho das partículas há um aumento na superfície de contato com o solvente, aumentando a velocidade de difusão do solvente. Porém, partículas muito pequenas tendem a formar uma camada de pó compacta, o que dificulta a penetração do solvente e influencia diretamente nos rendimentos da extração. Contrariamente, em partículas muito grandes há a diminuição da superfície de contato, diminuindo a difusão do solvente e dificultando o processo de extração (VASCONCELOS et al., 2005; FONSÊCA et al., 2005; CAMPOS et al., 2012).

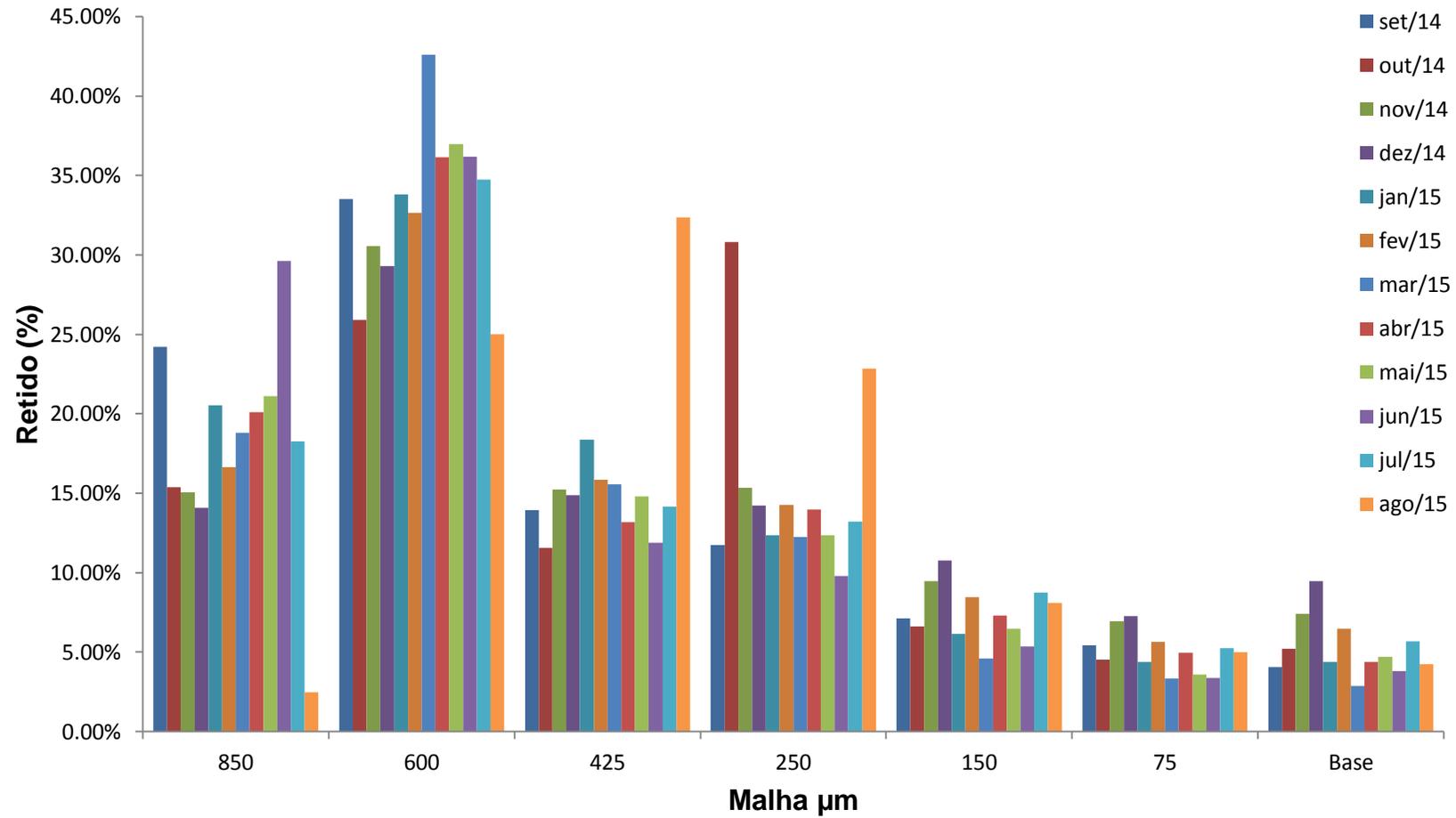
As análises granulométricas dos diferentes lotes de folhas e cascas de *L. ferrea* foram realizadas empregando o mesmo moinho para pulverização das drogas, as mesmas aberturas de malhas e tempo, a fim de diminuir a variabilidade externa. Os resultados observados nas figuras de 1 a 4 mostram que nos diferentes lotes foi possível estabelecer um diâmetro médio de  $652,5 \mu\text{m} \pm 51,05 \mu\text{m}$  para as amostras das folhas e  $481,25 \mu\text{m} \pm 52,66 \mu\text{m}$  para as amostras das cascas do caule, sendo todas as amostras consideradas como pós grossos segundo classificação da Farmacopeia Brasileira 5 Ed. (FB5, 2010), uma vez que as partículas obtidas não passaram em sua totalidade pela malha de  $850 \mu\text{m}$  em nenhum lote.

**Figura 1**-Distribuições granulométricas referentes aos lotes das folhas de *L. ferrea*.



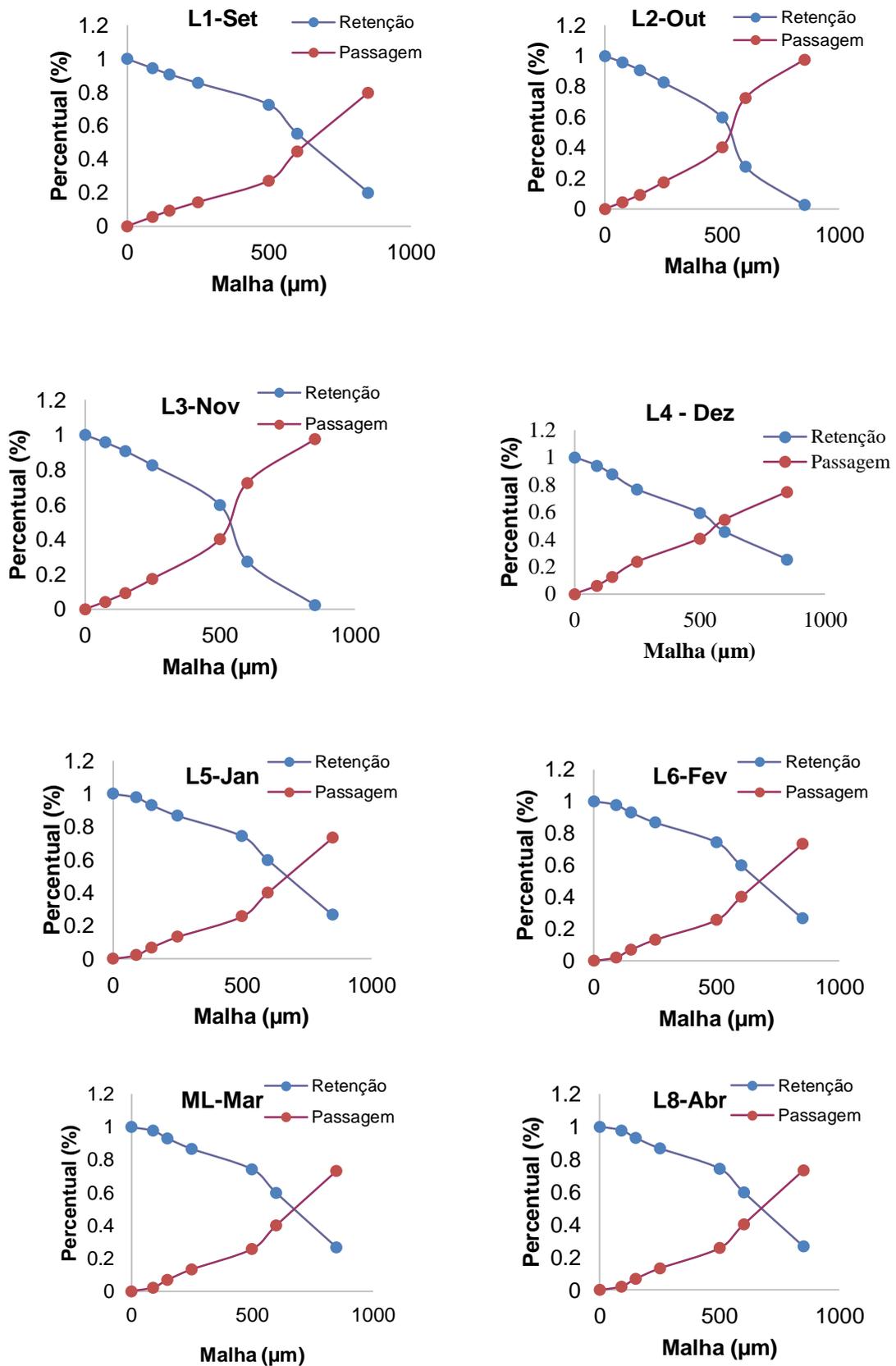
Fonte: Próprio Autor.

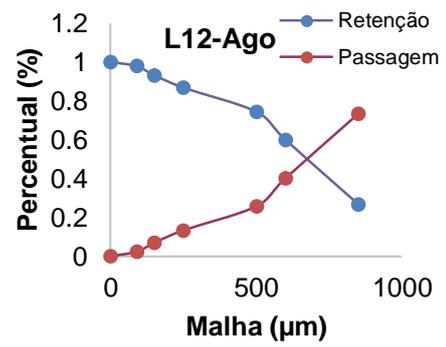
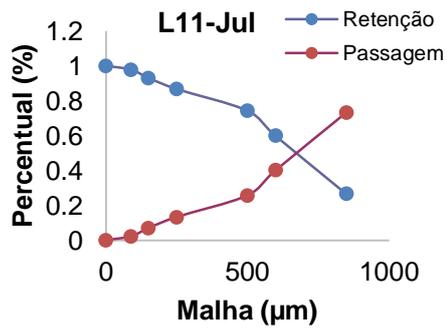
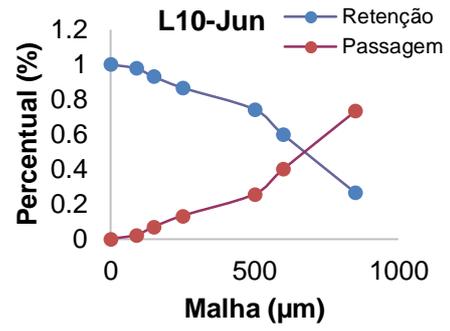
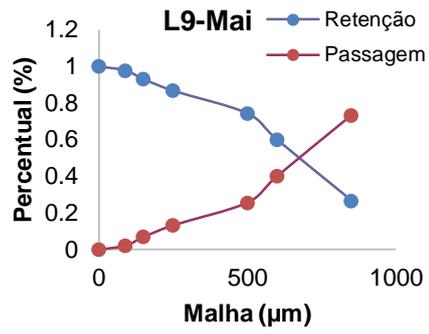
**Figura 2** - Distribuições granulométricas referentes às amostras das cascas de *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

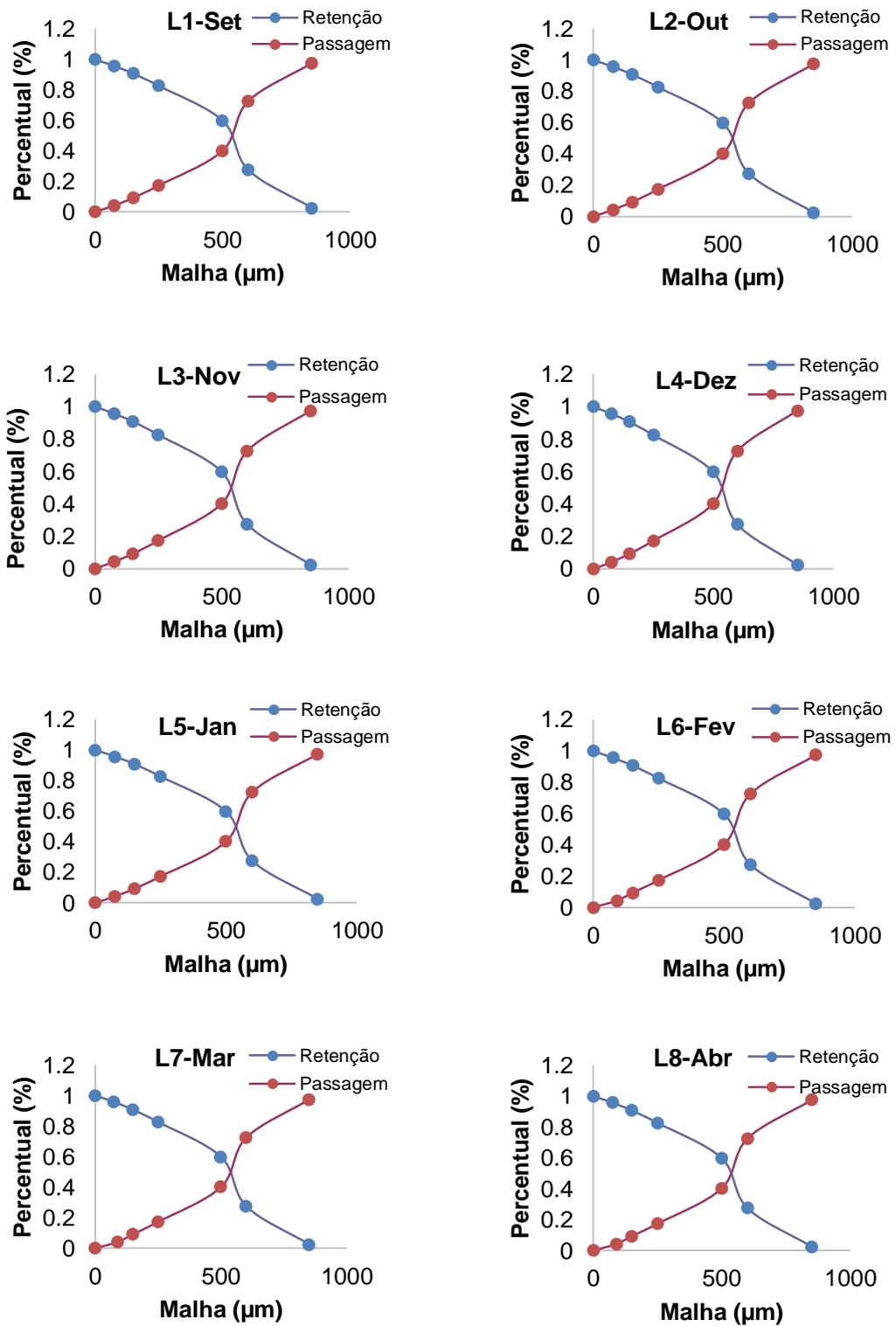
Figura 3 - Curvas de retenção e passagem referentes às amostras das folhas de *L. ferrea*.

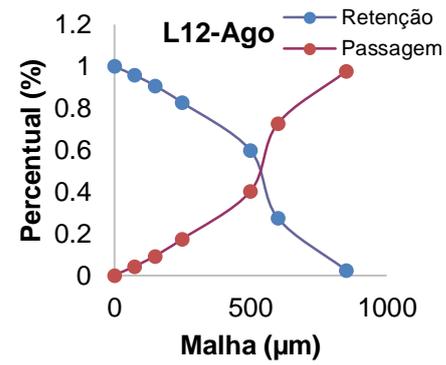
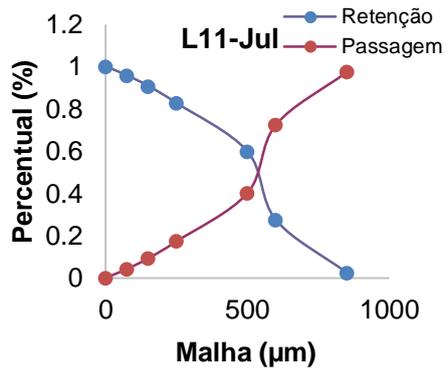
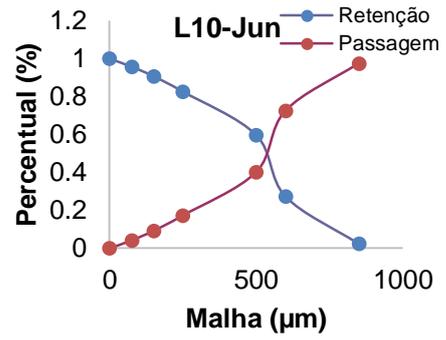
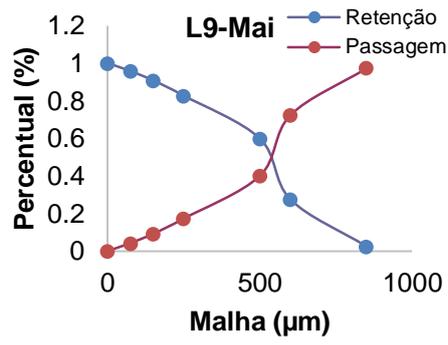




Fonte: Próprio Autor.

Figura 4 - Curvas de retenção e passagem referentes Aos lotes das cascas de *L. ferrea*.





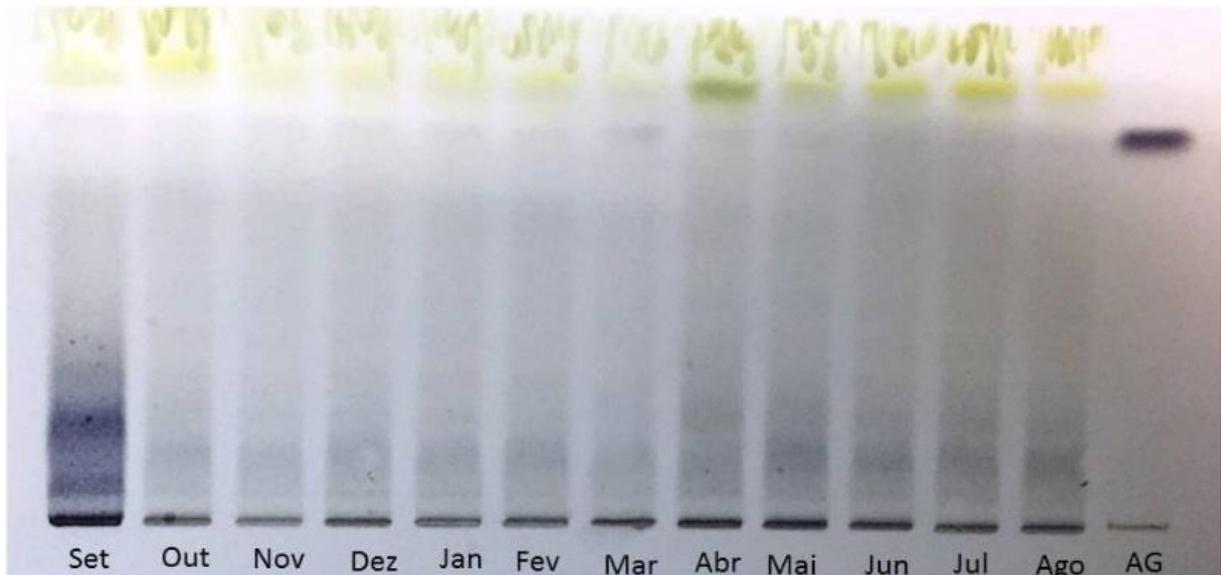
Fonte: Próprio Autor.

## 5.2 INVESTIGAÇÃO DE TANINOS HIDROLISÁVEIS NAS AMOSTRAS

No que diz respeito às folhas e cascas de *L. ferrea*, a literatura descreve a presença de taninos hidrolisáveis, flavonoides e glicosídeos cardiotônicos (GONZALEZ, 2004). Embora estejam descritos todos esses metabólitos para a espécie, o estudo realizado se concentrou em observar a variabilidade dos taninos hidrolisáveis ao longo do ano. As figuras 5 e 6 mostram os cromatogramas obtidos por CCD a partir dos extratos metanólicos das folhas e das cascas, respectivamente.

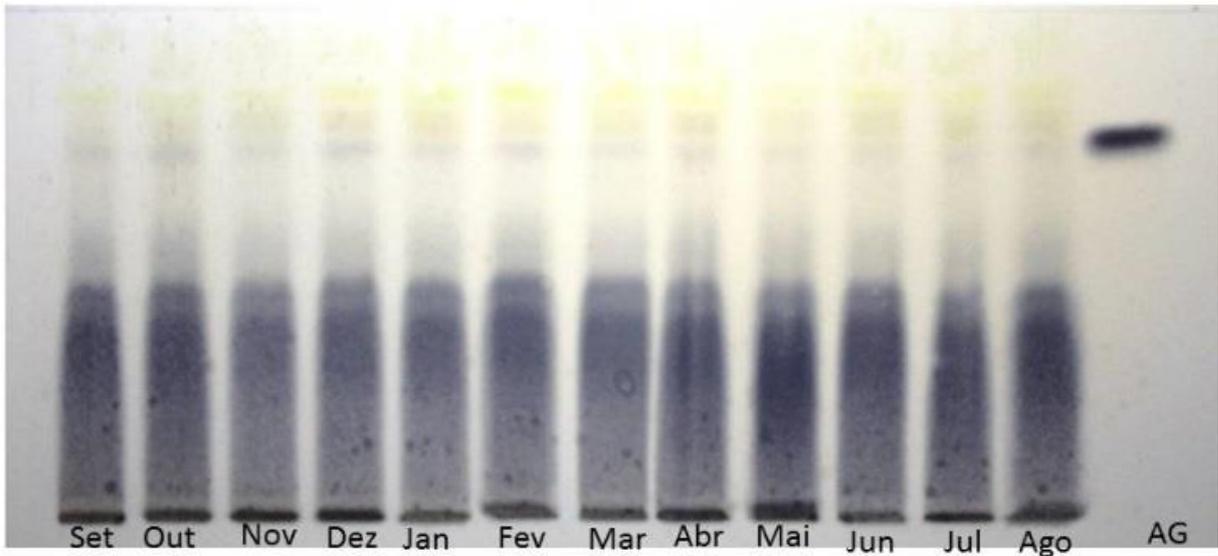
Nas cromatoplasas podem ser observadas para todas as amostras, bandas de mesma coloração e deslocamento, correspondentes a banda da solução padrão de ácido gálico (Rf 0,75).

**Figura 5**—Cromatograma obtido por CCD para avaliação de presença de taninos hidrolisáveis nas folhas de *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

**Figura 6**—Cromatograma obtido por CCD para avaliação de presença de taninos hidrolisáveis nas cascas de *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

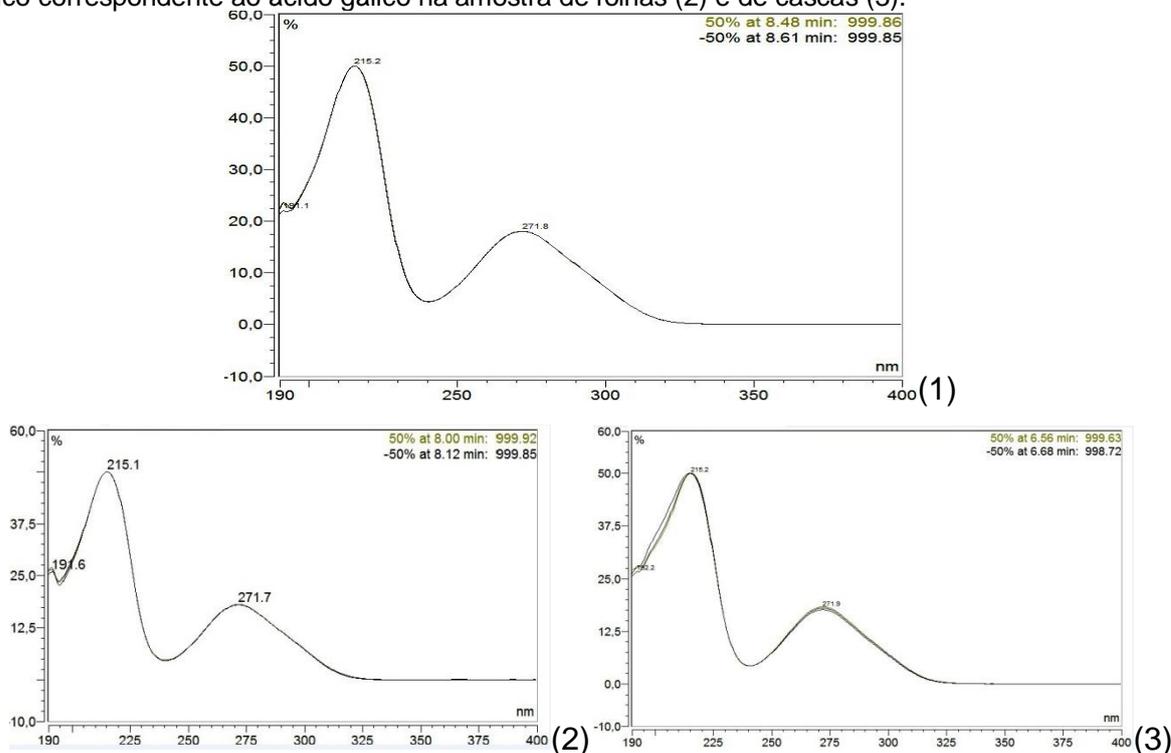
Considerado os dados da cromatoplaça preparada com as amostras das folhas de *L. ferrea*, a intensidade das bandas sugere que maior concentração de ácido gálico ocorre nos meses referentes a primavera (meio de setembro até o meio de dezembro), diminuindo de intensidade nos meses referentes ao outono (final de março até o meio de junho). Já para as amostras de cascas a intensidade das bandas apresentou variabilidade durante todo o período de análise. Entretanto, durante os meses de julho (inverno) e dezembro (primavera-verão) foi observada maior intensidade nas bandas.

## 5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR CLAE

### 5.3.1 Especificidade

A especificidade dos métodos foi avaliada através da comparação do espectro de varredura e do tempo de retenção das amostras de *L. ferrea* (folha e casca) e do padrão de ácido gálico. A figura 7 representa o espectro de varredura do ácido gálico (1), e dos picos correspondente ao padrão nas amostras de folhas (2), e das cascas (3). O máximo de absorvância ocorre em 270nm, para ambas as amostras.

**Figura 7** - Espectro de varredura do pico do padrão de ácido gálico (1) e espectro de varredura do pico correspondente ao ácido gálico na amostra de folhas (2) e de cascas (3).

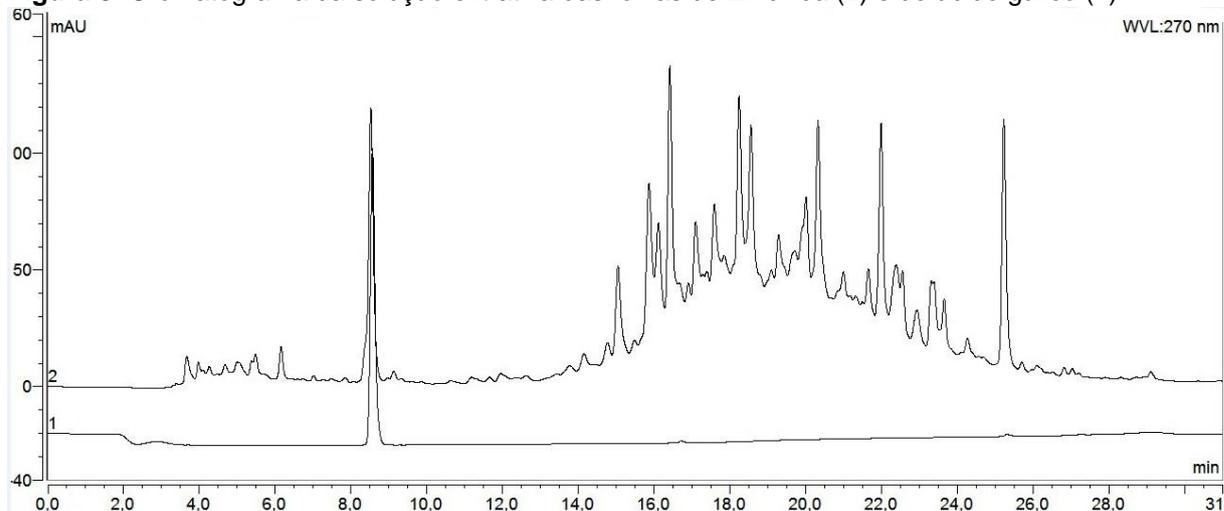


Fonte: Próprio Autor.

As figuras 8 e 9 mostram a sobreposição dos cromatogramas obtidos para o ácido gálico e as amostras das soluções extrativas obtidas das folhas e cascas respectivamente, evidenciando a similaridade dos respectivos tempos de retenção. Nas condições estabelecidas, o tempo de retenção médio para ácido gálico nas folhas foi de 8,76 minutos, sendo 31 minutos o tempo total de análise. Já na casca, o

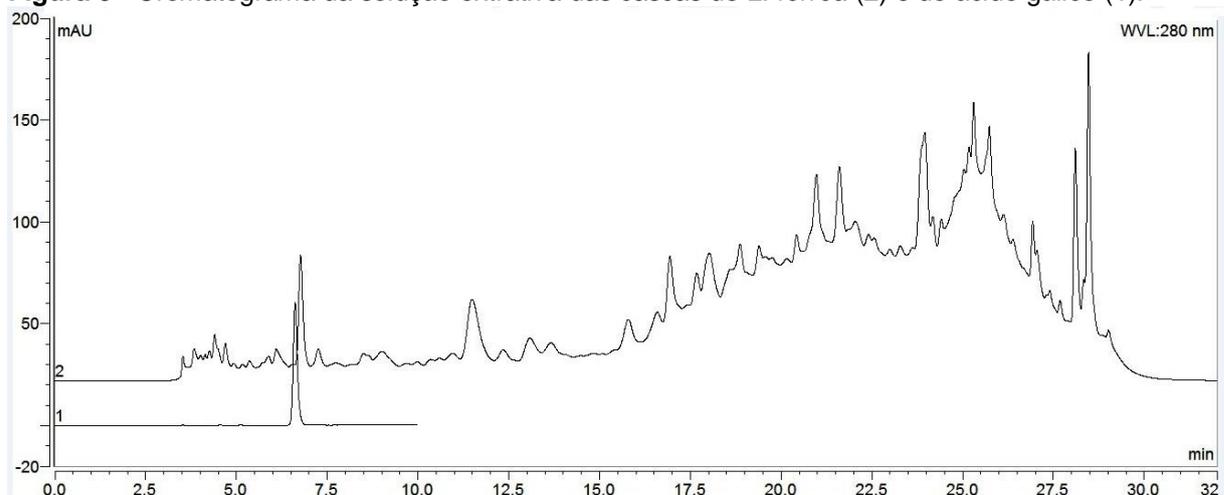
tempo de retenção médio para o ácido gálico foi de 6,5, e 32 minutos, o tempo total de análise.

**Figura 8** -Cromatograma da solução extrativa das folhas de *L. ferrea* (2) e do ácido gálico (1).



Fonte: Próprio Autor.

**Figura 9** - Cromatograma da solução extrativa das cascas de *L. ferrea* (2) e do ácido gálico (1).

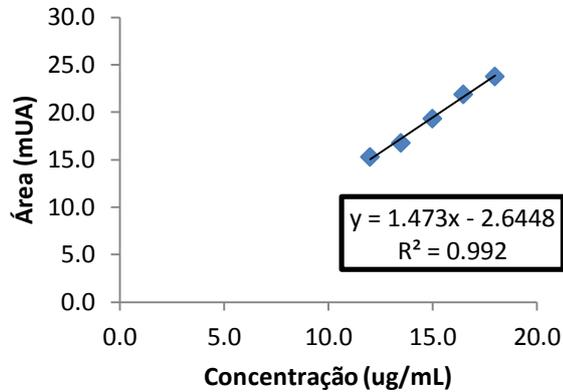


Fonte: Próprio Autor.

### 5.3.2 Linearidade

A curva de calibração do ácido gálico para o método aplicado às folhas foi construída a partir de três curvas independentes na faixa de concentração de 12 a 18  $\mu\text{g/mL}$ . A figura 10 mostra a curva de calibração média obtida para o ácido gálico referente ao método folha, com equação da reta obtida pela regressão linear igual a  $y = 1,473x - 2,6448$  e o coeficiente de determinação  $R^2 = 0,992$ . Já para o método aplicado às cascas, foram utilizadas concentrações na faixa de 5,44 a 8, 16  $\mu\text{g/mL}$ .

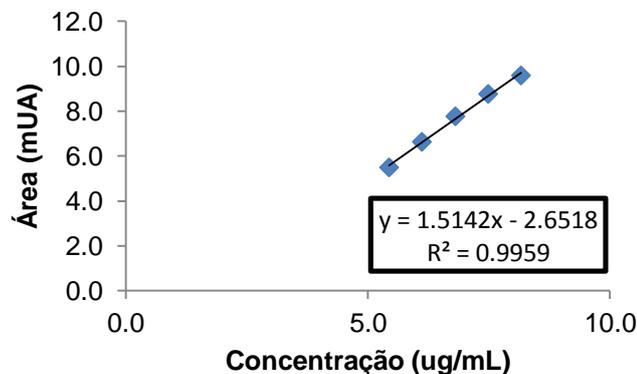
**Figura 10** - Curva de calibração média para a solução padrão de ácido gálico obtida para o método aplicado às folhas.



Fonte: Próprio Autor

A figura 11 mostra a curva de calibração obtida para o ácido gálico referente ao método casca, com equação da reta igual a  $y = 1,5142x - 2,6518$  e o coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9959$ .

**Figura 11** - Curva de calibração média para a solução padrão de ácido gálico obtida para o método aplicado às cascas.



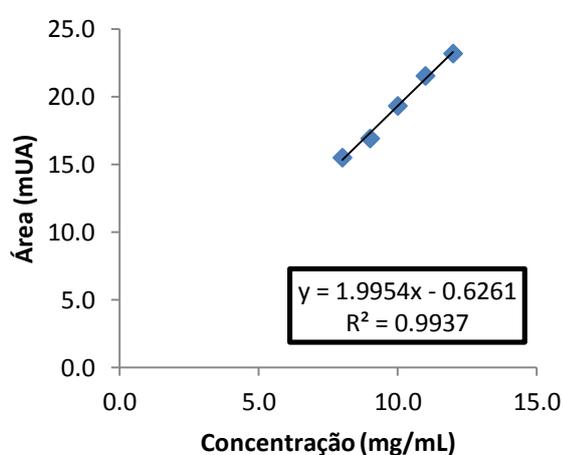
Fonte: Próprio Autor.

Após a avaliação do padrão, os métodos analíticos foram testados para a droga vegetal de *L. ferrea*. Assim, três curvas analíticas na faixa de concentração de 8000 a 12000  $\mu\text{g/mL}$  foram elaboradas para a amostra de folha, e três curvas na faixa de 16000 a 24000  $\mu\text{g/mL}$ , foram elaboradas para a amostra de casca. As curvas médias das amostras para o ácido gálico (Figura 12 e 13) apresentaram coeficientes de determinação e equações da reta igual a 0,9937 e  $y = 0,002x -$

0,6261e 0,9952 e  $y = 0,0003x + 0,7742$ , para o método das folhas e cascas, respectivamente.

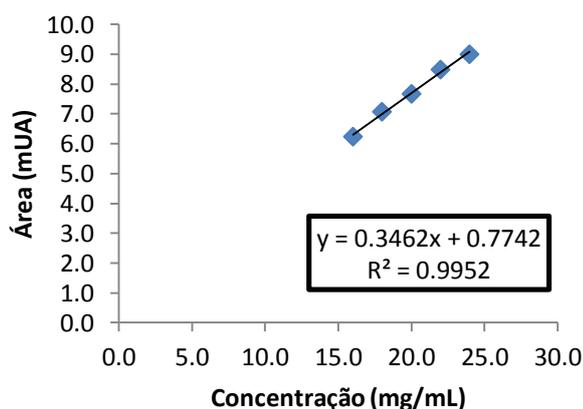
Os resultados obtidos comprovam, desta forma, a relação satisfatória entre as concentrações do analito e as respectivas áreas dos picos, atendendo aos requisitos preconizados pela legislação (BRASIL, 2003) em vigor para análise desse parâmetro ( $R^2 > 99\%$ ).

**Figura 12** - Curva de linearidade média para a solução da amostra das folhas de *L.ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

**Figura 13** - Curva de linearidade média para a solução da amostra das cascas de *L.ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

### 5.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

De acordo com os dados apresentados na tabela 5, os limites de detecção e quantificação para as amostras de folhas e casca indicam que os métodos analíticos para a quantificação de ácido gálico nas folhas e nas cascas de *L. ferrea* exibem boa sensibilidade, sem interferência da técnica instrumental, uma vez que, esses parâmetros mostram a concentração mínima em que o equipamento pode realizar análises com confiança, em valores abaixo dos limites de detecção e quantificação, o equipamento utilizado não mostra sinal confiável para qualquer determinação (BRASIL, 2003).

**Tabela 5** - Resultados dos limites de detecção e quantificação calculados para o ácido gálico nas folhas e cascas de *L. ferrea*.

Parâmetros		Equações	Ácido Gálico (µg/mL)
LD	Folhas	Dpa x 3/IC	0,09
	Cascas		0,10
LQ	Folhas	Dpa x 10/IC	0,31
	Cascas		0,33

Onde o DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e IC = inclinação da curva.  
Fonte: Próprio Autor.

### 5.3.4 Precisão

Repetibilidade (intracorrída)

A tabela 6 apresenta os resultados dos teores de ácido gálico obtidos no ensaio de repetibilidade para o método de quantificação aplicado às folhas e às cascas de *L.ferrea* por CLAE. Esse ensaio foi realizado em sextuplicata no mesmo dia e pelo mesmo operador. O teor médio de ácido gálico encontrado na amostra de folha foi de 0,1646 g%, já para a amostra de casca foi de 0,0366 g% . Os baixos desvios padrões relativos (DPR%) obtidos de 0,77 e 1,38 para folha e casca respectivamente, demonstrou que o método apresenta precisão adequada.

**Tabela 6** - Resultados do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de ácido gálico nas folhas e cascas de *L. ferrea* por CLAE.

AMOSTRAS	ÁCIDO GÁLICO (g%)	
	Folhas	Cascas
1	0,1664	0,0362
2	0,1656	0,0363
3	0,1645	0,0366
4	0,1645	0,0367
5	0,1659	0,0368
6	0,1627	0,0368
<b>MÉDIA ± DP (DPR%)</b>	<b>0,1646 ± 0,0013 (0,77%)</b>	<b>0,0366 ± 0,0003 (1,38%)</b>

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

Fonte: Próprio Autor

#### Precisão intermediária (inter - corrida)

A tabela 7 apresenta os teores do ácido gálico para o teste da precisão intermediária para os métodos de quantificação de ácido gálico nas folhas e cascas de *L.ferrea* por CLAE, realizado por analistas diferentes em um mesmo dia e em dias diferentes. Os baixos desvios padrões relativos gerais (DPR%) demonstram que os métodos apresentaram precisão apropriada visto que os valores encontram-se abaixo do limite estabelecido pela legislação vigente (5%) (BRASIL, 2003).

**Tabela 7** - Resultados do ensaio de precisão intermediária de ácido gálico.

TEOR (g%) ± DP (DPR%)				
Operador	Padrão	Dia 1	Dia 2	Interdia
1	Ácido gálico	0,1637±0,0009	0,1597±0,0002	0,1617±0,0023
	folha	(0,54%)	(0,11%)	(1,39%)
2	Ácido gálico	0,1637±0,0047	0,1694±0,0012	0,1619±0,0035
	folha	(2,80%)	(0,69%)	(2,07%)
1	Ácido gálico	0,0376±0,0003	0,0370±0,0004	0,0362±0,0011
	casca	(1,58 %)	(2,03%)	(3,3 %)
2	Ácido gálico	0,0355±0,0012	0,0342±0,0003	0,0353±0,0016
	casca	(6,91%)	(1,79%)	(4,3 %)

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

Fonte: Próprio Autor.

### 5.3.5 Exatidão

A tabela 8 mostra os resultados dos ensaios de exatidão das amostras de folha e casca após a fortificação de soluções amostras de concentração fixa (10 mg/mL para a folha e 20 mg/mL para a casca), com soluções padrão de concentrações conhecidas em 3 níveis crescentes de concentrações (80, 100 e 120%). Os valores de teor esperados foram calculados e comparados com os dados experimentais. Assim, a recuperação para o ácido gálico na amostra de folha encontra-se em torno de 99,6%, enquanto que o da amostra de casca encontra-se em torno de 98,24%, esses resultados demonstram que a exatidão dos métodos desenvolvidos foi alcançada. Deste modo, o procedimento pode ser considerado exato conforme limites especificados pelos compêndios oficiais de recuperação (entre 80 a 120%).

**Tabela 8** - Resultados obtidos no teste de recuperação para o pico de ácido gálico na solução amostra de folhas e cascas de *L.ferrea*.

Padrão		80%	100%	120%	Médias
Folha	Ácido gálico	99,57±0,3165 (0,32)	98,658±0,5943 (0,60)	100,743±1,4691 (1,46)	99,657±1,1268 (1,13)
Casca	Ácido gálico	102,92±2,9889 (2,90)	100,499±5,5032 (5,48)	91,314± 0,2017 (0,22)	98,246±2,6519 (2,70)

### 5.3.6 Robustez

A tabela 9 apresenta os resultados obtidos para avaliação da influência de pequenas variações introduzidas nos métodos sobre o teor de ácido gálico. A Resolução Específica (RE) nº 899/03 da ANVISA, estabelece alguns fatores que devem ser considerados para a determinação da robustez, entre eles fluxo e pH das fases moveis. Nos métodos propostos, foram analisados o fluxo da fase móvel e pH das fases A e B (aquosa e orgânica). Os dados obtidos demonstram que na avaliação do fluxo, os métodos aplicados para folhas e casca foram robustos, não havendo influência nos tempos de retenção. Já para o pH das fases moveis, observou-se que para as cascas o método foi robusto, enquanto que para as folhas, foi considerado um fator crítico, sendo necessário a realização de manutenção nesse parâmetro, ao contrário do fluxo, as modificações realizadas para o pH das fases moveis influenciaram os tempos de retenção das amostras. A robustez dos métodos pode ser vista em virtude do baixo desvio padrão relativo obtido para as análises, que encontram-se abaixo do limite estabelecido pela legislação vigente (5%) (BRASIL, 2003).

**Tabela 9** - Ensaio de robustez nas folhas e cascas de *L. ferrea* por CLAE.

<b>Parâmetro</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Variáveis</b>	<b>ÁCIDO GÁLICO (g%) Média ± DP (DPR%)</b>
FLUXO DA FASE MÓVEL (mL/min)	Folha	0,790	0,157 ± 0,0001 (0,09%)
		0,810	0,155 ± 0,0028 (1,81%)
	Casca	0,790	0,038 ± 0,0006 (1,51%)
		0,810	0,037 ± 0,0000 (0,07%)
pH DA FASE MÓVEL A e B	Folha	3,0/4,0	0,180 ± 0,0033 (1,83%)
		2,0/3,0	0,231 ± 0,0009 (0,40%)
	Casca	3,0/4,0	0,038 ± 0,0016 (4,12%)
		2,0/3,0	0,037 ± 0,0080 (2,12%)

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

Fonte: Próprio Autor.

## 5.4 INFLUÊNCIA SAZONAL NO MARCADOR QUÍMICO

### 5.4.1 Polifenóis por UV/VIS

Segundo Castro (2005), os metabólitos secundários representam uma interface entre as plantas e o ambiente circundante, logo, fatores como regime de chuvas, temperatura e umidade influenciam diretamente na composição dos metabólitos secundários .

Devido a sua localização quase por completo no hemisfério Sul, as estações do ano no Brasil podem ser estabelecidas em: Primavera a iniciar-se em setembro, o verão em dezembro, o outono em março e o inverno em junho. No entanto, de fato só é possível observar as quatro estações na região Sul, e em estados como São Paulo e Mato Grosso, e em regiões serranas como Minas Gerais. Na Amazônia praticamente não há estações do ano devido as baixas variações de temperatura e pluviosidade. E nas demais regiões incluindo o nordeste, há basicamente a estação chuvosa e a estação da seca. Em Pernambuco, principalmente no Litoral a estação chuvosa tem início em março (outono) e termina em agosto (inverno) (APAC, 2015; CLIMAMBUCO, 2015; SIMEPAR, 2015).

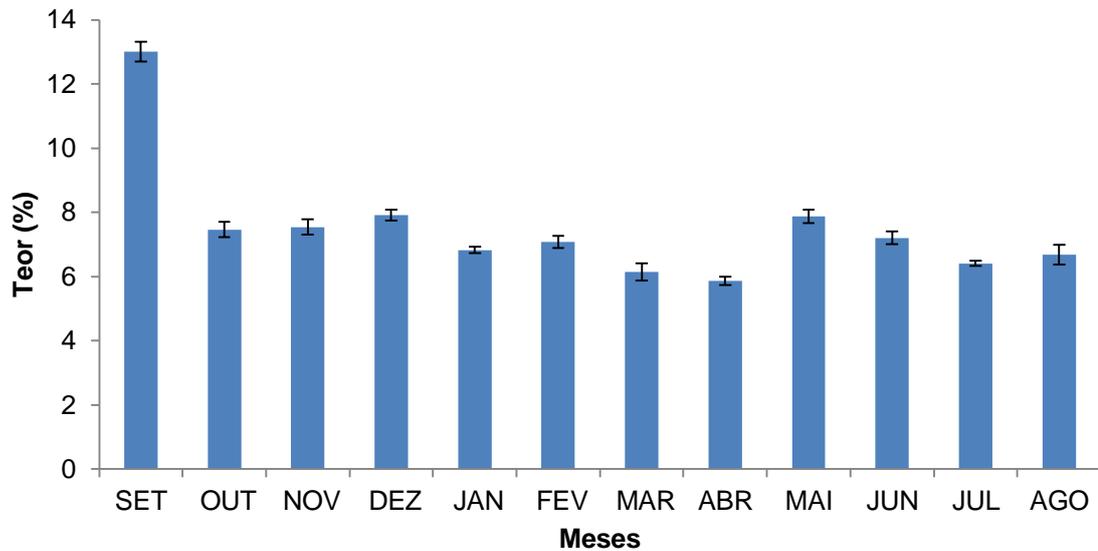
A tabela 10 apresenta os dados climáticos para o período do estudo, que foram registrados através do instituto nacional de meteorologia. Os dados confirmam a tendência de estiagem para os meses de setembro a fevereiro, onde a precipitação total somou 644 mm, enquanto que nos meses de março a agosto somou um volume de 1617.7 mm, concentrando a maior parte das chuvas, e registrando a menor concentração nos teores de polifenóis totais para folhas e cascas. Nas figuras 14 e 15 pode-se observar melhor a distribuição dos compostos fenólicos nas folhas e cascas de *L. ferrea* mostrando a presença dos compostos ao longo de todo o ano. É possível notar que há uma tendência na diminuição dos teores de polifenóis nos meses com alta precipitação. O contrário é observado para os meses de baixa precipitação, que tendem a apresentar maiores concentrações da classe de metabólitos. Quando se correlaciona a temperatura e a umidade relativa, não observou-se nenhuma relação entre os mesmos, sugerindo que a temperatura e a umidade relativa não apresenta grande influência sobre os teores de polifenóis totais.

**Tabela 10-** Análise das condições climáticas e evolução sazonal da quantificação de polifenóis totais nas folhas e cascas de *L. ferrea* por Espectroscopia no UV-Visível.

<b>Mês</b>	<b>Folhas TPT (%) ±DP</b>	<b>Casca TPT (%) ± DP</b>	<b>Precipitação Total (mm)</b>	<b>Temperatura (C°)</b>	<b>Umidade Relativa (%)</b>
Set/2014	13,01 ± 0,31	15,68 ± 0,49	248,9 mm	28,47	80
Out/2014	7,46 ± 0,24	16,08 ± 0,55	146,5 mm	29,13	78
Nov/2014	7,54 ± 0,23	13,96 ± 0,31	56 mm	30,5	73,3
Dez/2014	7,91 ± 0,16	14,77 ± 0,29	71,3 mm	30,7	73,2
Jan/2015	6,82 ± 0,10	14,41 ± 0,39	65,4 mm	30,87	71,3
Fev/2015	7,07 ± 0,18	14,56 ± 0,45	56,2 mm	31,6	70,8
Mar/2015	6,14 ± 0,26	12,55 ± 0,22	341,2 mm	30,57	76,8
Abr/2015	5,86 ± 0,13	13,14 ± 0,48	74,6 mm	31,63	73,5
Mai/2015	7,87 ± 0,21	14,76 ± 0,50	178,9 mm	30,76	77,5
Jun/2015	7,20 ± 0,20	12,28 ± 0,39	460,5 mm	29	82,8
Jul/2015	6,41 ± 0,07	12,22 ± 0,38	446,3 mm	28	85,8
Ago/2015	6,68 ± 0,30	12,94 ± 0,30	116,28 mm	28,46	79,6

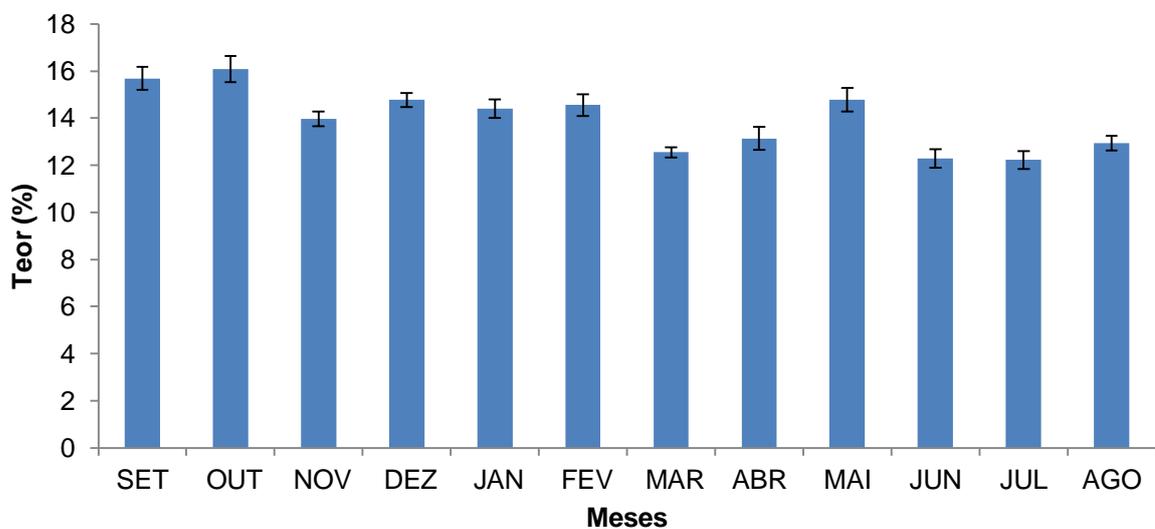
TPT – Polifenóis totais ; DP – Desvio Padrão

**Figura 14** – Estudo de sazonalidade para o teor polifenóis totais (UV/VIS) expressos em ácido gálico em amostras de folha de *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

**Figura 15** - Estudo de sazonalidade para o teor polifenóis totais (UV/VIS) expressos em ácido gálico em amostras de casca de *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

Segundo Harbone (2000) a tendência dos polifenóis em se distribuir em maior concentração no período seco, é coerente com o papel fotoprotetor dos fenóis. Chaves (2012), Ma e colaboradores (2003) e Brooks (2004), atribuem a distribuição desses metabólitos, a grande variedade de características climáticas a que as plantas estão sujeitas, principalmente, características referentes a precipitação de água. Dentro desse contexto de diferenças climáticas, estudos de Santos (2009) e Chavarria (2011) mostraram que quando sob estresse hídrico ou restrição hídrica, os

níveis de polifenóis tendem a aumentar. Esses estudos corroboram com os resultados obtidos, uma vez que, a maior concentração de polifenóis totais de *L. ferrea*, foi observada na estação seca.

Estudos de Yariwake e colaboradores (2005), observaram que a maior concentração dos polifenóis nas folhas de *Maytenus aquifolium*, foram nas estações da primavera e outono, enquanto que a menor foi no inverno e verão. Esses resultados foram atribuídos as características específicas das estações, pois na primavera e verão os dias e noites não apresentam diferença nítida entre a duração dos dias e das noites, enquanto no inverno, os dias são curtos e as noites longas, e no verão acontece justamente o oposto.

Em relação aos teores obtidos ao longo do ano, foram realizados testes estatísticos por ANOVA de uma entrada (Tabelas 11 e 12) confirmando a hipótese de diferença significativa entre os teores obtidos para as diferentes quantidades avaliadas, pois os valores de  $F_{calculado}$  (Folha: 222,80; Casca: 30,38) para os teores médios de TPT obtidos foram maiores do que os  $F_{tabelado}$  (2,21).

**Tabela 11** - ANOVA de Uma entrada para a avaliação da variabilidade sazonal sobre o teor de polifenóis totais nas folhas de *L. ferrea* para os diferentes meses do ano.

<b>Fonte da variação</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>
<b>Entre grupos</b>	113,2281	11	10,2934	222,80
<b>Dentro dos grupos</b>	1,10878	24	0,0461	
<b>Total</b>	114,3369	35		

Fonte: Próprio Autor.

**Tabela 12** - ANOVA de Uma entrada para a avaliação da variabilidade sazonal sobre o teor de polifenóis totais nas cascas de *L. ferrea*.

<b>Fonte da variação</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>
<b>Entre grupos</b>	56,6608	11	5,1509	30,3826
<b>Dentro dos grupos</b>	4,0688	24	0,16953	
<b>Total</b>	60,7297	35		

Fonte: Próprio Autor.

#### 5.4.2 Quantificação do ácido gálico por CLAE

A tabela 13 mostra a relação entre os dados climáticos obtidos para a época do estudo, e as concentrações de ácido gálico obtidos para as folhas e cascas de *L.*

*ferrea*. É possível observar que o doseamento de ácido gálico por CLAE acompanhou os resultados espectrofotométricos revelando que nas folhas as maiores concentrações do marcador ocorrem nos meses com baixa precipitação, que são referentes a primavera e o verão, já as menores concentrações do marcador ocorrem em meses com alta precipitação, que são referentes ao outono e inverno. Enquanto que para as cascas o marcador é mais evidente nos meses com alta precipitação (outono e inverno), e o teor mais baixo é observado quando há baixas precipitações (primavera e verão). A figura 16 mostra os dados cromatográficos obtidos para as folhas de *L. ferrea*, no período de setembro de 2014 a agosto de 2015. Através da sobreposição dos cromatogramas, é possível observar perfis cromatográficos e tempos de retenções semelhantes, assim como a presença de ácido gálico em todos os meses do ano.

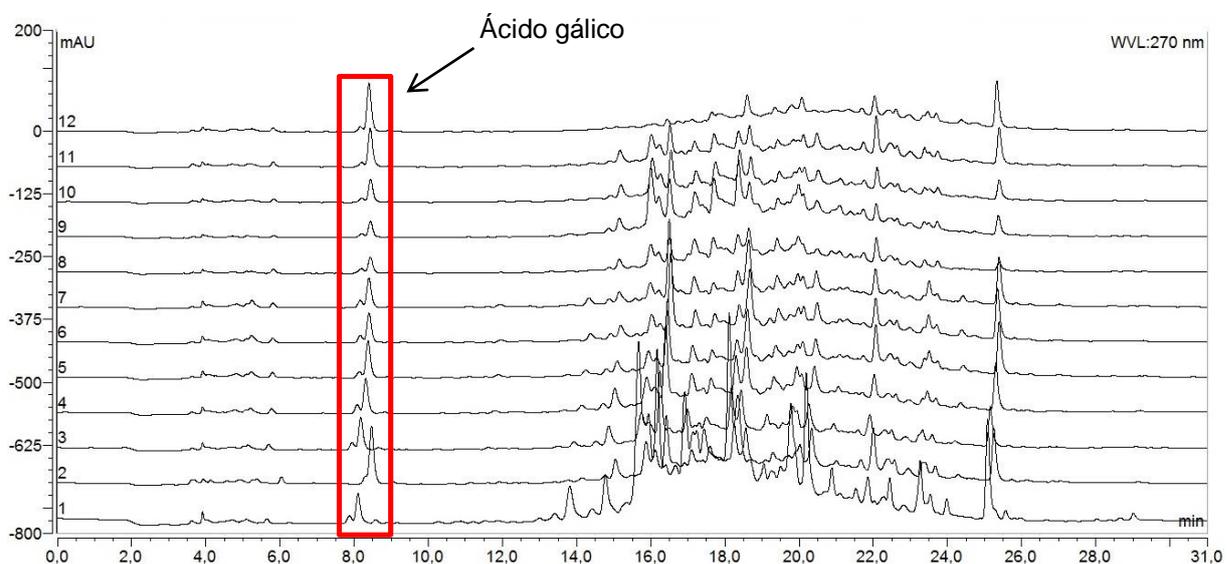
Embora exista uma tendência para as folhas de ácido gálico apresentar maior concentração em meses com baixa precipitação, a figura 16 mostra que em alguns meses que apresentam alta precipitação, há também grandes concentrações de ácido gálico, como é o caso dos cromatogramas 11 e 12 (figura 16), referentes aos meses de julho e agosto respectivamente. Esses dados mostram que há grandes concentrações tanto no período seco quanto no chuvoso.

Segundo Santos e colaboradores (2006), as flutuações observadas com máximos tanto em períodos de estiagem quanto em períodos chuvosos, pode ser atribuído a outros fatores que não sejam os climáticos, notando que condições como período de floração, de frutificação e ataque de herbívoros e patógenos também podem influenciar na produção de metabólitos secundários.

**Tabela 13** - Análise das condições climáticas e evolução sazonal da quantificação de ácido gálico (TAG) nas folhas e cascas de *L. ferrea* por HPLC.

Mês	Folha	Casca	Precipitação	Temperatura	Umidade
	TAG ± DP (%)	TAG± DP (%)	Total (mm)	(C°)	Relativa (%)
Set/2014	0,097 ± 0,0024	0,6465 ± 0,0096	248,9 mm	28,4	80
Out/2014	0,159 ± 0,0002	2,6000 ± 0,1534	146,5 mm	29,1	78
Nov/2014	0,069 ± 0,0001	1,5227 ± 0,0350	56 mm	30,5	73,3
Dez/2014	0,074 ± 0,0002	3,3616 ± 0,0156	71,3 mm	30,7	73,2
Jan/2015	0,0815 ± 0,0001	1,5279 ± 0,0508	65,4 mm	30,8	71,3
Fev/2015	0,063 ± 0,0006	2,7648 ± 0,1018	56,2 mm	31,6	70,8
Mar/2015	0,0635 ± 0,0001	1,5223 ± 0,0087	341,2 mm	30,5	76,8
Abr/2015	0,0323 ± 0,0006	3,1718 ± 0,0630	74,6 mm	31,6	73,5
Mai/2015	0,0332 ± 0,0001	3,0149 ± 0,0066	178,9 mm	30,7	77,5
Jun/2015	0,0490 ± 0,0001	1,5452 ± 0,0071	460,5 mm	29,0	82,8
Jul/2015	0,0868 ± 0,0008	3,5345 ± 0,1206	446,3 mm	28,0	85,7
Ago/2015	0,1101 ± 0,0009	2,4369 ± 0,0920	116,2 mm	28,4	79,6

**Figura 16** - Perfil cromatográfico das amostras de folha de *L. ferrea* em diferentes meses do ano, através de CLAE.



1 - Setembro; 2 - Outubro; 3 - Novembro; 4 - Dezembro; 5- Janeiro; 6- Fevereiro; 7- Março; 8- Abril; 9- Maio; 10- Junho; 11- Julho; 12- Agosto.

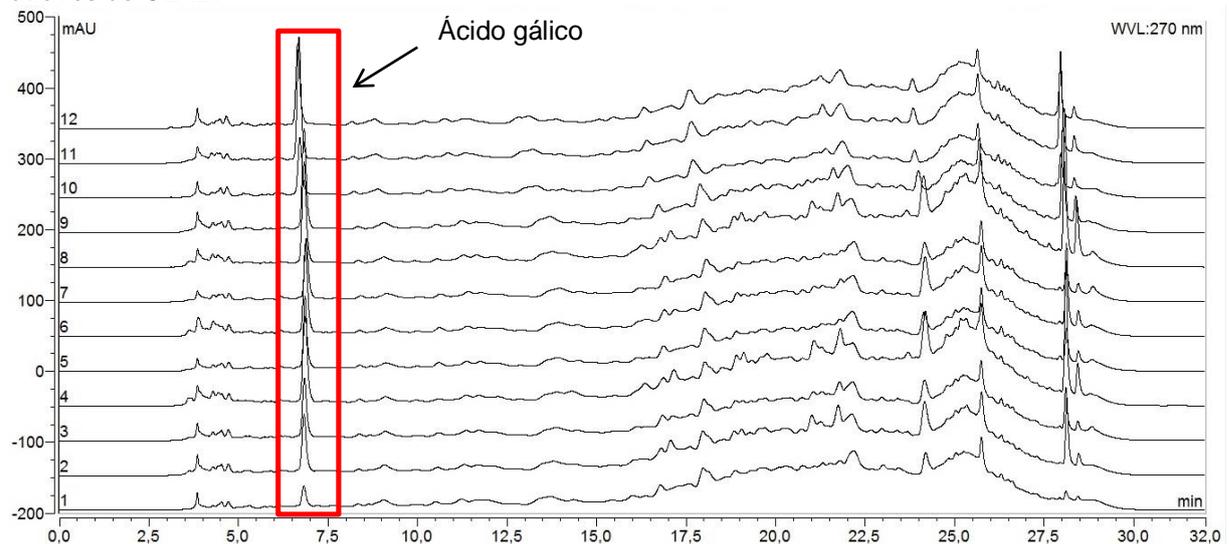
Fonte: Próprio Autor.

A sazonalidade expõe as plantas a diferentes variações climáticas, podendo algumas espécies apresentarem maiores concentrações de metabólitos em uma época do ano, e outras espécies apresentarem maiores concentrações em outros períodos. Macedo e colaboradores em 2013, realizaram um estudo com folhas de *Davilla rugosa* Poir, mostrando que as estações do verão e outono foram as que apresentam maiores concentrações de taninos, sendo possível inferir que as plantas reagem de formas diferentes as condições climáticas, o que pode refletir em diferentes perfis cromatográficos.

No que diz respeito às cascas, a tabela 13 mostra a relação entre as concentrações de ácido gálico e os dados climáticos obtidos para a época do estudo. É possível observar que a maior concentração de ácido gálico foi no mês de julho, um mês em que houve um grande volume de precipitação, referente a estação do inverno. Já a menor concentração foi no mês de setembro (Primavera), onde houve uma precipitação moderada. A figura 17 mostra os cromatogramas obtidos para os lotes das cascas de *L. ferrea*, através da sobreposição dos cromatogramas, observa-se que os lotes possuem perfis e tempos de retenção semelhantes entre si, assim como a presença de ácido gálico em todas as amostras, confirmando a presença do metabólito em todos os meses do ano.

Quando comparados, as folhas e cascas apresentam uma diferença significativa quanto ao teor de ácido gálico. Os dados expostos na tabela 13, mostram que as cascas apresentam maior concentração de ácido gálico do que as folhas. Segundo Gobbo-Neto e colaboradores (2007), a parte do vegetal influencia na produção de metabolitos secundários, podendo determinado metabólito secundário estar mais concentrado em uma parte da planta. De acordo com Sartori (2012), os taninos estão amplamente distribuídos nas plantas, porém tendem a apresentar maiores teores nas cascas.

**Figura 17** - Perfil cromatográfico das amostras de casca de *L. ferrea* em diferentes meses do ano, através de CLAE.

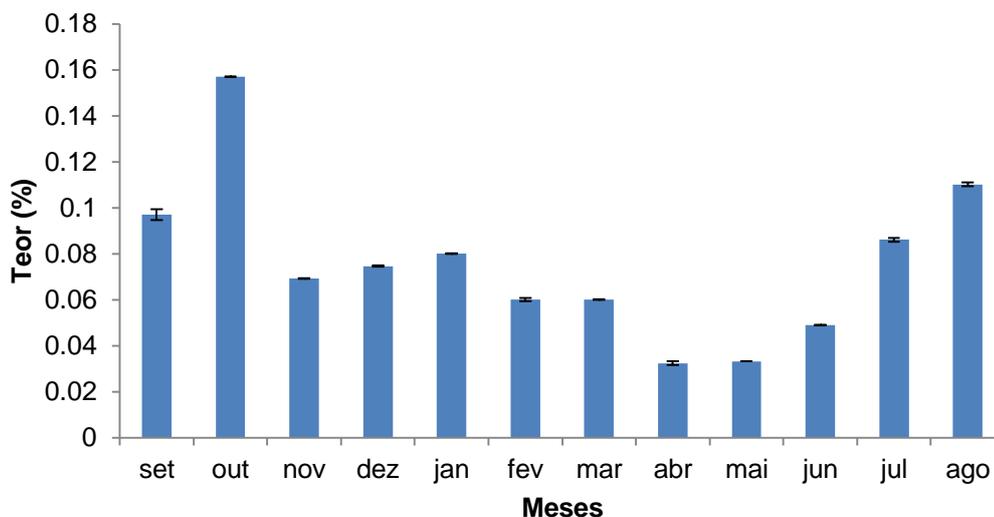


1 Setembro ; 2 - Outubro ; 3 - Novembro ; 4 - Dezembro ; 5- Janeiro ; 6- Fevereiro ; 7- Março ; 8- Abril ; 9- Maio ; 10- Junho ; 11- Julho ; 12- Agosto.

Fonte: Próprio Autor.

As figuras 18 e 19 mostram a distribuição de teores de ácido gálico ao longo do ano, tanto nas folhas quanto nas cascas, respectivamente. Considerando os dados obtidos para as folhas, é possível confirmar que há uma tendência para as concentrações do marcador aumentarem no período da estiagem (primavera e verão, set-fev), e diminuírem no período chuvoso (outono e inverno, mar-ago), havendo um significativo aumento nos últimos meses do inverno, o que sugere influência de outros aspectos que não os climáticos.

**Figura 18** - Perfil de distribuição de ácido gálico nas amostras de folha de *L. ferrea* ao longo do ano, através de CLAE.

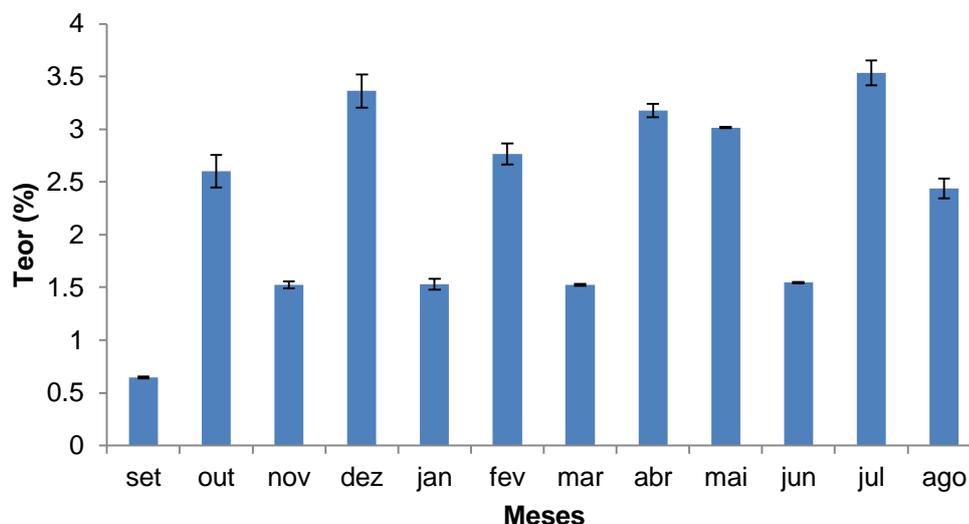


Fonte: Próprio Autor.

Já nas cascas, apesar da maior concentração ter sido no período do inverno, pode-se observar uma flutuação das concentrações entre as estações, havendo máximos ao longo do ano. Segundo Galdino e colaboradores (2007), a floração de *L. ferrea*, acontece na estação seca, e sua frutificação vai do final da estação seca até a chuvosa, o que pode sugerir que além de fatores climáticos, as cascas podem ser influenciadas por aspectos como floração e frutificação.

Ao correlacionar os resultados obtidos para o doseamento de ácido gálico nas folhas e cascas de *L. ferrea* por CLAE, com os obtidos para a prospecção fitoquímica, pode-se observar que tanto para as folhas como para as cascas os meses com maiores concentrações de ácido gálico correspondem as bandas de maiores intensidades nas duas placas (folhas e cascas). Enquanto que as menores concentrações obtidas para o marcador nas folhas e cascas, correspondem as bandas de menor intensidade nas placas cromatográficas. Ao comparar o resultado do doseamento de ácido gálico por CLAE nas folhas e cascas, com os doseamento de polifenóis por UV/VIS nas folhas e cascas de *L. ferrea*, percebe-se O doseamento de ácido gálico por CLAE acompanhou os resultados espectrofotométricos revelando que nas folhas a maior concentração do marcador ocorre na primavera e a menor no outono. Enquanto que para as cascas o marcador é mais evidente no inverno, e o teor mais baixo é observado na primavera.

**Figura 19** - Perfil de distribuição de ácido gálico nas amostras de casca de *L. ferrea* ao longo do ano, através de CLAE.



Fonte: Próprio Autor.

Assim, para os teores obtidos ao longo do ano, foram realizados testes estatísticos por ANOVA de uma entrada (Tabelas 12 e 13). Os testes confirmaram a hipótese de diferença significativa entre os teores obtidos para as diferentes quantidades avaliadas, uma vez que, os valores de  $F_{calculado}$  (Folha: 5523,56; Casca: 342,47) para os teores médios de ácido gálico, foram maiores do que os  $F_{tabelado}(2,21)$ .

**Tabela 14** - ANOVA de Uma entrada para a avaliação da variabilidade sazonal sobre o teor de ácido gálico nas folhas de *L. ferrea*.

<b>Fonte da variação</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>
<b>Entre grupos</b>	0,0407	11	0,0037	5523,56
<b>Dentro dos grupos</b>	1,61E-05	24	6,7E-07	
<b>Total</b>	0,0407	35		

Fonte: Próprio Autor.

**Tabela 15** - ANOVA de Uma entrada para a avaliação da variabilidade sazonal sobre o teor de ácido gálico nas cascas de *L. ferrea*.

<b>Fonte da variação</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>
<b>Entre grupos</b>	28,0196	11	2,5472	342,47
<b>Dentro dos grupos</b>	0,1785	24	0,0074	
<b>Total</b>	28,1981	35		

Fonte: Próprio Autor.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização físico-química contribuiu para a obtenção de parâmetros de qualidade para as folhas e as cascas do caule de *L. ferrea*. Os resultados obtidos fornecem subsídios comparativos de qualidade para posteriores estudos com a espécie vegetal. Além disso, as amostras avaliadas no estudo se apresentam dentro das exigências mínimas de qualidade recomendadas pela Farmacopeia Brasileira e puderam ser utilizadas com sucesso nos ensaios químicos de controle de qualidade analítico das mesmas.

Os dois métodos analíticos avaliados para determinação e quantificação de ácido gálico nas folhas e cascas de *L. ferrea* através de CLAE, apresentaram adequação aos parâmetros de validação estabelecidos pela RE nº 899/03. Estas metodologias mostram-se disponíveis como técnicas específicas, sensíveis, precisas, exatas e robustas. Desta forma, os procedimentos puderam ser considerados validados para o fim que se propõem.

Por fim, o estudo constatou alterações sazonais significativas na composição química das folhas e cascas de *L. ferrea*, indicando que o teor do marcador podem estar sendo influenciados por diversos fatores, principalmente no que diz respeito a precipitação. Outros estímulos como, período de floração e frutificação, também podem apresentar grande influência sobre o metabolismo vegetal, o que pode explicar as flutuações encontradas para a distribuição nas concentrações dos marcadores ao longo do ano.

## 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.
- AFONSO, A; MATOS, A.C; MARENGO, V.A; MOREIRA, E.G; SOARES, D.X; KOOLEN,H.H.F; SCARMINIO, I.S. Seasonal Effects on HPLC-DAD-UV and UPLC-ESI-MS Fingerprints and Analgesic Activities of *Vernonia Condensada* Baker Extracts. **J.Bras.Chem.Soc.** v.26, n.2, p.350-358, 2015.
- AMARAL, F. M. M; COUTINHO, D. F; RIBEIRO, M. N. S; OLIVEIRA, M. A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/ Maranhão. **Revista brasileira de Farmacognosia**. v. 13, p. 27-30, 2003.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v.66, n.1, p. 1-9, 2006.
- APAC. Disponível em: <<http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/estacoes-do-ano.php?estacao=verao>>. Acesso em :18 dez. 2015.
- ARAPISTAS P. Hydrolyzable tannin analysis in food.**Food Chemistry**, v. 135, p. 1708-1717, 2012.
- ARAUJO, A.A; SOARES, L.A.L; FERREIRA, M.R.A; NETO, M.A.S; SILVA,G.R; ARAUJO-JR, R.F; GUERRA, G.C.B; MELO, M.C.N. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rígida* and *Psidium guajava*. **Jornal of ethnopharmacology**. v. 156, p.88-96, 2014.
- ARAÚJO, L. B. D. C.; SILVA, S. L.; GALVÃO, M. A. M.; FERREIRA, M. R. A.; ARAÚJO, E. L., RANDAU, K. P.; SOARES, L. A. L. Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 736-742, 2013.
- AVELINO, J. I; LIMA, J.S.S; RIBEIRO, M.C.C; CHAVES, A.P; RODRIGUES, G.S.O. Métodos de quebra de dormência em sementes de Jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. Var. ferrea). **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**. V. 7, n.1, p. 102-106, 2012.
- BARNI, S.T.; FILHO, CECHINEL.V.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista brasileira de farmacognosia**. v. 19. n. 4, p. 865-870, 2009.
- BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. Frutos e sementes: morfologia aplicada a sitematica de dicotiledôneas. Viçosa: editora UFV, 1999.

BASTOS, L.L.; LUNELLI, P.S.; FERREIRA, J.Z.; MENEGUZZI, A. Aplicação de diferentes tipos de taninos comerciais como agentes de passivação do aço galvanizado para substituição de cromatização. In: 15 encontro e exposição brasileira de tratamentos de superfície e 4 INTERFINISH latino Americano. 2015, São Paulo. Anais.

BAYDOUN, S; LAMIS, C; HELENA, D; NELLY, A. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in traditional medicine by the communities of Mount Hermon, Lebanon. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 139-156, 2015.

BORTOLUZZI, R.L.C.; MIOTTO, S.T.S.; BIONDO, E.; SCHIFFINO-WITTMANN, M.T. **Estudos Morfológicos, Citotaxonômicos e moleculares no grupo *Caesalpinia L. Sensu Amplo: Caesalpinia, Hoffmannseggia e Pomaria* no sul da América do Sul.** CAV (UDESC). 2007.

BRAGA, F.C ; VALADARES, Y. M; COSTA, M.A; LOMBARDI, J.A; OLIVEIRA, A.B. Estudo fitoquímico de *Erythraea centaurium*, *Jacaranda caroba*, *Temijia ferrugínea* e *Solanum paniculatum* visando identificar marcadores químicos para o fitoterápico lerobina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, p. 28-31, 2003.

BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R.; NAGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *Verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 287-290, 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de atenção a saúde. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília: Ministério da saúde, 2012.

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.

BRITO, V.L.G.; PINHEIRO, M.; SAZIMA, M. *Sophora tomentosa* e *Crotalaria vitellina* (Fabaceae): biologia reprodutiva e interações com abelhas na restinga de Ubatuba, São Paulo. **Biota Neotrop**. v. 10, n.1, 2010.

BROOKS, J.S; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 32, p.769-782.

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

BUZZINI, P.; ARAPITSAS, P.; GORETTI, M.; BRANDA, E.; TURCHETTI, B.; PINELLI, P.; IERI, F.; ROMANI, A. antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. **Mini-Reviews in medicinal chemistry**. v.8, p. 1179-1187, 2008.

CAMPOS, D.A.; ALVES, N.D.; SILVA, T.D. Estudo de pré-formulação e desenvolvimento de pó efervescente contendo ácido acetilsalicílico. **Farmácia e Ciência**. v. 3, p.20-33, 2012.

CARNEIRO, F. B.; JUNIOR, I. D.; LOPES, P.Q.; MACÊDO, R.; Variação da quantidade de  $\beta$ -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20. n.4, p. 600-606, 2010.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto. Tecmedd. 2004.

CARVALHO, J.C.T; GOSMANN, G; SCHENKEL, E.P.Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.6 ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/EDUFSC, Cap. 24, p. 615-656, 2010.

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

CASTELLANI, D.C; CASALI, V.W.D; SOUZA, A.L; CECON, P.R; CARDOSO, C.A; MARQUES, V.B. Produção de óleo essencial em catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v. 8, n.4, p. 62-65, 2006.

CASTRO, A.H.F; ALVARENGA, A.A; SOARES, A.M; YOUNG, M.C.M; PURCINO, A.A.C. Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. Ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 7, n. 3, p. 45-55, 2005.

CAVALHEIRO, M. G; FARIAS, D. F; FERNANDES, G. S; NUNES, E.P; CAVALCANTI, F. S; VASCONCELOS, I. M; MELO, V. M. M; CARVALHO, A. F. U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 586-591, 2009.

CHABARIBERI, R.A.O.; POZZI, A.C.S.; ZERAIK,M.L.; YARIWAKE, J.H. Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de *Maytenus* (*Celastraceae*) e de *Passiflora* (*passifloraceae*) e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n.4, p.860-864, 2009.

CHAVARIA, G; BERGAMASCHI, H; SILVA, L. C; SAANTOS, H.P; MANDELLI, F; GUERRA, C. C; FLORES, C. A; TONIETTO, J. Relações hídricas, rendimento e compostos fenólicos de uvas *Cabernet Sauvignon* em três tipos de solo. **Áreas básicas**, v. 70, n. 3, p. 481-487, 2011.

CHAVES, T. P. **Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro**. 2012, p. 77. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande.

CLIMAMBUCO. Disponível em ><http://climambuco.blogspot.com.br/2012/10/tempo-e-clima-de-pernambuco.html><Acesso em: 18 dez. 2015.

COLLINS, C.H. O aperfeiçoamento da cromatografia em camada delgada. **Scientia Chromatographica**. v.2, n.2, p.5-9, 2010.

COSTA, A.C.O. **Caracterização e quantificação de marcadores químicos do extrato hidroetanólico das folhas de *Kalanchoe Brasiliensis cambes***. 2012, p.122. Dissertação (Mestrado). Universidade federal do rio grande do norte, Natal-RN.

COUTINHO, I.D.; KATAOKA, V.M.F.; HONDA,N.K.; COELHO, R.G.; VIEIRA, M.C.; CARDOSO, C.A.L. Influência da variação sazonal nos teores de flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess). **revista brasileira de farmacognosia**. v.20, n. 3, p. 322, 2009.

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

CRUZ, A. P. G. **Avaliação da influência da extração e microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. 2008, p. 88. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ.

CRUZ,G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Editora Bertrand Brasil, 1979.4 EDIÇÃO.

CUJÍC, N; SAVIKIN,K; JANKOVIC, T; PLJEVJAKUSIC, D; ZDUNIC, G; IBRIC, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food chemistry**. v. 194, p. 135-142, 2016.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agentes. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 23, p. 174-181, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidante and anticâncer properties. **Molecules**.v.15, p. 7313-7352, 2010.

DAS,B; TRIRUPATHI, P; RAVIKANTH,B; KUMAR,R.A; SARMA, A.L.S; BASHA,S.J. Isolation synthsis, and bioactivity of homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Chem.Pharm. Bull**. v.57, p.1139-1142, 2009.

DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Plantas medicinais. Fármacos derivados de plantas. In: Farmacologia. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. P. 134-145.

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.

DENG, Y.; ZHAO, Y.; ZAKOUR, O.P.; YANG, G. Polyphenols, antioxidante and antimicrobial of leaf and bark extracts of *Solidargo canadenses* L. **Industrial Crops and Products**. v. 74, p. 803-809, 2015.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 edição, revista e ampliada, São Paulo, editora UNESP, 2002.

DIAS, A.M.A; REY-RICO, R.A; OLIVEIRA, R.A; MARCENEIRO, S; ALVAREZ-LORENZO,C; CONCHEIRO, A; JUNIOR, R.N.C; BRAGA, M.E.M; SOUZA, H.C. Wound dressings loaded with na anti-inflammatory jucá (*libidibia ferrea*) extract using supercritical carbono dioxide technology. **J. of supercritical fluids**. v.74, p. 34-45, 2013.

DICIAULA, M. C; LOPES, G. C; SCARMINIO, I.S; MELLO, J,C.P. Otimization of solvente mixtures for extraction from bark of *schinus terebinthifolius* by a statistical misture-design technique and development of a UV-VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química Nova**. v. XY, n. 00, p.1-6, 2013.

DUARTE, E. C. **Desenvolvimento de extrato seco padronizado de frutos sem sementes de *Caesalpinia ferrea* C. Mart. E avaliação da atividade anti-inflamatória**. 2010, p. 110. Dissertação (Mestrato em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas. Manaus.

EMA.European Medicines Agency. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products. EMA/CVMP/814/00. 2006.

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. 5 ed., Brasília: **ANVISA**, 2010.

FDA.Working groups in the Medical Policy, Pharmacology and Toxicology, Complex Drug Substances Coordinating Committees.Guidance for Industry Botanical Drug Products. In: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluat ion and Research (CDER) editors. Rockville: US Food and Drug Administration (FDA). 2004.

FERNANDES, J.M.; GARCIA, F.C.P. Leguminosae em dois fragmentos de floresta estacional semidecidual em Araponga, Minas Gerais, Brasil: Arbustos, subarbustos e trepadeiras. **Rodriguésia**.v. 59. n. 3, p. 525-546, 2008.

FERREIRA, M.R.A; SOARES, L.A.L. *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz: A reviw of biological activities and phytochemical composition. **Journal of medicinal plant research**. v. 8, 2015.

FIGUEIRÊDO, C.B.M.; ALVES, L.D.S.; SILVA,FERREIRA, P.A.; MARQUES, G.S.; SANTANA, A.S.C.O.; RANDAU, K.P.; PIMENTEL, R.M.M.; SILVA, R.M.F.; ROLIM-NETO, P.J. Physical-chemical characterization, anatomical and seasonal evaluation of *Thuja Occidentalis* L. (Cupressaceae). **International jornal pharmaceutical sciences and research**. v. 5, p. 2320-5148, 2014.

**Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em 02 de Set 2015 as 16:00.

FOLIN, O; CIOCALTEU, V. On Tyrosine and Tryptophane determinations in Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. v.LXXIII, n.2, 1927.

FÔNSECA, S.G.C. **Farmacotécnica de fitoterápicos**. 2005

GALDINO, G.; MESQUITA, M.R.; FERRAZ, I.D.K. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Cesalpinia férrea* Mart. **Revista brasileira de biociências**. v. 5, p.747-749, 2007.

GARZA-JUARÉZ, A; SALAZAR-CAVAZOS, M.L; SALAZAR-ARANDA, R; PÉREZ-MESEGUER, J; TORRES, N.W. Correlation between chromatographic fingerprint and antioxidant activity of *Turnera diffusa* (Damiana). **Planta Médica**. v.77, n.9, p.958-963, 2011.

GHITESCU, R.E.; VOLF, I.; CARAUSU, C.; BUHLMANN, 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.

GIRI, L.; ANDOLA, C. H.; PUROHIT, V. K.; RAWAT, M. S. M.; RAWAL, S. R.; BAHTT, I. D. Chromatographic and Spectral Fingerprinting Standardization of Traditional Medicines: An Overview as Modern Tools. **Research Journal Phytochemistry**, v. 4, n.4, p. 234-241, 2010.

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.

GOMES, S.V.F. **Desenvolvimento de método por cromatografia líquida de alta eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilis***. 2009, P.139, Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

GONZALEZ, F. G., BARROS, S. B. M., BACCHI, E. M. Atividade Antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* MART. In: IX Semana da Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2004, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo : USP, 2004. v. 40. p. 79-79.

GUIMARÃES, E.C.B.T. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o controle de qualidade químico da qualidade de fitoterápicos à base de extrato seco de alcachofra**. 2007, p.87, dissertação (mestrado), FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

GUO, N; YU, Y; ABLAJAN, K; LI, L; FAN, B; PENG, J; YAN, H; MA, F; NIE, Y. Seasonal variations in metabolite profiling of the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait. **Rapid Commun Mass Spectrom**. v.25, p.1701-1714, 2011.

HALKINA, T.; SHERMA, J. Comparative evaluation of the performance of silica gel TLC plates and irregular and spherical-particle HPTLC plates. **Acta chromatographica**. n.17, p. 261-271, 2006.

HARBONE, J.B; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p.481-504, 2000.

HASLAM, E. Vegetables tannins-lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**. v.68, p. 2713-2721, 2007.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Methodology. **London**, 1996. Capturado da Internet - [www.eudra.org/emea.html](http://www.eudra.org/emea.html).

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. in: COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (org.). **Fundamentos da Cromatografia**. 4 ed. Campinas SP. Editora da Unicamp, Cap. IX, p. 273-287, 2006.

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

KYRALEOU, M.; PAPPAS, C.; VOSKIDI, E.; KOTSERIDIS, Y.; BASALEKOU, M.; TARANTILIS, P. A.; KALLINTHRAKA, S. Diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy for simultaneous quantification of total phenolics and condensed tannins contained in grape seeds. **Industrial Crops and Products**. v. 74, p. 784-791, 2015.

LIANG, Y.Z; XIE,P; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography**. v. 812, p.53-70, 2004.

LIMA, H.C. DE; QUEIROZ, L.P.; MORIM, M.P.; SOUZA, V.C.; DUTRA, V.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; IGANCI, J.R.V.; FORTUNATO, R.H.; VAZ, A.M.S. F; SOUZA, E.R. DE; FILARDI, F.L.R.; VALLS, J.F.M.; GARCIA, F.C.P.; FERNANDES, J.M.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREZ, A.P.F.; MANSANO, V.F.; MIOTTO, S.T.S.; TOZZI, A.M.G.A.; MEIRELES, J.E.; LIMA, L.C.P.; OLIVEIRA, M.L.A.A.; FLORES, A.S.; TORKE, B.M.; PINTO, R.B.; LEWIS, G.P.; BARROS, M.J.F.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B.B.; RANDO, J.G.; SCALON, V.R.; CARDOSO, D.B.O.S.; COSTA, L.C. DA; SILVA, M.J. DA; MOURA, T.M.; BARROS, L.A.V. DE; SILVA, M.C.R.; QUEIROZ, R.T.; SARTORI, A.L.B.; CAMARGO, R. A.; LIMA, I.B.; COSTA, J.; SOARES, M.V.B.; SNAK, C.; SÃO-MATEUS, W.; FALCÃO, M. J.; MARTINS, M.V.; REIS, I.P.; CORDULA, E. Fabaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 03 Set. 2015.

LOPES, J.L.C. in: COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (org.). **Fundamentos da Cromatografia**. 4 ed. Campinas SP. Editora da Unicamp, Cap. III, p. 67-85, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 162.

MA, M; HONG,C; AN, S; LI,B. Seasonal, spatial and inter-specific variation in quercetin in *Apocynum venetum* and *Poacynum herderosonii*, chinese traditional herbal teas. **Journal of agriculture, Food and Chemistry**. v.5, p.2390-2393, 2003.

MACEDO, J. M; SOUZA, L. G. P; VALENZUELA, V. C. T; OLIVEIRA, A .B; CASTILHO, R. O; JACOME, R. L. R. P. Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 34, n. 4, p. 585-590, 2013.

MACHADO, R.R.B.; MEUNIER, I.M.J.; SILVA, J.J.A.; CASTRO,A.A.J.F. Árvores nativas para a arborização de Teresina Piauí. **Revista da sociedade brasileira de arborização urbana**. v.1. n.1, 2006.

MACIEL, M.A.M; PINTO, A.C; VIEGA JUNIOR,F. plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARISWAMY, Y; GNARAJ, W.E; ANTONISAMY, J.M. Chromatographic fingerprint analysis on flavonoids constituents of the medicinally importante plant *Aerva lanata* L. by HPTLC technique. **Asian Pacific Journal of Ttopical Biomedicine**. p.S8-S12, 2012.

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.

MARREIRO, R. O.; BANDEIRA, M.F.C.L.; ALMEIDA, M.C.; COELHO, C.N.; VENÂNCIO, G.C.; CONDE, N.C.O. Avaliação de citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de *Libidibia ferrea*. **Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic**.v.14, p. 34-42, 2014.

MATOS, F.J.A. **plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. UFC edições. 3 edição. 2007. P.232. MEDEIROS, F.D. **Determinação da variabilidade sazonal de marcadores químicos de plantas de interesse medicinal**. 2006, p.94, Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa –PB.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.6 ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/EDUFSC, Cap. 24, p. 615-656, 2010.

MIGLIATO, K. F; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P; SACRAMENTO, L. V. S; CORREA, M. A; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) SKeels. **Revista brasileira de Farmacognosia**, V. 17, n. 1, p. 94-1001, 2007.

MIOTO, R. País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos. Folha de São Paulo. Publicada em 7 jul. 2010. Disponível em: ><http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/746386-pais-deixa-de-gerar-us-5-bi-por-ano-com-fitoterapicos.shtml>< acesso em 15 de fevereiro de 2016 as 16:00.

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

MOREIRA-CONEGLIAN, I.R.; OLIVEIRA, D.M.T. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e ofilares de dez espécies de *Caesalpinioideae* (Fabaceae). **Revista brasileira de botânica**. v.29, n.2, p.193-207, 2006.

NAKAMURA, E.S; KUROSAKI, F; ARISAWA, M; MUKAINAKA,T; OKUDA,M; TOKUDA,H; NISHINO,H; PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Cesalpinia ferrea* and related compounds. **Câncer letters**.v.177, p. 119-124, 2002.

NASCIMENTO, M.P.S.C.B.; OLIVEIRA, M.E.; MIURA,C.L.Q.; REIS, J.B.C.; NASCIMENTO,H.T.S.; LEITE, J.M.B.; LOPES, J.B.; RIBEIRO, V.Q. Potencial forrageiro do pau-ferro. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**.v.41, p. 1413-1455, 2002.

NAYAK, B; DAHMOUNE,F; MOUSSI,K; REMINI, H; DAIRI, S; AOUN, O. KHODIR, M. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. **Food Chemistry**. v.187, p. 507-516, 2015.

NI, Y; LAI, Y; BRANDES, S; KOKOT, S. Multi-wavelength HPLC fingerprints from complex substances: an exploratory chemometrics study of the *Cassia seed* example. **Analytica Chimica Acta**. v.647, p.149-158, 2009.

NOSAKI, H.; HAYASHI, K.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IUNUMA, M.; AKAO, Y. paufferol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mar exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron letters**. v. 48, p. 8290-8292, 2007.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. avaliação da atividade cicatrizante do jucá. (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul. Var. ferrea) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista brasileira de plantas medicinais botucatu**. v. 12. n.3, 302-310, 2010.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra, 2002.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUN, R.; ROSATO, 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.

RATHEE, D.; RATHEE, S.; RATHEE, P.; AAKASH, D.; ANANDJIWALA,S.; RATHEE, D. HPTLC densitometric quantification of stigmaterol and lupeol from *Ficus religiosa*. **Arabian Journal of Chemistry**. 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletrodoréticos. **Química Nova**. v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.; MORANO, S.C.; SIVA, 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.

SAMPAIO, F.C; PEREIRA, M.S.V; DIAS, C.S; COSTA, V.C.O; CONDE, N.C.O; BUZALAF, M.A.R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Jornal of ethnopharmacology**. v. 124, p.289-294, 2009.

SANTOS, A.O; KAYE, O. Composição quali-quantitativa da produção de 'Sirah' cultivada sob estresse hídrico transiente. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**. V. 13, n. 3, p. 272-281, 2009.

SANTOS, D. S. **Estudo fitoquímico sazonal e potencial antimicrobiano das raízes de *Vetiveria zizanioides***. 2013, p. 74, Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí-SP.

SANTOS, R.M; SANTOS, S. C. Variação sazonal de taninos hidrolisáveis em folhas de *Eugenia uniflora*. Anais letrônicos do III seminário de Pesquisa e pós-graduação, Goiânia: UFG, 2006.

SARTORI, C. J. Avaliação dos teores de compostos fenólicos nas cascas de *Anadenanthera peregrina* (angico- vermelho).2012. Dissertação ( Mestrado). Universidade Federal de Lavras. Lavras.

SHOKOUFI, N.; SHEMIRANI, F.; ASSADI, Y. Fiber optic-linear array detection spectrophotometry in combination with dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous preconcentration and determination of palladium and cobalt. **Analytica Chimica Acta**. v. 597, p. 349-356, 2007.

SILVA, F.A. **Simbiose micorrizica arbuscular em pau ferro (*Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. LP. Queiroz var. ferrea) visando maximização da produção de fitoquímicos foliares com potencial medicinal**. 2014, p.73, tese (doutorado), UFPE, 2014.

SILVA, H. H. G; SILVA, I. G; SANTOS, R.M.G; RODRIGUES-FILHO, E; ELIAS, C.N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St.Hil (sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**. v. 37, n. 5, p. 396-399, 2004.

SILVA, L.C.N; MIRANDA, R.C.M; GOMES, E.B; MACEDO, A.J; ARAUJO, J.M; FIGUEIREDO, R.C.B.Q; SILVA, M.V; CORREIA, M.T.S. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **Journal of medicinal plants research**. v.7, p.2358-2364, 2013.

SIMEPAR. Disponível em  
>[http://www.simepar.br/site/internas/conteudo/meteorologia/estacoes\\_ano.shtml](http://www.simepar.br/site/internas/conteudo/meteorologia/estacoes_ano.shtml)<  
.Acesso em: 18 dez. 2015.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária intenção da indústria com a academia. **Revista brasileira de farmacognosia**. v.12, n.1, p.35-40, 2002.

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

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

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.7-13, 2003.

TONHI, E.; KENNETH, E. C.; JARDIM, I. C.S.F.; COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**. v. 25, n.4, p. 616-623, 2002.

UEDA, H., TACHIBANA, Y., MORIYASU, M., KAWANISHI, K., ALVES, S.M., 2001. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v. 8, p. 377-381.

VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E. M.; COSTA, J.; SOARES, L.AL.; SÁ, M.D.C.; SOUZA, T.P.; WANDERLEY, A.G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia férrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.137, p.1533-1441, 2011.

VASCONCELOS, E.A.F; BARBOSA, R.M; MEDEIROS, M.G.G; MOURA, T.F.A.L. Influência do processo extrativo, solvente e tamanho da partícula do material vegetal no teor de sólidos totais da solução extrativa da *Schinus terebinthifolius Raddi*. **Revista Fitos**. v.1, n.11, 2005.

VERSA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V.; HENRIQUES, A. T.; ORTEGA, G. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso e folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**. v. 30, n. 4, p. 825-820, 2007.

VERSA, S.M.; **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseado na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona**. 2006, p. 134. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

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

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, p. 16057-16057, 2014.

YARIWAKE, J; LANÇAS, F.M; CAPPELARO, E. A; VASCONCELOS, E.C; TIBERTI,L.A; PEREIRA,A. M. S; FRANÇAS, S. C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonoides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (celastraceae). **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 162-168, 2005.

YUNES, R. A; PEDROSA, R.C; CECHINEL FILHO,V. fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, 2001.

ZANIN, J.L.B.; CARVALHO, B.A.; MARINELI, P. S.; SANTOS, M. H.; LAGO, J.H.G.; SANTORELLI, P.; VIEGAS-Jr, C.; SOARES, M.G. The Genus *Caesalpineia* L. (caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**. v. 17, p. 7887-7902, 2012.

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

ZLOTEK, U; MIKULSKA, S; NAGAJEC, M; SWIECA, M. The effect of diferente solvents and number of extraction steps on the polyphenol contente and antioxiant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. **Saudi jornal of biological sciences**. 2015.