UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

PAULO SERGIO REGINALDO AIRES

Estudo de Sazonalidade da espécie *Anadenanthera colubrina*: obtenção de impressões de digitais por UV/Vis, CCD-AE e CLAE-DAD para aplicação no controle de qualidade da droga vegetal

Recife - PE

2016

PAULO SERGIO REGINALDO AIRES

Estudo de Sazonalidade da espécie *Anadenanthera colubrina*: obtenção de impressões de digitais por UV/Vis, CCD-AE e CLAE-DAD para aplicação no controle de qualidade da droga vegetal

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Desenho, Modelagem Molecular e Preparação de Produtos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Recife - PE

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Aires, Paulo Sergio Reginaldo
Estudo de Sazonalidade da espécie *Anadenanthera colubrina*: obtenção de impressões de digitais por UV/Vis, CCD-AE e CLAE-DAD para aplicação no controle de qualidade da droga vegetal / Paulo Sergio Reginaldo Aires. – Recife: O Autor, 2016.

95 f.: il.

Orientadora: Luiz Alberto Lira Soares
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2016.
Inclui referências

1. Plantas da Caatinga 2. Plantas medicinais I. Soares, Luiz Alberto Lira (orient.) III. Título.

634.90981 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2017-215

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: AIRES, Paulo Sergio Reginaldo

Título: **Estudo de Sazonalidade da espécie *Anadenanthera colubrina*: obtenção de impressões de digitais por UV/Vis, CCD-AE e CLAE-DAD para aplicação no controle de qualidade da droga vegetal**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 13/01/2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr. Luiz Alberto de Lira Soares
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

Prof(a). Dr. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

Prof(a). Dr. Sofia Suely Ferreira Brandão Rodrigues
Instituição: Instituto Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria da Conceição (In memoriam) e a amiga Poliane Viana (In memoriam) que partiu cedo e no final do meu mestrado. Ambas, lutaram contra o câncer.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a Nsa. Senhora e a minha Mãe por sempre me iluminarem e guiarem meus caminhos. A meu pai, José Aires por todo esforço, dedicação e amor que me foi dado e pelos ensinamentos em busca de fazer sempre o bem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares, pelos ensinamentos, orientação e pela oportunidade me dada mesmo com as dificuldades de trabalho e distância.

A Magda Assunção, meus eternos agradecimentos pela dedicação e orientação em todo o curso do mestrado.

As companheiras da Central Analítica Júlia, Isabelle, Hyalyne, Kassia, Wliana e Rosário pela grande colaboração na execução desse trabalho.

A amiga Rebeka Monteiro que me cativou com seu jeito doce e que me ajudou bastante no caminhar do mestrado.

A meus irmãos José Manoel, Ana Paula e Fábio por me apoiarem e ajudarem sempre. Amo vocês.

A minha pequena Lindsay que ficou por tantas horas sozinha, esperando chegar das exaustivas viagens e encher-me de energia e amor que só um cão pode dar.

A Milvio Cordeiro pelo companheirismo e paciência nos momentos difíceis e de ouvir sempre o enfadar da palavra “Estou Cansado”. Meus eternos agradecimentos!

Ao Químico da GNR Agreste Central Rildo por me proporcionar a chance de realizar um sonho. A Dra. Nyadja por me ouvir e incentivar no momento de dificuldade e Gorete pela ajuda e suporte nas minhas ausências do laboratório.

Aos funcionários do IPA – Caruaru por todo apoio nas coletas e informações.

Aos meus eternos professores Sofia Suely, Eduardo Alécio e pelos primeiros passos na vida acadêmica, conselhos e ensinamentos. Vocês são as minhas referências.

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

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

(São Francisco de Assis)

RESUMO

AIRES, Paulo Sergio Reginaldo Aires. Estudo de Sazonalidade da espécie *Anadenanthera colubrina*: obtenção de impressões de digitais por UV/Vis, CCD-AE e CLAE-DAD para aplicação no controle de qualidade da droga vegetal. 2016. 104f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Anadenanthera colubrina var. cebil (Griseb.) Altschul (Angico) é uma espécie representativa da região do semiárido brasileiro em uma região geográfica conhecida como caatinga, possuindo utilização diversificada que vai desde a extração de taninos para o processo de curtume, ao uso na medicina popular. O angico é amplamente utilizado na terapêutica de doenças como bronquite, gastrite, pneumonia e resfriados, tratamento de cancro, anemia e difteria. O objetivo foi de avaliar as influências sobre a variabilidade sazonal nas cascas de *Anadenanthera colubrina* utilizando metodologias como CCD-AE, CLAE-DAD e espectrofotometria, estabelecendo características físico-químicas e um perfil químico como uma ferramenta para o controle de qualidade. Para tanto, as amostras das cascas de *A. colubrina* obtidas de Junho de 2014 a Junho de 2015 foram caracterizadas de acordo com métodos gerais em Farmacognosia da Farmacopeia Brasileira 5ª ed., e a quantificação dos taninos foi realizada tanto por espectrofotometria (metodologia de Folin-Ciocalteau), quanto por CLAE. Além disso, foram obtidos os perfis fitoquímicos para as amostras por CCD e CLAE. As amostras apresentaram resultados de ensaios físico-químicos em conformidade com os limites preconizados independente do período sazonal. A prospecção fitoquímica das cascas da espécie demonstrou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, açúcares redutores, cumarinas, saponinas, terpenos/esteroides e taninos condensados. A validação espectrofotométrica e cromatográfica atendem as exigências da RE 899/03 apresentando especificidade/seletividade para o marcador pirogalol/catequina (UV-Vis e CLAE, respectivamente); comportamento linear (R^2 > 0,99); repetibilidade e precisão intermediária com baixos valores de desvio padrão relativo (< 5%); exatidão requerida, entre 80 e 120%; e, robustez adequada as mudanças realizadas em ambas as metodologias. Resultados mostraram que nos meses com menores índices pluviométricos, os teores de taninos totais por Folin-Ciocalteau e catequina por CLAE-DAD apresentaram maiores teores quantificados nas cascas de angico. Através do *fingerprint* obtido por CLAE e HPTLC foi possível inferir que todas as amostras apresentaram-se semelhantes nos meses de estudo, evidenciado que as variações sazonais presentes na região não afetam as concentrações de taninos condensados nas cascas de *A. colubrina*.

Palavras Chave: *Anadenanthera colubrina.* Angico. *Fingerprint*. Sazonalidade.

ABSTRACT

AIRES, Paulo Sergio Reginaldo. Seasonality Study of *Anadenanthera colubrina*: obtaining fingerprints UV / Vis, CCD-AE and HPLC-DAD for use in quality control of plant drugs 2016. 104f. Thesis (MS). Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Anadenanthera colubrina var. cebil (Griseb.) Altschul (Angico) is a representative species of the Brazilian semi-arid region in a geographic region known as caatinga, having diversified use ranging from the extraction of tannin for the tanning process, for use in folk medicine. In its therapeutic value, mimosa is widely used in the treatment of inflammatory conditions such as bronchitis, gastritis, pneumonia and flu, treating cancer, anemia and diphtheria. Aiming at the development of more effective control tools and the establishment of quality specifications, the purpose of the study was to assess the seasonal variability on the physico-chemical characteristics, total tannin content and in the chemical profile for CCD, CCD-AE and HPLC -DAD, the shells of *Anadenanthera colubrina*. Therefore, samples of *A. colubrina* shells obtained from June 2014 to June 2015 were characterized according to general methods in Pharmacognosy from the Brazilian Pharmacopoeia 5th ed., And the quantification of tannins was carried out both by spectrophotometry (Folin method - Ciocalteau), or by HPLC. Moreover, phytochemicals profiles for the samples by TLC and HPLC were obtained. The samples presented data physicochemical tests in accordance with the limits recommended by the literature. The phytochemical screening of species of bark showed the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, reducing sugars, coumarins, saponins, terpenes / steroids and tannins. The spectrophotometric data validation and chromatographic meet the requirements of RE 899/03 having specificity / selectivity to the marker pyrogallol / catechin (UV-Vis and HPLC, respectively); linear behavior (R2> 0.99); repeatability and intermediate precision with low standard deviation values (<5%); required accuracy, between 80 and 120%; and adequate robustness changes made in both methodologies. The total tannin content by Folin-Ciocalteu had a mean value of 3.17% and the highest levels were evidenced during the dry season. Associated with this condition, the higher catechin levels were observed in the same period when quantified by HPLC-DAD. Through the fingerprint obtained by HPLC and HPTLC it was possible to infer that all samples were similar in the months of study evidenced that seasonal variations present in the region affect the tannin concentrations in condensed shells *A. colubrina*.

Keywords: *Anadenanthera colubrine*. Angico. *Fingerprint*. Seasonality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul localizada na Estação Experimental José Nilson de Melo – IPA Caruaru (A); Obtenção das cascas de *A. colubrina* (B); Partes aéreas da *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul observando as folhas e os frutos (C); Caule da *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul apresentando casca espessa de coloração acinzentada, e aspecto espiculado 23

Figura 2 - Estrutura dos monômeros taninos condensados. 26

Figura 3 - Curvas de retenção e passagem referentes às amostras de casca de *A. colubrina* no período de 12 meses. 54

Figura 4 - Histograma de distribuição granulométrica das amostras de casca de *A. colubrina* ao longo do período de 12 meses. 56

Figura 5 - Cromatograma para avaliação de alcaloides em cascas de *A. colubrina*. 59

Figura 6 - Cromatograma para avaliação de saponinas em cascas de *A. colubrina*. 59

Figura 7 - Cromatograma para avaliação de taninos hidrolisáveis em cascas de *A. colubrina*. 59

Figura 8 - Cromatograma para avaliação de antraquinonas em cascas de *A. colubrina*. 59

Figura 9 - Cromatograma para avaliação de cumarinas em cascas de *A. colubrina* 59

Figura 10 - Cromatograma para avaliação de açúcares redutores em cascas *A. colubrina*. 59

Figura 11 - Cromatograma para avaliação de flavonoides e derivados cinâmicos em cascas de *A. colubrina*. 59

Figura 12 - Cromatograma para avaliação de terpenos e esteroides em cascas de *A. colubrina*. 59

Figura 13 - Cromatograma para avaliação de taninos condensados com padrão catequina em cascas de *A. colubrina*. 60

Figura 14 - Espectro de varredura (400-900 nm) do pirogalol e do extrato aquoso obtido a partir da matéria-prima de *Anadenanthera colubrina*. 61

Figura 15 - Curva analítica média do pirogalol obtida para a verificação da linearidade do método. 62

Figura 16 - Curva analítica média obtida para a verificação da linearidade do método para a matéria-prima de *A. colubrina*. 62

Figura 17 - Curvas de linearidade e especificidade. 63

Figura 18 - Espectro de varredura de 190 a 400 nm referente ao padrão catequina. 66

Figura 19 - Curva analítica média para catequina obtida para a verificação da linearidade do método. 67

Figura 20 - Curva analítica média da catequina obtida para a verificação da linearidade do método. 67

Figura 21 - Parâmetro de especificidade referente à substância catequina presente na matéria-prima de *A. colubrina*. Cromatograma da matéria-prima intencionalmente contaminada com o padrão e o espectro de varredura correspondente. 68

Figura 22 - Correlação entre o teor de taninos totais das cascas de *A. colubrina* e o índice de precipitação durante 12 meses (2014/2015). 73

Figura 23 - Cromatograma obtido por CCD-AE antes da revelação em 365 nm para detecção de catequina em cascas de *A. colubrina*. 75

Figura 24 - Cromatograma obtido por CCD-AE depois da revelação em 365 nm para detecção de catequina em cascas de *A. colubrina*. 75

Figura 25 - Cromatograma obtido por CCD-AE depois da revelação em 254 nm para detecção de catequina em cascas de *A. colubrina*. 76

Figura 26 - Fingerprint obtidos por HPLC-DAD para as 12 amostras das cascas de *A. colubrina*. 78

Figura 27 - Cromatograma da amostras (ANG 1) de *A. colubrina* e do padrão catequina mostrando o espectro de varredura com tempo de retenção em 7.08 minutos. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições do gradiente de eluição do CLAE-DAD para as amostras de *A. colubrina*. 45

Tabela 2 – Resultados em porcentagem de umidade para as amostras em triplicata das cascas de *A. colubrina*. 51

Tabela 3 - Determinação do teor de cinzas totais em cascas de *A. colubrina.* 52

Tabela 4 - Prospecção fitoquímica das cascas de *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Gris.) Alts. 57

Tabela 5 - Resultados do ensaio de repetibilidade e precisão intermediária para o método de doseamento de taninos totais em matéria-prima de *A. colubrina* por UV-VIS. 64

Tabela 6 - Teores obtidos no experimento de robustez, para os parâmetro de luminosidade, concentração de carbonato e comprimento de onda. 65

Tabela 7 - Resultados de ANOVA para variação de concentração de carbonato de sódio. 66

Tabela 8 - Resultados (teor) do ensaio de precisão para o método de quantificação do teor de catequina em matéria-prima de *A.colubrina* por CLAE. 69

Tabela 9 – Análise do parâmetro de Robustez. 70

Tabela 10 - Índice Pluviométrico em milímetros (mm) na região de Caruaru/IPA em 2014/2015. 71

Tabela 11 - Perfil sazonal do teor de Taninos totais (UV-Vis) nas amostras das casca de *A. colubrina*. 72

Tabela 12 - Teor de catequina para a avaliação do efeito sazonal observado sobre as amostras das cascas de *A.* colubrina. 79

Tabela 13 - Correlação da amostras mensais dos teores de catequina por CLAE e Taninos Totais por UV-Vis das amostras em triplicata. 82

Tabela 14 - Correlação média das amostras em triplicata dos teores de catequina das cascas de A. *colubrina* em CLAE. 83

Tabela 15 - Correlação média das amostras em triplicata de Taninos Totais por Espectrofotometria UV-Vis das cascas de *A. colubrina* 84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Período de coleta das cascas de *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul. 39

Quadro 2 – Sistemas cromatográficos empregados para obtenção do perfil fitoquímico típico das cascas de *A. colubrina.* 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD-AE: Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG: Cromatografia Gasosa
CV%: Coeficiente de Variação
DP: Desvio Padrão
DPR: Desvio Padrão Relativo
EMA: European Medicines Agency
FDA: Food And Drug Administration
FE: Fase Estacionária
FM: Fase Móvel
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HPLC-ED: High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detection
ICH: International Conference on Harmonisation
IPA: Instituto de Pesquisas Agropecuárias
LD: Limite de Detecção
LQ: Limite de Quantificação
mg/g: miligrama/grama
nm: nanômetro
OMS: Organização Mundial de Saúde
p/v: Peso/Volume
pH: Potencial Hidrogeniônico
RE: Resolução Específica
WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **17**
2 OBJETIVOS **19**
2.1 OBJETIVO GERAL **19**
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **19**
3 REFERENCIAL TEÓRICO **20**
3.1 *Anadenanthera colubrina* **20**
3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS EM *A. colubrin**a*** **24**
3.2.1. Taninos **25**
3.3 PERFIS QUÍMICOS TÍPICOS: IMPRESSÕES DIGITAIS **30**
3.4 VARIABILIDADE SAZONAL **31**
3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS **35**
4 MATERIAIS E MÉTODOS **39**
4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL **39**
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA **39**
4.2.1 Perda por Dessecação – Método gravimétrico **40**
4.2.2 Cinzas totais **40**
4.2.3 Granulometria **41**
4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA **41**
4.2.1 Obtenção dos extratos **41**
4.3.2 Sistema cromatográfico **43**
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS CASCAS DE *A. colubrina* **43**
4.3.1 Obtenção da Solução Estoque **43**
4.3.2 Doseamento de Taninos Totais por Espectrofotometria UV-Vis **44**
4.3.2.1 Solução amostra para polifenois totais **44**
4.3.2.2 Solução amostra para polifenois não adsorvidos por pó de pele **44**
4.3.2.3 *Solução padrão* **44**
4.4.3 Doseamento de Catequina por CLAE-DAD **45**
4.5 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS **46**
4.5.1 Espectrofotometria UV-Vis **46**
4.5.2 CLAE - DAD **48**
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO **50**
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA **50**
5.1.1 Perda por dessecação – Método gravimétrico **50**
5.1.2 Cinzas totais **51**
5.1.3 Granulometria **52**
5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD **57**
5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis **60**
5.3.1 Linearidade **61**
5.3.2 Especificidade **62**

5.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) 63
5.3.4 Precisão 63
5.3.5 Exatidão 64
5.3.6 Robustez 64
5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE **66**
5.4.2 Linearidade 67
5.4.3 Especificidade e pureza do pico 68
5.4.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) 68
5.4.5 Precisão 69
5.4.6 Exatidão 69
5.4.7 Robustez 69
5.5 AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE SAZONAL SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS CASCAS DE *A. colubrina* **71**
5.5.1 Perfil Sazonal de Taninos por CCD-AE 74
5.5.2 Perfil Sazonal de Taninos por CLAE 76
6 CONCLUSÃO 86
REFERÊNCIAS 87

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a análise de perfis químicos ou "*fingerprint*" tem sido empregada para identificação e avaliação da qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos. A técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Agencia Europeia de Medicamentos (EMA) e pela Food and Drug Administration (FDA), permite a detecção e/ou quantificação simultânea de marcadores químicos ou farmacológicos presentes em matérias primas vegetais e produtos derivados (ZHA et al., 2012). A impressão digital química de produtos de origem vegetal, tal como um espectro ou cromatograma, é obtida por um procedimento definido, e se trata de uma característica única que permite tipificar o perfil químico deste tipo de produto (MOK et al., 2005).

Assim, o termo *fingerprint* parte da definição que, trata-se da análise de um conjunto de amostras de forma rápida, onde um grande e diferente número de metabólitos é avaliado. A perspectiva do *fingerprint* é comparar e classificar perfis ou modelos metabólicos que podem variar em resposta a alguma modificação inerente a espécie, como por exemplo, exposição a uma toxina, perturbações genéticas ou ambientais, podendo ainda identificar substâncias discriminantes e biomarcadores. Desta maneira, o *fingerprint* pode apresentar grande destaque tanto no âmbito industrial como científico, em estudos de caracterização de espécies vegetais, com ênfase no seu controle de qualidade, para realizar a certificação de origem e verificação de autenticidade e/ou adulteração de extratos oriundos destas espécies (CABRAL, 2010).

A obtenção das impressões digitais de espécies vegetais é possível devido a métodos que podem determinar um perfil característico da composição química em drogas vegetais, dentre os quais se destacam os espectroscópicos e cromatográficos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE e a Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência – CCD-AE (TISTAERT; DEJAEGHER; HEYDEN, 2011). A espectrofotometria é um processo de medida que basicamente emprega as propriedades dos átomos e moléculas de absorverem e/ou emitirem energia eletromagnética em uma das regiões do espectro eletromagnético, sendo uma das técnicas analíticas mais amplamente empregadas, em função da robustez, custo relativamente baixo, e grande número de aplicações desenvolvidas (LOPES et al, 2012)

Uma vez que as variações sazonais podem influenciar a produção de metabólitos nas plantas, a análise qualitativa e quantitativa desses compostos é importante, especialmente em regiões com condições climáticas típicas, como é o caso de regiões como o semiárido nordestino. As evidências na literatura de plantas da caatinga que sofrem mudanças no comportamento produtivo de seus metabólitos abordam, por exemplo o fato de que em períodos relacionados a altos índices de temperaturas e baixa taxa de pluviosidade são conhecidos por aumentar a concentração de compostos fenólico (MONTEIRO et al., 2006a).

No Brasil, várias espécies são pesquisadas por suas propriedades tanantes, entre as principais estão *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão), *Dimorphandra mollis* Benth (Barbatimão-falso), *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenam (Angico), *Acacia mearnssi* De Wild (Acácia), *Psidium guajava* L.(Goiabeira) e *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) (Aroeira). (MONTEIRO et al., 2005a).

Anadenanthera colubrina var. cebil (Griseb.) Altschul (angico) é uma espécie arbórea com até 20 metros de altura, bastante representativa nas caatingas, com utilização muito diversificada: extração de tanino, uso na medicina popular, fabricação de móveis, forragens das folhas fenadas, ornamentação, entre outras (SILVA; BARBOSA, 2000). Pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, e ao gênero *Anadenanthera* que representa sete espécies, sendo alguns deles de estreita afinidade morfológica: *A. cobi, A. rigida, A. colubrina, A. gonoantha, A. macrocarpa, A. peregrina* e *A. falcata* (SARTORI, 2012).

Considerando a importância da espécie e a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para o controle de qualidade de drogas vegetais de interesses econômico e terapêutico, este trabalho teve como propósito investigar as influências sazonais sobre as propriedades físico-químicas e perfis químicos quantitativos e qualitativos dos taninos das cascas de *Anadenanthera colubrina*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da variabilidade sazonal sobre parâmetros de qualidade das cascas de *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar parâmetros de qualidade farmacopeicos para a espécie vegetal *Anadenanthera colubrina*;
- Validar metodologias para quantificação de taninos das cascas de *A. colubrina* por espectrofotometria UV-Vis e por CLAE-DAD;
- Quantificar taninos totais por espectrofotometria nas cascas de *A. colubrina*;
- Quantificar catequina por CLAE-DAD nas cascas de *A. colubrina*;
- Estabelecer as impressões digitais através de CCD-AE e CLAE-DAD para os metabólitos das cascas de *A. colubrina.*
- Avaliar a influência da variabilidade sazonal sobre o teor de taninos totais, catequina e os metabólitos secundários das cascas de *A. colubrina*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Anadenanthera colubrina*

As plantas destinadas a utilização terapêutica e obtenção de novos produtos bioativos vêm sendo gradativamente estudas, sendo essas espécies, excelentes fontes de matérias primas para a conquista de novos fármacos. Os produtos bioativos podem ser obtidos através da sua forma *in natura* (extratos e tinturas) ou através da aplicação de tecnologias que conduzam a obtenção de um medicamento a base de derivados vegetais. No Brasil a existência de uma grande variedade de espécies vegetais utilizadas, por diferentes culturas, faz com que sejam requeridos novas possibilidades de se investigar a composição química desses vegetais. Neste propósito, o conhecimento e descoberta de substâncias bioativas possibilitam a criação de novos medicamentos. (ARAÚJO, et al 2015; ALBUQUERQUE, et al 2007; SOUZA, 2011)

A variedade vegetal brasileira compreende a presença de 6 biomas bem característicos, sendo o maior deles, o da Amazônia, que corresponde a um percentual de 49,29% e o bioma da caatinga abrange uma área correspondente a 9,92% e forma basicamente toda a região nordeste do país. O Bioma descreve o conjunto de vida seja ele vegetal ou animal, caracterizando esses por seus grupamentos contíguos, pelas condições climáticas resultando em uma diversidade biológica própria (IBGE, 2004). Com toda a extensão territorial, o bioma da caatinga vem agregando estudos nos quais os interesses às espécies presentes nesta biodiversidade tornem-se fonte de investigação para novos potenciais terapêuticos. (FERREIRA, 2012).

A região do Semiárido brasileiro está situada em uma área que ocupa aproximadamente 969.000 km e está inserida dentro dos estados do nordeste, exceto o Maranhão, e nos estados do Sudeste como Minas Gerais e Espirito Santo. O ecossistema predominante na região é a caatinga, que corresponde a aproximadamente 11% do território nacional, de vegetação bastante diversificada, com espécies em geral com características lenhosas, herbáceas, contendo ou não espinhos, além das cactáceas e bromeliáceas (SILVA, 2013). A vegetação da caatinga consegue ser bem tolerante as variações climáticas na região,

apresentando períodos secos e chuvosos com variabilidade espaço-temporal, associado a baixos índices pluviométricos e eventos extremos de secas (índice pluviométricos entre 200 a 800 mm), temperaturas elevadas (acima de 20^{o}C) e déficit hídrico, o que torna muitas vezes o solo poucos desenvolvidos em função da escassez de chuvas. A flora da Caatinga possui mais de 1500 espécies podendo essas, variar de acordo com condições como: volume e intensidade de chuvas, qualidade dos solos, da rede hidrográfica e da ação antrópica. (ARAÚJO, 2011; CORREIA et al, 2011).

A importância da caatinga como bioma da região do semiárido, carrega consigo, fonte de muitos recursos naturais onde diversas espécies vegetais são amplamente utilizadas na medicina popular. As espécies vegetais produtoras de polifenois, como flavonoides e taninos, apresentam variadas aplicações industriais que vão desde as indústrias de cosméticos até a produção de alimentos com finalidades conservantes e corantes naturais (FERREIRA, 2012). Dentre as espécies presentes em nossa região destacam-se: *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira), *Amburana cearensis* (Amburama), *Erythrina velutina* (Mulungu), *Anadenanthera colubrina* (Angico) e *Sideroxylon obtusifolium* (Quixaba) (ALBUQUERQUE et al., 2007).

A espécie *Anadenanthera colubrina*, desempenha um importante papel em comunidades tradicionais na região do semiárido do nordeste do Brasil e é amplamente utilizada em diversas atividades terapêuticas como dores reumáticas, inflamações dermatológicas, úlceras externas e com ação antimicrobiana (MONTEIRO et al., 2006a). A disponibilidade da casca para uso nas atividades terapêuticas é na maioria dos casos utilizada na preparação de decoctos, infusos ou macerados, sendo administrados por via oral, e utilizados no tratamento de bronquite, gastrite, pneumonia e resfriados (SANTOS et al., 2013), tratamento de cancro, gripe, anemia e difteria (SILVA et al., 2011).

Anadenanthera colubrina var. cebil (Griseb.) Altschul pertence à família (Fabaceae-Mimosoideae), é uma espécie nativa da floresta tropical da América do Sul, que cresce em altitudes superiores a 400 m. Sua distribuição é ampla, variando, no norte da Colômbia e regiões do Brasil (SANTOS, 2013), como a Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (GBIF, 2015). Na região nordeste é bastante comum a presença da espécie nos estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande

do Norte e Sergipe. O gênero *Anadenanthera* foi estabelecido por J. P. M. Brenan no ano de 1955 e em 1964 através de uma revisão taxonômica, o pesquisador Siri Von Reis Altschul estabeleceu que o gênero *Anadenanthera* é composto por duas espécies: *Anadenanthera peregrina* e *Anadenanthera colubrina*. *A. colubrina* compreende as variedades *A. colubrina* var. colubrina Altschul e *A. colubrina* var. cebil (Griseb) Altschul. As espécies podem ser encontrada também pelos sinônimos *Acacia cebil, Acacia colubrina*, *Anadenanthera macrocarpa* (MORIN, 2015; SILVA, 2013).

As espécies de angico possuem a parte periférica dos troncos pardo-rosado, cerne pardo-avermelhado podendo variar de coloração que vai de castanho-rosado até castanho-escuro. De sabor levemente adstringente, madeira pesada e dura (SARTORI, 2012). O angico pode crescer até 25 m de altura, com um diâmetro de tronco em torno de 60-90 cm, apresenta casca espessa de coloração acinzentada, e aspecto liso ou espiculado, e com folhas que variam em comprimento de cerca de 7-20 cm compostas de folíolos rígidos. As flores são de cor creme e floresce o ano todo, as vagens são simples e contêm cerca de 8 a 15 sementes cada. As sementes são planas, cada uma com cerca de 1,5 cm de diâmetro e de apresentação achatada (EOL, 2015; SILVA, BARBOSA, 2000; SANTANA et al., 2010; WEBER et al., 2011). No nordeste brasileiro, apesar de uma grande variedade de espécies produtoras de taninos, *Anadenanthera colubrina* continua a ser usada como uma das principais fontes deste metabólito secundário para aplicação em curtumes, fabricação de móveis, forragens das folhas fenadas, ornamentação. (SARTORI, 2012)

Diversos trabalhos encontrados na literatura relatam a indicação da espécie para o tratamento de dores reumáticas, úlceras externas e com ação antimicrobiana. A atividade antifúngica foi evidenciada através da ação inibitória do extrato hidroalcoolico de *A. colubrina*, indicando bom potencial fungistático (ROCHA, 2014) Weber e colaboradores (2011) e Araújo et al. (2015) relatam o uso das cascas ou caule do angico através da administração oral por infusões, decocção e xaropes no tratamento de inflamações na garganta, complicações no fígado, gonorreia, leucorreia, infecção dos ovários, gonorreia e no processo depurativo do sangue. O xarope das cascas de *A. colubrina* é administrado por via oral em indicações de problemas de bronquite e angina. A espécie também possui atividade antitumoral

relatada, quando relacionado à indicações populares (MONTEIRO et al 2007; SILVA, 2013). O uso tópico também é relatado através do “cataplasma” usando folhas aquecidas em manteiga ou azeites indicado para o tratamento de inflamações dermatológicas e úlceras externas. (ARAÚJO, et al 2015).

Figura 1 - *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul localizada na Estação Experimental José Nilson de Melo – IPA Caruaru (A); Obtenção das cascas de *A. colubrina* (B); Partes aéreas da *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul observando as folhas e os frutos (C); Caule de *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul apresentando casca espessa de coloração acinzentada, e aspecto espiculado

Fonte: próprio autor

Com relação à investigação fitoquímica das diversas partes de *A. colubrina*, a literatura relata a presença de taninos condensados e hidrolisados, flavonoides. (GUTIERREZ-LUGO et al., 2004). Araújo e colaboradores (2015) analisaram o perfil químico de amostras de cascas de *A. colubrina* coletada na região agreste do estado do Rio Grande do Norte indicando a presença dos flavonoides quercetina e luteonina. No cerne da madeira já foram descritos a presença de esteroides (ß-sitosterol e ácido palmítico) e triterpenoides (lupeol e lupenona); nas folhas foram relatados a presença de flavonoides, aminoácidos e alcaloides indólicos. Além disso, catequina, epicatequina e seus enatiômeros, já foram relatados como os principais componentes da espécie (MAIA, 2008).

3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS EM *A. colubrina*

Metabólitos secundários são amplamente distribuídos em todas as plantas superiores apresentando importantes papeis na defesa contra patógenos, animais herbívoros e ainda atuam como resposta a várias condições de estresse abióticas, como a precipitação e radiação ultravioleta. Valendo-se da importância farmacêutica, os grandes números elevados desses compostos levam a importantes fontes farmacologicamente ativas. Devido a esta diversidade, os polifenois estão presentes nos tecidos de plantas, principalmente como glicosídeos e/ou associados à ácidos orgânicos ou mesmo moléculas polimerizadas como complexos com pesos moleculares elevados (DAGLIA, 2013; NETO, et al 2015).

Esses compostos são comumente encontrados em partes comestíveis e não comestíveis das plantas, agregando vários efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante. A atividade antioxidante de compostos fenólicos é relacionada às suas propriedades redox, que podem desempenhar um papel importante na adsorção, neutralização dos radicais livres e decomposição peróxidos, atividade protetora na eliminação de radicais, propriedades quelantes e de inibição ou redução de enzimas tais como, telomerase, ciclooxigenases e/ou lipoxigenases. Além disso, mais recentemente, tem sido observadas interações destes compostos com vias de transdução de sinais e receptores celulares (DAGLIA, 2013; SILVA et al., 2011).

Os antioxidantes presentes nas espécies vegetais são compostos característicos de serem alvos na pesquisa e no controle de qualidade de drogas vegetais. Os mesmos podem estar relacionados a condições de estresses ambientais ou até mesmo quando há alterações nos estágios de desenvolvimento morfológicos provocados muitas vezes por condições anormais como quantidade de água, temperatura ou salinidade. Frente a esses fatores as plantas conseguem desenvolver mecanismos antioxidantes relacionados à defesa em virtude dessas condições. (ARAÚJO et al., 2015)

Os compostos fenólicos possuem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel benzênico (polifenois) podendo possuir múltiplos anéis fenólicos em sua estrutura e serem divididos em classes de acordo com o número de anéis fenólicos e os elementos estruturais que ligam estes. Dentre os principais representantes fenólicos

estão presentes os taninos, flavonoides e as cumarinas (ARCHELA; DALL'ANTONIA, 2013).

3.2.1. Taninos

O termo tanino foi primeiramente empregado como substâncias de origem vegetal, com propriedades de curtir a pele de animais já em estado de putrefação e com características de pouca permeabilidade. Em algumas espécies de vegetais, pode conferir entre 2 e 40% de massa seca, é amplamente distribuídos dentro do reino vegetal, sendo bastante difundidos em espécies de angiospermas e gimnospermas. Entre as espécies produtoras de taninos, o angico é uma das que mais se destaca na composição de polifenois. Taninos são compostos fenólicos solúveis em água e com capacidade de precipitar proteínas, formados através do metabolismo secundário, solúveis em água e presente em várias partes das plantas. Os taninos extraídos de casca e cerne de plantas podem atingir até 50% de massa seca através de extratos com diferentes solventes, tendo uma boa solubilidade em meio aquoso, em temperaturas que variam entre 70 a 105 ºC, agregando uma boa eficiência e economia. Podem ser, de acordo com as suas estruturas químicas, divididos em taninos hidrolisados e taninos condensados. (BEZERRA, 2012; GRASEL, FERRÃO, WOLF, 2015; PAES et al, 2013; SANTOS, 2012; SARTORI, 2012; VERZA, 2012).

Taninos hidrolisados são ésteres de um açúcar central e de ácidos fenólicos, principalmente ácido gálico e ácido elágico, formados a partir da via do chiquimato, sendo promtamente hidrolizados em condições ácidas ou básicas. A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poliol, usualmente D-glicose, com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) e pelo ácido hexadihidroxifênico (elagitaninos) (HUGERMAN, 2002; SANTOS, 2012).

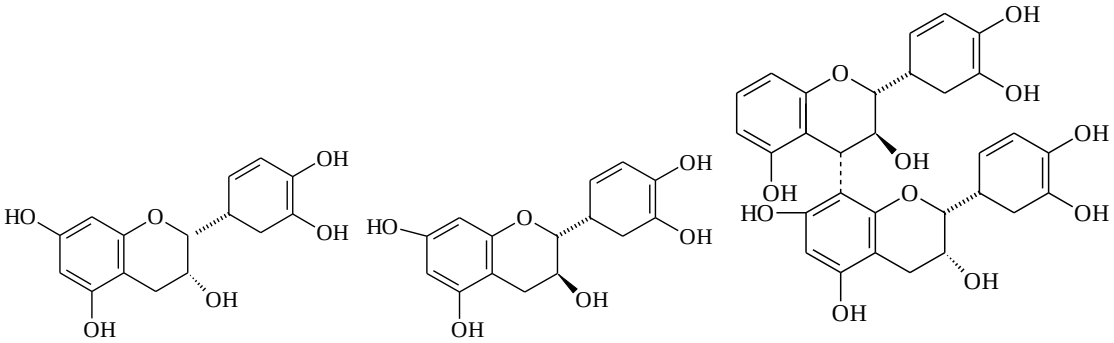
Os taninos condensados, referidos também como proantocianidinas, e ainda como taninos complexos, são os taninos que apresentam ampla ocorrência. São quimicamente bastante reativos com proteínas, em sua forma não-oxidada, podendo os mesmos serem quantificados através de precipitação proteica e formam pontes de hidrogênio de forma intra e intermoleculares. São formados a partir do produto da biossíntese do fenilpropanol. As proantocianidinas possuem a característica de

apresentar pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delfinidina; destacam-se com relação a sua diversidade estrutural; podem agregar substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e a estereoquímica. (BRUYNE, 1999; FRAZIER et al., 2010; MONTEIRO et al., 2005b; SARTORI, 2012).

Os taninos condensados ou protocianidinas (Figura 2) são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e ou flavan-3,4-diol com ligações formadas em C4–C8 ou C4–C6 e dentre essas unidades destacam-se a catequina e a epicatequina. A catequina é constituída por um anel flurogluciono1, um anel pirânico e um anel cacetol, possuindo centros quirais e dessa forma apresentam-se como (+) ou (-) catequina e (+) ou (-) epicatequina. São compostos hidrossolúveis, de sabor amargo e adstringente. (BEZERRA, 2012; MONTEIRO; ALBUQUERQUE, 2005; VERZA, 2006)

O desempenho em importantes ações do metabolismo biológico das plantas conferem aos taninos condensados a regulação e influência em processos como o ciclo do nitrogênio, digestão de nutrientes e metabolismo em animais. O interesse no uso de plantas que contenham taninos condensados está em constante crescimento e isto inclui a necessidade de procura de novas fontes de compostos (LI et al., 2014).

Figura 2 - Estrutura dos monômeros taninos condensados.



Fonte: próprio autor

Dados de Sartori (2012) relatam que os taninos condensados estão relacionados com a defesa contra microrganismos patogênicos, conferindo a planta uma durabilidade maior da madeira e atividade germicida. Podem conferir a planta,

papel importante na sua manutenção e consequentemente proteção a ações de estresses ambientais como a seca prolongada e baixa fertilidade.

Os taninos condensados podem conter de duas a cinquenta unidades flavonoides, estruturalmente complexas, resistentes à hidrólise e solúveis em solventes orgânicos e aquosos. Considerando a sua importância, os taninos respondem por aproximadamente metade dos compostos da casca da *Anadenanthera colubrina* e constituem a segunda maior proporção de polifenois do reino vegetal. (SANTOS, 2012). Estudos de Bezerra (2012) conferem a importância na quantificação catequina como marcadores para controle de qualidade de fitoterápicos.

Estudos de MONTEIRO et al., (2005b) acerca dos teores de taninos obtidos a partir dos extratos de casca em diferentes farmacógenos de *A. colubrina*, mostraram teores quantificados de 16,04 a 55,34 mg (3,21 a 11,07%). Oliveira e colaboradores, (2010) avaliaram teor de substâncias fenólicas na madeira de *A. colubrina* sendo quantificado 0,231 mg. O estudo de Paes e colaboradores (2010) indicou a presença de taninos na casca do tronco (13,95%), seguida pela proporção encontrada nos frutos sem sementes (10,75%) e nas raízes (10,37%). Outro estudo, realizou a estimativa de compostos fenólicos revelando que extrato hidro alcoólico de *A. colubrina* apresentou teor de 578 ± 5,03 mg/g (SILVA; JUNIOR, 2011).

3.2.2 Quantificação de Taninos

Os métodos para quantificação dos taninos podem ser avaliados através de métodos colorimétricos, análises por CLAE e CCD. O uso de metodologias analíticas como CLAE e CCD permitem a separação ou isolamento, conhecimento da composição química, identificação de princípios ativos ou ainda os compostos tóxicos das plantas de substâncias extrativas vegetais tornando os resultados mais rápidos e simples. O emprego dessas técnicas é aliado na obtenção de resultados que compõem o controle de qualidade das espécies, proporcionando uma padronização do material vegetal. (MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Os métodos disponíveis para quantificação de taninos totais incluem: Folin-Ciocalteau após precipitação por proteínas, Azul da Prússia, KIO_3, $NaNO_2$

enzimático para perfis biológicos de elagitaninos. As interações das proteínas com os taninos constituem a relação entre a estrutura molecular, ponto isoelétrico e glicolisação das proteínas, enquanto que a relação dos taninos com as proteínas envolvem o tamanho da molécula (complexação inicial, capacidade de precipitação). (MONTEIRO et al., 2005a; SARTORI, 2009; VERZA, 2012).

O método de Folin-Ciocalteau é bastante utilizado na quantificação de taninos totais em drogas vegetais devido ao seu baixo custo e praticidade. A intensidade de complexo de cor azul está relacionada com a presença compostos fenólicos mediante a formação do composto azul derivados da redução do reagente pelas hidroxilas fenólicas em meio alcalino à óxido de tungstênio e óxido de molibdênio (VERZA, 2009; SILVA; JUNIOR, 2011). Através desses óxidos formados é possível a quantificação da absorbância da solução na região do visível com comprimento de onda em 760 nm (CRUZ, 2008).

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica que pode ser utilizada na quantificação de taninos em espécies vegetais tanantes. Esta técnica físico-químico permite separar os componentes de uma mistura entre duas fases em contato íntimo através da migração diferencial das substâncias entre a fase móvel e a fase estacionária. A facilidade de separação, identificação e quantificação de espécies químicas, torna a CCD um instrumento analítico de fácil acesso, baixo custo, rápida e eficaz e deste modo bastante utilizadas dentro do âmbito do controle de qualidade de espécies vegetais por retratar uma metodologia para a caracterização simples e confiável para o estabelecimento de perfis fitoquímicos de espécies vegetais. Através de análises por CCD é possível avaliar variabilidades em perfis químicos de materiais vegetais para identificação e estudo de influencia de fatores tais como a sazonalidade , ou ainda, origem geográfica ou e condições de cultivo (BRAZ et al., 201; WOLF, 2008).

A metodologia apresenta avanços que podem evidenciar os constituintes de drogas vegetais, podendo fornecer dados qualitativos e quantitativos, sendo denominada de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE). Além disso, tem a capacidade de fornecer dados de várias amostras simultaneamente, fornecendo dados sobre o controle de qualidade atribuindo vantagens reais sobre gastos de solventes, valorizando a relação tempo e economia das análises. A contribuição analítica da técnica é extremamente útil no controle de

qualidade e a adoção dela é amplamente difundida em farmacopeias como a portuguesa, espanhola e americana (BRAZ et al., 2011; LOESCHER et al., 2014).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma importante técnica de separação de misturas, que emprega colunas fechadas com fases estacionárias na forma de partículas de granulometria reduzida e homogênea, proporcionando separações eficientes dos componentes de uma mistura complexa. (FIGUEREDO, 2012). Utilizada para finalidades quantitativas e qualitativas, devido a sua boa sensibilidade e boa possibilidade de separação de compostos, não sendo limitada pela volatilidade, estabilidade do composto da amostra termicamente instáveis. Trata-se de um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura realizada através de uma fase estacionária e uma fase móvel, definindo assim as afinidades diferenciais dos componentes da mistura por cada fase (GOMES, 2009).

A CLAE é uma técnica bastante significativa na composição de análises de produtos naturais e consequentemente quando se deseja a identificação de compostos fenólicos, monômeros de taninos condensados (SANTOS, 2012). A composição da fase móvel, concentração de tampão e pH, comprimento de onda de detecção, temperatura do forno da coluna, volume de injeção, concentração da amostra, condições da bomba de pressão fatores que são levados em consideração para um bom desempenho e obtenção de um cromatograma (GOMES, 2009; BEZERRA, 2012).

A CLAE pode ser realizada através da diferenciação dos elementos da Fase Estacionária (FE). As colunas empregadas em CLAE de Fase Reversa (FR) possuem uma camada orgânica apolar ligada quimicamente a um suporte cromatográfico devendo os poros terem um diâmetro apropriado para o tamanho do analito e boa conectividade para permitir uma alta taxa de transferência de massa, deve ter boa resistência térmica, mecânica e quimicamente à degradação. A retenção em colunas de fase reversa se dá pela interação hidrofóbica entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária. A separação dos componentes químicos de uma amostra deve seguir o requisito primordial que é a seletividade. Nas separações por CLAE, a seletividade é influenciada por quatro variáveis: a fase estacionária; a composição da fase móvel; as condições físicas (temperatura e

pressão) e, a natureza dos compostos a serem analisados (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).

Os inúmeros relatos acerca da análise por CLAE permite que a técnica seja uma das mais empregadas na determinação da “impressão digital” de matrizes complexas, como as espécies vegetais (RIBEIRO, 2010). Yongyu et al 2011, Tistaert; Dejaegher; Heyden, 2011; Ferreira, 2016, especificam o fingerprint por CLAE e CCD-AE como técnicas de referência e apropriadas para o controle de qualidade de drogas vegetais, recomendados por Farmacopéias Chinesa e Européia. Laghi et al 2010.

3.3 PERFIS QUÍMICOS TÍPICOS: IMPRESSÕES DIGITAIS

Técnicas analíticas modernas são utilizadas atualmente no controle de qualidade na composição dos metabólitos secundários das plantas, para avaliar a constância e uniformidade na sua composição e para que seja possível a garantia e a padronização do material vegetal (CABRAL, 2010). A análise de impressões digitais através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) tem sido aceita internacionalmente pela World Health Organization (WHO) e Food and Drug Administration (FDA) como um método eficiente e com o objetivo de controlar a qualidade dos medicamentos à base de plantas através da identificação de marcadores. (CAO et al., 2006; JOTHY; YENG; SASIDHARAN, 2013).

Uma impressão digital pode ser definida como um perfil característico refletindo a composição química da amostra analisada e pode ser obtido por métodos espectroscópicos e técnicas cromatográficas. As informações obtidas podem auxiliar na identificação, classificação de espécies, condições de otimização das técnicas cromatográficas utilizadas na obtenção do perfil químico través da aplicação dos dados obtidos e consequentemente a obtenção das impressões digitais. A obtenção de *fingerprint* por cromatografia permite, independente dos extratos utilizados, a identificação dos compostos fitoquímicos das plantas por se tratar de um método eficaz (JOTHY; YENG; SASIDHARAN, 2013).

A “impressão digital” obtida por cromatografia líquida utilizando detectores ultravioleta (CLAE-UV) e arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), tem vigorado como uma técnica adequada por ser uma ferramenta adequada à separação dos compostos de uma matriz complexa (TISTAERT; DEJAEGHER; HEYDEN; 2011; YONGYU et al., 2011). Com o fornecimento de dados pelos quais as técnicas cromatográficas fornecem, torna-se neste caso a utilização de tratamentos estatísticos que se tornam essenciais no estudo dos resultados. (GOMES, 2009)

A obtenção de dados qualitativos e quantitativos de drogas vegetais por meio do fingerprint dá condições de identificar propriedades holísticas relacionadas a processos de extração, comparação da similaridade, concentração do analito e avaliar a presença de metabólitos em amostras de diferentes localidades e perfís. O conhecimento dessas impressões digitais são essenciais para a identificação dos constituintes químicos das plantas e para assegurar a repetibilidade e confiabilidade (CABRAL, 2010; YONGYU et al., 2011; JOTHY; YENG; SASIDHARAN, 2013). Adulteração é outro ponto primordial na qualidade dos medicamentos e pode causar uma grande variabilidade dos ingredientes ativos, colocando em risco a saúde e segurança (TISTAERT, DEJAEGHER, HEYDEN; 2011).

Quando se trata do fator de qualidade dos medicamentos fitoterápicos, a relação entre os constituintes químicos e seus efeitos terapêuticos devem contribuir para verificação das variantes sazonais e com isso levar a uma boa eficácia do medicamento a ser produzido. Dois fatores essenciais que estão envolvidos no desenvolvimento de um método de impressão digital são: a obtenção de informação mais eficaz e estável, e avaliar a semelhança/diferença dos resultados obtidos com auxílio de métodos quimiométricos (YONGYU et al., 2011).

3.4 VARIABILIDADE SAZONAL

Algumas espécies de plantas são capazes de se desenvolverem sob condições de multi-estresse e muitas vezes associados às mudanças marcadas por fatores ambientais. Fatores associados à condição antioxidantes das plantas são proporcionados muitas vezes por variações sazonais e em espécies vegetais superiores, a modificação atribuída é muitas vezes associada a um aumento de

espécies reativas de oxigênio nas células da espécie. (LÓPEZ-ORENES et al, 2017).

A produção dos metabólitos secundários pode ser influenciada por situações ambientais de caráter duradouro ou temporais rápidas, muitas vezes simultâneos e que causam perturbações no metabolismo das plantas, dentre eles os mais comuns são a temperatura, pluviosidade, altitude e época estacional. Estes fatores tendem a interferir de forma significativa no metabolismo desses compostos atribuindo uma interface química entre as plantas e o ambiente em que está inserida e portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais. O estudo sobre as influências dos fatores citados sobre a capacidade das plantas em produzir os metabólitos essenciais para obtenção de medicamentos fitoterápicos é restrito a uma pequena parcela de grupos vegetais. É evidenciado que o fator mais importante de constituintes químicos como taninos, flavonoides, terpenos e alcaloides é a época do ano em que são realizadas as coletas do material vegetal. Outros fatores de grande importância são as condições de produção, coleta e estocagem da planta (CZELUSNIAK et al., 2012; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; LOURA, 2015).

Mudanças nas condições ambientais podem provocar alterações no comportamento fisiológico das plantas nos quais são mobilizadas enzimas e substâncias, com o intuito de proteger, eliminar substâncias inapropriadas a sua espécie e promover atividade antioxidante. Os fatores urbanos podem afetar a integridade das plantas de modo a induzir modificações metabólicas nas células vegetais. (BULBOVAS, 2005). De fato, é de se evidenciar que o efeito da sazonalidade contribui com grande influencia na manutenção conjunta do metabolismo secundário das plantas. A temperatura, bem como o solo contribuem em papel relevante ao papel fisiológico de vegetal e esses fatores por exemplo atuam variavelmente em espécies produtoras de óleos essenciais. (SOLETTI, 2015)

O controle de qualidade de produtos naturais está bastante ligado às condições de variabilidade sazonal de um determinado metabólito. Este controle é extremamente importante e deve ser levado em consideração quando pretende-se avaliar as variações existentes em uma espécie vegetal na presença de metabólitos de interesse. Aspectos como condições de cultivo, coleta e clima podem mostrar dados importantes sobre esses metabólitos de interesse, principalmente quando se

deseja a produção de medicamentos fitoterápico mais efetivos e com boa atividade biológica. (TISTAERT; DEJAEGHER; HEYDEN; 2011).

A definição de parâmetros farmacognósticos básicos (identificação botânica, caracterização macro e microscópica, cinzas totais e insolúveis, teor de extrativos e índice de espuma), associados a um desenvolvimento analítico e de validação para propor uma metodologia de controle de qualidade, podem ser extremamente importantes. Com o intuito de garantir a padronização completa de um produto fitoterápico, devem ser consideradas as necessidades do conhecimento da influência de fatores sobre a sua qualidade química. A variabilidade ao longo das estações do ano (verão e inverno), época e horário de colheita e quantidade de água na planta podem influenciar o produto fitoterápico o qual se deseja (VIGO et al., 2004).

3.5 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE OS TEORES DE TANINOS TOTAIS E CATEQUINA

O controle de qualidade realizado em drogas vegetais está ligado a variações que podem ser ocasionadas diferenças de clima, condições de cultivo, tempo, secagem, armazenamento. Dessa forma, quando compostos marcadores são utilizados, algumas variações ou diferenças nas concentrações podem ser evidenciados e a necessidade de classificação estatística é essencial a segurança do produto e aplicação do coeficiente de correlação para as impressões digitais geralmente pode ser aplicado. A semelhança varia entre 0 e 1, onde 0 não significa nenhuma semelhança entre as Impressões digitais e 1 impressões digitais idênticas. Além da análise de similaridade com base na impressão digital completa, o tempo de retenção relativo e a área relativa do pico de picos característicos também podem ser usados (TISTAERT, DEJAEGHER, HEYDEN, 2011).

Uma das medidas estatística na avaliação entre duas amostras é definida como Coeficiente de Correlação de Pearson (r). As duas medidas são expressas em termos de “x” e “y” e podem ser medidos ao longo do tempo e dessa forma a influência de uma variável depende do tempo sobre a outra. As duas variáveis se associam estatisticamente apresentando semelhanças na distribuição ou através de um modelo linear, supondo que o aumento ou diminuição de uma das variáveis, gera

um impacto na outra variável. O Coeficiente de Correlação de Pearson possui propriedades que não diferenciam entre variáveis independentes e variáveis dependentes e neste casso o valor entre X e Y é o mesmo entre o Y e o X; o valor “R” não muda quando se muda a variável mensurada e tem um caráter adimensional. O coeficiente de correlação de Pearson assume valores entre -1 e 1, onde -1 significa uma correlação negativa perfeita levando-se em consideração as duas variáveis envolvidas, enquanto o 1significa uma correlação perfeita positiva (JOSÉ, 2012)

Estudos de Rezende (2012) avaliou o estabelecimento da relação entre os compostos fenólicos da espécie *S. jambos* sob condições sazonais nos períodos secos e chuvosos. Zeggio, (2016) avaliou através da correlação, teores de polifenóis em própolis frente a variáveis ambientais como temperatura e altitude. Valores de correlação entre a temperatura o teores de fenóis totais apresentaram valores negativos de 0,29. Bueno, (2010) relacionou os teores de polifenóis totais e taninos totais na influencia entre a capacidade antioxidante e esses compostos secundários.

A produção de metabólitos nas plantas está sujeita a condições de períodos de estações secas ou chuvosas e esses efeitos podem ser curtos ou duradouros. As chuvas tendem a resultar em perdas de substâncias hidrossolúveis. (REZENDE, 2012). A composição de compostos fenólicos frente às atividades antioxidante são mais evidenciadas quando se avalia a correlação de dados nas estações de primavera e verão e a sinergia entre eles é mais eficiente e produz maiores concentrações de metabólitos do que estações de outono e inverno. (ZEGGIO, 2016). É relatado a presença de uma correlação positiva quando avalia-se intensidade de radiação solar em diferentes espécies de plantas e a produção de compostos fenólicos tais como flavonoides, taninos e antocianinas. A correlação de Pearson foi empregada para avaliar a relação existente entre os fatores climáticos com o teor de timol e carvacrol e para avaliar a relação existente entre flavonoides e a atividade antioxidante. (SOUZA, 2015)

Valores de ρ maiores que ±0,70 indicam correlação significativa e desse modo podem ser atribuídas conclusões significativas sobre o comportamento das variáveis. Valores entre ±0,30 e ±0,70 indicam correlação de moderada a fraca e

valores de correlação situados na faixa 0,00 e ±0,30 indicam correlação muito fraca e em alguns casos, desprezível. (CRESPO, 2013; EMERENCIANO et al, 2013)

3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Os processos de validação visam a obtenção de uma comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, permitindo informações confiáveis e interpretáveis das amostras. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. (RABANI et al., 2004).

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método, neste caso estão incluídos os equipamentos, instrumentação específica e reagentes (RIBANI et al., 2004). O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito e em casos de adaptações, deve gerar dados confiáveis e precisos. Algumas situações devem ser estudadas quando são necessárias: adaptações na metodologia já validada, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (BRITO et al., 2003; CDER, 1994; DICLA/CGCRE, 2010).

No Brasil, a validação é um processo regulamentado pela RE 899/03 e faz indicação sobre a proposta do método em ser apropriado em sua finalidade, bem como sofre ajustes metodológicos em um já existente. Trata-se de um processo sistematizado, que permite que a execução do processo analítico siga os critérios estabelecidos pelas legislações vigentes, permitindo que os procedimentos analíticos sejam reprodutíveis em diferentes laboratórios, de forma precisa e exata, dentro dos limites de confiança (MONTEIRO, 2016). O dado analítico, independente da técnica utilizada deve ser isento de interferências sobre a espécie em questão, ou pelo menos uma interferência possível de ser avaliada (MEDEIROS, 2006).

O “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA preconiza os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

ESPECIFICIDADE

Define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz, envolvendo a adição de padrão analítico (BRITO et al., 2003), e de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

LINEARIDADE

Capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A RE 899/03 recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo, 5 concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser ≥ 0,99 de acordo com as curvas obtidas experimentalmente através do tratamento matemático (BRASIL, 2003).

LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Limite de Detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, enquanto o Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito da amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LD avalia mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos e pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. O LQ avalia o sinal/ruído somente para processos analíticos que exibem linha de base. Efetua-se a determinação da razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra em baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, podendo assim avaliar a quantidade mínima possível do analito quantificado (BRASIL, 2003; BRITO et al., 2003). As equações utilizadas no processo de validação são preconizadas pelo ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2003).

PRECISÃO

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão para fármacos e medicamentos são recomendados a serem realizados nos níveis de 80, 100 e 120% como indicado na orientação para a apresentação de amostras e dados analíticos e deve ser realizada como: repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes; e, a reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial), concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica.. A precisão de um método analítico deve expressar além dos valores de teor, o Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DPR%) (BRASIL, 2003).

EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Ao lado da precisão, expressa um nível de confiança dentro de certos limites. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; e, adição padrão (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

ROBUSTEZ

Segundo a Anvisa (BRASIL, 2003), a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal e seu desenvolvimento metodológico. Se as mudanças estabelecidas estiverem dentro dos

limites de exatidão, e precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e pode ser incorporado ao procedimento (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As cascas de *Anadenanthera colubrina* foram coletadas no município de Caruaru – PE, nas dependências da Estação Experimental do Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA. A localização geográfica correspondente ao local de coleta está registrada em: Latitude (-8,24^{o}) e Longitude (-35,91^{o}). As coletas das cascas foram realizadas sempre no mesmo horário, no período da manhã, entre 8:00 e 9:00 e mantidas a temperatura ambiente. Em seguida, foram levadas ao Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

As cascas foram submetidas à secagem em estufa (modelo 82/480, Lucadema®) a 40 °C, durante 48 h, e posteriormente pulverizadas em moinho industrial (tipo Willye, TE-680, Tecnal®).

Os materiais foram coletados conforme o Quadro 1 e a exsicata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA-PE), sob nº 89757, sendo classificado o seu nome científico como *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul.

Quadro 1 - Período de coleta das cascas de *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul.

COLETAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MÊS/ANO	JULHO/2014	AGOSTO/2014	SETEMBRO/2014	OUTUBRO/2014	NOVEMBRO/2014	DEZEMBRO/2014	JANEIRO/2015	FEVEREIRO/2015	MARÇO/2015	ABRIL/2015	MAIO/2015	JUNHO/2015

Fonte: próprio autor

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

O controle de qualidade físico-químico das cascas de Angico foi realizado de acordo com os métodos preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5 (2010). Os

ensaios realizados foram: determinação de umidade, cinzas totais e análise granulométrica por tamisação. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados expressos como média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

4.2.1 Perda por Dessecação – Método gravimétrico

Foram pesados aproximadamente 2 g das amostras em pesa-filtros, previamente dessecados durante 30 minutos, a 105 ºC. Com auxílio de uma pinça metálica, os pesa-filtros foram colocados em estufa, durante 2 horas. Em seguida, os pesa-filtros foram resfriados à temperatura ambiente em dessecador e pesados. Após a 1ª pesagem, os pesa-filtros foram recolocados em estufa por mais 1 hora, resfriados e novamente pesados. O procedimento foi repetido até alcançar peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual segundo a equação (1):

$$\mathbf{PD} = \frac{\boldsymbol{P1 - P2}}{\boldsymbol{Pa}} \boldsymbol{X100} \quad (\mathbf{1})$$

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

4.2.2 Cinzas totais

Foram transferidos 3 g de droga vegetal para cadinhos previamente dessecados e tarados, distribuindo a droga uniformemente no fundo do cadinho e, estes foram levados a mufla para incineração, utilizando-se gradiente de temperatura de 30 minutos a 200 ºC ± 25 ºC, 60 minutos a 400 ºC ± 25 ºC e 90 minutos a 600 ºC ± 25 ºC. Após esse período, os cadinhos foram retirados da mufla e deixados esfriar em dessecador para pesagem; em seguida, as amostras foram recolocadas na mufla à temperatura de 600ºC até apresentar peso constante. Os resultados foram expressos em cinzas totais segundo a equação (2):

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

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

4.2.3 Granulometria

Para a determinação da granulometria foram pesados cerca de 25 g de cada amostra e foram submetidas à passagem através de tamises, previamente tarados, com abertura de malha de 850, 600, 425, 250, 150 e 125 µm e a base sem abertura. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 min em tamisador (Bertel®). Logo após este processo, as frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas. Os dados foram analisados através de métodos gráficos, construindo-se um histograma de distribuição e curvas de retenção e passagem para determinação do diâmetro médio das partículas.

4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

4.2.1 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos sob refluxo a 85 ^{o}C utilizando metanol como solvente e 1 g de droga vegetal, durante 15 minutos. Em seguida, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro qualitativo.

A prospecção fitoquímica por CCD foi realizada para os seguintes grupos de metabólitos secundários: alcaloides, cumarinas, saponinas, terpenos e esteroides, açúcares redutores, flavonoides, derivados cinâmicos, taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os sistemas de fases móveis e reveladores foram baseados nas metodologias propostas por Wagner e Bladt (2001) e os padrões correspondentes a cada classe encontram-se descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Sistemas cromatográficos empregados para obtenção do perfil fitoquímico típico das cascas de *A. colubrina*.

Classe de metabólito	Sistema	Padrão	Revelador
Taninos hidrolisáveis	AcOEt:HCOOH: H_2O(90:5:5)	Ácido gálico	Cloreto férrico
Taninos condensados	AcOEt:HCOOH: H_2O(90:5:5)	Catequina	Vanilina Clorídrica
Flavonoides	AcOEt:HCOOH:H_2O(90:5:5)	Quercetina Rutina	NEU +PEG
Alcaloides	AcOEt:HCOOH:AcOH:H_2O (100:11:11:26)	Pilocarpina	Dragendorff
Terpenos e Esteróides	Tolueno: AcOEt (70:30)	B-sitosterol	Lieberman Buchard
Derivado cinâmicos	AcOEt:HCOOH:H_2O(90:5:5)	Ác. Clorogênico Ac. Cafeico	NEU + PEG
Cumarinas	EtOEt:Tolueno:AcOH10%(50:50:50)	Cumarina	KOH + UV
Saponinas	AcOEt:HCOOH:AcOH:H_2O (100:11:11:26)	Escina	Lieberman + Δ
Antraquinonas	AcOEt:HCOOH:AcOH:H_2O (100:11:11:26)	Senosídeo B	HNO_3/KOH
Açúcares Redutores	AcOEt:HCOOH:AcOH:H_2O (50:20:10:10)	D-Glicose D-Frutose	Timol 0,5% + H_2SO_4 + Δ

AcOEt = Acetato de etila; HCOOH = Ácido fórmico;H_2O = Água;AcOH = Ácido acético;MeOH = metanol;EtOEt = Éter etílico; NEU = ácido etilborilaminoéster a 1% em metanol; PEG = Propilenoglicol; UV = ultravioleta.
Fonte: próprio autor

4.3.2 Sistema cromatográfico

Foram utilizadas cromatoplacas de sílica gel 60 F_{254} com 0,25 mm de espessura adsorvida em suporte de alumínio (Merck®) de dimensões 20 x 10 cm. A aplicação das amostras e dos padrões nesta etapa foi realizada manualmente. A cuba cromatográfica (Camag®) com as dimensões 20 x 10 cm foi saturada previamente com as respectivas fases móveis pelo menos 1 hora antes de cada processo de separação.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS CASCAS DE *A. colubrina*

O método realizado para quantificação do teor de taninos totais em cascas de *Anadenanthera colubrina* foi baseado na descrição de monografias presentes em códigos oficiais Farmacopeia Britânica (2008), Farmacopeia Europeia (2012) e Farmacopeia Brasileira (2010).

Em relação à metodologia para quantificação de catequina, por CLAE-DAD, foi baseada no método desenvolvido e validado no Laboratório de Farmacognosia (UFPE).

4.3.1 Obtenção da Solução Estoque

Foram pesados 0,75 g da droga pulverizada e transferidos para um balão de fundo redondo de 250 mL com boca esmerilhada. Em seguida, foram adicionados 150 mL de água destilada e a mistura (droga + solvente) foi aquecida em banho-maria, sob refluxo, durante 30 minutos, à temperatura de 85 - 90 °C. Ao final, o balão foi resfriado em água corrente e a mistura transferida para um balão volumétrico de 250 mL. O balão de fundo redondo foi lavado e as águas de lavagem foram transferidas, com todo conteúdo de droga vegetal, para o mesmo balão volumétrico. O volume foi aferido com água destilada. Esperou-se decantar, e por fim, a solução foi filtrada em papel de filtro, desprezando-se os primeiros 50 mL do filtrado. Essa solução foi denominada de Solução Estoque (SE).

4.3.2 Doseamento de Taninos Totais por Espectrofotometria UV-Vis

4.3.2.1 Solução amostra para polifenois totais

Uma alíquota de 5 mL da SE foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume aferido com água destilada. Desta solução, foram transferidos 2 mL para um balão volumétrico de 25 mL, adicionado 1 mL do reagente Folin-Ciocalteau, 10 mL de água destilada e o volume foi aferido com solução de carbonato de sódio anidro a 29% (p/v). A absorvância foi mensurada em comprimento de onda de 760 nm após 30 minutos da adição do último reagente, utilizando água destilada para ajuste do zero.

4.3.2.2 Solução amostra para polifenois não adsorvidos por pó de pele

Uma alíquota de 10 mL da SE foi transferida para um erlenmeyer com capacidade de 125 mL, adicionado 0,1 g de pó de pele, agitando-se mecanicamente durante 60 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada com auxílio de papel de filtro. Da solução obtida, foram diluídos 5 mL para balão volumétrico de 25 mL, aferindo o volume com água destilada. Por fim, foram transferidos 2 mL desta solução para um balão volumétrico de 25 mL, adicionado 1 mL do reagente Folin-Ciocalteau, 10 mL de água destilada e o volume foi aferido com solução de carbonato de sódio anidro a 29% (p/v). A absorvância foi mensurada em comprimento de onda de 760 nm após 30 minutos da adição do último reagente, utilizando água destilada para ajuste do zero.

4.3.2.3 Solução padrão

Foram dissolvidos 50 mg de pirogalol para balão volumétrico de 100 mL com água destilada. Transferiu-se 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi aferido com água destilada. Por fim, foram transferidos 2 mL dessa solução, adicionado 1 mL do reagente Folin-Ciocalteau, 10 mL de água destilada e o volume foi aferido com solução de carbonato de sódio anidro a 29% (p/v) para 25

mL. A absorvância foi mensurada em comprimento de onda de 760 nm após 30 minutos da adição do último reagente, utilizando água destilada para ajuste do zero.

O teor de Taninos Totais foi calculado e expresso como pirogalol, segundo a expressão:

$$TT = \frac{62,5 \times (A1 - A2) \times m2}{A3 \times m1}$$

Onde: A1 = absorvância da Solução amostra para polifenois totais; A2 = absorvância da Solução amostra para polifenois não adsorvidos em pó de pele; A3 = absorvância da Solução padrão; *m*1 = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água; *m*2 = massa de pirogalol, em gramas.

4.4.3 Doseamento de Catequina por CLAE-DAD

O doseamento de catequina na matéria prima foi realizado em Cromatógrafo Líquido acoplado a detector de arranjo de fotodiodos a 280 nm. Foi utilizada pré-coluna empacotada com sílica quimicamente ligada (C_{18}), coluna C_{18} de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada à grupo octadecilsilano (5 µm). A temperatura utilizada foi de 23 ± 1 °C; o fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL/minuto. A fase móvel foi constituída pelo eluente A - mistura de água e ácido fosfórico (85%), (99:1) e eluente B - mistura de metanol e ácido fosfórico (85%), (99:1). Um gradiente de fase móvel foi adotado conforme tabela a seguir:

Tabela 1 – Condições do gradiente de eluição do CLAE-DAD para as amostras de *A. colubrina*.

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluição
0-15	70 → 50	30 → 50	gradiente linear
15-16	50 → 25	50 → 75	gradiente linear
16-17	25 → 70	75 → 30	gradiente linear
17-18	70	30	Isocrático

Fonte: próprio autor

A injeção da amostra e do padrão ocorreu separadamente, 20 µL, com posterior avaliação dos picos e suas alturas correspondentes. O teor foi calculado segundo a equação abaixo, expresso em g% de catequina:

$$\frac{Cp \times AA}{Ap \times m} \times FD \times 100$$

Em que:

Cp = concentração do padrão em g/mL (pureza do padrão catequina 98%); Ap = área do padrão; AA = área da amostra; m = massa da amostra, considerando a perda por dessecação (8,97%); FD = fator de diluição (250).

4.5 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

Os métodos descritos para o doseamento de taninos totais (UV-Vis) e catequina (CLAE-DAD) nas cascas de *Anadenanthera colubrina* foram desenvolvidos e validados previamente no Laboratório de Farmacognosia da UFPE utilizando os parâmetros descritos na Resolução Específica (RE) 899/2003: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

4.5.1 Espectrofotometria UV-Vis

Linearidade

Para o desenvolvimento da curva analítica do padrão (pirogalol), foram utilizadas soluções na faixa de concentração entre 0,0010-0,0050 mg/mL. Para a curva analítica da amostra foram utilizadas concentrações entre 24 e 76 mg/mL. Os resultados foram analisados por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados para calcular o coeficiente de determinação (R^2) e outros parâmetros do modelo matemático.

Especificidade

A especificidade amostras foi evidenciada através da elaboração da curva analítica da amostra de *A. colubrina*, adicionando alíquota de 1 mL da solução padrão de pirogalol na concentração de 0,025 mg/mL, a cada solução da curva de linearidade. Em seguida, procedeu-se com a realização do procedimento usualmente utilizado para realização da leitura de polifenois totais. Por fim, a especificidade foi avaliada através da comparação entre as inclinações das curvas (coeficiente angular) obtidas no ensaio de especificidade e as curvas obtidas no ensaio de linearidade (RIBANI et al., 2004; BUENO et al., 2012; ALVES et al., 2015).

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados através das equações disponíveis na RE 899 (BRASIL, 2003).

Precisão - Repetibilidade e Precisão intermediária

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade, através de análise de 6 amostras de mesma concentração (100%), no mesmo dia e pelo mesmo operador; e, precisão intermediária, através da análise de 3 amostras de mesma concentração (100%), por dois analistas e em dois dias diferentes. Os resultados foram expressos em g% de pirogalol.

Exatidão

As amostras foram preparadas conforme procedimento para realização do doseamento de polifenois totais sendo adicionadas alíquotas da solução de pirogalol (procedimento de preparo para solução estoque do padrão, após segunda diluição, foram coletadas as alíquotas de 1, 2 e 3 mL) para assim realizar as leituras em espectrofotômetro.

Robustez

Na robustez realizou-se o preparo das amostras conforme procedimento para realização do doseamento de polifenois totais e fração não tanante (*polifenois não*

adsorvidos por pó de pele) e consequentemente a leitura em espectrofotômetro em condições adversas nos procedimentos realizando modificações de leitura da amostra protegida da luz e sem proteção da luz; utilização de solução de carbonato de sódio anidro a 29% (p/v) e a 10,75% (p/v), mudança no comprimento de onda de leitura das amostras 758 e 762 nm.

4.5.2 CLAE - DAD

Linearidade

A curva analítica da catequina foi obtida com faixa de concentração entre 3,15-4,95 µg/mL (80 a 120%), realizando as diluições em água. A curva analítica da amostra foi obtida com diluições realizadas a partir da Solução Estoque obtida conforme descrito no item 4.4.1, com faixa de concentração entre 2400-3600 µg/mL. Foram injetados, separadamente, 20 µL das soluções da curva de linearidade da catequina e da amostra, preparadas em triplicata e obtidos os cromatogramas. Ao final os cálculos das áreas dos picos e os resultados tratados estatisticamente com auxílio do Microsoft Excel (2010).

Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Na abordagem para os dados de LD e LQ foram utilizados os dados da regressão da curva analítica média da catequina para efetuar os cálculos e as equações conforme preconizadas pelo ICH (2005) e Anvisa (BRASIL, 2003).

Precisão - Repetibilidade e Precisão intermediária

Para a análise da repetibilidade foram preparadas 6 amostras independentes, conforme o procedimento da Solução Estoque, seguido de diluição apropriada para obter solução de concentração igual a 3000 µg/mL (100%). Na precisão intermediária, foram preparadas 3 amostras independentes (na concentração equivalente a 100%), por 2 operadores diferentes e em 2 dias diferentes. O teor foi calculado e expresso em g% de catequina.

Exatidão

A partir da Solução Estoque obtida conforme descrito no item 4.4.1, foram realizadas diluições apropriadas e obtidas amostras de concentração correspondente a 100%. Às amostras obtidas foram adicionadas quantidades conhecidas da solução padrão nas concentrações correspondentes a 80, 100 e 120% (3,60, 4,05 e 4,95 µg/mL). Os cromatogramas foram registrados e as áreas dos picos foram medidas por integração. Os resultados foram expressos como percentagem de recuperação (%), de acordo com a equação da reta obtida para a curva de calibração da catequina.

Robustez

Foram analisadas as amostras na concentração igual a 100% (3000 µg/mL) submetidas a diferentes variações no procedimento usual. As mudanças realizadas foram: fluxo em nível baixo (0,790 mL/min) e alto (0,810 mL/min); mudança no pH da fase móvel utilizada (pH 2,0/3,0 – pH 3,0/4,0); temperatura do forno (21 °C e 24 °C). Os efeitos das variações selecionadas foram avaliados através das alterações nos tempos de retenção, teor e resolução.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.1.1 Perda por dessecação – Método gravimétrico

O excesso de água em matérias-primas vegetais possibilita a ação de enzimas, desenvolvimento de fungos e bactérias (BORGES et al., 2005). Nesse sentido, a determinação do teor de água em drogas vegetais está intimamente ligada a padrões de qualidade, garantia e conservação da amostra. Ao determinar o parâmetro, é ofertado dado acerca do teor de água residual presente na droga vegetal, pelo qual constitui um índice da qualidade de sua preparação e da garantia de sua conservação, estado de integridade das estruturas celulares, estabilidade microbiológica quanto ao crescimento de fungos e bactérias, estabilidade química quando, principalmente relacionados a processos de hidrólise. Neste fato, a determinação da perda por dessecação é essencial quando se refere ao perfil tecnológico e de produção no emprego de matérias primas vegetais na produção de fitoterápicos (COSTA et al., 2009).

De acordo com os dados obtidos para as amostras das casca de *A. colubrina* descritos na tabela 01, pode-se observar que as amostras apresentaram teores mínimos de umidade no mês de Julho de 2014 de 9,32 e um máximo de 11,32 em dezembro do mesmo ano. A média do teor de umidade de todas as amostras ficaram em 10,65%, estando dentro das especificidades exigidas pela legislação que vai entre 8 a 14%. Teores de umidade em amostras de cascas de angico nos estudos de Medeiros, 2015 mostram que amostra de *A. colubrina* apresentou percentual de 10,4% em amostras coletadas na região da caatinga no estado da Paraíba – PB, evidenciando corroborar com os resultados obtidos neste estudo. Este teor garante que em qualquer época do ano as amostras estão dentro dos limites aceitáveis de umidade e este fato pode inferir em termos de controle de qualidade, um perfil significativamente estável desse teor para um possível desenvolvimento de um medicamento fitoterápico a base da planta estudada.

Tabela 2 – Resultados em porcentagem de umidade para as amostras em triplicata das cascas de *A. colubrina*.

Amostra/Mês/Ano	Teor de umidade%
ANG1 JUL/14	9,32 ± 0,1287 (1,38%)
ANG2 AGO/14	10,32 ± 0,3255 (3,15%)
ANG3 SET/14	9,99 ± 0,1996 (1,99%)
ANG4 OUT/14	10,54 ± 0,1678 (1,59%)
ANG5 NOV/14	10,91 ± 0,4027 (3,68%)
ANG6 DEZ/14	11,32 ± 0,0820 (0,72%)
ANG7 JAN/15	10,98 ± 0,1427 (1,29%)
ANG8 FEV/15	11,19 ± 0,1338 (1,19%)
ANG9 MAR/15	11,27 ± 0,1331 (1,18%)
ANG10 ABR/15	10,98 ± 0,1789 (1,62%)
ANG11 MAI/15	10,30 ± 0,1462 (1,41%)
ANG12 JUN/15	10,74 ± 0,1088 (1,01%)

Os resultados foram expressos como média (%) ± desvio padrão (desvio padrão relativo%).
Fonte: próprio autor

5.1.2 Cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas como sílica e constituintes silicosos da droga (MACEDO et al., 2013). Em cinzas, inúmeros fatores podem alterar esse teor, tais como: procedimentos de coleta, secagem e transporte dos materiais, diferenças na localização e região da matéria-prima (COSTA et al., 2009). Estudo físico-químico de Paes e colaboradores (2010) com *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Gris.) Alts. realizaram a determinação e obtiveram como resultado um teor igual a 2,10%.

Conforme a Farmacopeia Brasileira o limite máximo para a maioria das farmacopeias, o teor de cinzas deve ser de 14%. Quando esse teor estiver acima de 8% é necessário realizar o ensaio de determinação de cinzas insolúveis em ácido para a determinação de materiais silicosos presentes na droga vegetal. (GALVÃO, 2014)

As cascas obtidas das 12 amostras de *A. colubrina* apresentaram uma média anual de 3,43% dos teores de cinzas totais, estando seus resultados, dentro das especificações definidas pela legislação vigente e sem a necessidade de serem

realizados as cinzas insolúveis em ácidos, indicando a não presença de materiais como areia e terra. O maior teor de cinzas encontrado no período de estudo foi no mês de outubro/14 onde o valor correspondente foi de 4,69%.

Tabela 3 - Determinação do teor de cinzas totais em cascas de *A. colubrina.*

Amostras/Meses	Teor de Cinzas %
ANG1 JUL/14	2,73 ± 0,0229 (0,84%)
ANG2 AGO/14	3,59 ± 0,1133 (3,14%)
ANG3 SET/14	3,19 ± 0,0480 (1,50%)
ANG4 OUT/14	4,69 ± 0,0926 (1,97%)
ANG5 NOV/14	2,45 ± 0,0887 (3,62%)
ANG6 DEZ/14	4,02 ± 0,0278 (0,69%)
ANG7 JAN/15	3,08 ± 0,1384 (4,49%)
ANG8 FEV/15	3,27 ± 0,0548 (1,67%)
ANG9 MAR/15	3,57 ± 0,0367 (1,03%)
ANG10 ABR/15	3,53 ± 0,1171 (3,31%)
ANG11 MAI/15	3,45 ± 0,0832 (2,41%)
ANG12 JUN/15	3,61 ± 0,1364 (3,77%)

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (desvio padrão relativo%).
Fonte: Próprio Autor.

5.1.3 Granulometria

A determinação da granulometria em drogas vegetais representa uma relação de influência direta com a extração. A avaliação dos parâmetros físico-químicos conduzem a um melhor direcionamento sobre a qualidade da droga vegetal, possibilitando a incorporação da matéria-prima em formulações, principalmente quando se trata de vários lotes ou épocas de coletas diferentes (COSTA et al., 2009). Partículas muito finas ou pequenas (< 0,2 mm) podem comprometer a filtração, enquanto que partículas de diâmetros maiores (> 0,8 mm) podem impedir a absorção do líquido extrator sem a penetração do líquido no interior das células devido a pequena superfície de contato e consequentemente diminuem a eficiência da extração.

O processo de moagem das cascas possibilitam reduzir mecanicamente pedaços maiores da droga vegetal em fragmentos de granulometria pequena, fina e

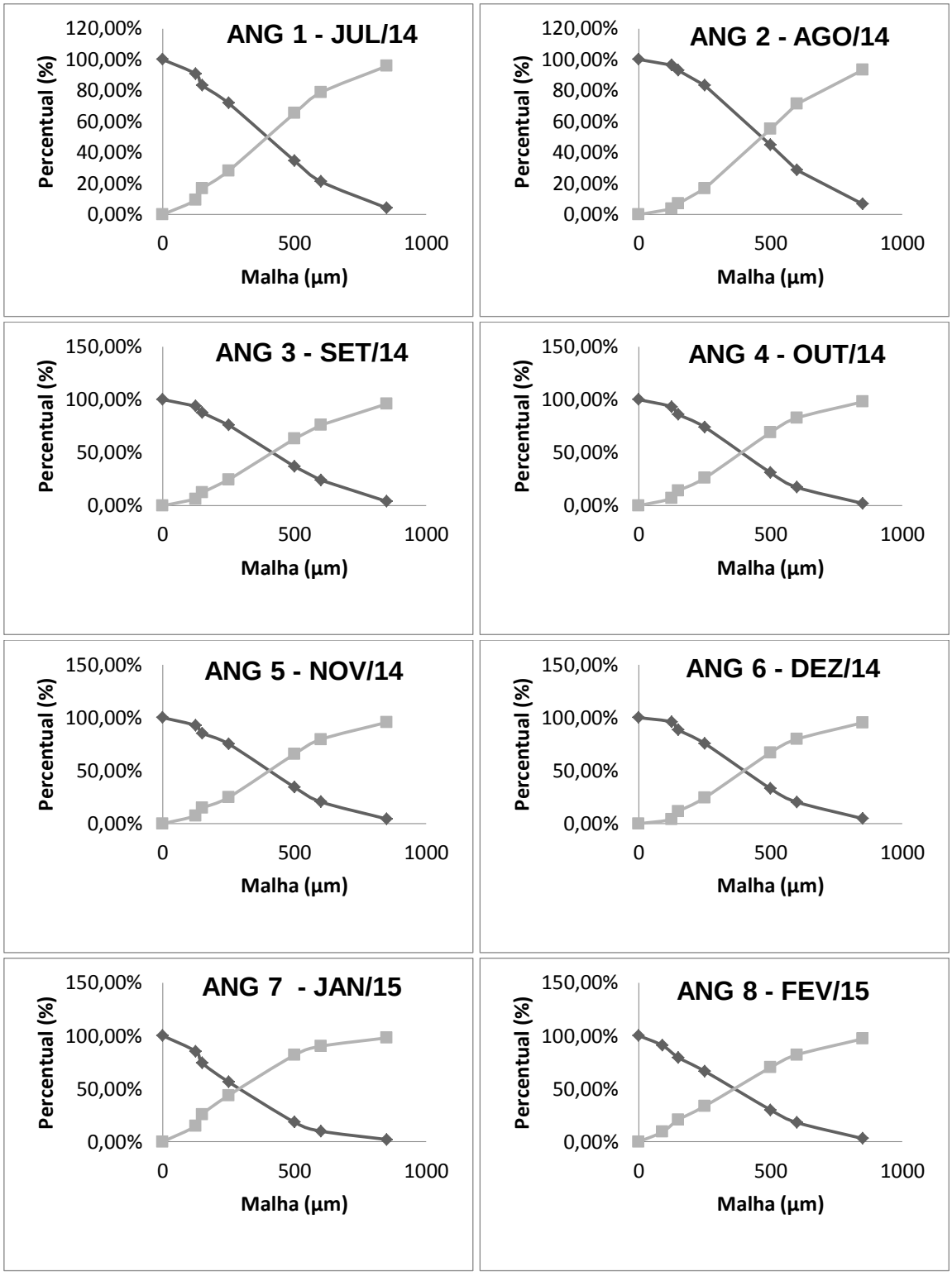
uniforme conduzindo a uma extração mais eficiente. Esse processo atribui uma melhor homogeneidade do material vegetal e consequentemente favorece a reprodutibilidade dos processos extrativos (GALVÃO, 2014).

A matéria vegetal *A. colubrina* foi fragmentada através da moagem em moinho de facas e isto possibilitou reduzir mecanicamente o material vegetal, favorecendo o processo de extração do composto desejado. A determinação granulométrica possibilitou a mensuração do tamanho médio das partículas da casca de *A. colubrina* conforme os resultados obtidos. É possível inferir através do histograma na Figura 4 que a distribuição granulométrica das amostras das cascas no período de 12 meses mostrou que as partículas se distribuíram predominantemente no tamis de 250 µm e a distribuição granulométrica apresentou média de retenção de 38,40% ± 2,21 (5,76%). O tamanho médio das partículas foi determinado pelo ponto de intersecção das curvas de retenção e passagem e foi de 343,79 µm ± 40,08 µm, e de acordo com as normas de especificações da Farmacopeia Brasileira 2010 as 12 amostras foram consideradas como pós moderadamente grosso tendo em vista que o maior percentual de retenção foi na malha de 250 µm.

A distribuição granulométrica das amostras apresentaram-se comportamento diferente ao longo do estudo. As amostras coletadas entre os meses de julho/14 a dezembro/14 apresentaram poucas variações nos percentuais retidos nos tamises. Nos meses de Janeiro/15 a Julho/15 as amostras apresentaram variações no percentuais de retenção, principalmente nas malhas de 850, 500 e 125 µm, sendo a de 850 e 125 µm apresentaram maiores desvios padrões quando comparados com as outras malhas. Neste período (Jan/15 a Jul/15) foi evidenciado menores percentuais retidos nas malhas de 850 µm, quando comparado com outros meses e houve uma maior proporção de massa da droga nas malhas de 150 e 125 µm. Como relatado, o maior percentual de retenção das partículas ficou na malha de 250 µm, estando ela com as menores variações entre os meses de coleta (38,40% ± 2,21 (5,76%). Condições climáticas associadas a alterações ambientais são capazes de determinarem ou modificarem, mais ou menos visivelmente, a organização vegetal, mesmo que sua característica genética seja padronizada, os fatores abióticos atuam sobre as mesmas agregando características adaptativas atribuindo novas condições. Algumas partes das plantas em situações de baixa umidade tendem a sofrer

modificações, de modo a transpirarem menos e a absorverem mais (AOYAMA, MAZZONI-VIVEIROS, 2006).

Figura 3 - Curvas de retenção e passagem referentes às amostras de casca de *A. colubrina* no período de 12 meses.



Continuação Figura 3 - Curvas de retenção e passagem referentes às amostras de casca de *A. colubrina* no período de 12 meses

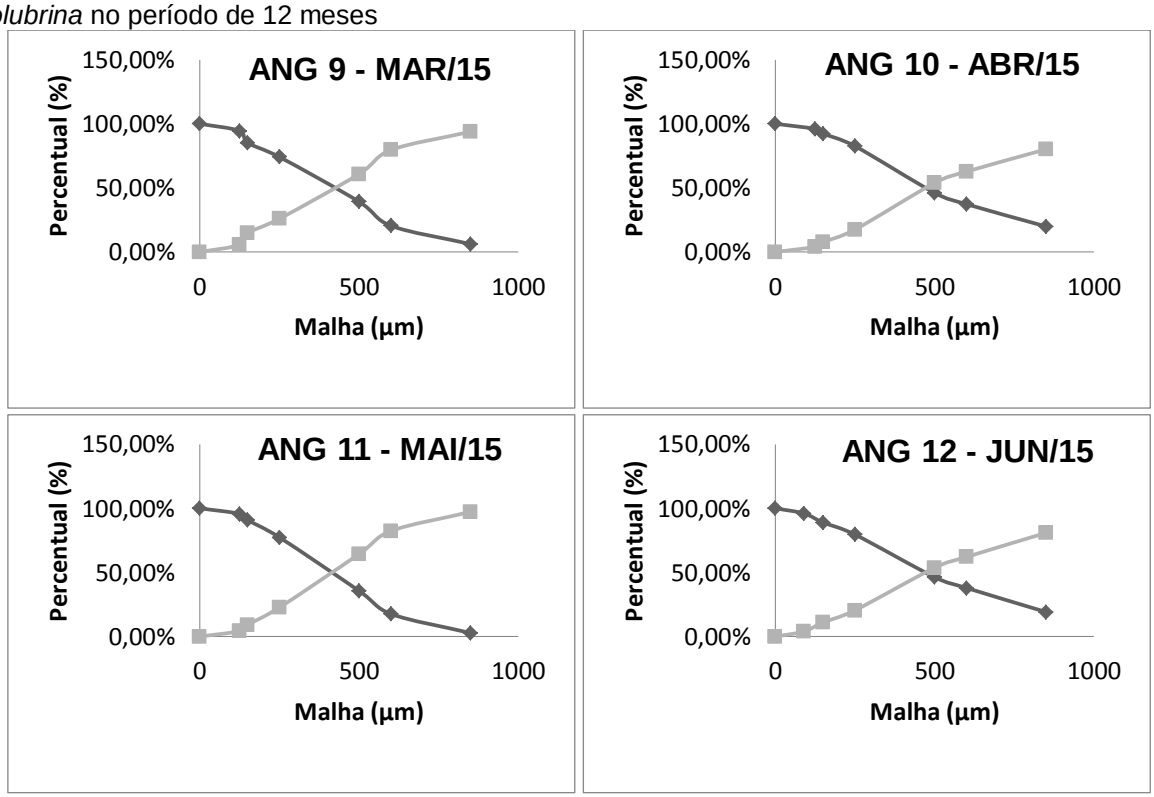
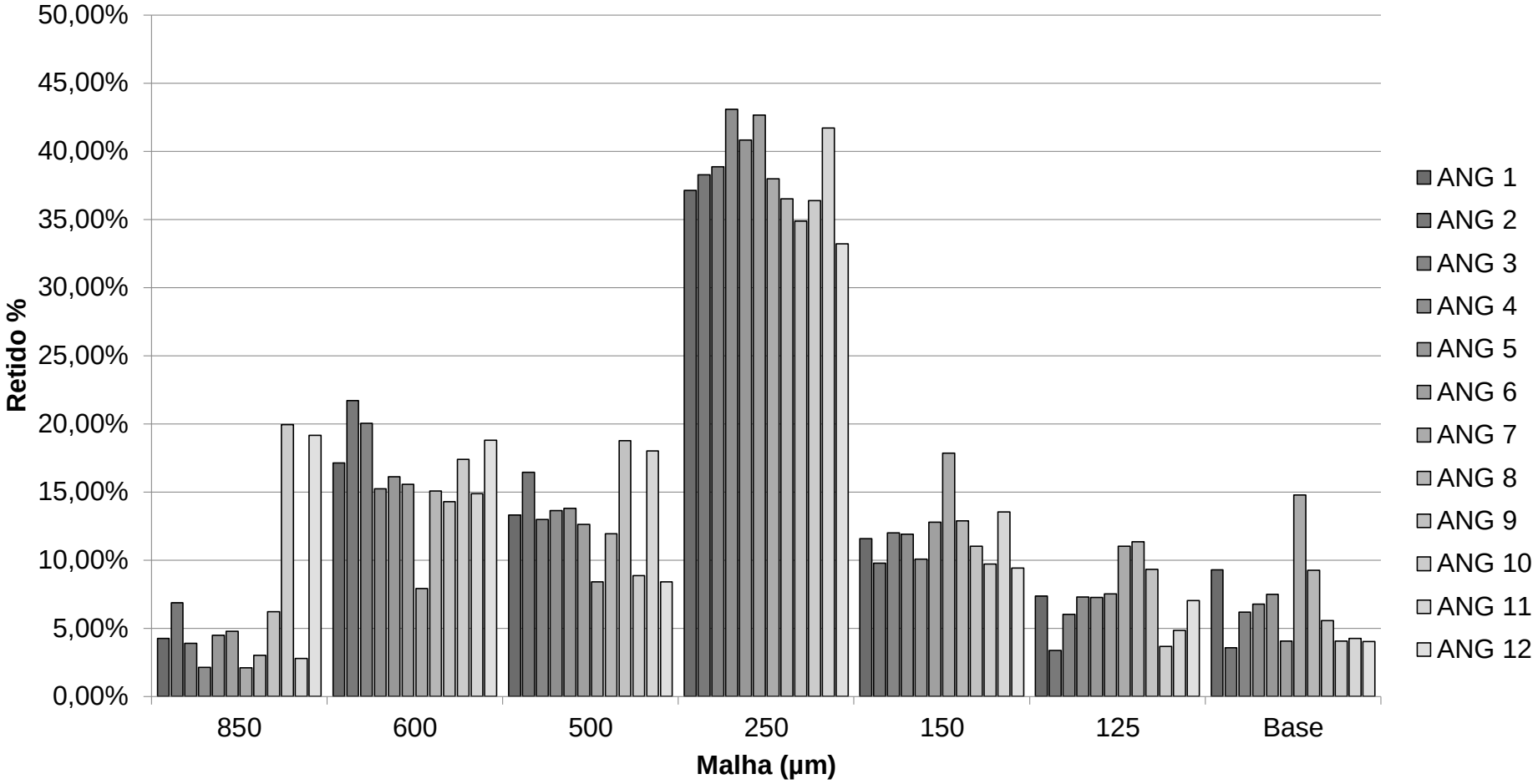


Figura 4 - Histograma de distribuição granulométrica das amostras de casca de *A. colubrina* ao longo do período de 12 meses.



Fonte: próprio autor.

5.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CCD

A determinação de um perfil fitoquímico por CCD oferece um resultado rápido, útil e eficaz para o controle de qualidade de drogas vegetais visto que o conhecimento e avaliação dos constituintes químicos de uma espécie dispõem das informações de seus grupos metabólitos e consequentemente útil para identificar as substâncias químicas complexas (ROCHA, 2015). Através dos extratos metanólicos foi possível avaliar a presença de compostos do metabolismo secundário como taninos condensados, terpenos, alcaloides, flavonoides, cumarinas, açúcares e saponinas.

Na tabela 4 são apresentados os resultados obtidos através dos cromatogramas de todas as amostras das cascas de *A. colubrina* para cada metabólito. Pode-se inferir que não houve presença de alcaloides, saponinas, taninos hidrolisáveis e antraquinonas e observou-se a presença de flavonoides, açucares redutores, taninos condensados, terpenos e cumarinas. Através das figuras 5 a 8 pode-se evidenciar os cromatogramas para as amostras que apresentaram ausência para alcaloides, saponinas, taninos hidrolisados e antraquinonas, onde nenhum desses grupos de metabólitos apresentou bandas com o mesmo Rf dos padrões utilizados. A figura 9, referente ao cromatograma para cumarinas, as bandas identificadas com mesmo Rf do padrão apresentaram leve florescência e os meses que apresentaram maiores intensidades foram nos meses de setembro/14, dezembro/14 e maio/15.

Tabela 4 - Prospecção fitoquímica das cascas de *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Gris.) Alts.

Metabólito Secundário	Resultado
Alcaloides	-
Antraquinonas	-
Cumarina	+/-
Açúcares Redutores	+
Flavonoides	+
Saponinas	-
Taninos Condensados	+
Taninos Hidrolisados	-
Terpenos	+

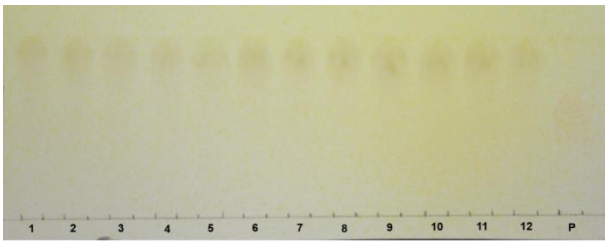
(-): Ausência; (+): Presença
Fonte: próprio autor

Foi observado que no cromatograma de açúcares redutores a presença de bandas com mesmo Rf do padrão frutose e com maiores intensidades nos meses de novembro/14 e de fevereiro a junho/15. Não foram evidenciados bandas das amostras com Rf's igual ao padrão de glicose (Rf = 0,32), contudo, bandas com valor de Rf igual a 0,42 foram detectadas em todas as amostras, inferindo a existência de outro açúcar redutor na droga vegetal (Figura 10).

A utilização de marcadores químicos pode servir como indicadores para identidade botânica ou na avaliação segura para o controle de qualidade de espécies vegetais resultando em uma melhor avaliação desses produtos (BRAZ, 2011). Os metabólitos secundários presentes na espécie já foram descritos por diversos autores (BRAZ, 2011; WEBER et al., 2011; ARAÚJO et al., 2015; NETO et al., 2015). A diversidade química presentes em diversas partes da *A. colubrina* são oriundas principalmente do caule e cascas da espécie estudada. A presença de flavonoides, terpenos e taninos são em geral características da espécie e as atividades biológicas atribuídas a esses grupos metabólicos são bem fundamentadas (WEBER et al., 2011). O perfil fitoquímico avaliado por Silva (2013) através do extrato das cascas de *A. colubrina* coletados na região do agreste pernambucano nas estações seca e chuvosa revelaram a ocorrência anual de flavanóides e taninos condensados e ausência de cumarinas, derivados cinâmicos e taninos hidrolisados. Esses dados vem a colaborar com os dados obtidos neste estudo e evidenciam que os metabólitos avaliados comportam-se de maneira parecida na mesma região e nas mesmas condições sazonais características da região.

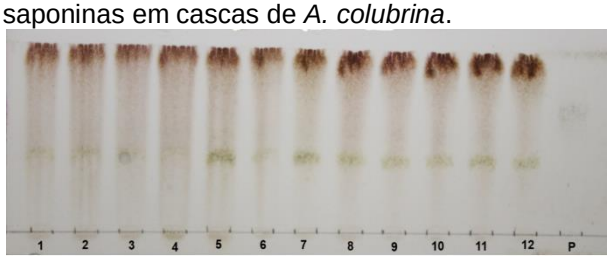
A presença de catequina na espécie estudada ressalta a importância na presença de taninos condensados e perfaz a confirmação de que a presença desse metabólito confere propriedades medicinais tais como ação antioxidante, antinflamatória e antimicrobiana (SARTORI, 2012). Através do cromatograma para identificação de catequina foram observadas que todas as amostras apresentaram bandas características com mesma coloração e deslocamento do padrão utilizado para compor o perfil químico, conforme mostra a Figura 13.

Figura 5 - Cromatograma para avaliação de alcaloides em cascas de *A. colubrina*.



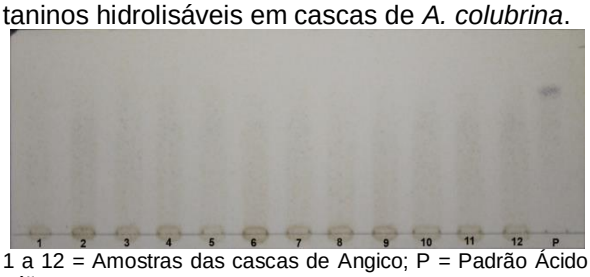
1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P = Padrão Pilocarpina;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH:AcOH:H2O (100:11:11:26)
Revelador: Dragendorff

Figura 6 - Cromatograma para avaliação de saponinas em cascas de *A. colubrina*.



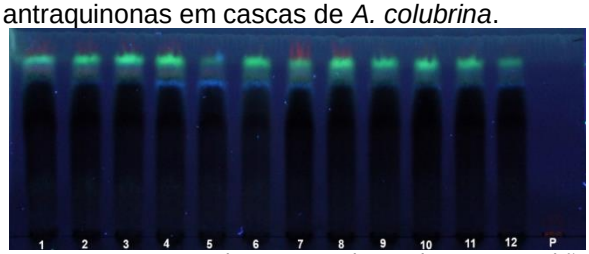
1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P = Padrão Escina;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH:AcOH:H_2O (100:11:11:26);
Revelador: Lieberman + Δ

Figura 7 - Cromatograma para avaliação de taninos hidrolisáveis em cascas de *A. colubrina*.



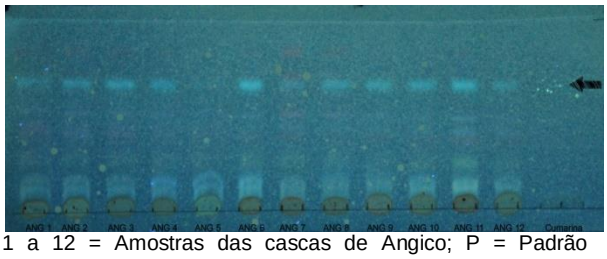
1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P = Padrão Ácido gálico;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH: H_2O(90:5:5);
Revelador: Cloreto Férrico.

Figura 8 - Cromatograma para avaliação de antraquinonas em cascas de *A. colubrina*.



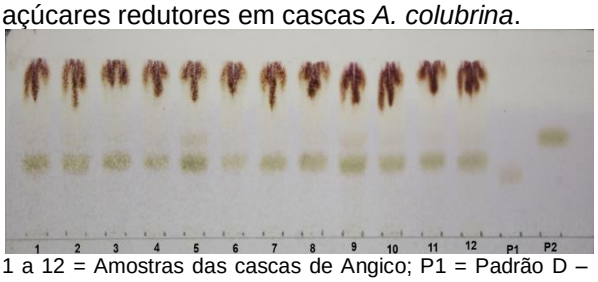
1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P = Padrão Senosídeo B;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH:AcOH:H_2O (100:11:11:26);
Revelador: HNO_3/KOH.

Figura 9 - Cromatograma para avaliação de cumarinas em cascas de *A. colubrina*



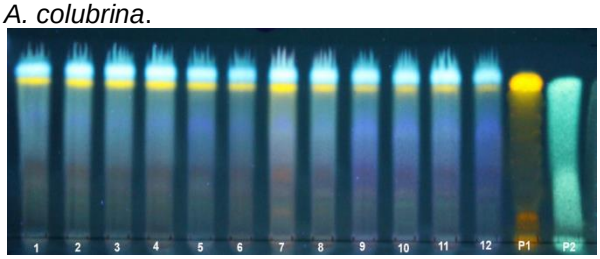
1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P = Padrão cumarina;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH:Tolueno (50:50:50);
Revelador: KOH + UV

Figura 10 - Cromatograma para avaliação de açúcares redutores em cascas *A. colubrina*.



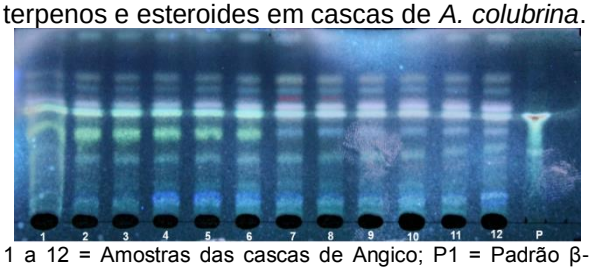
1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P1 = Padrão D – Glicose; P2 = Padrão D-Frutose;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH:AcOH:H_2O (50:20:10:10);
Revelador: Timol 0,5% + H_2SO_4 + Δ

Figura 11 - Cromatograma para avaliação de flavonoides e derivados cinâmicos em cascas de *A. colubrina*.



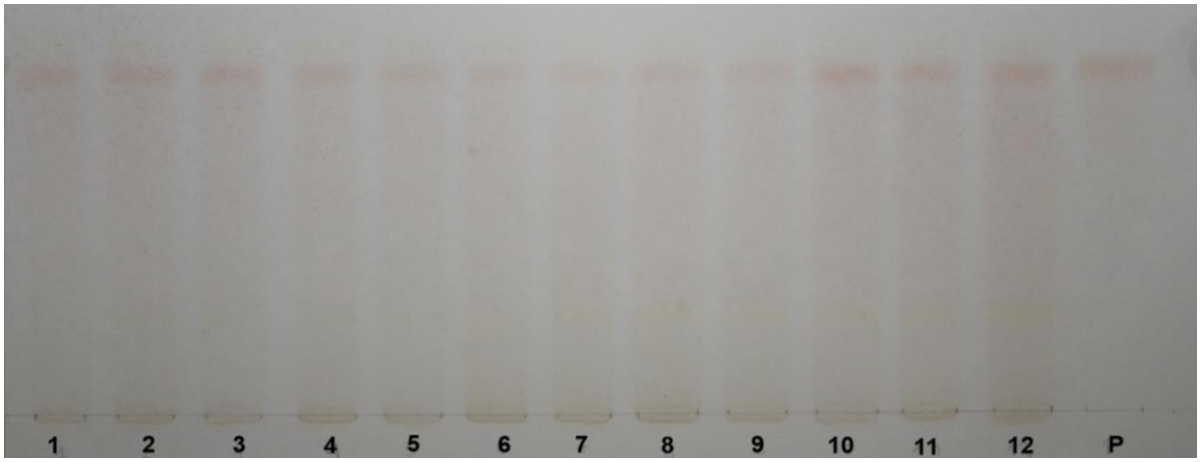
1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P1 = Padrão Flavonoide Quercetina/Rutina; P2 = Padrão Ác.Clorogênico/Ac. Cafeico;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH:H_2O(90:5:5) ;
Revelador: NEU + PEG

Figura 12 - Cromatograma para avaliação de terpenos e esteroides em cascas de *A. colubrina*.



1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P1 = Padrão β-sitosterol;
Fase móvel: Tolueno: AcOEt (70:30) ;
Revelador:Lieberman Buchard

Figura 13 - Cromatograma para avaliação de taninos condensados com padrão catequina em cascas de *A. colubrina*.



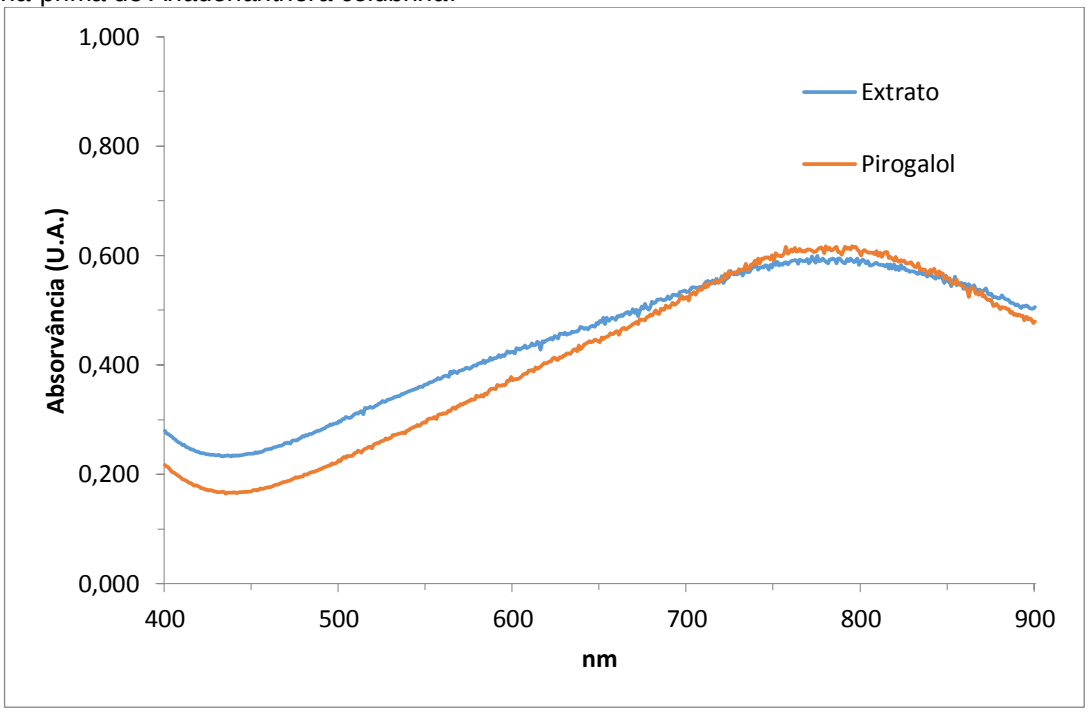
1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P = Catequina;
Fase móvel: Tolueno: AcOEt:HCOOH: H_2O(90:5:5);
Revelador: Vanilina Clorídrica
Fonte: próprio autor.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis

A validação é uma ferramenta capaz de mostrar através de bases experimentais, que o método é apropriado para a finalidade a que se destina e que desta forma possa garantir confiabilidade dos resultados obtidos. Para garantia do controle de qualidade de diversos produtos farmacêuticos, incluído fitoterápicos, a técnica espectrofotométrica na região do ultravioleta (UV) é bastante aplicada devido a rapidez, baixo custo operacional e elevada confiabilidade de resultados (BORBA et al, 2013)

O comprimento de onda ótimo de leitura foi determinado através da realização do espectro de varredura, na faixa de 400 a 900 nm da amostra e do padrão pirogalol, anteriormente citado. A figura 14 representa o espectro obtido para o pirogalol e para o extrato da matéria-prima após reação, demonstrando os máximos de absorvância em 760 nm.

Figura 14 - Espectro de varredura (400-900 nm) do pirogalol e do extrato aquoso obtido a partir da matéria-prima de *Anadenanthera colubrina*.

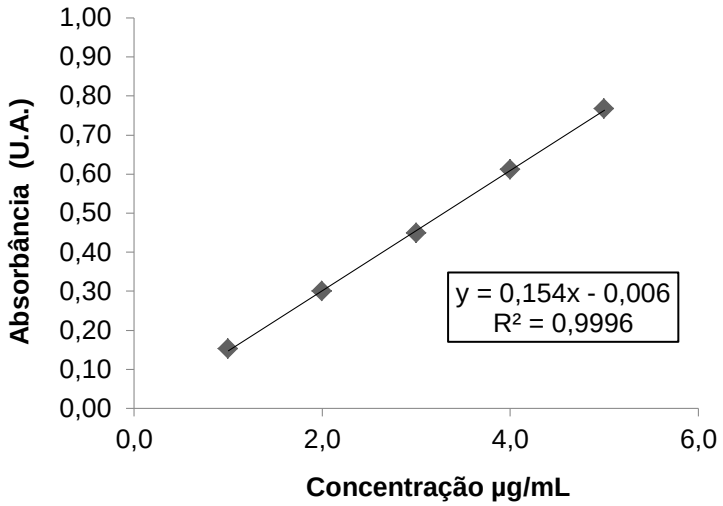


Fonte: próprio autor.

5.3.1 Linearidade

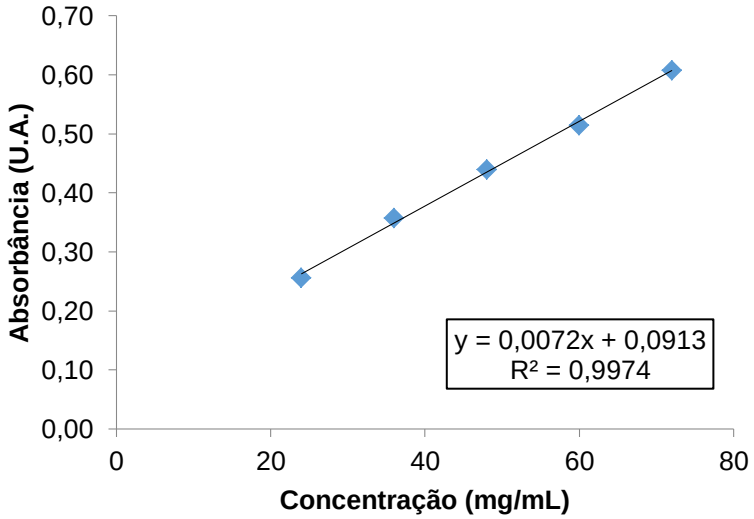
A linearidade do método foi verificada por meio da elaboração de curva analítica do pirogalol na faixa de concentração de 0,0010 a 0,0050 mg/mL e da matéria prima de *A. colubrina* na faixa de concentração de 0,012 a 0,048 mg/mL. As curvas obtidas apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,99. As figuras 15 e 16 apresentam as curvas médias obtidas para avaliação da linearidade, com o valor de equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de determinação (R^2 = 0,9996; 0,9974), respectivamente para o pirogalol e matéria prima de *A. colubrina*.

Figura 15 - Curva analítica média do pirogalol obtida para a verificação da linearidade do método.



Fonte: próprio autor.

Figura 16 - Curva analítica média obtida para a verificação da linearidade do método para a matéria-prima de *A. colubrina*.



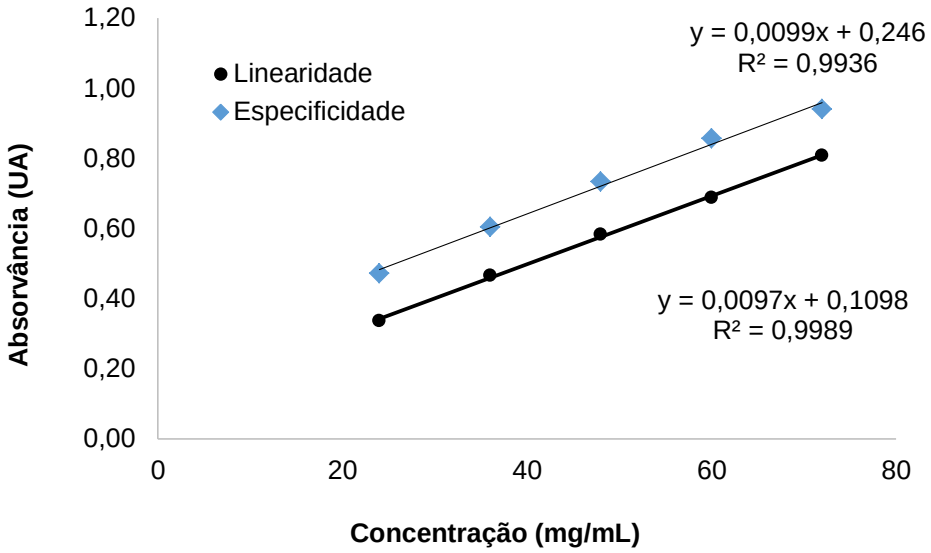
Fonte: próprio autor.

5.3.2 Especificidade

Através dos dados quantificados do teor de pirogalol foi possível a obtenção da equação da reta e assim obter o paralelismo das curvas de linearidade e especificidade, comprovando que o método é específico para a finalidade proposta (Figura 17). Devido a amostra trata-se de uma matriz complexas, o efeito do sistema matriz-analito pode ser avaliado observando o coeficiente angular das retas de

linearidade e especificidade, dessa forma a seletividade do método pode ser confirmada pela paralelismo das curvas analíticas.

Figura 17 - Curvas de linearidade e especificidade.



Fonte: próprio autor.

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

Os resultados dos limites de detecção e quantificação calculados com base na análise de regressão da curva do pirogalol foram LD = 0,0001359 mg/mL e LQ = 0,0004530 mg/mL indicando que o método analítico para o doseamento de taninos totais em matéria-prima de *A. colubrina* exibe boa sensibilidade.

5.3.4 Precisão

O valor médio do teor de taninos totais em relação ao parâmetro de precisão intermediária foi de 6,55% com desvio padrão relativo de 5,15% e para a repetibilidade, o teor médio de taninos totais encontrado foi de 6,28% com desvio padrão relativo (DPR%) igual a 1,56.. Apesar da legislação vigente (RE 899) para métodos analíticos exigir os DPR% abaixo de 5% para considerar o método preciso, foi avaliado que devido à complexidade da matriz estudada e a variação associada ao método de precipitação de taninos com pó de pele, foi permissível a utilização de DPR% de até 10%. Os resultados para precisão intermediária encontram-se na tabela 5 e foram expressos em média ± desvio padrão (desvio padrão relativo %).

Tabela 5 - Resultados do ensaio de repetibilidade e precisão intermediária para o método de doseamento de taninos totais em matéria-prima de *A. colubrina* por UV-VIS.

Ensaio		**Taninos Totais (%)**
Repetibilidade		6,28 ± 0,0981 (1,56)
Precisão Dia 1	**Operador 1**	6,81 ± 0,0969 (1,42)
	Operador 2	6,86 ± 0,0460 (0,68)
Precisão Dia 2	**Operador 1**	6,07 ± 0,0688 (1,13)
	Operador 2	6,46 ± 0,0233 (0,36)

Teor de Taninos totais representado por Média ± Desvio padrão (Desvio Padrão Relativo%)
Fonte: próprio autor.

5.3.5 Exatidão

Os resultados para o ensaio de recuperação do padrão de pirogalol na amostra das casca de *A. colubrina* foram de 95,51 a 100,80% e média de 97,49%, para os níveis de 80, 100 e 120 %. Os achados demonstram que o método desenvolvido apresenta exatidão satisfatória para matrizes complexas como drogas vegetais, através do ensaio da exatidão, o método aplicado apresenta desempenho dentro dos limites preconizados pela legislação (ANVISA, 2003).

5.3.6 Robustez

A finalidade de avaliação da robustez de um método analítico, visa identificar a capacidade em que o método tem em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Como pode ser observado na tabela 6, as modificações realizadas na metodologia não apresentaram grandes diferenças nos teores calculados e dessa forma, as mudanças realizadas não atribuíram alterações significativas ao método. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (desvio padrão relativo %).

Tabela 6 - Teores obtidos no experimento de robustez, para os parâmetro de luminosidade, concentração de carbonato e comprimento de onda.

Parâmetro	Modificação	Taninos Totais (%)
Luminosidade	Ausência de Luz	6,51 ± 0,0953 (1,46%)
	Presença de Luz	6,62 ± 0,0404 (0,61%)
[Na_2SO_3]	10,75%	7,07 ± 0,0594 (0,84%)
	29%	6,51 ± 0,0953 (1,46%)
Comprimento de onda (nm)	758	6,46 ± 0,0920 (1,42%)
	762	6,50 ± 0,0688 (1,06%)

Teor de Taninos totais representado por Média ± Desvio padrão (Desvio Padrão Relativo%)
Fonte: próprio autor.

Na avaliação da concentração de Carbonato de sódio foi possível inferir através dos resultados que não há diferença significativa nos teores de taninos totais quando comparados os valores de $F_{calculado}$ e $F_{crítico}$ através do ANOVA. Como o teor de taninos totais é calculado através do uso da absorbância do padrão, possíveis deslocamentos na resposta analítica resultantes da utilização de diferentes concentrações de Carbonato são ocasionados também na resposta do padrão, uma vez que este deve ser preparado do mesmo modo que a amostra é preparada. A utilização da concentração de Carbonato de sódio a 29% foi o mais recomendado tendo em vista que tal concentração é o preconizado pelas Farmacopeias e de monografias já existentes na farmacopeia Brasileira. A validação deve seguir a metodologia analítica conforme o preconizado e estabelecido pelos órgãos de regulação como o ICH e demais Farmacopeias. Alguns resultados podem apresentar valores de aceitação que não condizem com os estabelecidos, contudo deve-se considerar que trata-se de uma matriz vegetal que influi algumas complexidades podendo ocorrer limites de aceitação maiores em relação as normas estabelecidas (KAEFER et al., 2015). Os dados do Anova para a concentração dos teores de Carbonato de sódio estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Resultados de ANOVA para variação de concentração de carbonato de sódio.

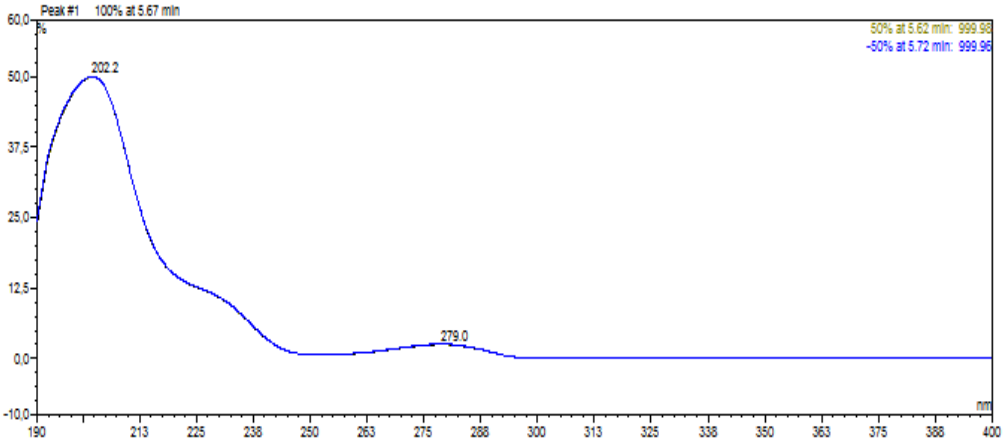
Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	0,81992	2	0,409959	5,002956	0,052676	5,143253
Dentro dos grupos	0,49166	6	0,081943			
Total	1,31158	8				

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE

O desenvolvimento de um teste de validação como o CLAE desempenha uma parte necessária do procedimento analítico conforme os parâmetros específicos e o objetivo que cada processo analítico venha a desempenhar. (FIGUEREDO, 2012).

O comprimento de onda ótimo de leitura foi determinado através da realização do espectro de varredura, na faixa de 190 a 400 nm (Figura 18), com auxílio do detector de arranjo de fotodiodos. A avaliação do resultado demonstrou que a partir do cromatograma obtido para a análise do padrão de catequina, o espectro de varredura por UV apresentou máximos de em 202,2 e de 280 nm. Adotou-se a utilização do espectro de varredura em 280 nm devido melhor clareza na resolução do pico, permitindo assim uma melhor visualização dos comprimentos de onda com maior absorção e uma melhor resposta do sinal cromatográfico, tornando mais específico e com menores absorção que no espectro de 202,2 nm.

Figura 18 - Espectro de varredura de 190 a 400 nm referente ao padrão catequina.

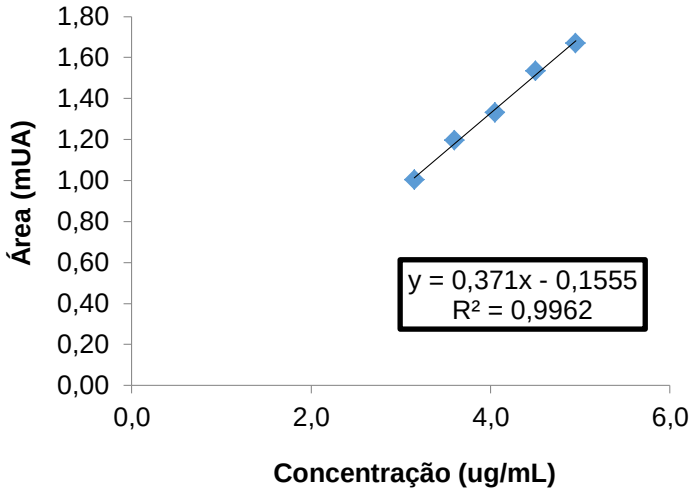


Fonte: próprio autor.

5.4.2 Linearidade

A linearidade do método foi verificada por meio da elaboração da curva analítica da catequina na faixa de concentração de 3,15 a 4,95 µg/mL. A curva de linearidade média obtida com equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de determinação (R^2 = 0,9962) estão apresentados na figura 19.

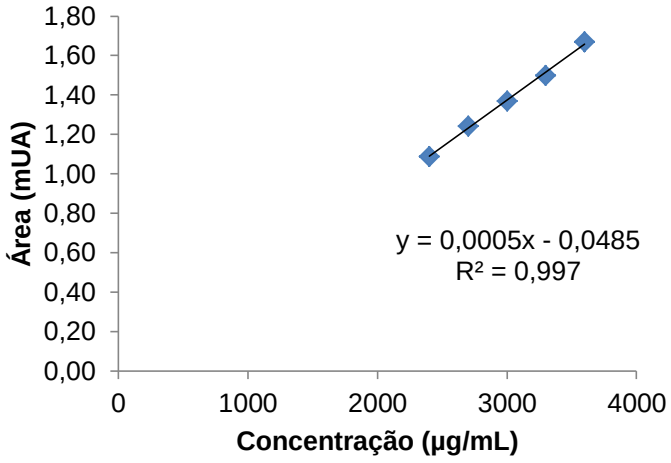
Figura 19 - Curva analítica média para catequina obtida para a verificação da linearidade do método.



Fonte: próprio autor.

A curva analítica para a matéria prima vegetal *A. colubrina* na faixa de concentração de 2,4 a 3,6 mg/mL, apresentou linearidade com coeficiente de determinação igual a 0,9970, para o pico correspondente a catequina (Figura 20).

Figura 20 - Curva analítica média da catequina obtida para a verificação da linearidade do método.

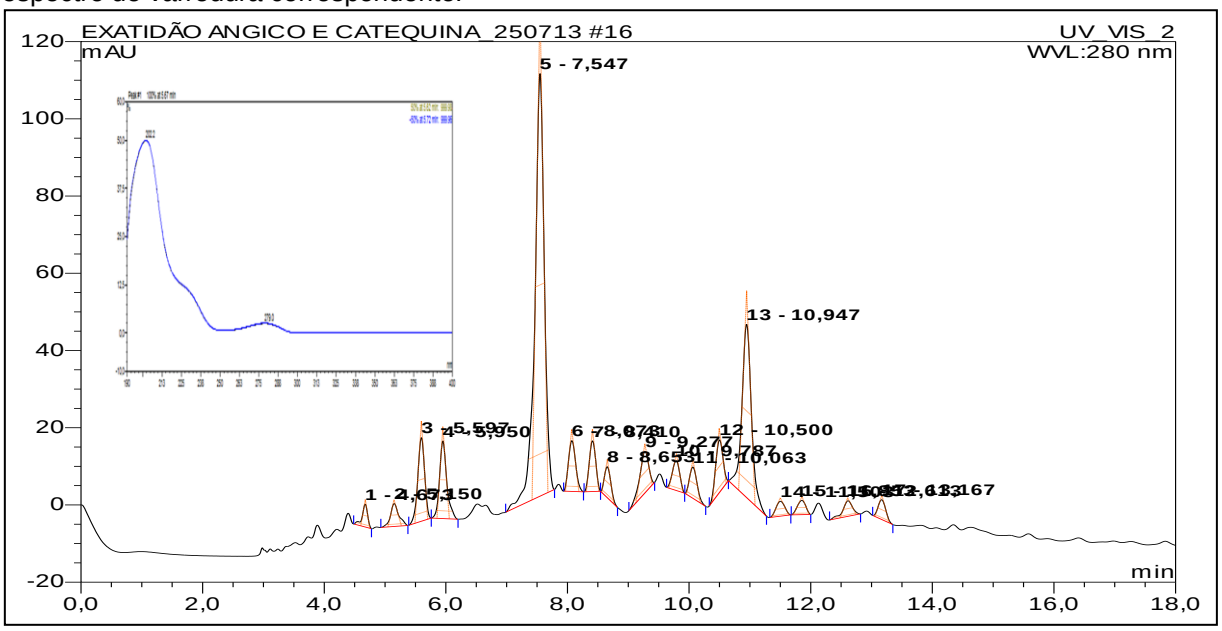


Fonte: próprio autor.

5.4.3 Especificidade e pureza do pico

O espectro foi empregado para confirmar a identidade do composto de interesse, onde foi realizada a varredura de 190 nm a 400 nm da matéria-prima e da matéria-prima adicionada intencionalmente de catequina para verificar a ocorrência ou a inexistência de desvio do comprimento de onda máximo (Figura 21). O pico da catequina está correspondendo ao pico de número 4, conforme o cromatograma da especificidade.

Figura 21 - Parâmetro de especificidade referente à substância catequina presente na matéria-prima de *A. colubrina*. Cromatograma da matéria-prima intencionalmente contaminada com o padrão e o espectro de varredura correspondente.



Fonte: própio autor

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

Através dos cálculos dos dados de regressão da curva analítica média da catequina, os limites de detecção e quantificação foram obtidos, sendo iguais a LD = 1,68 μg/mL e LQ = 5,60 μg/mL. Dessa forma, o método analítico para a quantificação de catequina em matéria prima das cascas de *A. colubrina* exibe boa sensibilidade.

5.4.5 Precisão

O teor médio de catequina obtido na repetibilidade foi igual a 0,239 ± 0,0007 (0,88%). Já na avaliação da precisão intermediária, o teor médio de catequina encontrado para o primeiro dia, calculado pela média obtida entre os dois operadores foi de 0,237% e o desvio padrão relativo (DPR%) obtido de 1,12. No segundo dia, o teor médio de catequina encontrado foi de 0,221% e desvio padrão relativo (DPR%) obtido de 2,72.

Tabela 8 - Resultados (teor) do ensaio de precisão para o método de quantificação do teor de catequina em matéria-prima de *A.colubrina* por CLAE.

Ensaio		**Catequina (g%)**
Repetibilidade		0,239 ± 0,0010 (0,88)
Precisão Dia 1	**Operador 1**	0,238 ± 0,0006 (0,52)
	Operador 2	0,236 ± 0,0038 (3,23)
Precisão Dia 2	**Operador 1**	0,226 ± 0,0036 (3,19)
	Operador 2	0,218 ± 0,0052 (4,80)

Teor em g% de catequina; representado por Média ± Desvio padrão (Desvio Padrão Relativo%)
Fonte: próprio autor.

5.4.6 Exatidão

As amostras da casca de *A. colubrina* foram analisadas com níveis de concentrações crescentes de 80, 100 e 120% e os teores esperados foram calculados e comparados. Os resultados obtidos no ensaio de recuperação foi de 100,77% a 107,49% e em média de 105,21%, demonstrando que o método desenvolvido apresenta exatidão satisfatória, de acordo com a equação da reta obtida para a curva de calibração de catequina. Deste modo o método realizado pode ser considerado exato conforme os limites estabelecidos pelos compêndios oficiais que vai de 80% a 120%.

5.4.7 Robustez

A robustez de um método analítico dar-se pela sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas alterações nos parâmetros analíticos de forma que em

CLAE, algumas influências como variação de pH da fase móvel, influência da variação da composição da fase móvel, diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes), temperatura e velocidade de fluxo são variações geralmente abordadas (NUNES et al., 2005).

O fluxo e pH da fase móvel, e, a temperatura da coluna foram escolhidos para compor a ensaio de robustez para o método por CLAE desenvolvido para a análise das cascas de *A. colubrina*. Os ajustes no fluxo foram estabelecidos em dois níveis (0,790 mL/min e 0,810 mL/min) e os resultados obtidos em relação ao teor de catequina, evidenciaram que não houve influência sobre a área dos picos de catequina e consequentemente os valores calculados foram os mesmos (0,223 g%).

Com relação à mudança de pH da fase móvel, não foram evidenciados influências sobre as áreas dos picos e consequentemente sua concentração calculada. A variação em 3 °C atribuída a coluna cromatográfica também não influenciou na identificação e retenção do pico da catequina, tornando assim o método robusto (Tabela 9). As aplicações das variáveis evidenciaram resultados, que podem ser considerados como robusto, uma vez que, os valores de DPR foram menores do que 5% em todos os casos conforme exigido pela legislação (BRASIL, 2003).

Tabela 9 – Análise do parâmetro de Robustez apresentando os parâmetros de modificação analítica

Parâmetro	**Teor (g%)**
Fluxo 0,790 mL/min	0,223 ± 0,0082 (3,67)
Fluxo 0,810 mL/min	0,223 ± 0,0004 (0,18)
pH 3,0/4,0	0,269 ± 0,0042 (1,56)
pH 2,0/3,0	0,270 ± 0,0011 (0,40)
Temp Col 21°C	0,225 ± 0,0014 (0,62)
Temp Col 24°C	0,224 ± 0,0069 (3,09)

Teor em g% de catequina; representado por Média ± Desvio padrão (Desvio Padrão Relativo%)
Fonte: próprio autor.

5.5 AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE SAZONAL SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS CASCAS DE *A. colubrina*

O material vegetal pode variar em seu conteúdo químico através de condições como a época do ano que o material foi coletado, localização territorial da espécie e estações do ano. A intensidade ou escassez de chuvas pode está relacionada com as concentrações dos compostos fenólicos nos vegetais e consequentemente com os mecanismos oxidantes, apresentando relação com as condições de estresse e de estabilidade química destes compostos. Dessa forma, a variabilidade química das espécies vegetais é bem dinâmica quando relacionadas às situações como clima, temperatura e chuvas. A época do ano em que a planta produz seus princípios ativos desejados ou até mesmo a produção de substâncias potencialmente tóxicas pode apresentar influência na produção dos medicamentos fitoterápicos. (ARAÚJO et al., 2015; BRAZ, 2011; SOUZA, 2011).

De acordo com dados obtidos pela Agência Pernambucana de Águas e Clima – APAC, o monitoramento pluviométrico registrado na localidade de coleta da espécie em estudo, Posto Caruaru (IPA), está descrito na Tabela 10. No mês de Junho de 2015 não houve dados apresentados pela fonte com relação ao índice pluviométrico.

Tabela 10 - Índice Pluviométrico em milímetros (mm) na região de Caruaru/IPA em 2014/2015.

Ano	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
2014	-	-	-	-	-	-	58,8	44,5	51,3	52,1	25,1	4,5
2015	3,2	5,5	44,1	9,8	19,5	SD	9,2	-	-	-	-	-

SD: sem dados disponíveis.
Fonte: APAC, 2016.

Os resultados dos teores de taninos totais das cascas de *A. colubrina* coletadas entre os meses de Julho de 2014 e Junho de 2015, obtidos por espectrofotometria UV-Vis, estão descritos na tabela 11.

Tabela 11 - Perfil sazonal do teor de Taninos totais (UV-Vis) nas amostras das casca de *A. colubrina*.

Amostras/Meses	Taninos Totais (%) Média ± DP (DPR%)
ANG1 JUL/14	2,89 ± 0,0410 (1,42)
ANG2 AGO/14	2,35 ± 0,0675 (2,87)
ANG3 SET/14	2,50 ± 0,1006 (4,03)
ANG4 OUT/14	4,94 ± 0,1899 (3,84)
ANG5 NOV/14	3,33 ± 0,1587 (4,76)
ANG6 DEZ/14	4,41 ± 0,0627 (1,42)
ANG7 JAN/15	5,53 ± 0,1480 (2,67)
ANG8 FEV/15	5,28 ± 0,0553 (1,04)
ANG9 MAR/15	5,76 ± 0,1037 (1,79)
ANG10 ABR/15	5,88 ± 0,1660 (2,82)
ANG11 MAI/15	6,06 ± 0,0316 (0,52)
ANG12 JUN/15	5,16 ± 0,0627 (1,21)

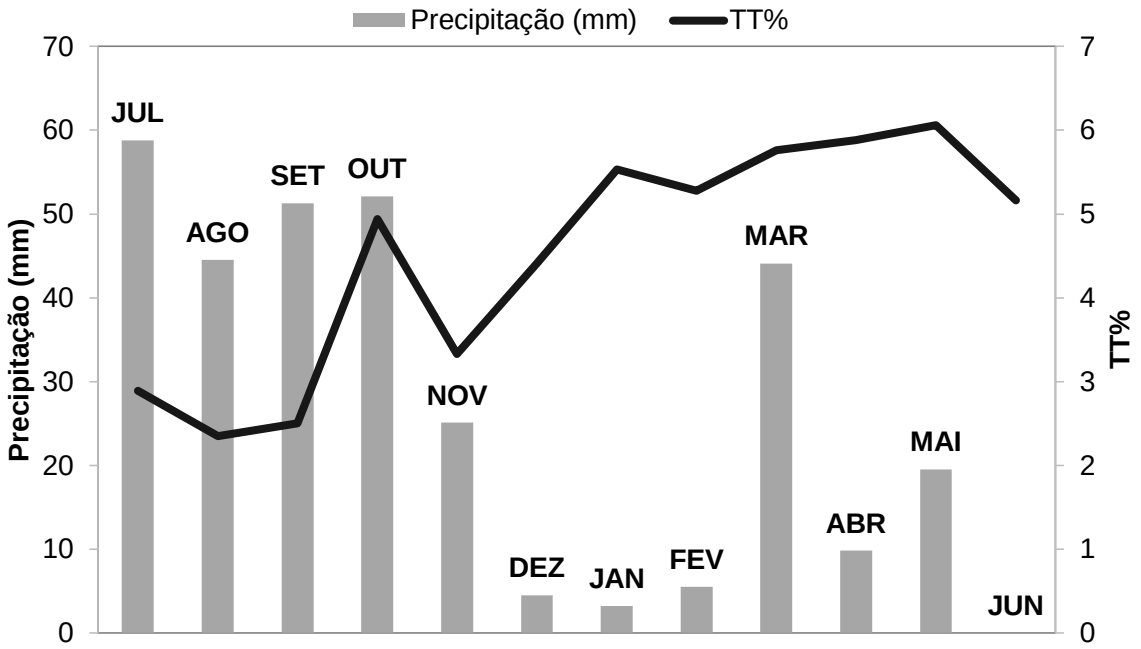
Fonte: Próprio Autor

Fatores já citados como temperatura, radiação UV, nutrientes, altitude, poluição podem modificar as condições de produção de metabólicos secundários nas plantas (MACEDO et al., 2013). A região do semiárido Pernambucano caracteriza-se basicamente em possuir duas estações ao longo do ano, uma seca e uma chuvosa, diferentemente do que ocorre em outras regiões do Brasil onde se tem estações climáticas bem definidas ao longo do ano. As coletas das cascas iniciaram durante o período chuvoso, que compreendeu entre julho/14 à outubro de 2014. Neste período, a média pluviométrica foi de 51,67 mm, e o teor de taninos totais obtidos por espectrofotometria por UV-Vis para as amostras coletadas nesse período apresentou valor médio de 3,17%.

Diferentemente observado no período seco (Novembro/15 a Junho/15), os teores de taninos totais apresentaram média de 5,48%, atingindo um valor máximo de taninos totais na amostra 11 coletada no início do mês de maio de 2015 (6,06%). Este fato demonstra que o baixo índice pluviométrico evidenciado neste período torna os meses mais quentes e secos e com isto, são evidenciados maiores produções dos metabólitos secundários em espécies da caatinga, como *A. colubrina*. Na Figura 22 é possível observar a relação existente dos teores de

taninos totais das cascas de *A. colubrina* e o índice de precipitação pluviométrica na região de estudo.

Figura 22 - Correlação entre o teor de taninos totais das cascas de *A. colubrina* e o índice de precipitação durante 12 meses (2014/2015).



Fonte: Próprio Autor

Estudos de Monteiro et al. (2014) avaliando espécies produtoras de taninos na região do semiárido nordestino, mostrou que *A. colubrina* apresentam maiores teores de taninos totais nas cascas em estações secas. Tal estudo corrobora com os dados obtidos, demonstrando uma tendência dos taninos serem quantificados em maiores concentrações nos períodos secos e com baixos índices de pluviosidade, devido a fatores como o papel fotoprotetor e estresse hídrico frente ao metabolismo secundário das plantas. Condicionado a isto, os fatores atribuídos as variáveis sazonais como, nível de água no solo, taxa de transpiração, intensidade luminosa, eficiência fotossintética, temperatura, respondem diretamente as influências multifatoriais do ambiente (CHAVES, 2012).

Conforme Monteiro e Albuquerque (2006), essas variações podem afetar quantitativamente e qualitativamente a produção de taninos em plantas, contudo as variações sazonais não afetam a disponibilidade de taninos nas cascas de *A. colubrina*. Poucos estudos sobre a influência de fatores ambientais e

consequentemente a influência dos taninos tem sido evidenciado em plantas na região da caatinga. (MONTEIRO et al., 2006; SANTOS et al., 2013).

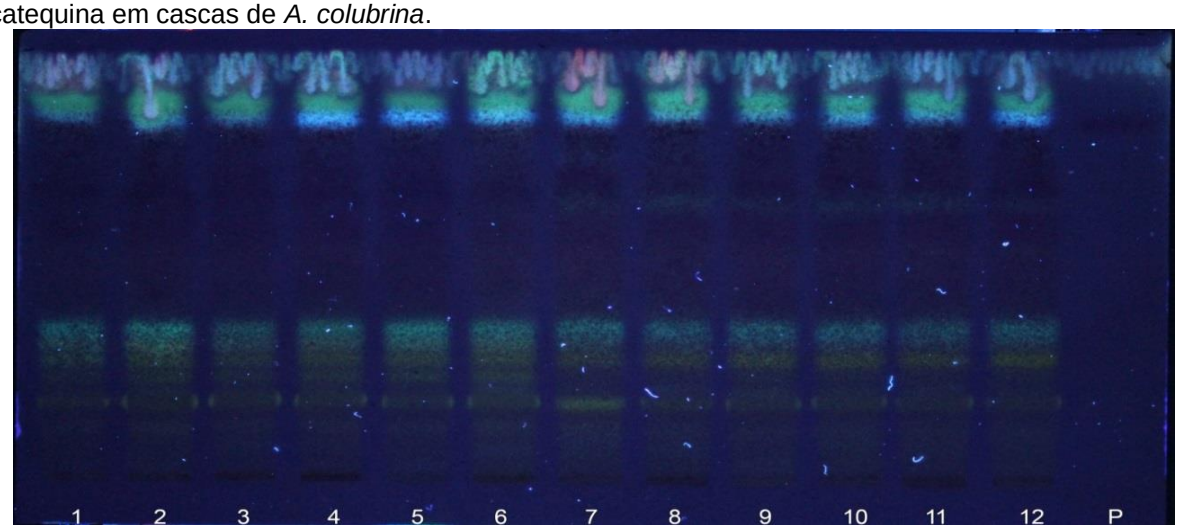
5.5.1 Perfil Sazonal de Taninos por CCD-AE

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência tornou-se uma ótima ferramenta para geração de *fingerprints* de espécies vegetais ajudando na identificação e controle de qualidade em uma determinada espécie. A análise por CCD-AE da *A. colubrina* pode colaborar com a perspectiva de identificação de constituintes químicos como o padrão catequina ou demais metabólitos de interesse para o controle de qualidade da droga vegetal (GUNALAN; SARASWATHY; VIJAYALAKSHMI, 2012).

A avaliação de perfis químicos de drogas vegetais e seus derivados, tem o papel importante como indicador da homigenidade da qualidade desses matérias. Com essa intuito foram avaliados que os cromatogramas obtidos dos extratos das cascas de *A. colubrina* apresentaram bandas que sugerem a presença de taninos condensados nas amostras. Foram avaliadas a presença de bandas características com mesmo Rf e cor frente ao padrão catequina antes e após revelação através da vanilina clorídrica no visível e nos comprimentos de onda em 254 nm e 365 nm. A placa que melhor apresentou a visualização da banda de catequina foi na região do visível, contudo bandas no mesmo Rf da catequina foram evidenciadas antes e depois da revelação no comprimento de onda de 365 nm (Figuras 23 a 25).

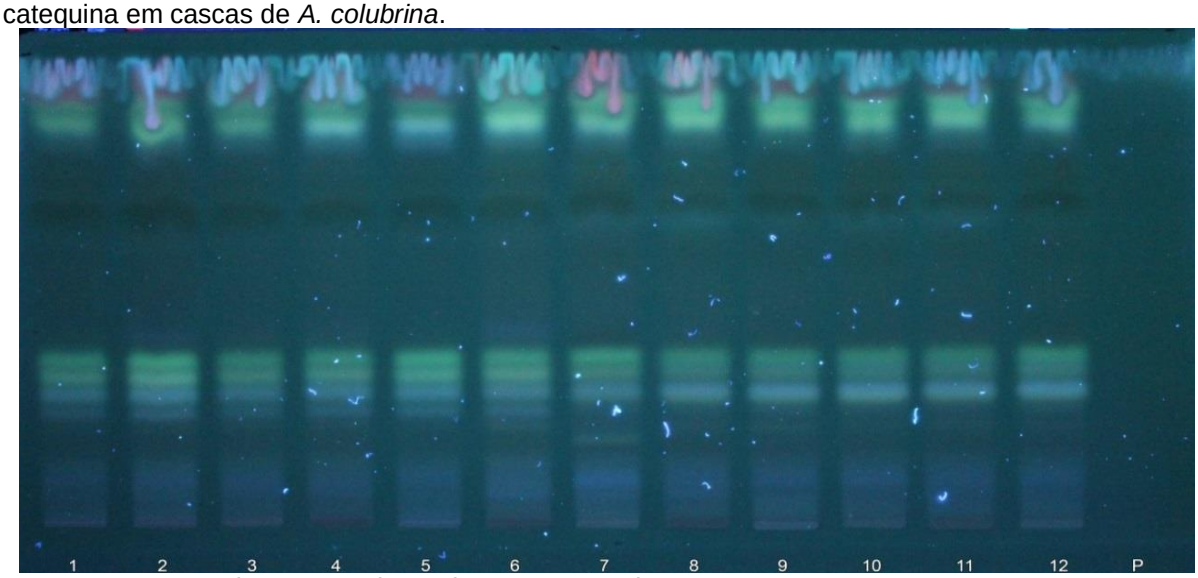
Ainda nas Figuras 23 e 24, é possível evidenciar que em todos os meses há presença de bandas com mesmas característica de cor e Rf's próximos ao da catequina, (Rf: 0,68). A perspectiva neste caso, pode contuzir a alguns derivados de catequina evidenciados nas amostras da espécie estudada. Estudos de Wolf (2008) demonstraram a identificação de epicatequina-3-O-galato em chá verde possuem bandas com Rf de 0,66 e de cor marrom-alaranjado utilizando condições de fase móvel e reveladores idênticos aos utilizados nas amostras estudadas de *A. colubrina.*

Figura 23 - Cromatograma obtido por CCD-AE antes da revelação em 365 nm para detecção de catequina em cascas de *A. colubrina*.



1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P = Catequina;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH: H2O(90:5:5)Fonte: próprio autor.

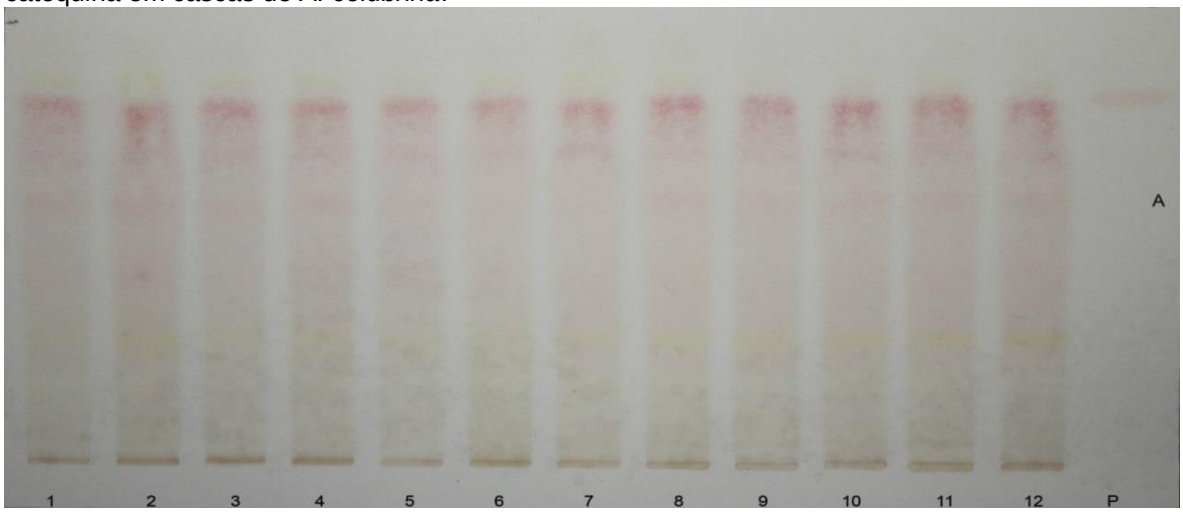
Figura 24 - Cromatograma obtido por CCD-AE depois da revelação em 365 nm para detecção de catequina em cascas de *A. colubrina*.



1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P = Catequina;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH: H2O(90:5:5)
Fonte: próprio autor.

A figura 25 mostra a placa revelada com vanilina clorídrica na região do visível, sendo possível a identificação da banda que é representativa da catequina (Rf: 0,83). Através dessa presença foi possível inferir que todas as amostras de angico apresentaram confirmação da substância com mesmo Rf e intensidades de cores iguais ao do padrão catequina.

Figura 25 - Cromatograma obtido por CCD-AE depois da revelação em 254 nm para detecção de catequina em cascas de *A. colubrina*.



1 a 12 = Amostras das cascas de Angico; P = Catequina;
Fase móvel: AcOEt:HCOOH: H2O(90:5:5).
Fonte: próprio autor.

A análise por CCD-AE através do aplicador semi-automático possibilitou a separação e identificação de catequina nas amostras de *A. colubrina* e revelou a confirmação de que todas as amostras apresentaram resultados positivos para este marcador. A obtenção desse marcador permitiu-se o fingerprint e através dele foi possível a avaliação das intensidades das bandas nas 12 amostras. Os resultados deste estudo mostra que as bandas correspondentes aos meses mais quentes (janeiro a abril de 2015), apresentaram maiores intensidades de cor, caracterizando uma variação sazonal da intensidade desse marcador constituinte. Ao se fazer uma relação dos dados obtidos pelas bandas com os resultados obtidos na quantificação de polifenois totais por espectrofotometria por UV-Vis, observou-se que esses meses também apresentaram maiores concentrações de taninos totais.

A variabilidade presente nas diferentes condições de clima, temperaturas e índices pluviométricos nos meses de coleta conduziram observar uma continuidade do marcador na droga vegetal mesmo com os estresses ambientais presentes na região e que podem provocar mudanças no metabolismo secundário das plantas.

5.5.2 Perfil Sazonal de Taninos por CLAE

A técnica de CLAE é bem estabelecida quando se pretende obtenção do controle de qualidade de drogas vegetais (YONGYU et al, 2011). A identificação do

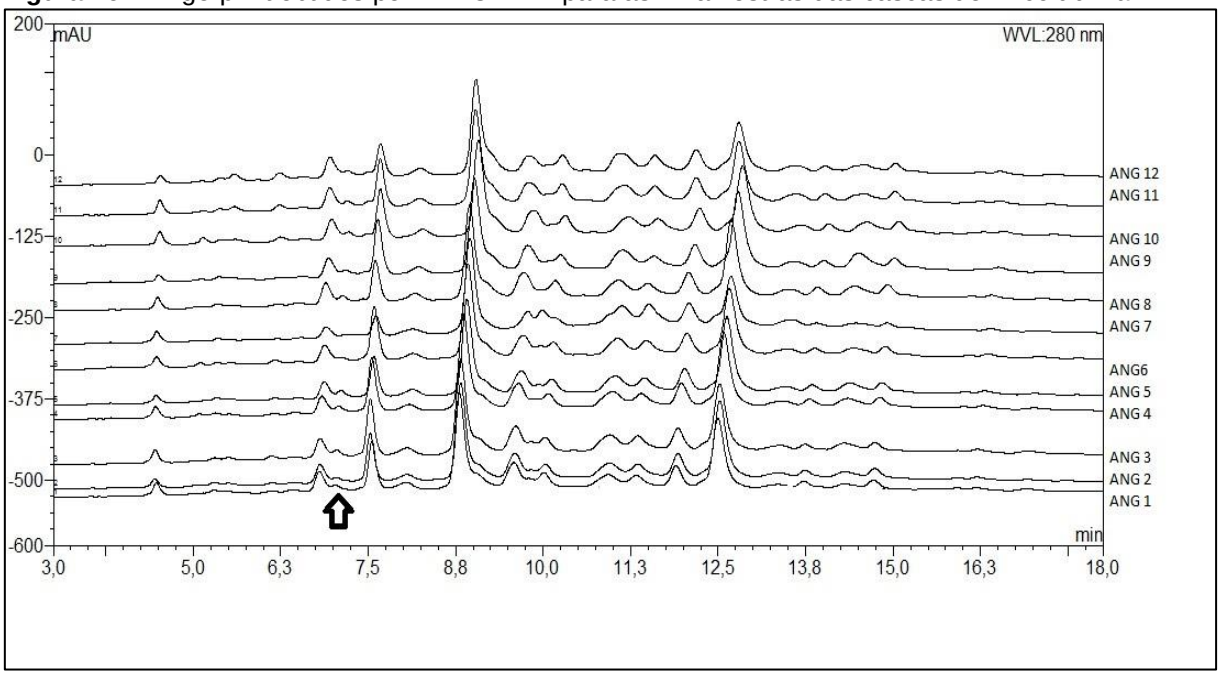
composto desejado através de um detector adequado, fases móveis polares e fase estacionária reversa torna-se uma poderosa ferramenta para desenvolver um perfil característico da amostra através do fingerprint (TISTAERT, DEJAEGHER, HEYDEN, 2011). Os cromatogramas obtidos nas condições estipuladas para os gradientes de fase móvel, temperatura e fluxo foram cuidadosamente respeitados. A adição de ácido fosfórico à fase móvel pode conferir uma redução da ionização e diminuição da polaridade dos compostos flavânicos e a obtenção dos cromatogramas foram obtidas por detecção através de fotodiodos.

Uma boa impressão digital por CLAE ajuda na caracterização das amostras avaliadas de modo a fundamentar as semelhanças e diferenças, principalmente quando se deseja avaliar substâncias marcadoras que são essenciais ao metabolismo secundário das plantas. A existência ou não desses marcadores pode ser evidenciadas juntamente com o fingerprint obtido por HPLC, ajudando na autenticidade e identificação que vão permitir verificar a composição química da planta e consequentemente a existência de condições ambientais e de estresses associados a ela.

A identificação dos componentes de uma amostra é feita através da comparação dos cromatogramas obtidos com os padrões estabelecidos e as condições de eluição. Com a obtenção dos cromatogramas é possível a quantificação dos componentes da amostra pela área dos sinais cromatográficos. (FIGUEREDO, 2012).

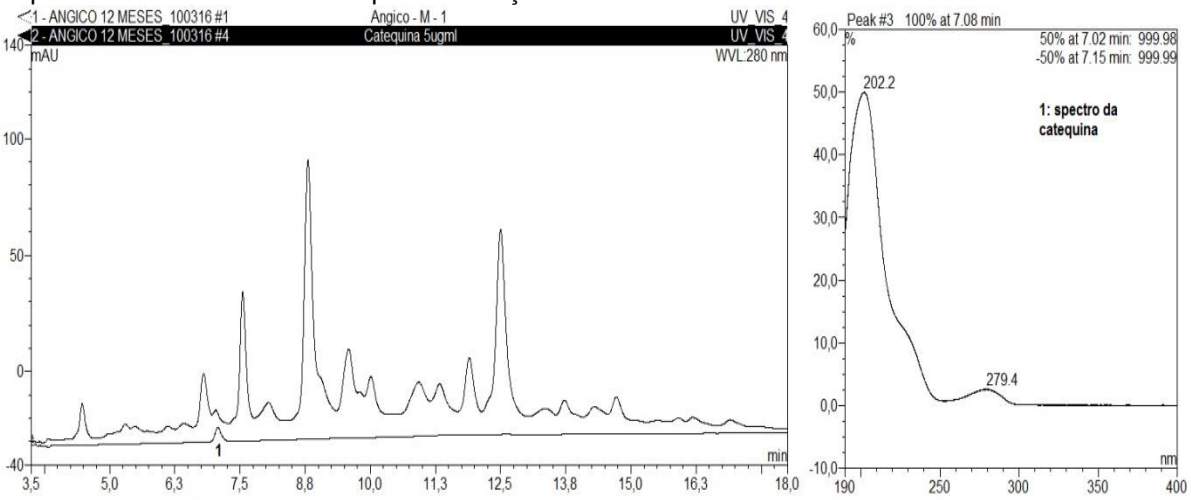
Através da figura 26 pode-se constatar que as 12 amostras de angico apresentaram constituinte claramente separados, com o mesmo perfil e com picos referentes a catequina. Mesmo com a presença de variações nas concentrações dos teores de catequina nas cascas de angico, foi possível a obtenção do fingerprint e deste modo obter os resultados de modo positivo, tendo em vista que a presença deste marcador é de suma importância para um possível desenvolvimento de um medicamento fitoterápico com base nesta droga vegetal estudada. Assim como a catequina, os demais constituintes extraídos das cascas de *A. colubrina* apresentaram-se característicos a espécie em todas as amostras coletadas, independente da época do ano.

Figura 26 - Fingerprint obtidos por HPLC-DAD para as 12 amostras das cascas de *A. colubrina*.



Fonte: próprio autor

Figura 27 - Cromatograma da amostras (ANG 1) de *A. colubrina* e do padrão catequina mostrando o espectro de varredura com tempo de retenção em 7.08 minutos.



Fonte: próprio autor

Os teores de catequina foram calculados de acordo com a área correspondente ao pico do padrão nas 12 amostras analisadas. Todas as amostras apresentaram catequina em sua composição, conforme evidenciado no perfil químico obtido. Os maiores teores foram obtidos nos meses em que as temperaturas apresentaram-se mais elevadas. Os dados dos teores para o marcador catequina estão presentes na tabela 12.

Tabela 12 - Teor de catequina para a avaliação do efeito sazonal observado sobre as amostras das cascas de *A.* colubrina.

AMOSTRA		TEOR DE CATEQUINA (Teor g%)
Código	**Mês/Ano**	
ANG1	**Junho/14**	0,1089
ANG2	**Julho/14**	0,1183
ANG3	**Agosto/14**	0,1156
ANG4	**Setembro/14**	0,1313
ANG5	**Outubro/14**	0,1064
ANG6	**Novembro/14**	0,1049
ANG7	**Dezembro/14**	0,1257
ANG8	**Janeiro/15**	0,1395
ANG9	**Fevereiro/15**	0,1680
ANG10	**Março/15**	0,1866
ANG11	**Abril/15**	0,1902
ANG12	**Maio/15**	0,2111

Fonte: Próprio autor.

Araújo e colaboradores 2015 constataram em seus experimentos que a concentração de catequina, epigalocatequina em *A. colubrina* por HPLC apresentaram pouca variação de taninos condensados ao longo do ano. A avaliação do estudo constatou que mesmo havendo variação de quantificação de seus constituintes, esses compostos sempre irão estar presentes no vegetal, independente das condições de clima, temperatura e índices pluviométricos. Conforme estudos de Monteiro 2005, os maiores teores de taninos encontrados em algumas espécies tânicas ocorrem nas estações do verão e outono. Diferentes condições climáticas fazem com que as plantas se ajustem a essas condições, refletindo em diferentes perfis cromatográficos

Tanto a CCD-AE como a CLAE enfrentam limitações semelhantes quando se desenvolve um método para pro-arquivamento de impressões digitais, no entanto, a CCD-AE tem a vantagem de possuir tanto bandas coloridas como fatores de retenção para identificar substâncias individuais. A técnica também permite que as amostras sejam analisadas simultaneamente, tornando-se um simples processo de comparação de perfis químicos (LOESCHER et al, 2014).

5.5.3 Avaliação da correlação entre teores de CLAE e Taninos Totais

Através dos resultados das análises por CLAE e de Taninos Totais em espectrofotometria UV-Vis foram avaliadas as correlação entre todas as amostras em triplicatas com o intuito de verificação das semelhanças entre as amostras e avaliar a similaridade ou dependência entre os valores encontrados mensalmente pelas amostras coletadas no período entre julho/14 a junho/15.

Com as áreas dos picos referentes a catequina e os teores de taninos totais foi possível correlacionar os resultados através do Excel 2010 nos meses correspondentes ao período de Julho/14 a Junho/15. Os dados obtidos são apresentados nas tabelas 13 e 14.

Na avaliação da correlação de catequina por CLAE, a amostra 1 (Jul/14) e a amostra 5 (Nov/14) foram as que mais apresentaram correlação muito fraca e relação as outras amostras coletadas. É possível inferir também uma baixa correlação entre as amostras 2 e as amostras 3 (ρ=0,0610) e 12 (ρ=-0,1085), baixa correlação entre as amostras 5 e 7. Os demais meses apresentaram correlação de moderada a forte. A tendência de se encontrar uma forte correlação foi vista entre as amostras coletadas no período de baixos índices de pluviosidade, no qual compreenderam as coletas realizadas entre Dezembro/14 até Maio/15.

A correlação de Pearson realizada através das amostras de taninos totais apresentados na tabela 13 mostram que a amostra 6 apresentou menores correlações entre as outras amostras no período de um ano, diferentemente do que aconteceu com a mesma amostra para a correlação de catequina por CLAE. A amostra 6 é representativa do mês de dezembro/14 evidenciou um aumento significativo do teor de taninos naquele ano e colaborado a este ponto, o índice pluviométrico apresentou uma diminuição considerável nos níveis de chuvas na região. A amostra 8 (fevereiro/15) e a amostra 11 (maio/15) apresentou a melhor correlação, ficando com uma correlação perfeita positiva de 1,000. Neste mesmo período seco, ficou claro também que as correlações apresentaram-se mais moderadamente positivas ($0,5 \leq r \leq 0,8$) e fortemente positivas ($0,8 \leq r \leq 1$).

Quando se aplica o Teste de Correlação de Pearson entre os teores de taninos totais e catequina nas amostras mês a mês pode-se avaliar a existência de correlação existente entre os teores de catequina por CLAE e taninos totais por

Espectrofotometria por UV-Vis. Os dados mostram que a maioria das amostras apresentam correlação fraca e negativa entre os teores quantificados e sobretudo esta similaridade fraca ocorre nos meses em que os teores quantificados são menores e há elevada taxa de precipitação de chuvas na região. A correlação moderada positiva no mês de julho/14, apresentando r = 0,70. Os meses considerados mais quentes e secos foram os que apresentaram uma correlação forte negativa (Dez/15, Mar/15 e Abr/15). Esse perfil de correlação mais forte corrobora com os dados entre amostras para os teores de catequina e taninos totais na tabelas 13 a 15.

Os métodos de doseamento, independente da técnica utilizada, deve levar a uma melhor resposta na identificação dos marcadores químicos presentes principalmente em amostras vegetais por possuírem vasta complexidade química. A adoção de um marcador para o controle de qualidade utilizando CLAE ou espectrofotometria por UV-Vis podem levar a conclusão equivocadas sobre a variabilidade químicas das amostras e consequentemente uma correlação de entre coletas em diferentes épocas do ano. As técnicas analíticas podem apresentar respostas com grandezas distintas e neste caso a avaliação da correlação encontrada pode sugerir a possibilidade de comparar os resultados (MARQUES et al, 2013).

Tabela 13 - Correlação da amostras mensais dos teores de catequina por CLAE e Taninos Totais por UV-Vis das amostras em triplicata**.**

	ANG 1	**ANG 2**	**ANG 3**	**ANG 4**	**ANG 5**	**ANG 6**	**ANG 7**	**ANG 8**	**ANG 9**	**ANG 10**	**ANG 11**	**ANG 12**
TT%/Catequina %	0,70	-0,13	0,18	-0,08	-0,38	-0,87	-0,11	-0,40	-0,95	-0,87	-0,37	0,25

ANG 1 a 12 = Amostras das cascas de Angico
Fonte: próprio autor

Tabela 14 - Correlação média das amostras em triplicata dos teores de catequina das cascas de A. *colubrina* em CLAE.

	Amostra 1	*Amostra 2*	*Amostra 3*	*Amostra 4*	*Amostra 5*	*Amostra 6*	*Amostra 7*	*Amostra 8*	*Amostra 9*	*Amostra 10*	*Amostra 11*	*Amostra 12*
Amostra 1	1											
Amostra 2	0,6741	1										
Amostra 3	-0,6960	0,0610	1									
Amostra 4	-0,0605	0,6964	0,7588	1								
Amostra 5	0,8853	0,9402	-0,2823	0,4105	1							
Amostra 6	-0,0541	-0,7740	-0,6792	-0,9934	-0,5122	1						
Amostra 7	-0,4219	0,3851	0,9446	0,9304	0,0480	-0,8824	1					
Amostra 8	0,1436	0,8277	0,6105	0,9791	0,5873	-0,9959	0,8366	1				
Amostra 9	-0,1918	0,5955	0,8382	0,9912	0,2864	-0,9695	0,9707	0,9436	1			
Amostra 10	-0,0996	-0,8021	-0,6450	-0,9871	-0,5508	0,9989	-0,8600	-0,9990	-0,9574	1		
Amostra 11	0,1111	0,8089	0,6362	0,9852	0,5604	-0,9983	0,8541	0,9994	0,9540	-0,9999	1	
Amostra 12	0,6610	-0,1085	-0,9988	-0,7889	0,2363	0,7134	-0,9591	-0,6475	-0,8632	0,6807	-0,6722	1

Amostras 1 a 12 = Amostras das cascas de Angico
Fonte: próprio autor.

Tabela 15 - Correlação média das amostras em triplicata de Taninos Totais por Espectrofotometria UV-Vis das cascas de *A. colubrina*

	Amostra 1	***Amostra 2***	***Amostra 3***	***Amostra 4***	***Amostra 5***	***Amostra 6***	***Amostra 7***	***Amostra 8***	***Amostra 9***	***Amostra 10***	***Amostra 11***	***Amostra 12***
Amostra 1	1											
Amostra **2**	0,1013	1										
Amostra 3	0,9786	0,1052	1									
Amostra 4	0,6850	0,6553	0,8200	1								
Amostra 5	0,0862	0,9823	0,2891	0,7849	1							
Amostra 6	0,3273	0,9732	0,1262	0,4641	0,91314	1						
Amostra 7	0,9707	0,1405	0,9993	0,8399	0,3230	0,0907	1					
Amostra 8	0,8660	0,4096	0,9502	0,9575	0,5728	0,1889	0,9607	1				
Amostra 9	0,7924	0,6871	0,6501	0,0984	0,5393	0,8357	0,6226	0,3812	1			
Amostra 10	0,3711	0,9614	0,1724	0,4222	0,8930	0,9989	0,1372	0,1428	0,8605	1		
Amostra 11	0,8660	0,4096	0,9502	0,9575	0,5728	0,1889	0,9607	1	0,3812	0,1428	1	
Amostra 12	0,9819	0,2875	0,9222	0,5349	0,1035	0,5000	0,9078	0,7559	0,8934	-0,5399	0,7559	1

Amostras 1 a 12 = Amostras das cascas de Angico

Fonte: próprio autor

Avaliando as correlações existentes entre as amostras em um mesmo grupo (catequina e TT) fica mais claro que as maiores correlações moderadas e fortes foram nas identificações por CLAE. O método de CLAE pode mostrar melhores resultados quando comparados a espectrofotometria, tendo em vista que a identificação de um composto específico, mesmo que em baixas concentração em determinadas épocas do ano o método é capaz de apresentar resposta parecidas dentro da faixa estudada para as substâncias em grupo (MARQUES et al, 2013).

O aumento de amplitude de uma das variáveis ou de ambas pode ocorrer quando se trabalha com amostras complexas e a variabilidade pode aumentar. Quando tem-se uma amostra que é homogênea, o valor do coeficiente de correlação tende a diminuir, pois um dos fatores que influenciam na intensidade da correlação é a variabilidade da amostra, portanto quanto maior a variabilidade das variáveis envolvidas na análise, maior a correlação entre elas (LIRA, 2004).

6 CONCLUSÃO

Através das análises físico-químicas realizadas nas cascas de *A. colubrina* var. cebil (Griseb.) Altschul foi possível inferir que as amostras atenderam exigências de qualidade mínimas recomendadas de umidade, cinzas e granulometria. O enquadramento para a droga vegetal dentro dos parâmetros recomendados pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição foram importantes para avaliar também o comportamento sazonal das amostras de cascas de *A. colubrina* frente as condições climáticas da região estudada.

A prospecção fitoquímica das cascas da espécie demonstrou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, açúcares redutores, terpenos/esteroides e taninos condensados. A composição química observada foi semelhante em todas as amostras avaliadas durante o estudo de sazonalidade indicando que mesmo com a presença de variações climáticas existentes, é possível a identificação desses compostos.

A validação dos métodos de doseamentos de taninos na matéria-prima de *A. colubrina* (por espectrofotometria no UV-Vis e por CLAE-DAD) mostrou que os métodos foram adequados para a finalidade proposta, apresentando-se dentro dos parâmetros exigidos pela legislação em vigor.

A obtenção dos *fingerprints* por CCD-AE e CLAE-DAD poderam comprovar uma semelhança em todas as amostras coletadas para avaliação do estudo de sazonalidade. Os testes de correlação de Pearson abordaram estatisticamente a similaridade entre os teores de catequina por CLAE e taninos totais por espectrofotometria UV-Vis, mostrando a relação existente foram fortes e moderada forte entre as amostras estudadas.

Em associação, a quantificação de taninos totais através da espectrofotometria por UV-Vis colaborou com a avaliação da variabilidade sazonal da espécie na perspectiva de atribuir o uso da droga vegetal em questão na produção de fitoterápicos e na grande ajuda que essas metodologias analíticas podem proporcionar no controle de qualidade das cascas de *A. colubrina*.

.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L.; MONTEIRO, J.M.; NETO, M. F. L. E.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p.325-354, 2007.

ALVES, I. A. B. S.; MIRANDA, H. M.; BARBOSA. A. P.; RANDAU, K. P.; SOARES, L. A. L. S. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl. **Revista Árvore,** v. 39, n. 1, p.37-47, 2015.

AOYAMA, E. M.; MAZZONI-VIVEIROS, S. C. Adaptações estruturais das plantas ao ambiente. Instituto de Botânica – IBt. São Paulo, outubro de 2006.

APAC. **– Agencia Pernambucana de Águas e climas.** Disponível em: <.http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/chuvas-caruaru.php>. Acesso em: 19 abr. 2016.

ARAÚJO, E. R. D.; OLIVEIRA, D. C.; SOARES, T. C.; ZUCOLOTTO, S. M.; TAVARES, J. C. M.; D. G. K. C. Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie *Anadenanthera colubrina* frente à bactérias Gram negativa e Gram positiva. **Biota Amazônia**, v. 5, n. 3, p. 66-71, 2015.

ARAÚJO, S. M. S. A região semiárida do nordeste do brasil: Questões Ambientais e Possibilidades de uso Sustentável dos Recursos. **Rios Eletrônica- Revista Científica da FASETE.** Ano 5, n. 5, 2011.

ARAÚJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. A.; SOLONC, L. G. S.; SILVA, G. A.; ALMEIDA, M. G.; COSTA, J. G. M.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species? **Industrial Crops and Products,** v. 76, p. 550-556, 2015.

ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas,** v. 34, n. 2, p.193-210. 2013.

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

BORBA, P. A. A.; RIEKES, M. K.; PEREIRA, R. N.; STULZER, H. K.; DALLA VECCHIA, D. Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV para quantificação de carvedilol. **Quim. Nova**, v. 36, n. 4, p. 582-586, 2013.

BORGES, D. B.; FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis L., Foeniculum vulgare Miller, Maytenus ilicifolia Mart. ex. Reissek* e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p.229-236, 2005.

BRAZ, R.; WOLF, L. G.; MELLO, J. C. P. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p.1111-1118, 2011.

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, N. M. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 129-146, 2003.

BRUYNE, T*.;* PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A . Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 4, p. 445-459, 1999.

BUENO, F. G. **Controle de qualidade, desenvolvimento de metodologia analítica e validação da atividade cicatrizante de *Caesalpinia peltophoroides* Benth**, Dissertação de Mestrado. UEM. 2010.

BULBOVAS, P.; RINALDI, M. C. S.; DELITTI, W. B. C.; DOMINGOS, M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam*.* (Pau-Brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 687-696, 2005.

CABRAL, E. C. **Utilização da técnica de *fingerprinting* por Espectrometria de Massas para análises de produtos naturais**. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Usp, São Paulo, 2010.

CAO, Y.; WANG, L.; YU, X.; YE, J. Development of the chromatographic *fingerprint* of herbal preparations *Shuang–Huang–Lian* oral liquid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p. 845-856, 2006.

CARDOSO, F. L.; MURAKAMI, C.; MAYWORM, M. A. S.; MARQUES, L. M**.** Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens Mill., Xanthorrhoeaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** São Paulo, v. 20, n. 1, p. 35-40, 2010.

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH.: Reviewer: Guidance Validation of Chromatographic Methods.1994.

CHAVES, T. P. **Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro.** 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia, UEPB, Campina Grande – Pb. 2012.

CORREIA, R. C.; KIILL, L. H. P.; MOURA, M. S. B.; CUNHA, T. J. F.; JÚNIOR, L. A. J.; ARAÚJO, J. L, P. A região semiárida brasileira**.** **<**http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54762/1/01-A-regiao-semiarida-brasileira.pdf-18-12-2011.pdf>. Acesso em 14 de setembro de 2016.

COSTA, R. S.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. S.; PEREIRA, N. L.; JÚNIOR, J. O. C. S. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus L. (Asteraceae)*. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

CRUZ, A. P. G. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante.** 2008. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Instituto de Química, UFRJ. 2008.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel *e Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 23, n. 2, p.174-181, 2012.

DIVISÃO DE ACREDITAÇÃO DE LABORATÓRIOS. 008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos - Documento de caráter orientativo**. Doq-cgcre, 2010.

EMERENCIANO, D. P.; CRUZ, A. M. F.; PEREIRA, J. D. S.; 1 MOURA, M. F. V.; MACIEL, M. A. M. Determinação da Propriedade Antioxidante e Teores de Minerais Presentes nas Folhas de Azadirachta. **Revista Fitos**, v 8(2), p. 73-160, 2013.

FERREIRA, M. R. A. **Triagem antifúngica de extratos obtidos de espécies vegetais do nordeste brasileiro.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. UFRN, 2012.

GBIF - Global Biodiversity Information. ***Anadenanthera colubrina var. cebil (Griseb.)*** **Altschul.** Disponível em: <http://www.gbif.org/occurrence/search?taxon_key=2952829>. Acesso em: 15 dez. 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimíca 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 gracillis shauer***. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, UFSE, 2009.

GUIMARÃES, E. C. B. T. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para o controle químico da qualidade de fitoterápicos à base de extrato seco de alcachofra.** 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde, Instituto

Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

GUTIERREZ-LUGO, M. T, DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B. N.Lipoxygenase Inhibition by *Anadanthoflavone*, a New Flavonoid from the Aerial Parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Med.,** v. 70, n. 3, p. 263-265, 2004.

HUGERMAN, A. E. **Tannins Chemistry.** 2. ed. Miami: Oxford, 2002.

IBGE,2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>. Acesso em: 22 de setembro 2016.

JOTHY, S. L.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Chromatographic and Spectral Fingerprinting of *Polyalthia longifolia* a Source of Phytochemicals. **Bioresource**, v. 8, n. 4, p. 510 2-5119, 2013.

KAEFERA, C. L.; HELLWIGA, F. M.; REISA, R. H. D.; SILVA, C. V.; MALESUIKA, M. D. Desenvolvimento e validação de método por CLAE-DAD e estudo preliminar da estabilidade da sinefrina em extrato seco de *Citrus aurantium* L. **Revista Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 709-714, 2015.

LIFE, E. Of. ***Anadenanthera colubrina var. cebil*.** Disponível em: <http://eol.org/data_objects/31960876>. Acesso em: 12 maio 2016.

LIMA NETO, G.A.; KAFFASHI, S.; LUIZ, W.T.; FERREIRA, W.R.; SILVA, Y.S.A.; PAZIN, G.V.; Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med**, v.17, n.4, p.1069-1077, 2015.

LOESCHER, C. M.; MORTON, D. W.; RAZIC, S.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*—Advantages and limitations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 98, p. 52-59, 2014.

LOPES, G.C.; SANTOS, P.V.P.; DICIAULA, M.C.; BLAINSKI, A.; GUTIERRE, M.A.M.; MELLO, J.C.P. Validação de metodologia analítica para a determinação de derivados do ácido hidroxicinâmico de *Echinodorus grandiflorus*. **Rev. Bras. Pl. Med**., v.14, n.3, p.500-505, 2012.

LÓPEZ-ORENES, A.; BUESO, M. C.; CONESA, H. M.; CALDERÓN, A. A.; FERRER, M. A. Seasonal changes in antioxidative/oxidative profile of mining and non-mining populations of Syrian beancaper as determined by soil conditions . **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 437–447, 2017.

LOURA, L. G. **Variação sazonal, horário de coleta e potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Cinnamodendron dinisii* Scwacke.** 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado), UFLA, 2015.

LI, Y.; IWAASA, A. D.; WANG, Y.; JIN, L.; HAN, G.; ZHAO, M. Condensed tannins concentration of selected prairie legume forages as affected by phenological stages during two consecutive growth seasons in western Canada. **Canadian Journal of Plant Science,** v. 94, n. 5, p.817-826, 2014.

LIRA, S. A. **Análise de correlação: abordagem teórica e de construção dos coeficientes com aplicações**. Dissertação de mestrado. UFPR. 2004.

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

MAIA, G. L. A. **Estudo fitoquímico da espécie *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Reis (Fabaceae).** 2008. 157 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, UFPB, 2008.

MALACARNE, M.; NARDIN, T.; BERTOLDI D.; NICOLINI, G.; LARCHER, R. Verifying the botanical authenticity of commercial tannins through sugars and simple phenols profiles. **Food Chemistry,** v. 206, p. 274-283, 2016.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa. **Química Nova,** v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MEDEIROS, J. X. **Quantificações de substâncias tânicas em *Anadenanthera colubrina* (vell.) brenan, *Mimosa tenuiflora* (willd.) poir. e *Acacia mearnsii* de wild. utilizando distintas metodologias.** 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Florestal, UFCG, 2015.

MOK, D. K. W.; CHAU, F. Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,** v. 82, n. 1-2, p. 210-217, 2006.

MONTEIRO, J. M. Teor de taninos em espécies arbóreas medicinais da caatinga: aspectos ecológicos e etnobotânicos. **Dissertação de mestrado**.UFRPE, 2005.

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

MONTEIRO, J. M.; SOUZA, J. S. N.; NETO, E. M. F. L.; SCOPEL, K.; TRINDADE, E. F. Does total tannin content explain the use value of spontaneous medicinal plants

from the Brazilian semi-arid region? **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 24, n. 2, p. 116-123, 2014.

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

MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM, E. L. C.; ARAÚJO E. L.; STRATTMANN, R. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005b.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; NETO, E. M. F. L.; ARAÚJO E. L.; AMORIM, E. L. C Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 173-186, 2006b.

MONTEIRO, R. P. M. **Desenvolvimento de perfis cromatográficos típicos e quantificação de polifenois das folhas e cascas de *Anacardium occidentale*.** 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, UFPE, 2016.

MOREIRA, T. M. S.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev. bras. Farmacognosia,** v. 20, n. 3, 2010.

NUNES R. S.; SENNA, B. A. A.; SILVA, J. A.; SANTANA, D. P. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. **Rev. Bras. Farm**., v. 86, n. 3, p. 87-91, 2005.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; LIMA, C. R.; BASTOS, P. M.; NETO, P.M.N. Taninos condensados da casca de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina var. cebil*) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 22 – 27, jul, 2013.

PAES, J. B.; LIMA, C. R.; OLIVEIRA, E.; NETO P. N.M Características Físico-Química, Energética e Dimensões das Fibras de Três Espécies Florestais do Semiárido Brasileiro. **Floram.**, p.1-6, 2013.

PAES, J. B.; SANTANA, G. M.; AZEVEDO. T. K. B.; MORAIS, R. M.; JÚNIOR, J. T. C. Substâncias tânicas presentes em várias partes da árvore angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina (Vell.)* Brenan. *var. cebil* (Gris.) Alts.). **Scientia Forestalis,** Piracicaba, v. 38, n. 87, p.441-447, 2010.

PETROVICK, P. R. Tecnologia de fitoterápicos: um desafio a vencer. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil,** Florianópolis, v. 14, 1996.

REZENDE, W. P. **Influência de fatores ambientais na composição química do óleo essencial e nos teores de substâncias fenólicas das folhas de *Syzygium jambos* L. Alston – Myrtaceae.** Dissertação de mestrado. UFG. 2012.

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

RIBEIRO, S. S. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Jatropha curcas* L.** 2010. 176 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, UFS, 2010.

ROCHA, E. A. L. S. S. **Atividade antifúngica, caracterização fitoquímica e perfil térmico da Anadenanthera colubrina (VELL.) Brenan.** Dissertação de Mestrado. UEPB. 2014.

SAITO, S. T. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá-verde brasileiro (*camellia sinensis* var. Assamica) cultivar iac-259.** 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2007.

SANTANA, A. L.; MARANHÃO, C. A.; SANTOS; J. C.; CUNHA, F. M.; CONCEIÇÃO, G. M.; BIEBER, L. W. NASCIMENTO, M. S. Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation,** v. 64, n. 1, p. 7-12, 2010.

SANTOS, Jandson S. *et al*. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina (Vell.)* Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 218-222, jun. 2013.

SANTOS, L. G. **Método de difusão radial: validação e otimização do processo de extração para doseamento de taninos de espécies medicinais da caatinga.** 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, UFPE, 2012.

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F. BATISTA, F.; SANTOS, L. R.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN J. C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 16, n. 4, p. 552-556, 2006.

SARTORI, C. J. **Avaliação dos teores de compostos fenólicos na casca de *Anadenanthera peregrina* (Angico vermelho)**. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agricultura, UFLA, 2012.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos.** 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, UFPE, 2013.

SILVA, L. M. B.; BARBOSA, D. C. A. Crescimento e sobrevivência de *Anadenanthera macrocarpa* (benth.) brenan *(leguminosae*), em uma área de caatinga, Alagoinha – PE. **Acta Bot. Bras.**, v. 3, n. 14, p. 251-261, 2000.

SILVA, L. C. N.; SILVA, L. C.; SILVA, C. A.; SOUZA, R. M.; SILVA, J. M. A.;SANTOS, C. M. T Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of Anadenanthera *colubrina, Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology,** v. 49, n. 9, p. 2222-2228, 2011.

SOLETTI, A. G. **Efeitos da sazonalidade sobre a composição química, potencial antimicrobiano, citotóxico e mutagênico dos óleos essências e frações diclorometano e acetato de etila de *Piper amplum* e *Piper cernuum***. Tese de Doutorado. UNIVALE. 2015.

SOUZA, L. M. **Flavonoides totais, atividade antioxidante e variação sazonal da composição química do óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* Kunth.).** Dissertação de Mestrado. UFMG. 2015.

SOUSA, J. P. B. ***Copaifera langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal**. 167 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, USP, 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, n. 2, p.148-161, 2011.

VERZA, S. G. **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona.** 134 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006.

VIGO, C. l.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal - raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 14, n. 2, p.137-144, 2004.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant drug analysis - a thin layer chromatography atlas.** 2. ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.

WEBER, C. R. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 98, n. 4, p. 235-244, 2011.

WOLF, L. G. Avaliação da qualidade físico-química de drogas vegetais. **Dissertação de mestrado.** Universidade Federal de Maringá, 2008.

YONGYU, Z.; SHUJUN, S.; JIANYE, D.; WENYU,D.; HUIJUAN,C.; JIANBING, W.; XIAOJUN, G. Quality Control Method for Herbal Medicine - Chemical Fingerprint Analysis. Quality **Control of Herbal Medicines and Related Areas,** v. 10, p.171-194, 2011.

ZEGGIO, A. R. S. **Própolis catarinense: influência da sazonalidade e da origem geográfica no perfil de metabólitos secundários.** Tese de doutorado. UFSC. 2016.

ZHA, X-G.; PAN, L. H.; LUO, J. P.; WANG J. H.; WEI, P.; BANSAL, V. Enzymatic *fingerprints* of polysaccharides of *Dendrobium officinale* and their application in identification of Dendrobium species. **Journal of Natural Medicines,** v. 66, n. 3, p. 525-534, 2012.