



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**ISABELLE CRISTINNE FERRAZ BEZERRA**

**Investigação Fitoquímica de Extrato Bruto e Frações das Folhas de *Eugenia uniflora* L.  
(Pitangueira)**

Recife - PE

2016

**ISABELLE CRISTINNE FERRAZ BEZERRA**

**Investigação Fitoquímica de Extrato Bruto e Frações das Folhas de *Eugenia uniflora* L.  
(Pitangueira)**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Recife - PE

2016

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Bezerra, Isabelle Cristinne Ferraz**

**Investigação Fitoquímica de extrato bruto e frações das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira). / Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra - Recife: O Autor, 2016.**

**213 folhas: il., fig., tab.**

**Orientador: Luiz Alberto Lira Soares**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2016.**

**Inclui referências e apêndices**

**1. Plantas medicinais 2. Pitangueira 3. Espectrofotometria I. Soares,  
Luiz Alberto Lira (orient.) II. Título**

**615.321**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CB-2017-399**

**ISABELLE CRISTINNE FERRAZ BEZERRA**

**Investigação Fitoquímica de Extrato Bruto e Frações das Folhas de *Eugenia uniflora* L.  
(Pitangueira)**

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

**Aprovado em: 01/03/2016.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Orientador)

---

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Membro Interno)

---

Prof. Dr. Elba Lúcia Cavaltanti de Amorim (Membro Externo)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITORA**

Prof. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**

Profa. Dra. Profa. Maria Eduarda de Larrazábal

**VICE-DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO**

**TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO**

**TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Dedico este trabalho a todos os amigos e familiares que foram meu alicerce durante esta jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, em especial à minha mãe, Edna, por todo o suporte e apoio durante toda minha vida. Ao meu pai por todo carinho e amor. À minha família que esteve sempre ao meu lado diante de todas as dificuldades e alegrias.

Ao meu orientador Luiz Soares, pela oportunidade, confiança, amizade e todos os ensinamentos passados durante todos estes anos de trabalho. Considero-o um grande exemplo de pessoa e profissional a ser seguido. Minha profunda admiração.

À Mágda por todos os puxões de orelha, toda a amizade e principalmente por todo conhecimento transmitido, e pelos bons momentos dentro e fora do ambiente de trabalho.

À Rhyanne, que como iniciação científica desempenhou um importante papel neste trabalho, agradeço pelo apoio e amizade.

As companheiras Julia e Wliana pela amizade e apoio nos momentos que precisei. Aos demais componentes de laboratório por tornarem o ambiente de trabalho um local tão acolhedor. É um prazer trabalhar com vocês.

A todos os meus amigos, que estiveram presentes nos momentos bons e ruins. Vocês me ajudaram muito e com certeza tem um papel importante na minha vida.

*"A persistência é o caminho do êxito."  
Charles Chaplin*

*"Nunca se esqueça de quem você é, porque é certo que o mundo não se lembrará. Faça disso sua força. Assim, não poderá ser nunca a sua fraqueza. Arme-se com esta lembrança, e ela nunca poderá ser usada para magoá-lo."  
George R. R. Martin*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CC</b>	Cromatografia em Coluna
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CCDP</b>	Cromatografia em camada delgada preparativa
<b>CCD-AE</b>	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
<b>CLAE-DAD</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Fotodiodos
<b>CV</b>	Coefficiente de Variação
<b>DCC</b>	Desenho Composto Central
<b>DD</b>	Doseamento direto
<b>DPR</b>	Desvio Padrão Relativo
<b>EB</b>	Extrato Bruto
<b>EBHA</b>	Extrato Bruto após Hidrólise Ácida
<b>MPHA</b>	Matéria Prima após Hidrólise Ácida
<b>FAc</b>	Fração Acetato de Etila
<b>FAq</b>	Fração Aquosa
<b>FC</b>	Folin Ciocalteu
<b>FH</b>	Fração Hexano
<b>FNT</b>	Fração Não Tanante
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonisation</i>
<b>PFT</b>	Polifenóis Totais
<b>TT</b>	Taninos Totais

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura dos taninos hidrolisáveis.....	33
<b>Figura 2</b> - Estrutura dos taninos condensados.....	33
<b>Figura 3</b> - Estrutura básica dos principais flavonoides.....	34
<b>Figura 4</b> - Histograma de distribuição granulométrica (A) e curva de retenção e passagem (B).....	76
<b>Figura 5</b> - Teor de Flavonoides Totais em diferentes proporções de solvente.....	78
<b>Figura 6</b> - Teor de flavonoides totais em diferentes proporções de droga.....	79
<b>Figura 7</b> - Estruturas dos flavonoides Quercetina (A) e Rutina (B).....	80
<b>Figura 8</b> - Espectro de varredura da matéria prima, extrato bruto e frações (300 a 500 nm)..	81
<b>Figura 9</b> - Cinética de complexação do cloreto de alumínio na matéria prima e extrato bruto.....	83
<b>Figura 10</b> - Influência das diferentes alíquotas de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) 5% sobre as absorvâncias das amostras de matéria prima e extrato bruto de <i>E. uniflora</i> .....	84
<b>Figura 11</b> - Teor de flavonoides totais por hidrólise ácida em diferentes quantidades de droga vegetal de <i>E. uniflora</i> .....	86
<b>Figura 12</b> - Influência das alíquotas de ácido sobre os teores de flavonoides totais (TFT %) nas amostras.....	87
<b>Figura 13</b> - Espectros de Varredura para os padrões (A) e para a matéria prima (B) por doseamento direto e após hidrólise ácida.....	88
<b>Figura 14</b> - Espectros de varredura para matéria prima, extrato bruto, frações enriquecidas, após hidrólise ácida e padrão em complexação com $AlCl_3$ .....	89
<b>Figura 15</b> - Cinética de complexação do cloreto de alumínio na matéria prima e extrato bruto após hidrólise ácida.....	90
<b>Figura 16</b> - Influencia da alíquota de $AlCl_3$ 5% nas absorvâncias das amostras de matéria prima e extrato bruto de <i>E. uniflora</i> após hidrólise ácida.....	91
<b>Figura 17</b> - Comparação entre teores de polifenóis totais (PFT g%) obtidos em diferentes quantidades de droga e expressos como ácido gálico.....	93
<b>Figura 18</b> - Comparação entre teores de taninos totais (TT) obtidos em diferentes métodos extrativos, expressos em g% de ácido gálico.....	95
<b>Figura 19</b> - Cinética de formação de cromóforo através de reação de Folin Ciocalteu para quantificação de polifenóis em <i>E. uniflora</i> .....	96
<b>Figura 20</b> - Gráfico de Paretos para efeitos padronizados do fatorial $2^2$ .....	98

<b>Figura 21</b> - Superfície de resposta para o fatorial.....	99
<b>Figura 22</b> - Absorvâncias da fração não adsorvida nos agentes complexantes da matéria prima em diferentes concentrações. ....	101
<b>Figura 23</b> - Teor de taninos totais da matéria prima (A) e do extrato bruto (B) de acordo com diferentes agentes complexantes. ....	101
<b>Figura 24</b> - Absorvâncias obtidas para o extrato bruto na fração não adsorvida de acordo com diferentes agentes complexantes. ....	102
<b>Figura 25</b> - Curvas de linearidade médias da rutina (A) e quercetina (B) pelo método de doseamento direto.....	103
<b>Figura 26</b> - Curva de calibração média da quercetina. ....	104
<b>Figura 27</b> - Curva de calibração média do padrão ácido gálico. ....	104
<b>Figura 28</b> - Curvas de linearidade da matéria prima (A) e extrato bruto (B) na metodologia de quantificação de flavonoides por Doseamento Direto.....	105
<b>Figura 29</b> - Curvas de linearidade médias da matéria prima(A) e extrato bruto (B) na metodologia de quantificação de flavonoides após Hidrólise Ácida.....	106
<b>Figura 30</b> - Linearidades médias da metodologia de Taninos Totais na matéria prima (A) e extrato bruto (B) das folhas de <i>E. uniflora</i> . ....	106
<b>Figura 31</b> - Curvas de especificidade e linearidade obtidas por Doseamento Direto (1), Hidrólise ácida (2), Taninos totais (3) na matéria prima. ....	109
<b>Figura 32</b> - Curvas de especificidade e linearidade obtidas por Doseamento Direto (1'), Hidrólise ácida (2'), Taninos totais (3') no extrato bruto.....	109
<b>Figura 33</b> - Cromatogramas obtidos pela metodologia desenvolvida para matéria prima em 270 nm (A) e em 350 nm (B); para o extrato bruto em 270 nm (C); e em 350 nm (D). ....	121
<b>Figura 34</b> - Espectros de varredura das substâncias em análise: ácido gálico (A); ácido elágico (B); flavonoide 2 (C); e, flavonoide 3 (D). ....	122
<b>Figura 35</b> - Cromatogramas obtidos para os padrões de calibração externa – monômeros de taninos (A) e padronização interna – flavonoides (B) por CLAE-DAD. ....	124
<b>Figura 36</b> - Cromatogramas sobrepostos das matrizes analisadas (matéria prima e extrato bruto) e padrões (ácido gálico, ácido elágico, hiperosídeo e vitexina) por CLAE-DAD em 270 nm. ....	125
<b>Figura 37</b> - Curvas analíticas médias para os padrões obtidos para a verificação da linearidade do método. A –Ácido Gálico; B – Ácido Elágico; C – Vitexina; D – Hiperosídeo. ....	126

<b>Figura 38</b> - Curvas analíticas médias da matéria prima de folhas de pitanga obtidas para a verificação da linearidade do método. Em relação ao ácido gálico (A), Ácido Elágico (B), Flavonoide 2 (C) e Flavonoide 3 (D).....	128
<b>Figura 39</b> - Curvas analíticas médias do extrato bruto de folhas de pitanga obtidas para a verificação da linearidade do método. Em relação ao ácido gálico (A), Ácido Elágico (B), Flavonoide 2 (C) e Flavonoide 3 (D).....	128
<b>Figura 40</b> - Parâmetro de especificidade referente à substâncias pesquisadas (A: ácido gálico; B: ácido elágico; C: flavonoide 2 e flavonoide 3) presentes na matéria prima de <i>E. uniflora</i> . .....	130
<b>Figura 41</b> - Parâmetro de especificidade referente à substâncias pesquisadas (A: ácido gálico; B: ácido elágico; C: flavonoide 2 e flavonoide 3) presentes no extrato bruto de <i>E. uniflora</i> .	131
<b>Figura 42</b> - Cromatograma para taninos hidrolisáveis na Matéria prima (A) e no Extrato Bruto e Frações (B). Revelador: Cloreto Férrico. ....	145
<b>Figura 43</b> - Cromatogramas para taninos hidrolisáveis. Revelador: NEU + PEG, observado sob luz UV 365 nm Matéria prima (A) extrato bruto e frações observados sob luz UV 254 nm (B); extrato bruto e frações observados sob luz UV 365 nm (C). ....	147
<b>Figura 44</b> - Cromatograma para flavonoides. Revelador: Cloreto de alumínio, observada sob luz UV 365 nm. A: Matéria prima; B: Extrato bruto e frações. ....	148
<b>Figura 45</b> - Cromatograma para Flavonoides/Derivados Cinâmicos. Revelador: NEU +PEG, observada sob luz UV 365 nm.....	150
<b>Figura 46</b> - Cromatograma para Triterpenos/Esteroides. Revelador: Lieberman, observada sob luz UV 365 nm. A: Matéria Prima; B: Extrato Bruto e Frações. ....	151
<b>Figura 47</b> - Cromatograma para açúcares redutores. A – Extrato bruto e Frações; B – Matéria Prima. Revelador: Timol seguido de aquecimento a 100 °C. ....	153
<b>Figura 48</b> - Cromatogramas para derivados antracênicos. A: Matéria prima; B: Extrato bruto e frações sem revelador; C: Revelada: HNO <sub>3</sub> . ....	154
<b>Figura 49</b> - Cromatograma para taninos e flavonoides da matéria prima, extrato bruto e frações. Revelador: NEU+PEG em 365 nm. ....	155
<b>Figura 50</b> - Cromatograma obtido para a matéria prima. ....	158
<b>Figura 51</b> - Cromatograma obtido para o extrato bruto.....	158
<b>Figura 52</b> - Cromatograma obtido para a fração acetato. ....	159
<b>Figura 53</b> - Cromatograma obtido para a fração aquosa. ....	159

<b>Figura 54</b> - Espectros de absorção de varredura das substâncias presentes na matéria prima, extrato bruto e frações. AG: Ácido gálico; F1, F2, F3 e F4: Espectros de flavonoides não identificados; AE: Ácido Elágico .....	160
<b>Figura 55</b> - Cromatogramas sobrepostos da matéria prima (MP), extrato bruto (EB), fração aquosa (FAq), fração acetato (FAc) e fração hexano (FH). .....	161
<b>Figura 56</b> - Fingerprint por CCD-AE para diferentes amostras de extrato bruto de <i>E. uniflora</i> . Revelador: NEU+PEGem 365 nm.....	163
<b>Figura 57</b> - Fingerprint por CCD convencional para diferentes amostras de extrato bruto de <i>E. uniflora</i> . Revelador: NEU+PEG em 365 nm.....	163
<b>Figura 58</b> - <i>Fingerprint</i> por CLAE para diferentes amostras de <i>E. uniflora</i> .....	165
<b>Figura 59</b> - Análise das frações obtidas por coluna aberta por CCD (A) e por CLAE (B)...	168
<b>Figura 60</b> - Análise das frações obtidas por coluna aberta por CCD (Revelada NEU+PEG em 365 nm).....	169
<b>Figura 61</b> - Análise de CCD em frações coletadas da coluna aberta 2, revelada com NEU + PEG visualizadas sob luz UV 366.....	170
<b>Figura 62</b> - Análise de CCD em frações coletadas da coluna aberta 3, observada sob luz UV 366.....	171
<b>Figura 63</b> - CCD para as soluções obtidas das bandas da CCD preparativa; A – Sem revelação, visualizada sob luz UV 365 nm ; B – revelada NEU + PEG, visualizada sob luz UV 365 nm. ....	172
<b>Figura 64</b> - Cromatograma obtido para fração de CCDP (A); Espectro flavonoide 1 (B); Espectro flavonoide 2 (C).....	173

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Matriz experimental do DCC realizada no ensaio fatorial. ....	57
<b>Tabela 2</b> - Absorvâncias* do teste de alíquota para matéria prima vegetal (MP) e para extrato bruto (EB) em 410 nm. ....	81
<b>Tabela 3</b> - Matriz do Desenho de Composto Central para avaliar a influência da quantidade de Folin Ciocalteau e concentração de Carbonato sobre a resposta do método em absorvância. ....	97
<b>Tabela 4</b> - Análise estatística realizada para as curva analíticas médias dos padrões. ....	105
<b>Tabela 5</b> - Análise de Variância (ANOVA) realizada para as curva analíticas médias dos padrões. ....	107
<b>Tabela 6</b> - Equações das retas obtidas para os ensaios de especificidade e linearidade. ....	108
<b>Tabela 7</b> - Dados de Repetibilidade para as metodologias de Doseamento direto, hidrólise ácida e taninos totais. ....	111
<b>Tabela 8</b> - Dados de precisão intermediária obtidos pelas metodologias de quantificação de flavonoides e taninos por espectrofotometria. ....	113
<b>Tabela 9</b> - Dados de Robustez obtidos para a matéria prima. ....	115
<b>Tabela 10</b> - Dados de Robustez obtidos para o extrato bruto. ....	115
<b>Tabela 11</b> - Determinação de teores de flavonoides e taninos por espectrofotometria nas frações enriquecidas de <i>E. uniflora</i> . ....	118
<b>Tabela 12</b> - Método gradiente utilizado na análise por CLAE do extrato bruto das folhas de <i>E. uniflora</i> . ....	119
<b>Tabela 13</b> - Análise estatísticas das curvas de regressão para os padrões utilizados em calibração externa e padronização interna. ....	126
<b>Tabela 14</b> - Análise de regressão das curvas para as substâncias pesquisadas nas amostras. ....	127
<b>Tabela 15</b> - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para ácido gálico, ácido elágico e flavonoides na matéria prima e extrato bruto das folhas de <i>E. uniflora</i> . ....	132
<b>Tabela 16</b> - Ensaios de repetibilidade para ácido gálico, ácido elágico e flavonoides por CLAE na matéria prima e extrato bruto das folhas de <i>E. uniflora</i> . ....	133
<b>Tabela 17</b> - Ensaios de de precisão intermediária para o método de quantificação dos componentes nos farmacógenos de <i>E. uniflora</i> por CLAE. ....	134
<b>Tabela 18</b> - Robustez: avaliação do método por CLAE para quantificação dos metabólitos nas folhas de <i>E. uniflora</i> . ....	137

<b>Tabela 19</b> - Robustez: avaliação do método por CLAE para quantificação dos metabólitos no extrato bruto de <i>E. uniflora</i> . .....	138
<b>Tabela 20</b> - Quantificação de taninos e flavonoides por CLAE no extrato bruto (EB) nas frações enriquecidas (FAq – aquosa; FAc - Acetato de Etila; FH – Hexano).....	143
<b>Tabela 21</b> - Resultados em valores de RF para cromatoplaça para pesquisa de taninos hidrolisáveis. Placa revelada com cloreto férrico e observada sob luz visível .....	146
<b>Tabela 22</b> - Resultados em valores de Rfs para a cromatoplaça para pesquisa de taninos hidrolisáveis. Placa revelada com NEU e PEG e observada sob luz UV em 254 (B) e 365 nm (AC).....	147
<b>Tabela 23</b> - Resultados em valores de Rfs para cromatoplaça para pesquisa de flavonóides. Placa revelada com cloreto de alumínio e observada sob luz UV em 365 nm.....	149
<b>Tabela 24</b> - Resultados em valores de Rfs para placa para pesquisa de flavonóides. Placa revelada com NEU PEG e observada sob luz UV em 365 nm.....	150
<b>Tabela 25</b> - Resultados em valores de Rfs para placa para pesquisa de triterpenos/esteróides. Placa revelada com reagente de Liebermann e observada sob luz UV em 365 nm. ....	152
<b>Tabela 26</b> - Resultados em valores de Rfs para placa para pesquisa de açúcares redutores. Placa revelada com timl e observada sob luz visível.....	153
<b>Tabela 27</b> - Resultados em valores de Rfs para placa para pesquisa de derivados antracênicos. Placa revelada com ácido nítrico e observada sob luz UV em 365 nm.....	154
<b>Tabela 28</b> - Resultados em valores de Rfs para <i>fingerprint</i> de taninos e flavonóides. Placa revelada com NEU PEG e observada sob luz UV em 365 nm.....	156

## RESUMO

*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), conhecida como pitangueira, é uma espécie nativa do Brasil, de importância econômica e terapêutica devido ao seu emprego como alimento e na medicina popular. Considerando as propriedades biológicas, diversas atividades são relatadas para *E. uniflora* entre as quais: antibacteriana, antifúngica, antidiarreica, hipoglicêmicas e antitumorais. A partir de 2009, a espécie foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o SUS (RENISUS), visando incentivar estudos relativos ao desenvolvimento biológico, analítico e tecnológico da espécie. Neste contexto, relatos acerca de investigações analíticas e tecnológicas para farmacógenos de *E. uniflora* são escassos. Portanto, o propósito deste trabalho foi o desenvolvimento e avaliação de ferramentas analíticas para a caracterização química de extratos e frações de *E. uniflora*. Assim, o monitoramento dos metabólitos da espécie foi empregado para o estabelecimento de especificações de qualidade para droga vegetal e avaliação de operações de transformação. As folhas secas e trituradas de pitangueira foram empregadas como material vegetal e caracterizadas de acordo com os Métodos Gerais em Farmacognosia da Farmacopeia Brasileira 5 ed. (2010). Para análise quantitativa de flavonoides e taninos na droga vegetal e extrato bruto foram avaliadas metodologias espectrofotométricas (UV/Vis) usando os reagentes  $AlCl_3$  e Folin Ciocalteu para aumento de seletividade. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de fotodiodos também foi utilizada para análises quantitativas; as análises qualitativas foram conduzidas por CCD/CCDAE e CLAE. Além disso, um fracionamento preliminar das substâncias presentes nas folhas de pitanga foi executado através de sucessivas cromatografias de coluna aberta, utilizando gel de sílica como fase estacionária e posteriormente CCD preparativa para a obtenção das substâncias desejadas. Os procedimentos espectrofotométricos avaliados atendem as exigências preconizadas pela RE 899/2003, apresentando especificidade/seletividade para os marcadores eleitos, comportamento linear ( $R^2 > 0,99$ ); nos ensaios de repetitividade e precisão dentro dos limites determinados pela legislação ( $< 5\%$ ) onde foram encontrados teores médios de flavonoides de 1,82% (matéria prima – MP) e 4,90% (Extrato bruto – EB) na metodologia por doseamento direto, e 1,72% (MP) e 3,90 (EB) na metodologia após hidrólise ácida; no caso de taninos totais os teores médios encontrados foram de 10,12% (MP) e 21,11 (EB). No parâmetro exatidão, os resultados obtidos encontram-se de acordo com o preconizado pela RE899 (80-120%) para as três metodologias (faixa de recuperação de 92 a 107%); além de estabilidade às variações intencionais avaliadas na robustez (tempo de reação, reagentes e solventes). A metodologia por CLAE para a quantificação ácido gálico e ácido elágico e dos flavonoides presentes na matriz, também atendeu aos requisitos preconizados pela legislação, oferecendo dados quantitativos mais específicos relativos às substâncias presentes nas amostras. O fracionamento permitiu a obtenção de frações contendo os compostos de interesse, e através da CCD preparativa foi possível obter uma fração semi-purificada contendo duas substâncias flavonoídicas potenciais marcadoras da espécie. Adicionalmente, os perfis químicos (fingerprints) por CCD e CLAE permitiram identificar nas matrizes (droga, extratos e frações), bandas/picos relacionados a grupos de metabólitos promissores para apoiar a padronização química de produtos derivados das folhas de *Eugenia uniflora*.

**Palavras Chave:** Cromatografia. Espectrofotometria. *Eugenia uniflora*. Flavonoides. Taninos.

## ABSTRACT

*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), known as pitangueira, is a native species from Brazil, with economic and therapeutic importance due to the extensive use as food and in traditional medicine. Considering the biological properties, various activities are reported to *E. uniflora*: antibacterial and antifungal, antidiarrheal, antitumor and hypoglycemics, among others. From 2009, the species was included in the National Ratio of medicinal plants of interest for the SUS (Brazilian Unified Health System)(RENISUS), to encourage studies about the biological, analytical and technological development of the specie. In this context, the reports about analytical and technological research for pharmacogens of *E. uniflora* are scarce. Therefore, the purpose of this work was the development and evaluation of analytical tools for chemical characterization of extracts and fractions from leaves of *E. uniflora*. Thus, the monitoring of the metabolites of the species were employed for the establishing quality specifications of plant drug and for the evaluation of processing operations. The dried and milled leaves of *E. uniflora* were used as plant material and characterized according to the General Methods in Pharmacognosy of the Brazilian Pharmacopoeia 5th ed. (2010). For the quantitative analysis of flavonoids and tannins in the raw material and crude extract, spectrophotometric methodologies (UV/Vis) were evaluated using  $AlCl_3$  and Folin Ciocalteu reagents to increase selectivity. High performance liquid chromatography (HPLC) coupled to photodiode array detector was also used for quantitative analysis; the qualitative analyzes were conducted by TLC/HPTLC and HPLC. In addition, a preliminary fractionation of substances in “pitanga” leaves was performed by successive classical column chromatographies, using silica gel as the stationary phase and subsequently preparative TLC for obtaining the desired substances. The data revealed that the spectrophotometric procedures evaluated meet the requirements of RE 899/2003, presenting specificity / selectivity for the chosen markers, and linear behavior ( $R^2 > 0,99$ ). In the tests of repeatability and precision within the limits determined by the legislation ( $<5\%$ ) where average levels of flavonoids of 1,82% (raw material - MP) and 4.90% (crude extract - EB) were found in the methodology by dosing Direct, and 1,72% (MP) and 3,90 (EB) in the methodology after acid hydrolysis; besides accuracy compatible for the three methods (recovery range 92-107%), and stability to intentional variations evaluated (reaction time, reagents and solvents). The methodology by HPLC for the quantification of gallic acid and ellagic acid and the flavonoids present in the matrix, also have met the requirements preconized by legislation, providing more specific quantitative data relating to substances present in the samples. The fractionation enabled to obtain fractions containing the compounds of interest, and by preparative TLC was possible to obtain a semi-purified fraction containing two flavonoids potential marker species. Additionally, chemical profiles (fingerprints) by HPTLC and HPLC allowed to identified in different matrices (drug, extracts and fractions), bands/peaks related to promising groups of metabolites to assist the chemical standardization of products derived from the leaves of *Eugenia uniflora*.

**Keywords:** Chromatography. Spectrophotometry. *Eugenia uniflora*. Flavonoids. Tannins.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>28</b>
3.1 <i>Eugenia uniflora</i> L.....	29
3.2 POLIFENOIS.....	32
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS CONVENCIONAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E FLAVONOIDES EM VEGETAIS.....	35
3.3.1 Espectrofotometria No Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	35
3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	38
3.5 PESQUISA DE NOVOS CONSTITUINTES DE ORIGEM VEGETAL.....	40
3.6 PERFIS FITOQUÍMICOS TÍPICOS: FINGERPRINTS.....	41
3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	42
3.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE).....	44
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 MATERIAIS.....	46
4.1.1 Reagentes, Solventes e Padrões.....	46
4.1.2 Vidrarias, Equipamentos e Materiais Complementares.....	46
4.2 MATERIAL VEGETAL.....	47
4.2.1 Caracterização físico-química.....	47
4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS.....	49
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENOIS (FLAVONOIDES E TANINOS) POR UV-Vis NA DROGA VEGETAL, EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>E.uniflora</i> L.....	49
4.4.1 Avaliação de metodologias para o doseamento de flavonoides totais na matéria prima (folhas), extrato bruto e frações enriquecidas de <i>E.uniflora</i> .....	49
4.4.1.1 <i>Quantificação de flavonoides totais por doseamento direto (DD)</i> .....	49
<i>Preparação das amostras</i> .....	49
<i>Avaliação das condições de preparação da amostra de droga vegetal</i> .....	50
<i>Avaliação das condições analíticas</i> .....	50
4.4.1.2 <i>Quantificação de flavonoides totais após hidrólise ácida (HA)</i> .....	52
<i>Preparação das amostras</i> .....	52
<i>Avaliação das condições de preparação da amostra de droga vegetal</i> .....	52

<i>Avaliação das condições analíticas</i> .....	52
4.4.2 Avaliação do método para quantificação de taninos totais na droga vegetal, extrato bruto e frações enriquecidas das folhas de <i>E. uniflora</i> .....	54
<i>Preparação das amostras</i> .....	54
<i>Avaliação das condições analíticas</i> .....	56
4.4.3 Validação das Metodologias Analíticas.....	58
4.4.3.1 <i>Linearidade</i> .....	58
4.4.3.2 <i>Especificidade/Seletividade</i> .....	59
4.4.3.3 <i>Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)</i> .....	60
4.4.3.4 <i>Precisão</i> .....	60
4.4.3.4 <i>Exatidão</i> .....	60
4.4.3.6 <i>Robustez</i> .....	60
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E FLAVONOIDES POR CLAE-DAD .....	61
4.5.1 Desenvolvimento de metodologia CLAE-DAD para quantificação de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides presentes na matéria prima, extrato bruto e frações das folhas de <i>E. uniflora</i> .....	61
4.5.1.1 <i>Preparo das soluções para análise por (CLAE-DAD)</i> .....	61
4.5.1.2 <i>Condições cromatográficas</i> .....	62
4.5.2 Validação da metodologia analítica por CLAE.....	63
4.5.2.1 <i>Linearidade</i> .....	64
4.5.2.3 <i>Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)</i> .....	65
4.5.2.4 <i>Precisão</i> .....	65
4.5.2.5 <i>Exatidão</i> .....	66
4.5.2.6 <i>Robustez</i> .....	66
4.6 AVALIAÇÃO DE PERFIS QUÍMICOS ( <i>fingerprints</i> ) POR CCD E CLAE-DAD PARA DROGA VEGETAL, EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS.....	66
4.6.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia de Camada delgada de Alta Eficiência (CCD-AE).....	67
4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).....	68
4.7 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA: FRACIONAMENTO DOS CONSTITUINTES DAS FOLHAS DE <i>Eugenia uniflora</i> L.....	69
4.7.1 Cromatografia de coluna aberta em gel de sílica 1.....	71
4.7.2 Cromatografia de Coluna aberta em gel de sílica 2.....	71
4.7.3 Cromatografia de coluna aberta em gel de sílica 3.....	72
4.7.4 Cromatografia de Camada Delgada Preparativa.....	72

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	74
5.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	75
5.1.1 Caracterização físico-química.....	75
5.2 QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS (FLAVONOÍDES E TANINOS) NA DROGA VEGETAL E EXTRATOS DAS FOLHAS DE <i>E. uniflora</i> L.....	77
5.2.1 Avaliação de metodologias espectrofotométricas para quantificação de flavonoides das folhas de <i>E.uniflora</i> por doseamento direto.....	77
5.2.1.1 Otimização das condições experimentais.....	78
<i>Preparação da amostra a partir da matéria-prima vegetal</i> .....	78
<i>Avaliação do comprimento de onda e diluição para leitura</i> .....	79
<i>Determinação do tempo de leitura e concentração de AlCl<sub>3</sub></i> .....	81
<i>Avaliação da alíquota de AlCl<sub>3</sub></i> .....	83
5.2.2 Avaliação de metodologias espectrofotométricas para quantificação de flavonoides das folhas de <i>E. uniflora</i> após hidrólise ácida.....	85
5.2.2.1 Otimização das condições experimentais.....	85
<i>Preparação da amostra a partir da matéria-prima vegetal</i> .....	85
<i>Otimização das condições experimentais</i> .....	87
<i>Determinação de comprimento de onda</i> .....	87
<i>Determinação do tempo de leitura e concentração de AlCl<sub>3</sub></i> .....	89
<i>Avaliação da alíquota de AlCl<sub>3</sub></i> .....	90
5.2.3 Avaliação de metodologia farmacopeica (HA).....	92
5.2.3 Avaliação de Metodologia Analítica Para Quantificação de Taninos Totais.....	93
5.2.3.1 Avaliação de procedimento de preparação da amostra a partir da droga vegetal .....	93
<i>Avaliação de quantidade de droga</i> .....	93
<i>Avaliação de metodologia extrativa</i> .....	94
<i>Avaliação do tempo de leitura</i> .....	95
<i>Avaliação da influência dos reagentes Folin-Ciocalteu e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></i> .....	96
<i>Avaliação do Agente complexante</i> .....	99
5.2.4 Validação das Metodologias Analíticas por Espectrofotometria UV-Vis.....	103
5.2.4.1 Linearidade.....	103
5.2.4.2 Limites de Detecção e Quantificação.....	107
5.2.4.3 Especificidade/Seletividade.....	108
5.2.4.4 Precisão.....	110

<i>Repetitividade</i> .....	110
<i>Precisão Intermediária</i> .....	111
5.2.4.5 <i>Exatidão/Recuperação</i> .....	114
5.2.4.6 <i>Robustez</i> .....	114
5.2.5 Avaliação quantitativa nas frações.....	116
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E FLAVONOIDES POR CLAE-DAD.....	119
5.3.1 Desenvolvimento de metodologia CLAE-DAD para quantificação de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides presentes na matéria prima, extrato bruto e frações das folhas de <i>E. uniflora</i> .....	119
5.3.2 Validação do método de referência – CLAE.....	122
5.3.2.1 <i>Linearidade</i> .....	125
5.3.2.2 <i>Especificidade</i> .....	129
5.3.2.3 <i>Limites de Detecção e Quantificação</i> .....	132
5.3.2.4 <i>Precisão</i> .....	132
5.3.2.5 <i>Exatidão</i> .....	135
5.3.2.5 <i>Robustez</i> .....	136
5.3.3 Metodologias UV-Vis x CLAE.....	139
5.3.4 Doseamento de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides nas frações das folhas de <i>E. uniflora</i> .....	141
5.4 AVALIAÇÃO DE PERFIS QUÍMICOS ( <i>fingerprints</i> ) POR CCD E CCD-AE E CLAE-DAD PARA MATÉRIA PRIMA, EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES .....	144
5.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	144
5.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....	156
5.4.3 Aplicação de fingerprints cromatográficos na identificação de diferentes amostras de extratos brutos de <i>Eugenia uniflora</i> L.....	161
5.5 FRACIONAMENTO PRELIMINAR DOS CONSTITUINTES DAS FOLHAS DE <i>Eugenia uniflora</i> L. ....	165
5.5.1 Cromatografia em coluna aberta com gel de sílica (1).....	166
5.5.2 Cromatografia em coluna aberta com gel de sílica (2).....	169
5.5.3 Cromatografia em coluna aberta com gel de sílica (3).....	170
5.5.4 Cromatografia em camada delgada preparativa.....	171
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>174</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>177</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>189</b>
<b>APÊNDICE A – DADOS DE REGRESSÃO LINEAR – AMOSTRAS UV-VIS</b> .....	<b>190</b>

<b>APÊNDICE B – DADOS BRUTOS DOS ENSAIOS DE LINEARIDADE POR CLAE.....</b>	<b>197</b>
<b>APÊNDICE C – REGRESSÃO LINEAR - AMOSTRAS POR CLAE .....</b>	<b>200</b>
<b>APÊNDICE D – DADOS BRUTOS DA PRECISÃO POR CLAE .....</b>	<b>208</b>

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta, sozinho possui entre 20-22% de toda a diversidade de plantas e microrganismos (DUTRA et al., 2016; CALIXTO, 2005) e detém grande conhecimento associado ao uso de plantas medicinais, com um enorme potencial para pesquisas e desenvolvimento, possibilitando novas tecnologias e abordagens terapêuticas (BRASIL, 2006). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda apontam que cerca de 80% da população mundial utilizam fitoterápicos (WHO, 2011). Seguindo esta tendência, o Ministério da Saúde do Brasil, lançou em 2006 uma série de políticas para o estabelecimento de diretrizes voltadas desde o cultivo até o desenvolvimento de tecnologias e inovações, com o objetivo de garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, além do uso sustentável de recursos naturais e promoção do desenvolvimento da cadeia produtiva e industrial (BRASIL, 2006).

Antes mesmo deste estímulo a produção de fitoterápicos implantada pelas políticas nacionais para plantas medicinais e fitoterápicos este setor já movimentava, por volta dos anos 2000, montantes estimados em bilhões de dólares. E atualmente este mercado continua em crescente expansão (YUNES, 2001; MARQUES et al., 2012). Acredita-se que a expansão da fitoterapia deve-se a crescente comprovação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, bem como o desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade de novas formas de preparações, administração dos produtos e relativo baixo custo (MELO et al., 2007).

Com o interesse crescente acerca de espécies com potencial terapêutico, a busca pela sustentabilidade e uso racional de recursos naturais, além da enorme biodiversidade existente no Brasil propiciou o surgimento de políticas incentivadoras de pesquisas e produção de derivados naturais, como o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Seguindo as diretrizes das políticas e programas de plantas medicinais, o Ministério da Saúde publicou em 2009 a Relação de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS). A relação contendo 71 espécies medicinais objetivou incentivar pesquisas para que as espécies relacionadas pudessem ser inclusas como alternativa terapêutica no sistema público de atenção primária (BRASIL, 2006; BRASIL, 2009).

Nesse contexto, a *Eugenia uniflora* L. é uma das espécies que integram a RENISUS -. Bastante conhecida em virtude dos frutos comestíveis e também por seu

emprego na terapêutica popular, com relatos na literatura de diversas atividades biológicas; a espécie ainda possui poucos os estudos acerca de sua constituição química, marcadores e dos requisitos de qualidade.

Dentre as atividades relatadas, destacam-se: antidiarreica (atribuída aos taninos), anti-hipertensiva (CONSOLINI, 2002), antidiabética, hipocolesterolemiantes (ARAI, 1999), antipirética e antirreumática (atribuída aos flavonoides inibidores da enzima xantina oxidase) (SCHMEDA-HIRSCHMAN, 1987). Portanto, algumas das diversas atividades farmacológicas exibidas podem ser correlacionadas com a presença de polifenóis na pitangueira, o que indica que estes podem ser tomados como substâncias marcadoras da espécie, podendo ser então utilizados para o controle de qualidade de *E. uniflora*.

De maneira geral, o controle de qualidade de espécies vegetais pode ser realizado através da quantificação de substâncias conhecidas como marcadores (LIANG et al., 2004; SAHOO et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2012), os quais podem ser definidos como substância ou classe de substâncias, que pode ser utilizada como referência no controle de qualidade da matéria prima vegetal ou do produto acabado, preferencialmente correlacionada com a atividade terapêutica (BRASIL, 2014). Para realizar a quantificação, diversas técnicas são aplicadas, dentre elas, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV/Vis) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devido à simplicidade e eficiência.

Diversas são as metodologias utilizadas para a quantificação de polifenóis por espectrofotometria UV/Vis, como a metodologia de Folin Ciocalteu que reage com os polifenóis através de oxido-redução, conferindo uma coloração azul aos polifenóis oxidados (FOLIN, 1927; BUENO et al., 2012; ALVES et al., 2015). Para a quantificação de flavonoides, a metodologia de complexação com Cloreto de Alumínio é bastante difundida, pois possibilita um deslocamento da absorvância máxima para regiões de maior comprimento de onda, permitindo a determinação dos flavonoides (MARQUES et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; MARQUES et al., 2013). A quantificação de grupos de substâncias por espectrofotometria ainda vigora como uma atrativa técnica para o controle de qualidade, principalmente quando a substância ativa farmacologicamente não é conhecida. Isto aliado ao fato de que as substâncias presentes em matrizes vegetais possuem maiores atividades em conjunto do que isoladamente, o que vem sendo atribuído ao sinergismo das moléculas do fitocomplexo, contribuem para a ampla utilização da técnica (WAGNER, 2011; RODRIGUEZ et al., 2012).

Através da CLAE taninos e flavonoides podem ser quantificadas especificamente, através da utilização de um detector adequado. Dentre os detectores mais utilizados em CLAE, está o de arranjo de diodos, que absorve nos comprimentos de onda na faixa do ultravioleta ao visível, o que faz com que este detector seja aplicável a compostos fenólicos. Tornando a CLAE uma alternativa para quantificação de marcadores, bastante difundida no controle de qualidade de produtos naturais devido a sua seletividade e especificidade (COLLINS et al., 2010).

Neste contexto, diante da importância da espécie e de seus constituintes químicos, o objetivo deste trabalho foi investigar a diversidade química da espécie através métodos cromatográficos (preparativos e analíticos); bem como avaliar e validar simples metodologias para quantificação de polifenóis (taninos e flavonoides) por espectrofotometria UV/Vis e CLAE-DAD em matéria prima, extrato bruto e frações enriquecidas das folhas de *E. uniflora*, além de desenvolvimento de *fingerprints* cromatográficos por CLAE e CCD-AE, objetivando estabelecer perfis químicos típicos que possam ser empregados como padrões de referência para as propriedades biológicas da espécie, aplicando-os ao controle de qualidade.

**OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a diversidade química (qualitativa e quantitativa) de extratos e frações obtidos das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira) objetivando estabelecer perfis químicos típicos que possam ser empregados como padrões de referência para controle de qualidade da espécie.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar, identificar e caracterizar a matéria-prima vegetal constituída das folhas de *E.uniflora*;
- Preparar extratos brutos e frações a partir das folhas de *E. uniflora*;
- Avaliar e validar metodologias analíticas por espectrofotometria no UV/Vis para a quantificação de flavonoides e taninos presentes na matéria prima, extratos e frações das folhas de *E. uniflora*;
- Avaliar e validar metodologia analítica por CLAE-DAD para a quantificação dos monômeros de taninos e flavonoides presentes na matéria prima, extratos e frações das folhas de *E. uniflora*;
- Investigar perfis químicos típicos (*fingerprints*) por CLAE-DAD e CCD para matéria prima, extratos e frações das folhas de *E. uniflora*;

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 *Eugenia uniflora* L.

*Eugenia uniflora* L., conhecida popularmente como pitanga, pitangueira, pitangueira vermelha, cerejeira brasileira, é originária da região que compreende o Brasil e é distribuída em toda América do Sul (LORENZI; MATOS, 2002). Com classificação taxonômica de Reino Plantae, da Divisão Magnoliophyta, de Classe Magnoliopsida, de Ordem Myrtales, pertencente à Família Myrtaceae e do Gênero *Eugenia*, a espécie *Eugenia uniflora* L. possui algumas sinónimas, entre elas: *Eugenia michelii*, *Myrtus brasiliana*, *Stenocalyx affinis*, *Stenocalyx micheli*, *Stenocalix lucidus* (SOBRAL, 2015).

Do ponto de vista botânico, esta planta se apresenta como um arbusto ou árvore semidecídua, que pode atingir de 3 a 10 metros de altura, com copa estreita, e tronco liso de cor pardo clara. Apresenta folhas simples, com 3 a 7 cm de comprimento, e possui aroma característico. Suas flores são de cor branca, solitárias ou em grupos de 2-3 nas axilas e nas extremidades dos ramos. Os frutos são do tipo drupa, globosos e sulcados, brilhantes e de cor vermelha, amarela ou preta, com polpa carnosa e agridoce, contendo 1 a 2 sementes (LORENZI; MATOS, 2002; FIÚZA et al., 2008).

Esta espécie medicinal teve seu uso, na medicina empírica, introduzido pelos índios guaranis no século XV, como tratamento para diversas enfermidades (FIÚZA et al., 2008). De forma geral, a pitangueira, é amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diversas manifestações clínicas devido às suas atividades digestivas (com grande efeito sobre o trânsito intestinal), diurética, anti-hipertensiva (CONSOLINI et al., 2002), antipirética, anti-inflamatória, antirreumática (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987), hipocolesterolemiantes e ainda hipoglicêmica (ARAI et al., 1999).

Diversos estudos ainda relataram atividades atribuídas aos óleos voláteis presentes em *E. uniflora*, tal como Adebajo e colaboradores (1989) que avaliaram a ação antimicrobiana do óleo essencial das folhas e frutos, obtendo resultados positivos para *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Trichophyton menthagrophytes*.

Wazlawik e colaboradores (1997) relataram que extratos hidroalcoólicos das folhas produziram um relaxamento de anéis de aorta e atribuiu a ação vasodilatadora de *E. uniflora*

ao fato de que o extrato pode vir a estimular a síntese de óxido nítrico, sendo o responsável por manter o relaxamento endotelial e, conseqüentemente, manter a pressão arterial estável.

Arai e colaboradores (1999) avaliaram os efeitos de extratos hidroalcoólicos das folhas sobre hiperglicemia e hipertrigliceridemia em camundongos. Os autores observaram redução de níveis de glicose no sangue em camundongos tratados com glicose via oral e extrato etanólico na dose de 300 mg/Kg. Para verificar ação anti-hipertrigliceridêmica os autores relataram que houve inibição da atividade da enzima lipase pancreática pela ação de diferentes frações e doses do extrato de *E. uniflora*, sugerindo desta forma que a ação do extrato acontece por inibir a decomposição de açúcares e gordura no intestino (ARAI et al., 1999).

Também foi demonstrada a atividade hipotensora em ratos normotensos empregando dose efetiva de 3 mg de extrato bruto aquoso seco por quilo, equivalente a dose etnoterapêutica (CONSOLINI et al., 1999). O efeito foi associado a uma ação vasodilatadora direta em vasos resistentes a perfusão e uma ligeira diurese em altas doses (120 mg/kg). Consolini e colaboradores, em 2002, identificaram o possível mecanismo de ação do extrato bruto aquoso das folhas *E. uniflora*, evidenciando ação beta adrenérgica através da liberação de catecolaminas e bloqueio dos canais de cálcio, produzindo hipotensão e contribuindo para os efeitos cronotrópicos e inotrópicos no coração.

Através da preparação do extrato de folhas de *E. uniflora* com diferentes solventes e consequente determinação de seus constituintes, foi identificada uma potencial atividade inibitória sobre a xantina oxidase, atribuída aos flavonoides quercetina, quercitrina e miricetina, presentes na espécie (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987).

A espécie também apresentou atividade contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, indicando que *E. uniflora* pode ser fonte de nutracêuticos com atividade anti-Trypanosoma, o que representa uma alternativa interessante para combater a doença de Chagas. Sendo esta espécie promissora no desenvolvimento de novas terapias, principalmente devido à baixa toxicidade *in vitro* (SANTOS et al., 2012). Estes mesmos autores, ainda relataram atividade relevante contra cepas de *Leishmania brasiliensis* (SANTOS et al., 2013).

Ogunwande e colaboradores demonstraram efeitos contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, e ainda uma excelente ação citotóxica para o tumor humano das linhagens celulares de PC-3 e Hep G2, e houve uma completa inibição do crescimento de linhas celulares Hs 578T (OGUNWANDE et al., 2005). Lima et al. (2006) evidenciaram a atividade dos óleos essenciais da pitangueira contra *Candida krusei*. Outras atividades tais

como antinoceptivas e antipiréticas também foram reportadas para o óleo essencial e terpenoides isolados das folhas de *E. uniflora* (AMORIM et al., 2009). Ainda sobre o óleo essencial, Victoria e colaboradores (2012), evidenciaram as atividades antioxidante em três diferentes métodos, além de uma DL<sub>50</sub> maior que 200mg/kg em ratos e atividades antimicrobianas e antifúngicas.

Óleos essenciais das folhas da pitanga apresentaram ainda atividades antidrepressivas mediada pela modulação de sistemas serotoninérgicos e adrenérgicos, confirmando o potencial terapêutico da espécie (VICTÓRIA et al., 2013). Além disso, também foram encontradas evidências de que estes óleos possuem atividades hepatoprotetoras, a partir de lesões induzidas por acetaminofeno (VICTÓRIA et al., 2013).

Uma lecitina encontrada nas sementes dos frutos da pitangueira exibiu diversas atividades, incluindo antimicrobiana, de forma não seletiva, contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* sp.; além de atividade moderada na inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* sp. e *Escherichia coli*. Estas propriedades indicam um forte potencial para aplicações terapêuticas destas lecitinas, sendo que esta lecitina possui ainda uma grande propriedade interfacial e dielétrica (ANDRADE et al., 2008).

Ferreira e colaboradores (2013) obtiveram resultados positivos em seus testes sobre atividades antifúngicas de extratos brutos das folhas da pitangueira em espécies de *Candida* (*albicans* e não-*albicans*), com maior potência nas espécies não-*albicans*. Outros estudos também evidenciaram um potencial inibitório do extrato bruto das folhas de *E. uniflora* em três importantes fatores de virulência de *Candida albicans* presentes no organismo de pacientes transplantados. Neste estudo também foi verificado que as células alveolares continuam viáveis mesmo após exposição de altas concentrações do extrato bruto, indicando que este pode ser considerado como um agente antifúngico seguro (SILVA-ROCHA et al., 2015).

Vários fitoconstituintes de *E. uniflora* foram isolados, tais como os flavonoides miricitrina, quercetina-3-ramnosídeo (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1995), e os taninos macrocíclicos hidrolisáveis eugeniflorina D1 e eugeniflorina D2, sendo estes taninos potentes agentes inibidores EBV (Epstein Barr Vírus) DNA polimerase (LEE, 1997; LEE, 2000).

Além disso, muitos estudos foram focados na caracterização química do óleo volátil da espécie (OGUNWANDE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; MELO et al., 2007). Estudos fitoquímicos das folhas já revelaram a presença de ácido gálico, β-sitosterol e

triterpenos (RUCKER et al., 1976). Fiúza, em seus estudos de triagem fitoquímica com o macerado das folhas de *E. uniflora*, obteve resultados que evidenciaram a presença de compostos antraquinônicos, esteroidais, triterpênicos, heterosídeos flavonoídicos, heterosídeos saponínicos e taninos (FIÚZA, 2008). Nos frutos de *E. uniflora*, também já foram comprovadas a presença de carotenoides, flavonoides, catequinas e proantocianidinas (CELLI et al., 2011).

Considerando que os polifenóis são uma classe de constituintes de grande importância para a espécie, Garmus e colaboradores (2014) desenvolveram uma metodologia de extração desta classe de compostos através de fluido supercrítico, correlacionando ainda a  $EC_{50}$  do potencial antioxidante com o teor de polifenóis na amostra.

Dados presentes na literatura confirmam o potencial terapêutico da espécie para diversas aplicações. Como pode ser observado, os polifenóis possuem grande destaque na espécie sendo estes relacionados a grande parte das atividades da *E. uniflora*. Contudo, ainda são necessários mais estudos acerca da diversidade química, de controle de qualidade (análise quantitativa) referentes a espécie e as suas atividades.

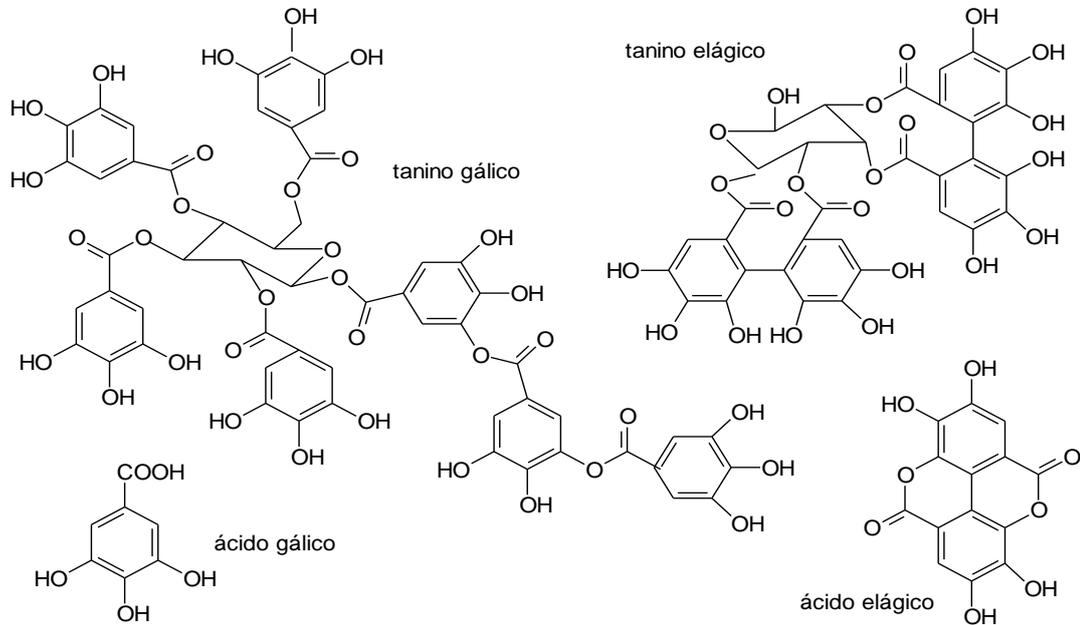
### 3.2 POLIFENOIS

Polifenóis representam o grupo de substâncias mais abundante na natureza, apresentando considerável importância fisiológica nas plantas, além de responderem por diversas propriedades biológicas (PINELO et al., 2005). Os compostos fenólicos constituem uma classe de metabólitos secundários de plantas que incluem uma grande variedade de estruturas tanto simples quanto complexas, e que possuem ao menos um anel aromático substituído com uma hidroxila. Estes podem ser diferenciados segundo seu esqueleto principal podendo apresentar-se como: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, lignanas, ligninas, e taninos hidrolisáveis ou condensados (SIMÕES et al., 2010).

Dentre os polifenóis, destacam-se os taninos devido à sua ampla distribuição e atividades biológicas. Taninos são compostos com alto peso molecular que possuem a propriedade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides e proteínas. Os taninos podem ainda se subdividir em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (SIMÕES et al., 2010). Os taninos hidrolisáveis, que constituem parte do presente trabalho, são denominados ésteres de ácidos gálico e elágico, formados a partir do ácido chiquímico, onde um açúcar, ou poliol tem seus grupos hidroxilas esterificados com os monômeros destes ácidos (Figura 1).

Os grupos galoil podem ainda serem esterificados ou oxidados formando os mais complexos taninos hidrolisáveis (HAGERMAN, 2002; MONTEIRO et al., 2005).

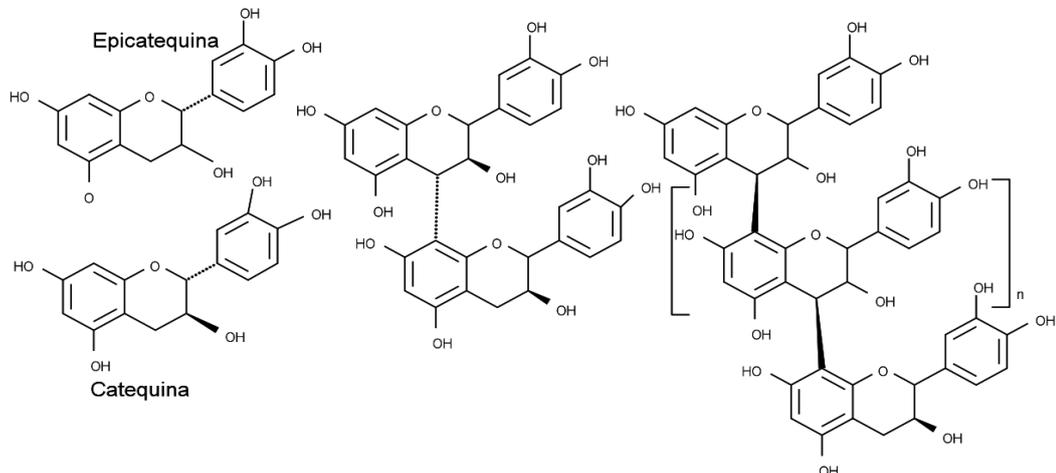
**Figura 1-** Estrutura dos taninos hidrolisáveis.



Fonte: Adaptado de SOARES, 2002.

Enquanto que os taninos condensados (Figura 2) são polímeros naturais, denominados mais precisamente de proantocianidinas, podem ser encontrados na natureza sob forma de monômeros de flavan-3,4-dióis (leucoantocianidinas) ou constituídos por dímeros ou maiores combinações de flavan-3-ol (proantocianidinas condensadas) (SCHOFIELD et al., 2001; HAGERMANN, 2002; HASLAN, 2007).

**Figura 2-** Estrutura dos taninos condensados.

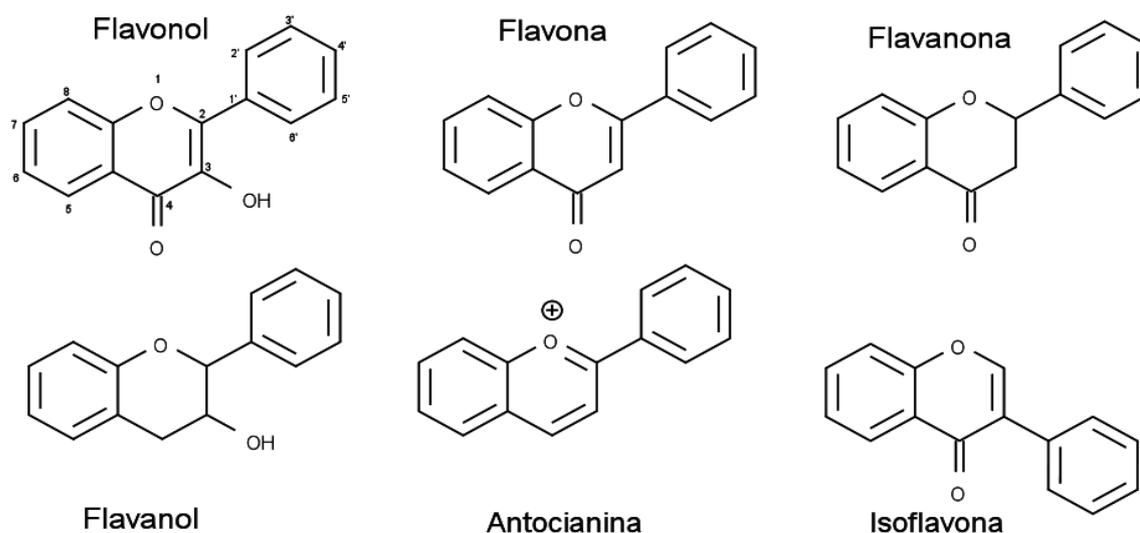


Fonte: Adaptado de SOARES, 2002.

Os taninos apresentam diversas atividades biológicas, que estão relacionadas principalmente com sua capacidade adstringente, e estes são usados com frequência devido aos seus efeitos antidiarreicos, antissépticos, antimicrobianos, antifúngicos, entre outras atividades (MONTEIRO et al., 2005). Devido à variedade de atividades biológicas que lhes são atribuídas, eles podem apresentar uma enorme variação estrutural, o que dificulta o desenvolvimento de modelos que possam quantificar precisamente o efeito de tais compostos no sistema (HAGERMAN, 2002).

Outros polifenóis de importância para este trabalho são os flavonoides, que constituem uma classe com moléculas diversas que consistem de dois anéis aromáticos conectados por um anel pirano. É um grupo bastante diversificado com mais de 8000 substâncias já identificadas (TAPAS et al., 2008) Estas substâncias podem ser separadas em seis subgrupos principais: flavonas (p.e. apigenina, luteolina), flavonóis (p. ex. quercetina, miricetina), flavanóis (p.ex. epicatequina, galocatequina), flavanonas (p. ex. naringenina, hesperitina), antocianinas (p.ex. cianina, pelargonina) e isoflavonas (p.ex. genisteína, daidzeína) (ROSS, et al. 2001; ERLUND, 2004; HOFFMANN-RIBANI et al., 2008). Eles podem apresentar-se na natureza como O- ou C- glicosídeos (onde os açúcares mais comuns são: ramnose, glicose, galactose e arabinose) ou como agliconas (que são as formas encontradas com menor constância na natureza), e são frequentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3' e 4' (COOK et al., 1995; ERLUND, 2004; RIJKE et al., 2006).

**Figura 3** - Estrutura básica dos principais flavonoides.



Fonte: Adaptado de COOK et al., 1995.

Dependendo do tipo de açúcar ligado a molécula, poderão ser influenciados diversos fatores, relacionados à extração (natureza do solvente, tempo e temperatura) e hidrólise destes açúcares (HOFFMANN-RIBANI et al., 2008). Na literatura foram reportadas diversas atividades biológicas relacionadas aos flavonoides, incluindo antiviral, antibacteriana, antiinflamatória, antialérgica, vasodilatadoras, anticarcinogênica, antiagregatória, antiulceroso, hepatoprotetora, além da ação antioxidante e quelante (COOK et al., 1995; NIJVELDT et al., 2001; ERLUND, 2004; HOFFMANN-RIBANI et al., 2008; TAPAS et al., 2008; SIMÕES et al., 2010). Espécies contendo estas substâncias têm sido cada vez mais utilizadas como potenciais nutracêuticos e terapêuticos, devido às atividades descritas, como são o caso da *Eugenia uniflora*.

### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS CONVENCIONAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E FLAVONOIDES EM VEGETAIS

#### 3.3.1 Espectrofotometria no Ultravioleta-Visível (UV-VIS)

Espectrofotometria por absorção na região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético é uma das ferramentas analíticas mais amplamente difundidas, em função de sua robustez, baixo custo e grande número de aplicações. Os procedimentos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivação química e acoplamento a diversas técnicas, e ainda constitui em uma importante ferramenta para determinação de parâmetros físico-químicos, tais como constantes de equilíbrio e de velocidade de reações (ROCHA et al., 2004; TZANAVARAS et al., 2007; GALO et al., 2009).

Apesar de ser uma técnica consolidada, de fácil implementação e de sensibilidade compatível com muitas das necessidades que surgem no controle de qualidade de produtos naturais, a baixa seletividade desta técnica é o principal desafio a sua aplicabilidade. Isto se deve à sobreposição espectral para compostos que absorvem na mesma região, impedindo a detecção independente de substâncias diferentes, mas que apresentam cromóforos semelhantes (ROJAS et al., 2009; ABADI et al., 2012; MARQUES et al., 2012).

Considerando a determinação quantitativa de taninos, os procedimentos de análise são dificultados pela complexidade e diversidade estrutural do grupo e, portanto, existe uma

grande diversidade de métodos descritos na literatura objetivando a quantificação destes metabólitos em drogas vegetais (SCHOFIELD et al., 2001). Para tais metodologias são adotadas diferentes estratégias no intuito de detectar as diferenças estruturais presentes nesta classe. Podem encontrados ensaios que utilizam precipitação de taninos com metais ou proteínas, metodologias colorimétricas, ou ainda combinação de ambas (MONTEIRO et al., 2005).

Como a maioria das atividades biológicas dos taninos está relacionada à sua capacidade de formar complexos insolúveis com macromoléculas tal como as proteínas, alguns dos métodos de quantificação também se baseiam nessa propriedade. Nesse contexto, os taninos podem ser determinados por diferença através de ultravioleta, colorimetria ou gravimetria após remoção dos mesmos por filtração ou centrifugação depois da formação de complexos insolúveis (HAGERMAN, 2002; SOARES et al., 2006).

Entre as metodologias descritas para quantificação de taninos por espectrofotometria no ultravioleta-visível, reações colorimétricas são comumente as mais utilizadas. O emprego do método de Folin-Ciocalteu é bastante consolidado. Neste procedimento, que é uma adaptação do método de Folin Denis para quantificação de tirosina, a concentração total de grupos fenólicos presentes nas amostras é mensurada através da intensidade de coloração azulada decorrente de reação de oxi-redução dos polifenóis pelo reagente de Folin-Ciocalteu, que é quantificada em espectrofotometria de absorção no visível (FOLIN, 1927; SCHOFIELD et al., 2001).

Este ensaio é bastante utilizado para determinar o teor total de polifenóis em matrizes vegetais, e vem sendo descritos por diversos autores em várias publicações científicas e compêndios oficiais (FOLIN, 1927; TSAO; YANG, 2003; LAPORNIK; PROSEK; GOLC, 2005; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2012; BUENO et al., 2012; BLAINSKY et al., 2013; ALVES et al., 2015). Porém para assegurar a especificidade da determinação de taninos, é necessário que seja executado o passo de precipitação/complexação dos mesmos. Assim, após formação de complexos insolúveis com macromoléculas, o complexo/precipitado é removido e o teor de taninos determinado pela diferença espectrofotométrica entre o teor de polifenóis no extrato completo (polifenóis totais) e o teor de polifenóis no sobrenadante resultante da precipitação (polifenóis não adsorvidos/complexados). Deste modo, o resultado desta diferença é o teor de taninos totais (SOARES et al., 2006).

A reação de precipitação com pó de pele seguida por reação espectrofotométrica de Folin Ciocalteu é o método de quantificação de taninos utilizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. (BRASIL, 2010), porém em virtude de limitações relacionadas ao custo e a variabilidade de do pó de pele, outros agentes complexantes alternativos tem sido avaliados, especialmente de natureza proteica tais como, hemoglobina, gelatina, albumina bovina e caseína e também de natureza não proteica, como derivados da povidona (SOARES et al., 2006; VERZA et al., 2007).

Para a quantificação de flavonoides a estratégia mais empregada para determinação espectrofotométrica é baseada na formação do complexo flavonoide- $\text{AlCl}_3$  (GLASL, BECKER, 1984; PETRY et al., 1998, 2001; FERNANDES et al., 2012). A partir da adição do cloreto de alumínio, pode se obter espectros dos flavonoides sem a interferência de outros compostos fenólicos. Isto ocorre devido à formação de complexos estáveis entre as hidroxilas vicinais livres dos flavonoides e o cátion  $\text{Al}^{3+}$ , ocasionando extensão do sistema conjugado e, conseqüentemente, um desvio batocrômico. Ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda (MARQUES et al., 2012; 2013).

Inicialmente, a técnica foi desenvolvida para análise de flavonoides O-glicosídeos após hidrólise ácida e extração com solvente orgânico, onde as agliconas seriam quantificadas após adição do  $\text{AlCl}_3$  (GLASL; BECKER, 1984). Porém esta metodologia estava sendo utilizada também em espécies que continham flavonoides C-glicosilados, os quais eram descartados na fase aquosa devido a sua maior polaridade em consequência da presença de resíduo de açúcar em sua estrutura (SCHMIDT; ORTEGA, 1993; FERNANDES et al., 2012).

A Farmacopeia Brasileira (2010) apresenta as duas metodologias para quantificação de flavonoides: determinação por doseamento direto (monografia maracujá doce – *Passiflora alata*), ou após hidrólise ácida (Pitangueira – *Eugenia uniflora*). A metodologia por doseamento direto consegue quantificar todos os flavonoides presentes no extrativo independente do tipo de glicosilação, ou seja, o método é capaz de detectar desde agliconas livres até heterosídeos C- ou O-glicosilados. Isso é possível porque o extrato rico em flavonoides é diretamente submetido à complexação com  $\text{AlCl}_3$  garantindo que todas as espécies de flavonoides presentes possam ser quantificadas (PETRY et al., 1998).

Já a metodologia por hidrólise ácida, possui a capacidade de determinar as agliconas mediante a perda dos resíduos de açúcares devido à hidrólise, além das próprias agliconas livres existentes no extrato. Porém, esta técnica não pode ser aplicada a flavonoides C-glicosídicos que resistem à hidrólise ácida devido à ligação carbono-carbono entre o

flavonoide e o resíduo glicosídico, e seriam então descartados na fase aquosa na etapa de partição com solvente orgânico da metodologia (PETRY et al., 1998; FERNANDES et al., 2012).

A desvantagem do uso desta técnica em espécies vegetais, assim como todas as técnicas espectrofotométricas, é o fato de que, são estimados apenas os valores totais das substâncias pesquisadas, impossibilitando a quantificação individual das substâncias presentes na matriz analisada, devido à sobreposição de bandas espectrais. Este inconveniente é minimizado através da mensuração nos máximos de absorção.

### 3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos tem como objetivo garantir que o método é apropriado para os fins propostos (BRASIL, 2003). Assim, para afirmar que um método analítico alcança resultados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra em estudo, é necessário que o desempenho do procedimento seja testado em condições pré-estabelecidas em uma série de ensaios que compõem a validação (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, a validação de metodologias analíticas regulamentada pela Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003, a qual determina que a validação deve garantir, através de ensaios experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003); e, também pelo manual do INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 onde este possui diversas similaridades com a RE 899, porém a resolução é um documento com poder de lei e deve ser obedecido (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais, como *Internacional Conference on Harmonisation* (ICH) (ICH, 2005), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003), ISO (através da norma ISO/IEC 17025). A ANVISA e o ICH estabelecem os itens que devem ser avaliados na validação, como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação.

No ensaio de especificidade, é demonstrada a capacidade que o método possui em medir exatamente o composto de interesse na presença de substâncias que podem ser interferentes tais como impurezas, produtos de degradação e compostos químicos da matriz estudada. A linearidade reflete a capacidade da metodologia analítica de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, dentro de um intervalo

especificado. O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada pelo método, já o limite de quantificação é a menor quantidade de analito que pode ser quantificada (BRASIL, 2003; CASSIANO et al., 2009).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis, repetibilidade (precisão intra-corrida), precisão intermediária (precisão intercorrida) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). Os resultados obtidos neste ensaio devem ser expressos como desvio padrão relativo (DPR%), onde resultados acima de 5% não são considerados aceitáveis (BRASIL, 2003).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos em um determinado ensaio em comparação um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI, 2004; LEITE, 2008).

A robustez de um método analítico indica a capacidade deste de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Este ensaio demonstra sua confiança durante o uso normal. Caso seja constatada a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

### 3.5 PESQUISA DE NOVOS CONSTITUINTES DE ORIGEM VEGETAL

Depois de séculos com o uso totalmente empírico de espécies medicinais, o isolamento de substâncias farmacologicamente ativas provenientes de drogas vegetais no início do século XX foi um grande marco para química de produtos naturais, porém logo os medicamentos sintéticos tomaram destaque. Posteriormente, a necessidade de renovação de compostos no mercado, além do uso de fitoterápicos (gingko, valeriana) com mesma eficácia que drogas sintéticas, o interesse de pesquisadores do mundo em substâncias de origem vegetal voltou a crescer, trazendo novamente o foco para a pesquisa de novas substâncias através da fitoquímica (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; PHILLIPSON, 2001).

A Fitoquímica é uma vertente da química de produtos naturais que está associada com a enorme variedade de substâncias orgânicas que são produzidas e acumuladas pelas plantas, e lidando com a estrutura química destas substâncias, sua biossíntese, metabolismo, sua distribuição natural e funções biológicas destes constituintes (HARBORNE, 1984).

Quando se fala em fitoquímica, imediatamente há associação com métodos de separação, purificação e identificação dos diferentes compostos presentes nas plantas, métodos como cromatografia (coluna aberta, CCD, CLAE, contra corrente, entre outras) para a separação/purificação; métodos espectroscópicos (espectrofotometria, infravermelho, massas, ressonância magnética) para a elucidação estrutural, sendo o entendimento destas técnicas e o desenvolvimento de novas que proporciona os avanços na fitoquímica (HARBORNE, 1984; MACIEL et al., 2002).

Um dos principais problemas relacionados a espécies medicinais é a execução das diversas técnicas necessárias para o avanço da investigação fitoquímica com pequenas quantidades de material vegetal. Outra dificuldade é a complexidade das amostras, principalmente na separação/purificação, o que faz necessário, em condições normais a aplicação de mais de um método para a separação/purificação, já que os métodos utilizados para elucidação estrutural necessitam de substâncias puras para realizada a identificação das substâncias. Este processo é bastante longo e geralmente é multidisciplinar. A abordagem fitoquímica ocorre da seguinte forma: Coleta e identificação botânica; preparação de extratos e análise por CCD; avaliação de atividades nos extratos brutos; consecutivas aplicações de métodos cromatográficos; avaliação de pureza; elucidação estrutural; testes toxicológicos e síntese química (HARBORNE, 1984; HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; MACIEL et al., 2002; CARMONA et al., 2013).

### 3.6 PERFIS FITOQUÍMICOS TÍPICOS: FINGERPRINTS

O controle de qualidade sempre foi um ponto chave no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, pois este encontra maiores dificuldades do que para medicamentos sintéticos, devido à complexidade da matriz vegetal, já que preparações à base de plantas medicinais possuem centenas de compostos, tornando extremamente difícil a caracterização de todos eles (ZHANG et al., 2005; XIE et al., 2007).

Atualmente o controle de qualidade de plantas medicinais é realizado através da quantificação de marcadores químicos, que normalmente estão relacionados com as atividades farmacológicas das espécies. Porém, essa informação não é o suficiente para dar uma imagem completa do material vegetal, pois a matriz complexa é tomada como responsável pelos efeitos terapêuticos, já que as substâncias atuam sinergicamente, sendo necessária a aplicação de técnicas que forneçam uma informação mais completa do vegetal/produto (LIANG et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2012).

Baseado no sinergismo das matérias primas vegetais, foi criado o conceito da Fitoequivalência, em que de acordo com este conceito, um perfil químico da espécie vegetal deve ser construído e comparado com o perfil obtido para um produto de referência clinicamente testado, considerando-os equivalentes quando as semelhanças forem evidenciadas (RODRIGUEZ et al., 2012).

A técnica de *fingerprint* é uma eficiente ferramenta para o controle de qualidade de múltiplos componentes presentes em plantas medicinais e têm sido amplamente aceita como um meio para avaliação e controle de qualidade de matérias primas vegetais e seus produtos acabados (ZHANG et al., 2005). O *fingerprint* pode ser considerado como uma representação, a mais próxima possível da mistura de substâncias presentes na matriz vegetal (NICOLETTI, 2011).

A obtenção de *fingerprints* é recomendada para o controle de qualidade de espécies vegetais, onde são utilizados perfis das substâncias farmacologicamente ativas, onde este perfil é essencial para representar similaridades e diferenças nas espécies de interesse. Esta forma de análise de materiais vegetais tem sido exigida por agências regulatórias como a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e European Medicines Agency (EMA) (FDA, 2004; EMA, 2006; GIRI et al., 2010). As metodologias usualmente empregadas para obtenção dos *fingerprints* são CLAE, Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Gasosa (CG), Infravermelho (IR), entre outras (LIANG et al., 2004).

### 3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia se destaca como a técnica analítica mais utilizada e eficiente para as necessidades atuais do âmbito farmacêutico e/ou químico. Sua eficiência está relacionada com a capacidade que o método apresenta na determinação qualitativa e quantitativa de diversos componentes presentes em uma matriz complexa, como extratos vegetais, em uma única análise (PRATHAP et al., 2013).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que tem recebido grande destaque e obteve grande evolução nos últimos 50 anos, sendo bastante utilizada com fins qualitativos e quantitativos (TONHI et al., 2002). Esta técnica destaca-se na separação de constituintes, conseguindo a separação eficiente mesmo de substâncias similares. Seu emprego tem sido considerado indispensável em um grande número de laboratórios (COLLINS et al., 2010), possuindo a capacidade de separar uma gama de compostos em diversos tipos de amostras em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade.

A CLAE pode ser utilizada a partir de instrumentos semi ou totalmente automatizados, e emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e com alto grau de compactação, como fase estacionária e fases móveis que são eluídas sob altas pressões (COLLINS et al., 2010). Normalmente o equipamento é dividido em bomba de alta pressão, reservatório de fase móvel, injetor, coluna contendo a fase estacionária, detector e um computador para o registro dos sinais.

Estimativas apontam que pelo menos 90% dos laboratórios que utilizam a CLAE, aplicam a modalidade da fase reversa, que consiste em sistemas que possuem menor polaridade na fase estacionária e maior polaridade na fase móvel. Para isso, são utilizados polímeros ou sílica quimicamente modificada, através da ligação de cadeias orgânica apolar. O uso da fase reversa apresenta diversas vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, fases estacionárias estáveis, rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel, maior rapidez e boa reprodutibilidade. Além disso, são muito aplicadas à separação de substâncias de diferentes polaridades e funcionalidades químicas (TONHI et al., 2002; MALDANER et al., 2010).

A escolha da fase móvel é de grande importância, devendo ser levado em consideração algumas características para a determinação desta, como suas características físico-químicas (pureza, solubilidade dos analitos, miscibilidade com os outros componentes da fase móvel e

compatibilidade com o detector), força de eluição (capacidade de interagir com as substâncias a serem analisadas por meio de interações químicas) e seletividade (solubilidade relativa dos componentes em solventes de polaridade semelhantes). Quando se utiliza fase reversa, as fases móveis mais utilizadas são água, metanol, acetonitrila e tetraidrofurano, devido a sua alta polaridade (COLLINS et al., 2010).

Uma grande vantagem da utilização desta técnica é a possibilidade de acoplar a vários tipos de detectores. O detector é o componente mais sofisticado presente no sistema. Ele mede de forma contínua alguma propriedade do analito e envia sinais para o registro, que geralmente é diretamente proporcional a concentração da substância na amostra. Os detectores podem ser universais ou seletivos, de acordo com sua capacidade de identificar todas as substâncias ou apenas classes (COLLINS et al., 2010).

Os principais tipos de detectores disponíveis são: de absorção espectrofotométrica no UV-Vis, o que inclui os detectores de arranjo de fotodiodos e UV-Vis convencional; de índice de refração; de fluorescência; de massas; de espalhamento de luz; entre outros com menor utilização (MALDANER et al., 2009; COLLINS et al., 2010; DA SILVA; COLLINS, 2011). Diversas publicações científicas têm enfatizado a utilização de detectores ultravioleta (UV) e arranjo de fotodiodos (DAD), no caso de compostos que absorvem luz UV (TISTAERT et al., 2011).

Dentro das diferentes metodologias de quantificação de polifenóis, a CLAE possui grande destaque, sendo a preferida para a quantificação destas substâncias. As condições cromatográficas incluem o uso quase exclusivo de colunas de fase reversa (C<sub>18</sub>), sistema binário de solventes, e principalmente o sistema de detecção através de detector de arranjo de fotodiodos (DAD) (IGNAT et al., 2010).

Além disso, a CLAE é a técnica mais comumente empregada para o desenvolvimento de *fingerprints* de matérias primas vegetais devido à sua grande precisão, sensibilidade, reprodutibilidade e capacidade de separar misturas complexas. Recentemente os *fingerprints* cromatográficos por CLAE têm sido bastante explorados, especialmente na correlação de produtos à base de vegetais e a matéria prima. Por diversas vezes estes *fingerprints* também aliados a ferramentas quimiométricas para análise de similaridades e criação de modelos que permitam a identificação das substâncias marcadoras (HE et al., 2015; HE et al., 2015; LI et al., 2015; WHANG et al., 2015; XIE et al., 2015; LIU et al., 2016).

### 3.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCD-AE)

A cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel é uma conhecida técnica utilizada para a separação e identificação de produtos naturais, amplamente aplicada no controle de qualidade analítico de matérias primas vegetais e fitoterápicos (COSTA CÉSAR, 2007). A CCD é uma técnica simples, rápida e de baixo custo. É comumente usada com fins qualitativos, devido a sua baixa reprodutibilidade, já que sua realização é manual. Entretanto, sua aplicação vem sendo realizada também na análise quantitativa, em razão do desenvolvimento de adsorventes de maior qualidade, de novas formas de aplicação e a utilização de densitômetros, que permitem a análise quantitativa *in situ* das bandas resultantes (COLLINS et al., 2010; PATRA et al., 2010; NICOLETTI, 2011).

Atualmente uma nova versão desta técnica vem sendo utilizada, CCD de alta eficiência (CCD-AE), que é uma forma e instrumentalizada da CCD convencional, que inclui adsorventes com melhores performances (menores tamanhos de partículas) e sistemas semiautomáticos ou automáticos de aplicação e desenvolvimento, possibilitando separação mais eficiente. com maior resolução e reprodutibilidade. Comparativamente, é mais rápida e possui menores limites de detecção, o que a torna mais atrativa para fins quantitativos (COLLINS et al., 2010; PATRA et al., 2010; NICOLETTI, 2011; SHEWLYO et al., 2012), o que permite que esta técnica seja empregada com eficiência na identificação e caracterização da matéria prima ou derivado vegetal.

A CCD-AE possui muitas vantagens na análise de plantas medicinais, como exemplo a separação de fácil visualização, principalmente com compostos coloridos; a utilização de pequenas quantidades de fase móvel; e fases com pHs acima de 8,0; análise de muitas amostras ao mesmo tempo, onde mais de 20 aplicações podem ser analisadas por placa, além de uma fácil observação de resultados. A CCD-AE, ainda fornece dados quantitativos da amostra desenvolvida quando utilizado todo o aparato instrumental oferecido pela CAMAG® (LIANG et al., 2004; PATRA et al., 2010). Um objetivo frequente desta técnica é a obtenção de *fingerprints*, como um autêntico marcador da complexidade biológica do vegetal, representando a sua diversidade e possibilitando uma identificação correta e determinando alterações na matéria prima e produtos derivados (NICOLETTI, 2011) sendo esta técnica uma das melhores e mais precisas na estimação de constituintes presentes em amostras vegetais através de *fingerprint*. Sua grande resolução a torna então uma útil ferramenta para o controle de qualidade de espécies vegetais (GUNALAN et al., 2012).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Para a realização dos procedimentos foram utilizados diferentes materiais e equipamentos, os quais encontram-se listados nas seções 4.1.1 e 4.1.2.

#### 4.1.1 Reagentes, solventes e padrões

Solventes: Etanol (Cinética®), metanol (Cinética®), metanol grau HPLC (Tédia®; JTBaker®), ácido trifluoroacético, ácido fórmico (Vetec®), ácido acético (Dinâmica®), acetato de etila (Dinâmica®), tolueno (Cinética®), ácido clorídrico, diclorometano (Dinâmica®).

Reagentes: Cloreto de alumínio, carbonato de sódio, polivinilpirrolidona (PVP), caseína, pó de pele, folin ciocalteau.

Padrões: Ácido gálico (Sigma®), ácido elágico (Sigma®), kaempferol (USP®), rutina (Merck®), quercetina (Merck®), vitexina (USP®), hiperosídeo, luteolina,  $\beta$ -sitosterol (Sigma®), D-maltose, D-frutose, antraquinona (Sigma®), senosídeos A e B (Sigma®).

#### 4.1.2 Vidrarias, equipamentos e materiais complementares

Vidrarias: Pesa-filtros, cadinhos de porcelana, dessecadores, balões de fundo redondo de 250, 500 e 1000 mL, balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 250 mL, pipetas volumétricas de 0,5 - 10,0 mL, béqueres 50-1000 mL, erlenmeyers de 50 - 1000 mL.

Materiais complementares: pipetas automáticas de 25-250 e 100-1000  $\mu$ L (Brand®), cuba cromatográfica (Camag®), seringas de 5 mL, filtros de seringa PVDF 0,45  $\mu$ m (Macherey-Nagel®), papéis de filtro (comum e quantitativo), pinças, espátulas, pipetadores, ponteiros

azuis e amarelas, placas cromatográficas para CCD (Macheray-Nagel®) e CCDAE (Merck®), sílica gel para cromatografia em coluna (Merck®).

Equipamentos: Banho maria (Lucadema®), banho de ultrassom (Unique®), Espectrofotômetros UV-Vis (Thermoscientific® e Micronal®), vórtex (IKA®), aplicador semi-automático de CCD Linomat V (Camag®), cromatografo à líquido acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (Thermoscientific®), balanças analíticas (Shimadzu®), evaporador rotativo (IKA®), liofilizador (Liotop®), estufa de circulação de ar (Lucadema®), agitador magnético múltiplo (IKA®), mufla, fotodocumentador (UVP®).

## 4.2 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal, constituído das folhas de *Eugenia uniflora*, foi coletado em Ipojuca – PE, em novembro de 2013, e levado à identificação no Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA sob o número de tombamento 89989. Após coleta, foi realizada estabilização através de secagem em estufa de ar circulante (40 °C) durante 7 dias.

### 4.2.1 Caracterização físico-química

A matéria prima foi caracterizada empregando Métodos Gerais em Farmacognosia de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB5, 2010).

#### Determinação de matéria estranha

Cerca de 50 g das folhas de *E. uniflora* foram espalhadas em uma fina camada sobre uma superfície coberta com papel, e a partir da técnica de quarteamento, os materiais estranhos às amostras foram separados manualmente. Inicialmente a olho nu e, em seguida com o auxílio de lente de aumento (cinco a dez vezes). O material separado foi pesado e com base no peso da amostra submetida ao ensaio, foi calculada a percentagem de matéria estranha em percentagem de massa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### Determinação da perda por dessecação

Amostras com 1g das folhas de *E. uniflora* foram transferidas para pesa-filtros previamente dessecados durante 30 minutos nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. As amostras foram colocadas na estufa (Quimis<sup>®</sup>), com temperatura de  $105 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 2 horas, seguidas de resfriamento em dessecador por 30 minutos e pesagem em balança analítica (Shimadzu<sup>®</sup>). A operação foi repetida em ciclos de uma hora até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, pela média de três determinações.

#### Determinação do teor de extrativos

Amostras contendo 4 g da droga foram transferidas para balão volumétrico de 250 mL e acrescentou-se 100 mL de água destilada, submetido à agitação, seguido de repouso durante 1 hora. Posteriormente, as amostras foram deixadas em banho Maria sob refluxo por 1 hora a  $90^\circ \text{C}$ , filtradas e apenas 25 mL do filtrado foram transferidos para pesa filtros e deixados secar em banho maria. Após secagem, os pesa-filtros foram colocados em estufa por um período de 6 horas, resfriadas em dessecador e pesadas.

#### Determinação do teor de cinzas

Amostras contendo 3,0 g do material vegetal foram transferidas para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. As amostras foram incineradas em mufla por 3 horas, mantendo-se a temperatura entre  $400\text{-}600^\circ \text{C}$ . Em seguida foram arrefecidos por 30 minutos em dessecador e pesados. Os resultados foram expressos pela média de três determinações e a operação foi repetida em ciclos de uma hora até peso constante.

#### Análise granulométrica por tamisação

Amostras de 25 g de matéria prima vegetal foram submetidas à passagem através de tamises, previamente pesados e tarados, com abertura de malha 850, 600, 500, 250, 150 e 90  $\mu\text{m}$ . A tamisação foi realizada através vibrações durante um período de tempo de 15 minutos. Os dados foram analisados de acordo com a média dos pesos das frações de amostras retidas nos tamises e coletor.

### 4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS

#### Extrato Bruto

O material vegetal seco e triturado foi levado a liquidificador industrial por 20 minutos, com intervalos de 5 minutos a cada ciclo extrativo de 30 segundos. Para cada 10 g do material vegetal, foram empregados 100 mL de líquido extrator (acetona: água, 7:3, v/v), na proporção droga/solvente de 10% (p/v). A solução foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida (RV10 Basic, IKA<sup>®</sup>) para eliminação do solvente orgânico. O resíduo foi congelado em freezer -80 °C por 3 dias e em seguida liofilizado (Modelo L101, Liotop<sup>®</sup>), originando o extrato bruto seco (EB).

#### Frações Enriquecidas

Cerca de 1,0 g do EB exatamente pesado foi reconstituído em água na proporção de 1:10. Em seguida a solução aquosa foi particionada com 10 mL hexano por 6 vezes. A fração aquosa resultante foi particionada por mais 12 vezes com 10 mL de AcOEt. Ao final, as frações foram reunidas e concentradas para total eliminação do solvente orgânico, congeladas e então liofilizadas. Portanto, ao final o procedimento resultou nas seguintes frações: hexânica (FH), acetato (FAc) e aquosa (FAq).

### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS (FLAVONOÍDES E TANINOS) POR UV-Vis NA DROGA VEGETAL, EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *E.uniflora* L.

4.4.1 Avaliação de metodologias para o doseamento de flavonoides totais na matéria prima (folhas), extrato bruto e frações enriquecidas de *E.uniflora*

#### 4.4.1.1 Quantificação de flavonoides totais por doseamento direto (DD)

##### *Preparação das amostras*

Droga vegetal: Foram pesados inicialmente 0,5 g do material vegetal e levados a banho maria sob refluxo, com temperatura média de  $85 \pm 2$  °C, durante 30 minutos, utilizando 30 mL de solução hidroalcoólica como líquido extrator. Em seguida, o extrato obtido foi filtrado em algodão para balão volumétrico de 100 mL. O algodão e o resíduo do material vegetal foram devolvidos ao balão e submetidos à nova operação de extração por 15 minutos com mais 30 mL da solução hidroalcoólica. A solução foi filtrada e o filtrado reunido com a solução resultante do primeiro ciclo. A operação de extração foi repetida por mais uma vez, a mistura resultante filtrada e todos os filtrados reunidos no balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com a solução hidroalcoólica.

#### *Avaliação das condições de preparação da amostra de droga vegetal*

A operação de preparação de amostra por refluxo foi avaliada através da investigação das influências da quantidade de amostra e da proporção de solvente. Para tanto, foram testadas amostra entre 0,25 e 1,50 g de droga vegetal, empregando como solvente as soluções hidroetanólicas nas proporções de 40, 60 ou 80% (v/v).

#### *Avaliação das condições analíticas*

##### *a) Soluções Estoque (SE)*

Solução estoque da droga vegetal (DV): solução resultante da operação de extração por refluxo a partir da droga vegetal foi tomada como solução estoque.

Solução estoque do extrato bruto/frações: foram pesados exatamente cerca de 200 mg do EB e das frações (FAq, FAc e FH), e em seguida solubilizados em balão volumétrico de 100 mL utilizando solução hidroalcoólica (50%, v/v) obtendo solução com concentração igual a 2 mg/mL.

Soluções estoque dos padrões: foram pesados 10 e 5 mg dos padrões rutina e quercetina, respectivamente, os quais foram solubilizados em balão volumétrico de 100 mL de solução hidroalcoólica 50% (v/v), resultando em soluções com concentrações de 0,100 e 0,050 mg/mL, respectivamente.

*b) Diluição e comprimento de onda para leitura*

Alíquotas de 3, 4, 5 e 6 mL das soluções estoques (DV, EB ou frações) foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL, adicionados de 2 mL de  $\text{AlCl}_3$  (5,0% em MeOH; p/v), e em seguida, o volume foi aferido com EtOH 50% (v/v). Após 30 min de reação, os espectros de varredura foram mensurados na faixa de 300 a 500 nm em espectrofotômetro UV-Vis (EVOLUTION 60S, ThermoScientific®). Os dados foram usados para eleição do comprimento de onda de leitura e a da diluição mais apropriada para a realização das análises.

*c) Tempo de leitura e concentração de  $\text{AlCl}_3$*

A cinética reacional foi investigada através da determinação das absorvâncias a cada 5 minutos após a adição de  $\text{AlCl}_3$ , até completar 60 minutos de experimento. O procedimento foi repetido em três níveis de concentração de  $\text{AlCl}_3$ : 2,5; 5,0 e 7,5% (p/v).

*d) Avaliação/determinação do volume de  $\text{AlCl}_3$*

Alíquotas de 1, 2 e 3 mL da solução de  $\text{AlCl}_3$  foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL, adicionadas 5mL da solução amostra da DV e o volume foi completado com EtOH 50% (v/v). A absorvância foi determinada em 410 nm após 25 minutos de reação.

*e) Cálculo do teor de flavonoides totais (TFT)*

O teor de flavonoides totais foi calculado pela equação:

$$TFT = \frac{A \times FD}{m \times E_{1\%}^{1\text{cm}}}$$

Onde: TFT – teor de flavonóides totais; A – absorvância lida; FD – fator de diluição; m – massa da matéria prima/extrato bruto/frações enriquecidas (g);  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  – absorção específica do complexo quercetina (500) ou rutina (259,4) – cloreto de alumínio.

#### 4.4.1.2 Quantificação de flavonoides totais após hidrólise ácida (HA)

##### *Preparação das amostras*

Droga vegetal: cerca de 0,5 g do material vegetal exatamente pesados foram transferidos para balão de fundo redondo, adicionados de 20 mL de acetona, 2 mL de ácido clorídrico concentrado e 1 mL de solução aquosa de metenamina 0,5% (p/v). A mistura foi levada a banho maria sob temperatura de  $85 \pm 3$  °C e refluxo por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi resfriada e filtrada através de algodão. O algodão e o resíduo da droga foram devolvidos ao balão de fundo redondo, adicionados de mais 20 mL de acetona, e a operação de extração repetida por mais 15 minutos. A operação foi repetida por mais uma vez e ao final dos três ciclos de extração, os filtrados foram reunidos em balão volumétrico de 100 mL. O volume foi aferido com acetona.

Extrato bruto e frações enriquecidas: o material foi solubilizado em acetona em balão volumétrico de 50 mL (concentração de 2 mg/mL). A solução obtida foi transferida para balão de fundo redondo e submetida a refluxo em banho-maria sob temperatura de  $85 \pm 3$  °C, juntamente com 1 mL de HCl e 0,5 mL de solução aquosa de metenamina 0,5% (p/v). Após 30 minutos, a solução foi resfriada e filtrada para balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com acetona.

##### *Avaliação das condições de preparação da amostra de droga vegetal*

A influência da quantidade de amostra sobre a resposta do método foi avaliada empregando amostras entre 0,25 e 1,0 g.

##### *Avaliação das condições analíticas*

###### *a) Soluções Estoque*

Solução estoque da droga vegetal: 20 mL da solução extrativa da droga vegetal após hidrólise foram transferidos volumetricamente para funil de separação. Em seguida, foram adicionados 20 mL de água destilada, e esta solução foi inicialmente lavada com 15 mL de acetato de etila. Foram realizadas outras três lavagens com 10 mL de acetato de etila, e por fim as frações orgânicas foram reunidas e lavadas 2x com 50 mL de água, onde a fração orgânica resultante foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com acetato de etila.

Solução estoque do EB e frações: 20 mL da solução após hidrólise foram transferidos volumetricamente para funil de separação. Em seguida, foram adicionados 20 mL de água destilada, e esta solução foi inicialmente lavada com 15 mL de acetato de etila. Foram realizadas outras três lavagens com 10 mL de acetato de etila, e por fim as frações orgânicas foram reunidas e lavadas 2 vezes com 50 mL de água, onde a fração orgânica resultante foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com acetato de etila.

Solução estoque do padrão: o padrão de quercetina foi solubilizado em metanol, na concentração de 0,050 mg/mL.

*b) Avaliação da alíquota de ácido na etapa de hidrólise*

Alíquotas de 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 mL de ácido clorídrico (HCl) foram testadas durante esta etapa.

*c) Determinação do comprimento de onda*

Para escolha do comprimento de onda para leitura, alíquotas de 7,0 e 7,5 mL das soluções estoque (DV, EB ou Frações) foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL, adicionada de 1,0 mL de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  5,0% (p/v), e em seguida, o volume foi aferido com solução de ácido acético a 5% em MeOH. Após 30 min de reação o espectro de varredura foi mensurado na faixa de 300 a 500 nm em espectrofotômetro UV-Vis.

d) *Determinação do tempo de leitura e concentração de AlCl<sub>3</sub>*

A cinética reacional foi investigada através da determinação das absorvâncias a cada 5 minutos após a adição de AlCl<sub>3</sub>, até completar 60 minutos de experimento. O procedimento foi repetido em três níveis de concentração de AlCl<sub>3</sub>: 2,5; 5,0 e 7,5% (p/v).

e) *Avaliação/determinação da alíquota de AlCl<sub>3</sub>*

Alíquotas de 1, 2 e 3 mL da solução de AlCl<sub>3</sub> foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL, adicionados de uma alíquota da solução amostra e o volume foi completado com a solução de ácido acético a 5% em MeOH. A leitura foi realizada após 30 minutos de reação.

f) *Cálculo para determinação do teor de flavonoides totais (TFT)*

O teor de flavonoides totais foi calculado pela equação:

$$TFT = \frac{A \times FD}{m (100 - Pd) \times E_{1\text{ cm}}^{1\%}}$$

Onde: TFT – teor de flavonóides totais; A – absorvância lida; FD – fator de diluição; m – massa da matéria prima/extrato bruto/frações enriquecidas (g); Pd – Perda por dessecação;  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  – absorção específica do complexo quercetina (500) – cloreto de alumínio (Farmacopeia Brasileira, 2010).

#### 4.4.2 Avaliação do método para quantificação de taninos totais na droga vegetal, extrato bruto e frações enriquecidas das folhas de *E. uniflora*

##### *Preparação das amostras*

Droga vegetal: foram pesados exatamente cerca de 0,25 g da droga vegetal e adicionados 150 mL de água destilada em balão de fundo redondo com capacidade para

250 mL. A preparação foi mantida em banho maria sob refluxo durante 30 minutos, a temperatura de  $85 \pm 2$  °C e, em seguida, resfriada até a temperatura ambiente. O conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água destilada. A solução foi deixada em repouso para decantar e filtrada em papel de filtro, desprezando os primeiros 50 mL. O filtrado restante constituiu a Solução Estoque (SE- 1mg/mL) (FB, 2010).

Extrato bruto e frações enriquecidas: o EB e as FAq, FAc e FH foram preparadas conforme descrito anteriormente no item 4.3.1.1., utilizando água destilada como solvente.

#### *a) Soluções Estoque*

Solução estoque da droga vegetal (DV): solução resultante do procedimento de extração por refluxo para matéria prima vegetal foi tomada como solução estoque.

Solução estoque do extrato bruto/frações: foram pesados 50 mg do EB e das frações enriquecidas (FAq, FAc e FH), e em seguida transferidos para balões volumétricos de 25 mL onde foram reconstituídos utilizando água destilada como solvente, resultando em uma solução de concentração final de 2 mg/mL.

Soluções estoque dos padrões: foram pesados 50 mg dos padrões empregados neste estudo (ácido gálico e pirogalol), e em seguida solubilizados em balão volumétrico utilizando água destilada como solvente, de maneira a originar soluções com concentração de 1 mg/mL.

#### *b) Determinação de polifenóis totais (PFT)*

Uma alíquota da solução estoque (1,0 mL de DV ou 150 µL de EB e frações) foi transferida, juntamente com 3,0 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada, para balão volumétrico de 25 mL. O volume foi aferido com solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 10,75% (m/v). A absorvância correspondente aos

polifenóis totais (PFT) foi mensurada em 780 nm ( $A_1$ ) após 15 minutos da adição da solução de carbonato de sódio e utilizando água destilada para ajuste do zero.

*c) Determinação de polifenóis não adsorvidos (FNT)*

Foram tomados 10,0 mL da SE (DV, EB ou frações) e transferidos para erlenmayer de 125 mL contendo uma quantidade exatamente pesada de um agente precipitante de taninos (pó de pele, caseína ou PVP). A mistura foi submetida a agitação durante 30 minutos e filtrada em papel de filtro. Uma alíquota do filtrado (1,0 mL para DV ou 150  $\mu$ L para EB e frações), foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e adicionadas de 3,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada. O volume completado com solução de carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 10,75% (m/v). A absorvância correspondente a fração não-tanante (FNT) foi mensurada em 780 nm ( $A_2$ ) após 15 minutos da adição da solução de carbonato de sódio e utilizando água destilada para ajuste do zero.

*d) Avaliação do tempo de leitura*

A cinética reacional foi avaliada através de sucessivas determinações das absorvâncias após cada 5 minutos depois da adição da solução de carbonato de sódio anidro (conforme reação de Folin-Ciocalteu), até completar 60 minutos da reação.

*Avaliação das condições analíticas*

*a) Quantidade de droga*

O procedimento de preparação das amostras por refluxo foi avaliado através da influência de diferentes quantidades da amostra. Neste sentido foram testadas quantidades de 0,25 a 1,0 g da droga vegetal, empregando água destilada como líquido extrator.

*b) Extração da amostra*

Cerca de 0,25 g da droga vegetal foram exatamente pesados e submetidos a três processos extrativos para preparação da amostra: maceração com agitação, ultrassom ou refluxo. Após filtração, diluição e reações apropriadas, os teores de taninos foram calculados e os rendimentos avaliados comparativamente.

*c) Avaliação da influência dos reagentes Folin-Ciocalteu e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$*

As influências do reagente de Folin-Ciocalteu (FC) e da concentração de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sobre a resposta do método foram estabelecidas através da realização um desenho experimental do tipo  $2^2$ . O desenho foi adicionado de 3 pontos centrais e os experimentos realizados em triplicata. A variável de saída foi a absorvância lida em 780 nm. A matriz experimental do Desenho Composto Central (DCC) contendo as variáveis naturais e codificadas está representada na Tabela 1. Os resultados foram ajustados a um modelo matemático através do método dos mínimos quadrados parciais e a equação foi usada para gerar superfícies de resposta. A análise estatística do desenho experimental foi realizada através de ANOVA, gráfico de paretos e coeficientes de determinação ( $R^2$ ); com o auxílio dos programas computacionais STATISTICA 7.0 (Statsoft, USA) e Microsoft Excel (Microsoft, USA) (ALVES et al., 2015).

**Tabela 1** - Matriz experimental do DCC realizada no ensaio fatorial.

Variáveis Naturais		Variáveis Codificadas	
FC (mL)	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (%)	FC (mL)	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (%)
1	10,75	-1	-1
3	10,75	1	-1
1	20	-1	1
3	20	1	1
2	15	0	0
2	15	0	0
2	15	0	0

Fonte: Autoria própria.

*d) Avaliação do agente complexante*

Para avaliação de agentes complexantes, o método analítico foi testado com

polivinilpirrolinona-PVP (50-200 mg), pó de pele (50-200 mg) e caseína (50 a 500 mg). Para tanto, 10 mL das soluções estoque foram transferidas para erlenmeyer de capacidade de 125 mL e adicionada dos respectivos agentes complexantes. A mistura foi submetida à agitação magnética durante 30 minutos. Após filtração e diluição apropriada, a capacidade de sequestro de cada agente complexante foi determinada espectrofotometricamente pela diferença das absorvâncias em 780 nm entre as amostras antes e depois da adição do agente complexante.

#### e) Cálculo do teor de taninos totais

O teor de taninos totais foi calculado pela equação:

$$TT = \frac{FD \times (A1 - A2) \times m_1}{m_2 \times A3}$$

Onde: TT: Taninos Totais; FD: Fator de Diluição; A1: Absorvância amostra polifenóis totais; A2: Absorvância para polifenóis não adsorvidos; A3: Absorvância solução padrão;  $m_1$ : massa do padrão;  $m_2$ : massa da droga/extrato bruto considerando a perda por dessecação.

### 4.4.3 Validação das Metodologias Analíticas

Para a validação das metodologias de quantificação taninos e flavonoides por espectrofotometria UV/Vis para a droga vegetal (folhas), extrato bruto e frações enriquecidas de *Eugenia uniflora* L., foram utilizados os parâmetros preconizados pela legislação em vigor – RE 899 (BRASIL, 2003): linearidade, limites de detecção e quantificação, especificidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

#### 4.4.3.1 Linearidade

*Curva dos padrões para flavonoides*

Quercetina: Foram dissolvidos 12,5 mg em balão volumétrico de 250 mL com a solução hidroalcoólica 50% (para doseamento direto) e etanol (para hidrólise ácida) (50 µg/mL – Solução Estoque Quercetina / SEQ).

Rutina: Foram dissolvidos 25 mg em balão volumétrico de 250 mL com a solução hidroalcoólica 50% (100 µg/mL – Solução Estoque Rutina / SER).

#### *Curvas do padrão para taninos*

Ácido gálico: Foram dissolvidos 50 mg de ácido gálico em balão volumétrico de 50,0 mL com água (1 mg/mL – Solução Estoque Ácido Gálico / SEAG).

Pirogalol: Foram dissolvidos 50 mg de pirogalol em balão volumétrico de 100 mL com água, e em seguida foram transferidos 5 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL e volume ajustado com água (0,025 mg/mL Solução Estoque Pirogalol / SEP).

As soluções foram armazenadas em frascos âmbar, bem fechados, em geladeira até o momento da utilização. Ao final, uma série de diluições foi realizada para obter a curva analítica, sendo elaboradas de acordo com a faixa de concentração estabelecida entre 80 e 120%.

#### *Curvas analíticas da matéria prima e extrato bruto de E. uniflora*

As curvas de linearidade da matéria prima e dos extratos brutos foram elaboradas de acordo com a faixa de concentração estabelecida entre 80 e 120%.

#### *4.4.3.2 Especificidade/Seletividade*

Os parâmetros foram estabelecidos através do método de adição do padrão. Alíquotas fixas do padrão foram adicionadas às soluções da amostra de diferentes concentrações utilizadas na curva de calibração das amostras, a fim de evidenciar o paralelismo entre as duas curvas.

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

O LD e o LQ foram estabelecidos a partir dos dados de regressão das curvas analíticas médias dos padrões. As equações abaixo foram utilizadas para calcular os parâmetros, conforme preconizadas pelo ICH (2005) e BRASIL (2003).

$$LD = 3,3 \cdot \left(\frac{S}{I}\right) \quad LQ = 10 \cdot \left(\frac{S}{I}\right)$$

Onde o  $S$  = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e  $I$  = inclinação da curva.

#### 4.4.3.4 Precisão

Na análise de repetitividade (intracorrída) foram realizadas 06 determinações empregando amostras independentes, na diluição correspondente a 100% da concentração de trabalho. Para a precisão intermediária (intercorrída), foram preparadas 03 amostras independentes, por 02 operadores e em 02 dias diferentes.

#### 4.4.3.4 Exatidão

Para a exatidão as amostras foram fortificadas com soluções do padrão em 80, 100 e 120%. A recuperação foi calculada pelo percentual do padrão recuperado.

#### 4.4.3.6 Robustez

A estabilidade de procedimento do método analítico foi avaliada através da introdução de pequenas e intencionais variações, tais como: concentração de carbonato de sódio (no caso de taninos totais), luminosidade, estabilidade da solução amostra, diferentes marcas de reagentes e diferentes equipamentos. Os efeitos das variações selecionadas foram avaliados através da quantificação das variabilidades nas respostas analíticas.

## 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E FLAVONOIDES POR CLAE-DAD

4.5.1 Desenvolvimento de metodologia CLAE-DAD para quantificação de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides presentes na matéria prima, extrato bruto e frações das folhas de *E. uniflora*

### 4.5.1.1 Preparo das soluções para análise por (CLAE-DAD)

Droga vegetal: cerca de 1,0 g da droga vegetal foram levados a refluxo com EtOH 80% (v/v) conforme descrito no item 4.3.1.1. Após filtração, a solução extrativa foi tomada como solução estoque, e foi realizada diluição apropriada para cada ensaio.

Extrato bruto/Frações: para estes materiais, cerca de 50 mg do extrato bruto e frações foram pesados e, em seguida, transferidos para balões volumétricos com capacidade de 25 mL. Em seguida, 20 mL de água ultrapura (Elga<sup>®</sup>) foram adicionados e os balões levados ao banho de ultrassom (Ultracleaner, Unique<sup>®</sup>) durante 15 minutos para total dissolução. Ao final, o volume foi completado com água ultrapura. Para as análises, foi realizada diluição apropriada para cada ensaio.

#### Padrões:

Ácido Gálico: cerca de 2,5 mg de ácido gálico exatamente pesados foram dissolvidos com água ultrapura em balão volumétrico de 25 mL, originando a solução estoque de concentração de 100 µg/mL.

Ácido Elágico: cerca de 5,0 mg de ácido elágico exatamente pesados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido em balão volumétrico de 10 mL, que foi levado a sonicator para total dissolução durante 30 minutos. A solução obtida de concentração de 500 µg/mL foi diluída em mistura de metanol:água na proporção de 3:2, resultando na solução estoque de concentração de 100 µg/mL.

Padrões utilizados na padronização interna:

Vitexina: cerca de 1,0 mg de vitexina exatamente pesados foram dissolvidos com solução hidroalcoólica a 50% em balão volumétrico de 10 mL. Originando solução estoque de concentração de 100 µg/mL.

*Hiperosídeo*: cerca de 1,0 mg de hiperosídeo exatamente pesados foram dissolvidos com solução hidroalcoólica a 50% em balão volumétrico de 10 mL. Originando solução estoque de concentração de 100 µg/mL.

Para a análise, as amostras da droga vegetal, do extrato bruto, frações e os padrões foram filtrados individualmente diretamente para os vials, através de membrana de PVDF com 0,45 µm de abertura de poro (Macherey-Nagel®).

#### 4.5.1.2 Condições cromatográficas

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

As condições cromatográficas adotadas para a análise do perfil cromatográfico de *E. uniflora* foram estabelecidas a partir de ensaios preliminares utilizando como ponto de partida os seguintes parâmetros: coluna de fase reversa 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno (Dionex®, C<sub>18</sub>; 5 µm) protegida por pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada (C<sub>18</sub>, 3,9 µm); composição da fase móvel: acetonitrila ou metanol e água purificada, acidificadas com ácido acético, ácido fosfórico ou ácido trifluoroacético; modo gradiente ou isocrático; fluxo: 0,8 - 1,2 mL/minuto; comprimento de onda para detecção: foi estabelecido após obtenção de espectro de varredura na faixa de 190 a 400 nm através do detector com arranjo de fotodiodos (MARQUES et al., 2013; MESQUITA et al., 2015). Todas as análises foram realizadas sob temperatura ambiente (23 ± 2°C).

Para determinar o método mais eficiente, foi levada em consideração a separação das substâncias de interesse, simetria de picos, número de pratos teóricos, resolução, etc. Determinando as seguintes condições (Quadro 1):

**Quadro 1** - Condições cromatográficas utilizadas nas análises por CLAE.

<b>Fase estacionária</b>	250 mm x 4,6 mm (C <sub>18</sub> ; 5 µm), pré-coluna (C <sub>18</sub> , 3,9 µm)
<b>Fase móvel</b>	H <sub>2</sub> O (A) e MeOH (B)
<b>Fluxo</b>	0,8 mL/min
<b>Modo</b>	Gradiente (0-10 min de 10-25% de Fase B; 10-15 min de 25-40% de FB; 15-25 min de 40-70% de FB; 25-30 min 75% de FB; 30-31 min de 75-10% de FB)
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Temperatura</b>	23 ± 2 °C
<b>Comprimento de onda do detector</b>	254, 270 e 350 nm

Fonte: Autoria própria.

Após o método desenvolvido, foram analisadas quantitativamente a presença dos monômeros de taninos hidrolisáveis e flavonoides. Os resultados foram expressos em %m/m das substâncias pesquisadas de acordo com a equação:

$$\frac{C_p \times AA}{A_p \times m} \times FD \times 100$$

Em que: Cp = concentração do padrão em g/mL (pureza dos padrões, 98%); Ap = área do padrão; AA = área da amostra; m = massa da amostra, considerando a perda por dessecação; FD = fator de diluição.

#### 4.5.2 Validação da metodologia analítica por CLAE

Para a validação do método de quantificação de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides por CLAE em matéria prima extrato bruto de *Eugenia uniflora* L., foram utilizados os parâmetros preconizados pela legislação em vigor – RE 899 (BRASIL, 2003): linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), especificidade, exatidão e robustez.

#### 4.5.2.1 Linearidade

##### **Curvas dos Padrões**

**Ácido gálico:** foram dissolvidos 2,5 mg de ácido gálico em balão volumétrico de 25 mL com água (0,1 mg/mL – Solução Estoque/SE). A solução foi armazenada em frasco âmbar bem fechado em geladeira até o momento da utilização no trabalho. Para obter a solução de trabalho, uma alíquota de 0,600 mL da SE foi diluída a 25 mL e o volume completado com água (2,0 µg/mL). Ao final, uma série de diluições foi realizada para obter a curva analítica, sendo elaboradas de acordo com a faixa de concentração estabelecida entre 1,9 e 3,1 µg/mL.

**Ácido elágico:** foram dissolvidos 5,0 mg de ácido elágico em dimetilsulfóxido em balão volumétrico de 10 mL, e em seguida levado a sonificador para total dissolução durante 30 minutos. A solução obtida de concentração de 500 µg/mL foi diluída em mistura de metanol:água na proporção de 3:2, resultando na solução estoque de concentração de 100 µg/mL (Adaptado de DHOOGHE et al., 2010). A solução foi armazenada em frasco âmbar bem fechado em geladeira até o momento da utilização no trabalho. Para obter a solução de trabalho, uma alíquota de 0,400 mL da SE foi diluída a 10 mL, e o volume ajustado com água (4,0 µg/mL). Ao final, uma série de diluições foi realizada para obter a curva analítica, sendo elaboradas de acordo com a faixa de concentração estabelecida entre 2,0 e 6,0 µg/mL.

**Vitexina:** Foram dissolvidos 1,0 mg de vitexina em balão volumétrico de 10,0 mL com solução hidroalcoólica 50% (0,1 mg/mL – Solução Estoque (SE)). A solução foi armazenada em frasco âmbar bem fechado em geladeira até o momento da utilização no trabalho. Para obter a solução de trabalho, uma alíquota de 0,500 mL da SE foi diluída a 10 mL e o volume completado com água (5,0 µg/mL). Ao final, uma série de diluições foi realizada para obter a curva analítica, sendo elaboradas de acordo com a faixa de concentração estabelecida entre 3,0 e 7,0 µg/mL.

**Hiperosídeo:** Foram dissolvidos 1,0 mg de hiperosídeo em balão volumétrico de 10,0 mL com solução hidroalcoólica 50% (0,1 mg/mL – Solução Estoque (SE)). A solução foi armazenada em frasco âmbar bem fechado em geladeira até o momento da utilização no trabalho. Para obter a solução de trabalho, uma alíquota de 0,300 mL da SE foi diluída a 10,0

mL e o volume completado com água (3,0 µg/mL). Ao final, uma série de diluições foi realizada para obter a curva analítica, sendo elaboradas de acordo com a faixa de concentração estabelecida entre 2 e 4 µg/mL.

**Curva analítica de extrato bruto e matéria prima de *Eugenia uniflora* L.:** as curvas de linearidade da matéria prima e extrato de folhas de pitanga foram elaboradas de acordo com a faixa de concentração estabelecida entre 80 e 120%.

#### 4.5.2.2 Especificidade e pureza do pico

O espectro obtido pelo detector (DAD) 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 extrato bruto e de ambos adicionados intencionalmente de ácido gálico, ácido elágico e das amostras (padronização interna) para verificar a ocorrência ou a inexistência de desvio do comprimento de onda máximo.

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

Foram utilizados os dados da regressão da curva analítica média do ácido gálico, ácido elágico e das amostras para efetuar os cálculos. As equações abaixo foram utilizadas para os cálculos, conforme preconizadas pelo ICH (2005) e ANVISA (2003).

$$LD = 3,3 \cdot \left( \frac{S}{I} \right) \quad LQ = 10 \cdot \left( \frac{S}{I} \right)$$

Onde o  $S$  = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e  $I$  = inclinação da curva.

#### 4.5.2.4 Precisão

Repetitividade (intracorrida)

Foram preparadas 6 amostras independentes conforme descrito anteriormente em *Solução amostra*.

#### Precisão intermediária (intercorrida)

Foram preparadas 3 amostras independentes, por 2 operadores diferentes e em 2 dias diferentes, para verificar a precisão do método.

#### 4.5.2.5 Exatidão

As *Soluções amostra* foram obtidas conforme descrito anteriormente, foram diluídas exatamente 5 mL das soluções estoque para balão volumétrico com capacidade de 10 mL para o extrato bruto, e de capacidade de 25 mL para a matéria prima e adicionadas alíquotas de soluções de ácido gálico nas concentrações 1,9, 2,4 e 3,1 µg/mL, e de ácido elágico nas concentrações de 2,0, 4,0 e 6,0 µg/mL. Para este ensaio, na quantificação de flavonoides por padronização, o extrato bruto e a matéria prima foram contaminadas com as soluções estoque do extrato bruto e matéria prima, respectivamente, nas concentrações de 80, 100 e 120 utilizadas na linearidade.

#### 4.5.2.6 Robustez

As *Soluções amostra* foram obtidas conforme descrito anteriormente tanto para a matéria prima quanto para o extrato bruto. E para o ensaio de robustez foram utilizadas como variáveis: mudança de fluxo em nível baixo (0,790 mL/min) e alto (0,810 mL/min); mudança na marca solvente utilizado na fase móvel (Tedia<sup>®</sup> e JTBaker<sup>®</sup>) 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 no teor e resolução do pico principal.

### 4.6 AVALIAÇÃO DE PERFIS QUÍMICOS (*fingerprints*) POR CCD E CLAE-DAD PARA DROGA VEGETAL, EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES ENRIQUECIDAS

#### 4.6.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia de Camada delgada de Alta Eficiência (CCD-AE)

A droga vegetal, o extrato bruto e suas frações enriquecidas foram caracterizados, inicialmente por CCD, através da aplicação manualmente das amostras e empregando os sistemas eluentes e reveladores propostos por Wagner e Bladt (1996) e descritos no Quadro 2.

**Quadro 2** - Sistemas cromatográficos, reveladores e padrões utilizados para análise do perfil fitoquímico do extrato bruto e frações enriquecidas de *E. uniflora*.

Metabólitos	Sistema de eluição	Reveladores	Padrões
Alcaloides	AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	Dragendorff	Atropina
Derivados Antracênicos	AcOEt:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O <sup>3</sup>	HNO <sub>3</sub> /KOH 10%	Antraquinona/ Senosídeos
Açúcares redutores	AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	Timol	D-maltose/D-frutose
Cumarinas	Éter:Tolueno: CH <sub>3</sub> COOH <sup>2</sup>	KOH	CumarinaMeOH
Derivados Cinâmicos	AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	NEU	Ácido cafeico
Flavonoides	AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O <sup>1</sup> / AcOEt:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O <sup>3</sup>	NEU/AlCl <sub>3</sub>	Quercetina/Luteolina/Kaempferol
Triterpenos/Esteroides	Tolueno: AcOEt <sup>4</sup>	Lieberman Bouchard	β-Sitosterol
Taninos hidrolisáveis	AcOEt:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O <sup>3</sup>	Cloreto férico/ NEU	Ácido gálico e ácido elágico
Taninos condensados	AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	VC	Catequina

<sup>1</sup>100: 11: 11: 27 v/v; <sup>2</sup>50: 50: 50 v/v; <sup>3</sup>90:5:5 v/v; <sup>4</sup> 90:10 v/v; AcOEt – Acetato de etila; HCOOH – Ácido fórmico; AcOH – Ácido Acético; H<sub>2</sub>O – Água; NEU – ácido etilborilaminoéster; VC – Vanilina Clorídrica.

Fonte: Adaptado de Wagner e Bladt (1996).

Após otimização das condições cromatográficas, os experimentos foram transpostos para CCD utilizando aplicador semiautomático no caso da pesquisa fitoquímica e para CCD-AE para a obtenção de *fingerprint*.

#### Preparação das amostras

Matéria prima: foram pesados 2 g da droga vegetal, e em bécker foi realizada extração por decocção em 20 mL de metanol durante 5 minutos. Após a extração, a solução extrativa foi resfriada e filtrada em algodão.

Extrato bruto e frações: as amostras foram diluídas em metanol na concentração de 3 mg/mL e os padrões na concentração de 1 mg/mL. A solubilização foi alcançada com o auxílio de vórtex.

Placas de sílica gel 60-F<sub>254</sub> com partículas de 10 - 12 µm (Macherey-Nagel<sup>®</sup>) para CCD convencional ou placas de sílica gel 60-F<sub>254</sub> com partículas de 5 - 6 µm (Merck<sup>®</sup>) para CCD-AE foram usadas para estas análises. As amostras foram aplicadas com auxílio de equipamento semi-automatizado (Linomat<sup>®</sup> 5, Camag) controlado por programa computacional Wincats<sup>®</sup> (Camag). Uma seringa de dispensação com capacidade para 100 µL foi empregada para aplicar 30 µL de amostra em bandas com largura de 9 mm e espaço entre as bandas, 5 mm. Os cromatogramas foram desenvolvidos em cubas de vidro (Camag<sup>®</sup>, 10 cm x 10 cm) após saturação por 30 minutos com a fase móvel adequada.

Ao final do experimento as placas foram secas em capela, e observadas sob luz visível e ultravioleta em 254 e 365 nm. Em seguida, as placas foram reveladas com reagentes específicos para cada grupo de metabólitos secundários, e reavaliadas sob luz visível e, quando necessário, sob UV em 365 nm.

As imagens das placas foram capturadas em fotodocumentador (UVP) munido de iluminação branca e UV em 254 e 365 nm.

#### 4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

As condições cromatográficas adotadas para a análise do perfil cromatográfico de *E. uniflora* foram adotadas após avaliação das melhores condições e posterior validação da metodologia, como demonstrado no item 4.4.2..

##### Preparação das amostras

Droga vegetal: cerca de 1,0 g da droga vegetal foram levados a refluxo com EtOH 80% (v/v) conforme descrito no item 4.3.1.1. Após filtração, o filtrado foi diluído na proporção de 5/25 mL.

Extrato bruto e frações: para estes materiais, cerca de 25 mg do extratos bruto e das frações aquosa e acetato de etila foram pesados e, em seguida, transferidos para balões volumétricos

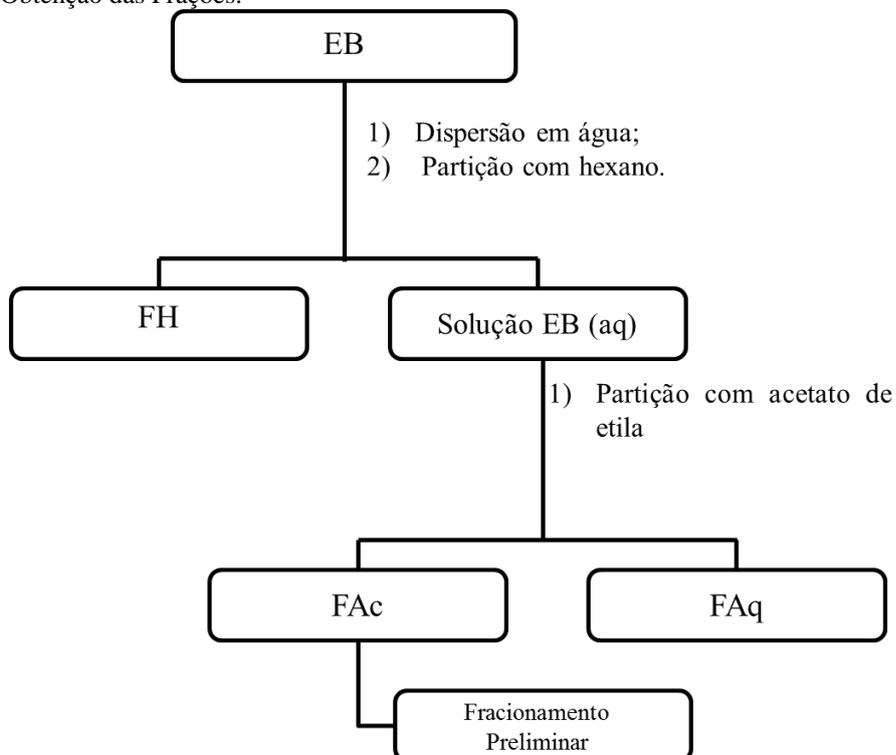
com capacidade de 25 mL. Em seguida, 20 mL de água ultrapura (Elga<sup>®</sup>) foram adicionados e os balões levados ao banho de ultrassom (Ultracleaner, Unique<sup>®</sup>) durante 15 minutos para total dissolução. Ao final, o volume foi completado com água ultrapura.

Para a análise, as amostras da droga vegetal, do extrato bruto e as frações foram filtradas individualmente diretamente para os vials, através de membrana de PVDF com 0,45 µm de diâmetro de poro (Macherey-Nagel<sup>®</sup>).

#### 4.7 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA: FRACIONAMENTO DOS CONSTITUINTES DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L.

Para a realização do fracionamento, o extrato bruto foi primeiramente submetido à extrações líquido-líquido com hexano para remoção de substâncias lipofílicas e acetato de etila para enriquecimento dos polifenóis, conforme descrito na seção de preparação de extrato bruto e frações, e exemplificado no esquema 1. As frações resultantes foram concentradas, congeladas e liofilizadas.

**Esquema 1** - Obtenção das Frações.

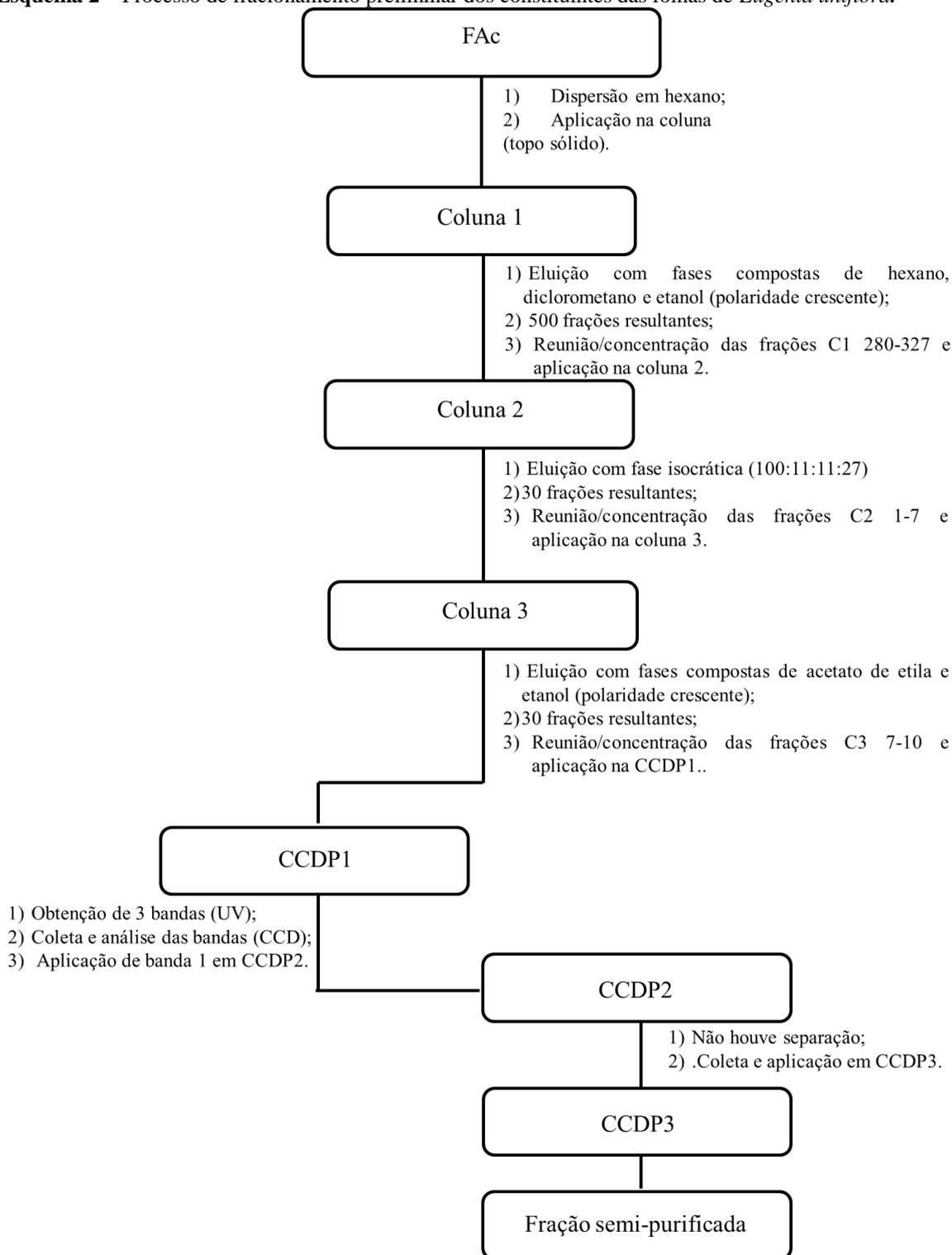


Fonte: Autoria Própria.

Para a realização do fracionamento dos constituintes da pitangueira, a fração acetato de etila foi escolhida devido aos maiores teores das substâncias de interesse. A partir da FAc,

foram realizadas consecutivas aplicações em cromatografias de coluna aberta, seguida de cromatografias de camada delgada preparativas, até a obtenção da pureza desejada. Como exemplificado no esquema 2.

**Esquema 2** – Processo de fracionamento preliminar dos constituintes das folhas de *Eugenia uniflora*.



Fonte: Autoria Própria.

#### 4.7.1 Cromatografia de coluna aberta em gel de sílica 1

Foi realizada a separação dos constituintes presentes nas folhas de *Eugenia uniflora* L., a partir de 4 g da fração acetato de etila. Para tal, foi utilizada uma coluna de vidro com 30 mm de comprimento e 35 mm de diâmetro. Como recheio, foi utilizado gel de sílica (fase normal) para cromatografia em coluna aberta, com partículas com tamanho de 0,063 a 0,200 mm (Merck®). O recheio foi previamente ativado (secagem em estufa a 105 °C, durante 3 horas). A coluna foi montada na forma suspensão da fase estacionária (totalizando 120 g da sílica ativada) e utilizando hexano como solvente. A suspensão foi transferida para a coluna de vidro na posição vertical, com cuidado para evitar a formação de bolhas de ar, sendo aplicadas pequenas batidas nas laterais da coluna, com auxílio de um bastão de madeira para facilitar a compactação.

Após a montagem da coluna, a amostra foi dissolvida no solvente de montagem juntamente com uma pequena quantidade da fase estacionária, e em seguida foi o solvente evaporado, resultando em uma massa sólida contendo a amostra e o gel de sílica. Por fim, a amostra foi aplicada no sistema através de topo sólido.

O sistema de eluição foi iniciado a partir o solvente de montagem da coluna, o hexano, e posteriormente alterado com misturas de hexano:diclorometano, em diferentes proporções até alcançar a totalidade de diclorometano (variações de 20% nas proporções dos solventes). A partir desse ponto, as misturas passaram a ser de diclorometano:etanol (variações de 10% nas proporções dos solventes), até proporção 100% de etanol. Cerca de 20 mL das frações foram recolhidas em tubos de ensaio com tampas, sendo analisadas através de CCD, espectrofotometria e CLAE.

#### 4.7.2 Cromatografia de Coluna aberta em gel de sílica 2

As frações 280-327 obtidas na primeira coluna em sílica gel (1), após análise foram concentradas e aplicadas em nova coluna cromatográfica, utilizando topo líquido em coluna de vidro nas dimensões de 300 mm de altura e 18 mm de diâmetro contendo aproximadamente 30 g de sílica gel ativada como fase estacionária. A fase móvel usada foi um sistema isocrático, utilizando o eluente 100:11:11:27 (acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água), comumente utilizado em CCD. As frações (cerca de 6 mL) foram

analisadas por CCD e observadas sob luz UV e reveladas com reagente natural A (NEU) + PEG quando necessário.

#### 4.7.3 Cromatografia de coluna aberta em gel de sílica 3

As frações 1-7 resultantes da coluna em sílica (2) foram reunidas e concentradas e aplicadas em nova coluna utilizando gel de sílica como fase estacionária, utilizando fase móvel em sistema gradiente de polaridade crescente, através de acetato de etila e misturas de acetato de etila: etanol (variações de 5-10%). As frações (cerca de 6 mL) obtidas foram analisadas através de CCD e observadas sob luz UV.

#### 4.7.4 Cromatografia de Camada Delgada Preparativa

As frações resultantes da cromatografia em coluna que apresentaram os compostos de interesse, foram reunidas concentradas e cromatografadas em placas preparativas, com dimensões de 20 x 20 cm. As placas foram preparadas utilizando suspensão de sílica (0,05 a 0,10 mm, Merck®) a 30% (p/v) em água destilada. Após distribuição da suspensão de sílica no centro de placas de vidro desengorguradas e secas em estufa, a sílica foi espalhada através de movimentações da massa para as arestas da placa e com auxílio de bastão de vidro. A placa foi seca em ambiente e posteriormente em estufa a 105 °C.

Para realização da análise, as amostra foram aplicadas nas placas ativadas a 2 cm das bordas laterais e inferior, em aplicação banda única. Em seguida a amostra foi eluída em cuba saturada com sistema de eluição acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5). Após eluição a placa foi seca e observada sob luz UV. As bandas de interesse foram raspadas para a coleta da sílica contendo a substância de interesse e em seguida lavadas com 20 mL de metanol (grau HPLC) para obtenção de solução posteriormente analisada através de CCD.

Após análise das bandas obtidas por CCD convencional, as bandas de interesse foram submetidas à cromatografia em novas placas preparativas. Para tal, o resíduo de sílica obtido anteriormente foi lavado novamente com metanol (grau HPLC), totalizando 100 mL de solução de lavagem. A solução foi concentrada em evaporador rotativo e aplicada em placa preparativa, como descrito anteriormente no item 4.6.4., em cuba saturada com sistema eluente. Foram realizadas ao total 2 repetições utilizando diferentes sistemas eluentes (100:11:11:27, acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água, v/v/v; e 95:5:5, acetato de

etila: ácido fórmico: água, v/v/v). Após eluição as placas foram secas e observadas sob luz UV para identificação de bandas. As bandas identificadas foram raspadas para a coleta das substâncias de interesse.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

#### 5.1.1 Caracterização físico-química

Para garantir a segurança e a manutenção da eficácia da planta medicinal, seja *in natura* ou como produto fitoterápico, a definição de critérios de qualidade para insumos de origem vegetal é de suma importância, especialmente devido à complexidade de composição destas matérias primas e as variações ligadas às condições de cultivo, coleta do vegetal, transporte e fornecimento (BARNI et al., 2009).

Dentre os principais problemas relacionados à qualidade de vegetais encontra-se a autenticidade, que pode ocorrer com facilidade em decorrência de adulteração da matéria prima. Este é um método fraudulento que pode comprometer o efeito do fitoterápico, colocando em risco o consumidor que pode se deparar com efeitos subterapêuticos ou tóxicos além de outros efeitos adversos que possam ser prejudiciais ao paciente (FALKOWSKI et al., 2009).

A determinação de matéria estranha tem grande importância na avaliação da qualidade da matéria prima vegetal, pois evidencia a presença de agentes adulterantes e contaminantes, tais como insetos, impurezas internas (como partes de outros farmacógenos da mesma espécie) e externas (outras espécies vegetais adulterantes, areia, embalagens plásticas, entre outros tipos). Este ensaio é priorizado quando amostras são adquiridas de fornecedores, e por convenção é realizada em amostras coletadas. As folhas de *E. uniflora* apresentaram um percentual de matéria estranha dentro dos limite de 2% preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5 edição (FB5, 2010).

Outro parâmetro de qualidade de relevância para a matéria prima vegetal é o percentual de umidade. A perda por dessecação é um teste farmacopeico que se destina a determinar o percentual de umidade da droga vegetal denotando a eficiência das operações de transformação do material vegetal, assegurando maior estabilidade de armazenamento e evitando a ocorrência de fenômenos de degradação, transformações enzimáticas e proliferação de microrganismos. A especificação preconizada oficialmente para o parâmetro segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) é de 8 a 14%. A droga vegetal de *E. uniflora* apresentou teor

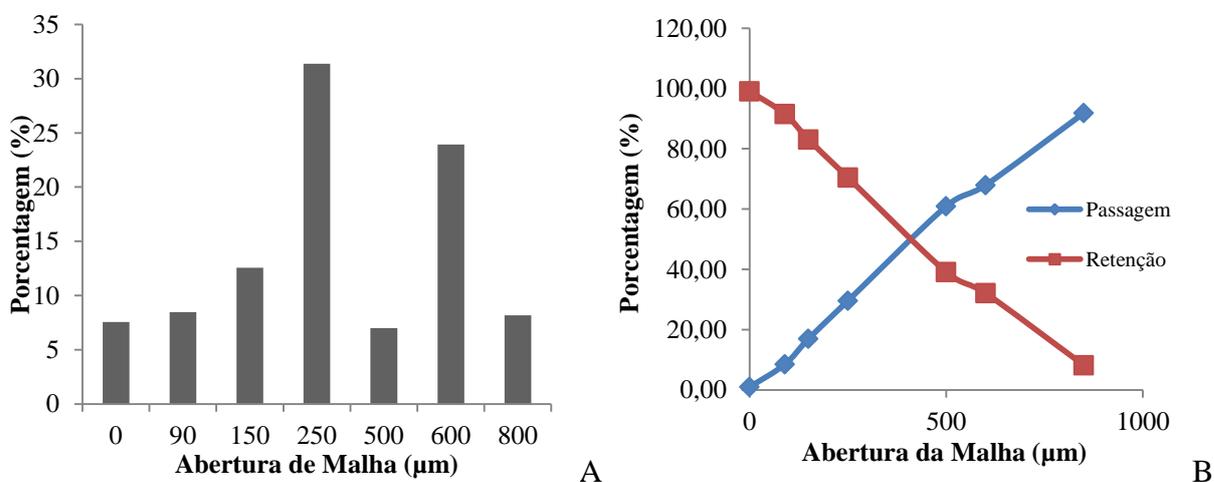
de umidade médio de  $10,90\% \pm 0,3231$  (2,96%). Dessa forma, houve eficiência no processo de secagem assegurando boa conservação.

A determinação do teor de cinzas totais avalia a presença de substâncias intrínsecas, que representa a porção do material de caráter inorgânico, como também de características extrínsecas como, por exemplo, a presença de areia e terra. Para este ensaio a Farmacopeia Brasileira apresenta limites de 14%. O teor de cinzas apresentou média de  $5,90\% \pm 0,0002$  (0,24%), indicando que as amostras das folhas de *Eugenia uniflora* apresentam-se dentro das especificações.

Quanto ao parâmetro de teor de extrativos, o teste representa o total de substâncias hidrossolúveis retiradas da matriz vegetal, sendo o resultado encontrado de  $0,90\% \pm 0,1157$  (1,26%). Para tal ensaio não existem especificações de referência, mas este ensaio pode ser utilizado para avaliação comparativa entre diferentes amostras quando aplicado sob condições padronizadas (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004; MARQUES et al., 2012).

A distribuição granulométrica fornece dados à cerca da homogeneidade do tamanho de partículas, que é fator importantíssimo nos processos extrativos, pois o tamanho das partículas está diretamente relacionado com a eficiência da extração. Neste ensaio, demonstrou-se que as partículas estão distribuídas entre os tamises de abertura de malha de 90 e 850  $\mu\text{m}$  (Figura 4A). Quanto ao tamanho médio das partículas, determinado pelo ponto interseção das curvas de retenção e passagem (Figura 4B), apresentou valor médio de 420  $\mu\text{m}$ . De acordo com os resultados obtidos, as folhas pulverizadas podem ser classificadas como pó moderadamente grosso (FB5, 2010).

**Figura 4** - Histograma de distribuição granulométrica (A) e curva de retenção e passagem (B).



Fonte: Autoria própria.

Após a caracterização do material vegetal, com a verificação dos requisitos de qualidade da matéria prima, foram obtidos os extratos brutos e frações.

#### Preparação dos Extratos brutos e frações

O extrato resultante da turbulização com acetona:água 7:3 (v/v), após filtração, foi concentrado em rota evaporador rotativo. Nesta etapa de concentração/remoção do solvente, a solubilidade de algumas substâncias lipofílicas diminuiu resultando na formação de uma graxa aderida à superfície do balão. Esta graxa foi descartada após o término da remoção do solvente. Com o término da concentração, o extrato foi congelado e posteriormente liofilizado. O extrato bruto resultante após liofilização apresenta-se como pó fino, de características higroscópicas com razoável solubilidade em água. As extrações obtiveram rendimentos médios entre 16-18% (8 e 9 g de extrato bruto para cada 50 g de matéria prima vegetal). A fração aquosa apresenta características semelhantes às exibidas pelo extrato bruto, e as frações hexano e acetato de etila diferem quanto à solubilidade.

## 5.2 QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENOIS (FLAVONOIDES E TANINOS) NA DROGA VEGETAL E EXTRATOS DAS FOLHAS DE *E. uniflora* L.

### 5.2.1 Avaliação de metodologias espectrofotométricas para quantificação de flavonoides das folhas de *E.uniflora* por doseamento direto

A metodologia por doseamento direto é bastante utilizada para quantificação de flavonoides totais em espécies vegetais, pois é capaz de detectar todos os tipos de núcleos dos flavonoides independente do tipo de ligação entre a aglicona e o glicosídeo. Este procedimento encontra-se na FB 5ª Ed. (2010), (monografia maracujá doce – *Passiflora alata*), além de ser o método preconizado por Schimdt e González Ortega (1993), reproduzido por Petry (1998). Esta metodologia consiste em extração com solução hidroalcoólica, onde a solução extrativa é levada diretamente à reação com  $AlCl_3$ , sem a etapa de hidrólise e extração com acetona e acetato de etila, o que permite que tanto agliconas como C- e O-glicosilados possam ser quantificados (PETRY et al., 1998).

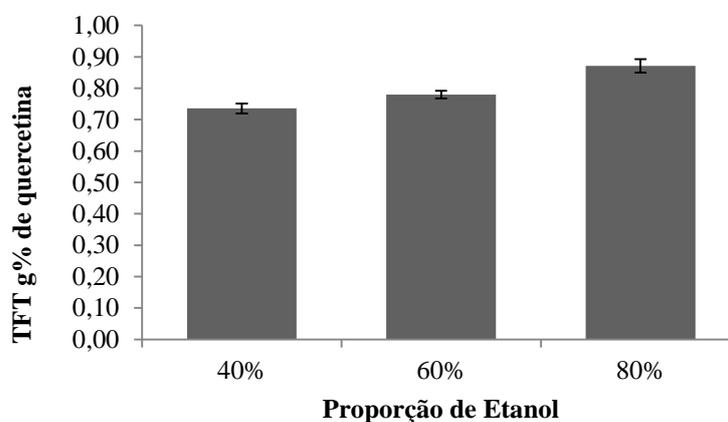
Nesta etapa, a metodologia por doseamento direto proposta para o maracujá por Petry (1998), reproduzida em diversos artigos científicos (MARQUES et al., 2012; FERNANDES et al., 2012) e presente em compêndios oficiais, passou por diversas avaliações e modificações com objetivo de obter as melhores condições para a aplicação desta na quantificação dos flavonoides presentes na matriz das folhas de *E. uniflora*.

### 5.2.1.1 Otimização das condições experimentais

#### *Preparação da amostra a partir da matéria-prima vegetal*

Na metodologia de quantificação de flavonoides através de doseamento direto, são realizadas extrações com soluções hidroalcoólicas, e nesta etapa foram avaliadas diferentes proporções de etanol, a fim de evidenciar a melhor proporção solvente extrator dentre os propostos. A proporção de solvente que obteve melhores respostas foi a de 80% de etanol, resultando em teores médios de 0,87 g%  $\pm$ 0,0214 (2,45%) expressos em quercetina, como pode ser observado na figura 5.

**Figura 5** -Teor de Flavonoides Totais em diferentes proporções de solvente.

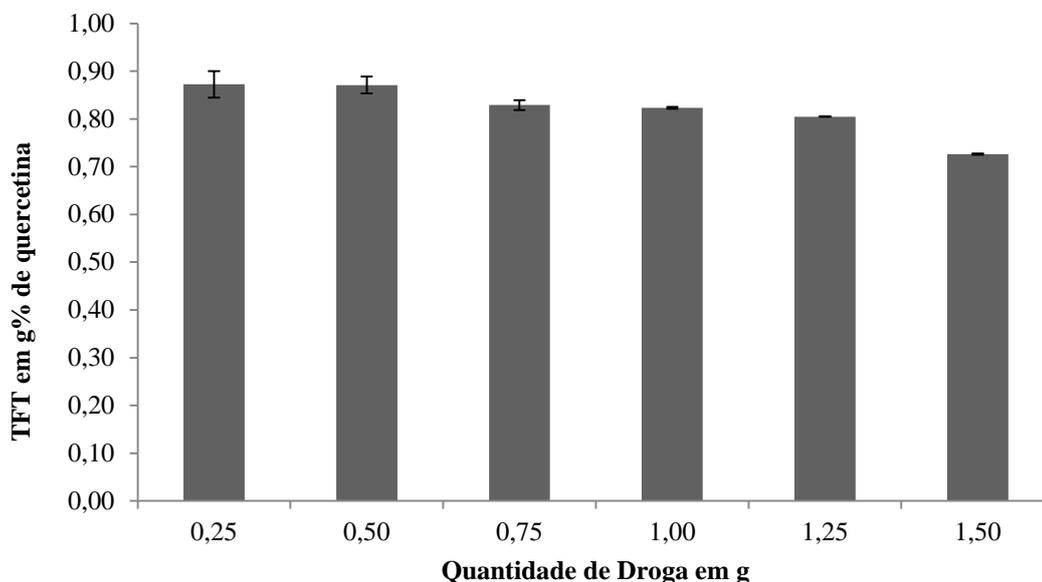


Fonte: Autoria própria.

Em relação a quantidade de matéria prima vegetal utilizada, os teores obtidos apresentaram pequena variação em relação as quantidades de droga utilizadas. Aquela que obteve melhor rendimento em g% de quercetina foi 0,50 g, com teor médio igual a 0,87g%  $\pm$  0,0175 (2,00%). Apesar da quantidade de 0,25 g apresentar valor bem próximo de teor calculado, 0,87g%  $\pm$  0,0275 (3,15%), não apresentando variações estatísticas significativas, algumas interferências podem ocorrer como: por se tratar de pequena quantidade a ser pesada,

quando levada em consideração que as substâncias de interesse na matriz estão em pequenas concentrações, o que pode ocasionar erro durante esta etapa do processo, acarretando em erros nas demais etapas (Figura 6).

**Figura 6** - Teor de flavonoides totais em diferentes proporções de droga.



Fonte: Autoria própria.

#### *Avaliação do comprimento de onda e diluição para leitura*

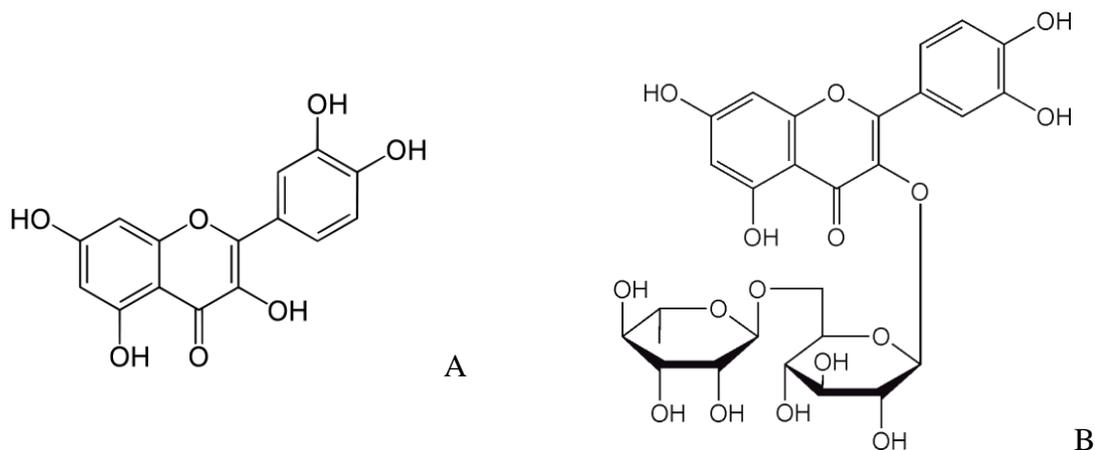
A determinação dos comprimentos de onda de absorção máxima é de grande importância na quantificação de flavonoides, uma vez que os máximos observados podem fornecer informações sobre as substâncias presentes na amostra. Ademais, no caso dos flavonoides, os compostos podem corresponder a agliconas livres e/ou heterosídeos. Considerando que o cromóforo poderá mascarar muitos detalhes acerca das estruturas dos metabólitos, o emprego de reações tais como a formação de complexos com  $AlCl_3$  pode proporcionar deslocamentos importantes no comprimento de onda de absorção máximo capazes de incrementar a especificidade da análise para os flavonoides. Estes deslocamentos podem estar associados com os padrões de substituição nas moléculas tal como o posicionamento e/ou o grau de hidroxilação (PETRY et al., 2001).

Segundo dados da literatura podem ser encontrados na espécie, tanto flavonoides glicosilados e não glicosilados (agliconas livres). Por esta razão, neste estudo foram avaliadas duas substâncias de referência, uma aglicona (quercetina) e um heterosídeo (rutina), para

expressar os resultados levando em conta os tipos de flavonoides encontrados nas folhas de *E. uniflora*.

Como pode ser observado na figura 7, a quercetina corresponde a aglicona livre do heterosídeo rutina. A diferença se resume a substituição da hidroxila no carbono 3 por cadeia glicosilada (-O-Rutinosídeo).

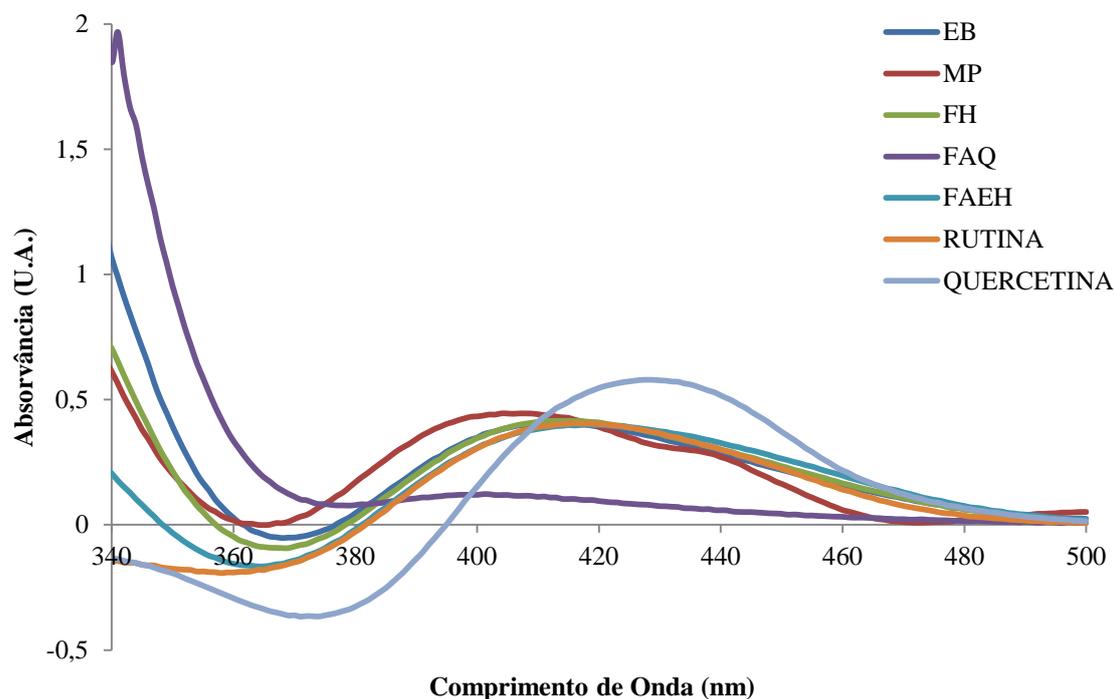
Figura 7 – Estruturas dos flavonoides Quercetina (A) e Rutina (B).



Fonte: Adaptado de OU-YANG et al., 2013.

No que pese a manutenção do cromóforo, a introdução do substituinte O-glicosilado em C3 é suficiente para modificar o sistema de complexação do  $AlCl_3$  entre a hidroxila em C3 e a carbonila vicinal. Esta modificação pode facilmente ser observada através dos espectros de varredura apresentados na figura 8, onde o espectro de absorção da rutina apresenta máximo na faixa de 410 nm, e a quercetina apresenta absorção máxima na faixa de 425 nm. Os espectros das amostras estudadas apresentaram maior semelhança com os máximos exibidos pela rutina (cerca de 410 nm), indicando se tratar de compostos flavonoídicos com comprometimento do sistema de complexação entre a carbonila e o alumínio, seja por decorrência de glicosilação (em C3 e/ou C5), seja por ausência de hidroxilas vicinais. Os mesmos perfis de absorção também foram observados para as frações.

Portanto, o comprimento de onda escolhido através da varredura para realização das determinações foi de 410 nm, apresentando absorção máxima, como pode ser observado na Figura 8.

**Figura 8-** Espectro de varredura da matéria prima, extrato bruto e frações (300 a 500 nm).

Fonte: Autoria própria.

Após a determinação do comprimento de onda de 410 nm, a seleção da diluição apropriada para a leitura foi avaliada empregando diferentes alíquotas a partir das soluções estoque obtidas da matéria prima e do extrato bruto. Deste modo, as diluições foram preparadas conforme descritas na tabela 2, objetivando concentrações de trabalho capazes de proporcionar absorvâncias de aproximadamente 0,400 U.A.

**Tabela 2** - Absorvâncias\* do teste de alíquota para matéria prima vegetal (MP) e para extrato bruto (EB) de *E. uniflora* em 410 nm.

	<b>4 mL</b>	0,329 ± 0,0052 (1,37)		<b>3 mL</b>	0,333 ± 0,0052 (1,57)
<b>MP</b>	<b>5 mL</b>	0,422 ± 0,0104 (2,47)	<b>EB</b>	<b>4 mL</b>	0,420 ± 0,0114 (2,72)
	<b>6 mL</b>	0,515 ± 0,0044 (0,85)		<b>5 mL</b>	0,545 ± 0,0102 (1,87)

\*Os dados estão expressos como: Média ± DP (DPR%).

Fonte: Autoria própria.

#### *Determinação do tempo de leitura e concentração de AlCl<sub>3</sub>*

A determinação do tempo de leitura tem importante papel nas cinéticas reacionais, especialmente nas reações que envolvem a formação de complexos, tal como a interação

flavonoides-Al. Nestes casos é necessário que a leitura seja realizada após período que permita a conclusão do processo reacional e a maximização da resposta analítica. . Estudos realizados por Petry e colaboradores (2001) evidenciaram comportamentos muito distintos para flavonoides de diferentes classes perante o tempo de complexação flavonoide- $\text{AlCl}_3$  demonstrando a necessidade deste tipo de avaliação em cada matriz estudada.

Estes estudos avaliaram algumas possíveis causas para os diferentes comportamentos diante do tempo de reação de complexação, entre elas estão: as diferentes estruturas das classes dos flavonoides, a presença de grupamentos hidroxilas livres e ainda interações intermoleculares, principalmente quando a matriz é complexa, como é o caso de matrizes vegetais (PETRY et al., 2001).

Outro fator importante quando se trata de formação de complexos, está relacionada a concentração do agente complexante. A formação do complexo flavonoide- $\text{AlCl}_3$  apresenta-se de forma diferente para as diversas classes de flavonoides e esse efeito é bastante específico e intrínseco. Ademais, o comportamento observado para o flavonoide isolado é modificado quando presente em mistura ou na solução extrativa, de maneira que para cada droga vegetal é primordial investigar o comportamento antes da adoção de procedimentos desta natureza (PETRY et al., 2001; MARQUES et al., 2012; FERNANDES et al., 2012).

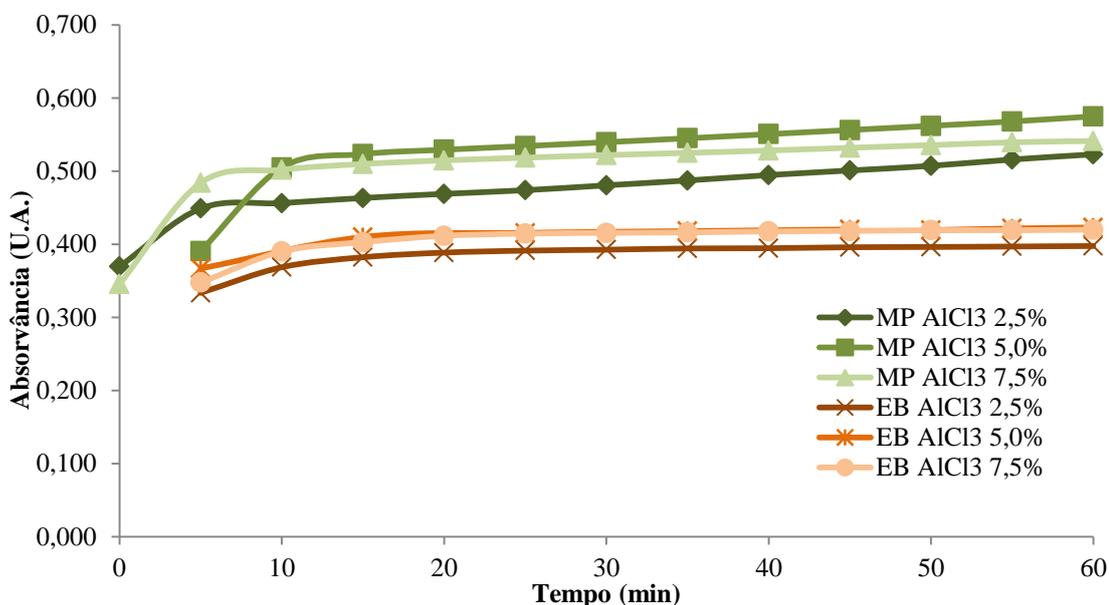
A figura 9 apresenta as cinéticas de complexação das amostras derivadas de *E. uniflora* e diferentes concentrações de cloreto de alumínio. As curvas exibem um rápido incremento na absorvância lida, que pode ser identificado pela inclinação da curva, nos primeiros 10 a 15 minutos seguido por tendência a estabilização na formação do complexo que atingem platô após 20 minutos. As curvas de cinética ainda revelam que após estabilização, os complexos formados permanecem íntegros durante o restante do experimento.

Considerando a influência da concentração de  $\text{AlCl}_3$ , os perfis de formação de complexo foram similares para todos os casos. Porém, a concentração do agente complexante que apresentou melhor desempenho foi 5%, independente da matriz testada (droga vegetal ou extrato bruto).

Em relação às duas matrizes avaliadas, foi evidenciado que o extrato bruto apresenta comportamento mais uniforme nas três concentrações do reagente. Além de uma maior tendência a estabilização. Enquanto que a matéria prima apresentou menor uniformidade e diferenças mais evidentes diante dos diferentes níveis de concentração do reagente. Estas

diferenças podem ter ocorrido devido à presença de substâncias interferentes no extrato obtido para a matéria prima, advindas do diferente processo de obtenção dos extratos.

**Figura 9** - Cinética de complexação do cloreto de alumínio na matéria prima e extrato bruto.



Fonte: Autoria própria.

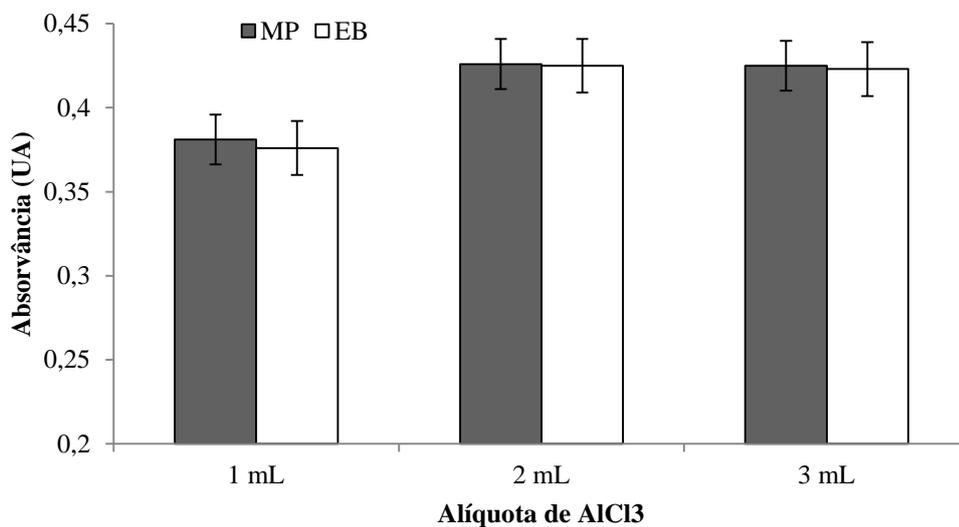
Assim, as cinéticas reacionais permitiram a escolha da concentração de 5% de AlCl<sub>3</sub> e do tempo de leitura de 30 minutos para o prosseguimento das análises, em virtude das melhores respostas encontradas nestas condições.

#### *Avaliação da alíquota de AlCl<sub>3</sub>*

Para determinar a quantidade de reagente AlCl<sub>3</sub> 5% necessário para a formação dos complexos, três alíquotas foram testadas. Neste sentido, foi possível observar que a menor alíquota de AlCl<sub>3</sub> 5% utilizada (1 mL) não obteve respostas máximas na formação do complexo flavonoide-Al, em virtude da concentração molar insuficiente para saturar os flavonoides presentes em solução. Já a alíquota de 2 mL da solução obteve melhores resultados, evidenciando maiores valores na absorvância. Indicando que a concentração de reagente resultante desta alíquota foi o bastante para satisfazer o total de flavonoides em solução, obtendo respostas superiores às obtidas para a alíquota de nível inferior. Em relação

a terceira alíquota testada, não foram evidenciadas diferenças entre as alíquotas de 2,0 e 3,0 mL, possuindo valores médios de absorvância muito semelhantes (Figura 10)

**Figura 10** - Influência das diferentes alíquotas de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 5% sobre as absorvâncias das amostras de matéria prima e extrato bruto de *E. uniflora*.



MP – Matéria Prima; EB – Extrato Bruto;  
Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos neste ensaio possibilitam a conclusão de que são necessárias alíquotas superiores a 1 mL para formação eficaz do complexo flavonoide- $\text{AlCl}_3$ . Evidenciando que, dentre as alíquotas testadas, a alíquota de 2 mL obteve as respostas, não possuindo diferenças significativas quando comparadas à alíquotas superiores.

De acordo com dados os obtidos na avaliação das variáveis envolvidas na metodologia, foram estabelecidas as condições experimentais ótimas para a quantificação de flavonoides totais na matéria prima e extrato bruto de *E. uniflora*. As melhores condições para preparação da amostra da matéria prima foram: solução hidroalcoólica a 80% como líquido extrator; 0,5 g da droga vegetal. Os ajustes metodológicos selecionados para o procedimento analítico foram: 410 nm como comprimento de onda para leitura; 2 mL de  $\text{AlCl}_3$  a 5% em metanol; e, tempo de leitura após 30 minutos de reação.

### 5.2.2 Avaliação de metodologias espectrofotométricas para quantificação de flavonoides das folhas de *E. uniflora* após hidrólise ácida

A metodologia para doseamento de flavonoides após hidrólise ácida é uma técnica bastante difundida para obtenção de dados quantitativos destes compostos. Esta técnica fundamenta-se na determinação de agliconas livres ou provenientes da quebra de O-glicosídeos após a hidrólise (MARQUES, 2011; FERNANDES et al., 2012). Porém, esta metodologia não é apropriada para espécies que contenham substâncias C-glicosiladas, pois estas serão subestimadas devido ao descarte em uma das etapas do procedimento.

Neste método a etapa da hidrólise ocorre simultaneamente à extração, o que justifica a utilização da acetona como solvente extrator, já que sua polaridade intermediária possibilitará a extração das agliconas geradas pela quebra dos glicosídeos. Além disso, a diminuição de substâncias interferentes no meio confere a metodologia uma quantificação mais específica de agliconas. Isto ocorre por que o extrato íntegro, após a hidrólise, passa pela etapa de partição, onde as agliconas ficarão retidas na fase orgânica, diminuindo drasticamente a quantidade de substâncias interferentes em solução (PETRY et al., 1998; MARQUES, 2011; FERNANDES et al., 2012).

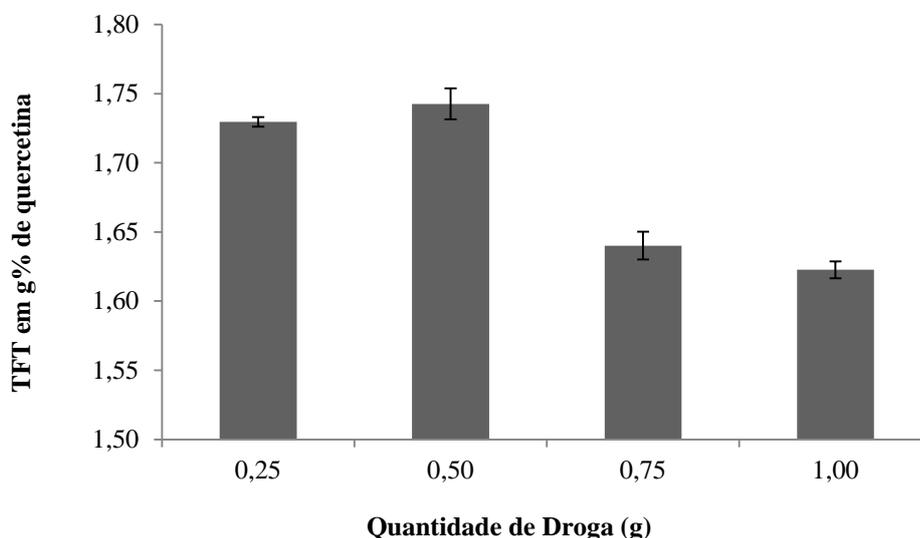
#### 5.2.2.1 Otimização das condições experimentais

##### *Preparação da amostra a partir da matéria-prima vegetal*

Uma das principais variáveis nos processos analíticos de espécies vegetais é a preparação dos extrativos, bem como a proporção de droga:solvente a ser utilizada neste procedimento. Para a metodologia após hidrólise ácida esta variável tem maior importância, pois nesta etapa ocorre também a quebra dos açúcares dos resíduos O-glicosídicos. Quantidades acima ou abaixo das proporções necessárias podem implicar em menor eficiência na extração e/ou na hidrólise das substâncias pesquisadas. Na avaliação da variação da quantidade da droga, não foram encontradas diferenças significativas nas respostas analíticas para as amostras de 0,25 e 0,5 g de droga vegetal, cujos teores de flavonoides totais foram de 1,73 g%  $\pm$ 0,0193 (1,11%) e 1,74 g%  $\pm$ 0,0313 (1,79%) respectivamente. Para as demais amostras houve redução significativa nas respostas analíticas, o que pode ser atribuído à

saturação do meio extrativo, ou até mesmo a limitações existentes no meio reacional (Figura 11).

**Figura 11** - Teor de flavonoides totais por hidrólise ácida em diferentes quantidades de droga vegetal de *E. uniflora*.



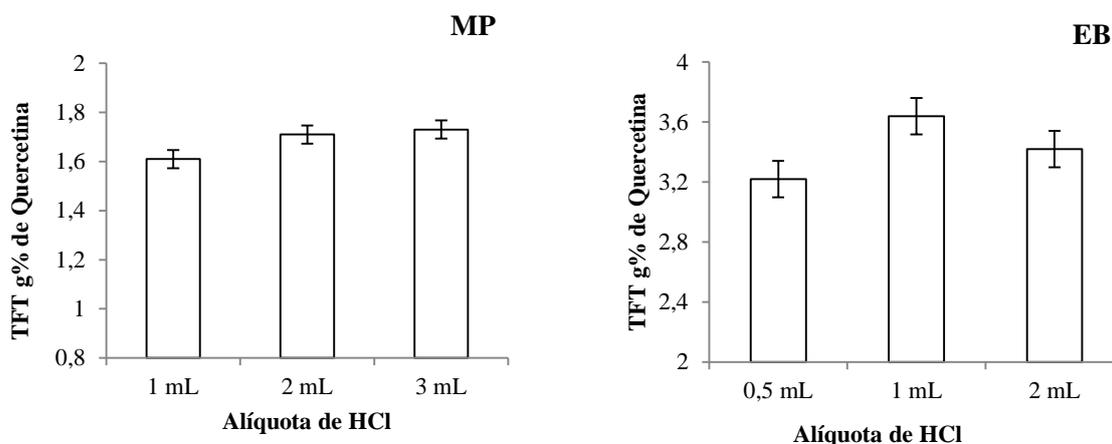
Fonte: Autoria própria.

Assim, os resultados encontrados permitiram a escolha de 0,5 g da droga vegetal para o prosseguimento dos ensaios.

#### *Avaliação de alíquota de ácido clorídrico*

No teste de avaliação da quantidade de ácido utilizado na etapa de hidrólise, considerando as diferentes formas de preparação, foram testadas diferentes quantidades de ácido na matéria prima e no extrato bruto (Figura 12). Na matéria prima, a alíquota de 2 mL apresentou aumento nas respostas analíticas, quando comparada com a quantidade de 1 mL. Este aumento na resposta não foi evidenciado com a alíquota de 3 mL, que apresentou respostas semelhantes as obtidas pela alíquota de 2,0 mL. No extrato bruto, a resposta analítica também foi intensificada com o aumento da alíquota, neste caso de 0,5 para 1 mL. E com o aumento para 2,0 mL, os teores apresentaram queda.

**Figura 12** - Influência das alíquotas de ácido sobre os teores de flavonoides totais (TFT %) nas amostras.



MP – Matéria Prima; EB – Extrato Bruto;  
Fonte: Autoria própria.

Assim, os resultados obtidos permitiram a escolha dos volumes de 2 e 1 mL de HCl para hidrólise da matéria prima e do extrato bruto, respectivamente. Alíquotas inferiores não obtiveram as respostas máximas e as superiores mantiveram os resultados obtidos pelas alíquotas centrais, ou apresentaram queda. Evidenciando que as alíquotas que proporcionam a hidrólise de forma mais eficiente são as centrais (2 mL para matéria prima e 1 mL para o extrato bruto), possibilitando maiores respostas analíticas.

#### *Otimização das condições experimentais*

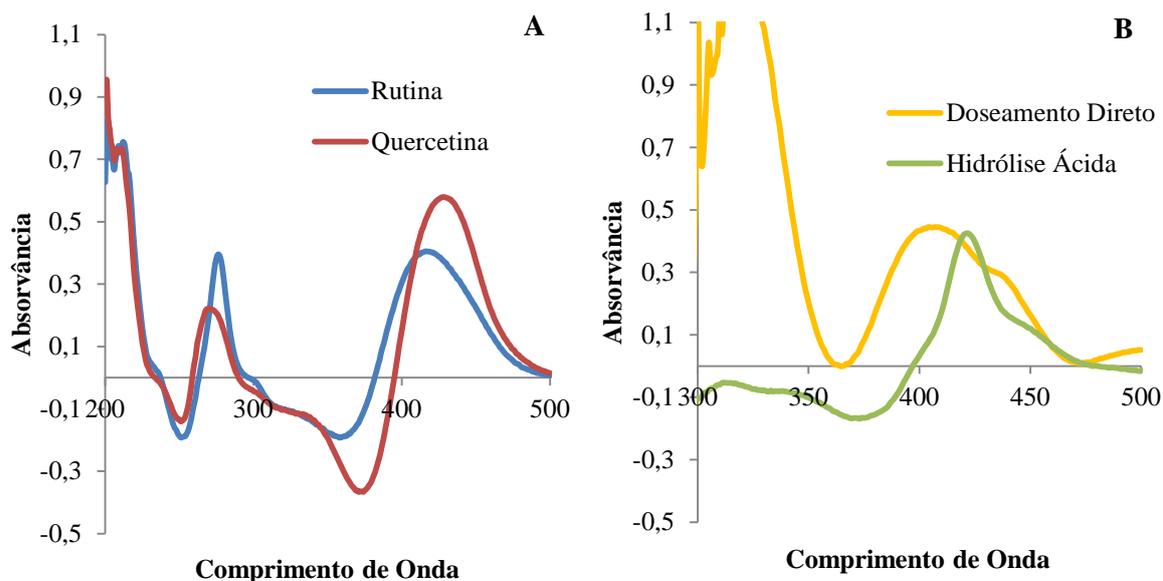
##### *Determinação de comprimento de onda*

O comprimento de onda máximo observado após a complexação com  $AlCl_3$  é dependente da estrutura da molécula e da quantidade de hidroxilas livres (PETRY et al., 2001; MARQUES et al., 2012). Esta diferença de máximos de absorção pode ser observada nos padrões quercetina e rutina, que possuem máximos de 425 e 410 nm, respectivamente, devido ao comprometimento de hidroxila em C-3 (Figura 13A).

Após a hidrólise ácida as amostras apresentaram-se com máximos de absorção semelhantes ao padrão quercetina, demonstrando um deslocamento no comprimento de onda (de 410 para 425 nm) resultante da perda do resíduo glicosídico presente nos flavonoides da amostra (Figura 13B). Evidenciando uma hidrólise eficaz e a conversão dos O-glicosídeos em agliconas. Estas agliconas possuem um número maior de hidroxilas passíveis de complexação

e conseqüentemente maiores máximos de absorção, como é possível observar nas amostras e nas substâncias químicas de referência. Porém, a perda do resíduo glicosídico só apresenta influência sobre os máximos quando a substituição ocorre dentro o sistema de complexação, ou seja, nas hidroxilas vicinais. Caso contrário, a presença de açúcares é irrelevante.

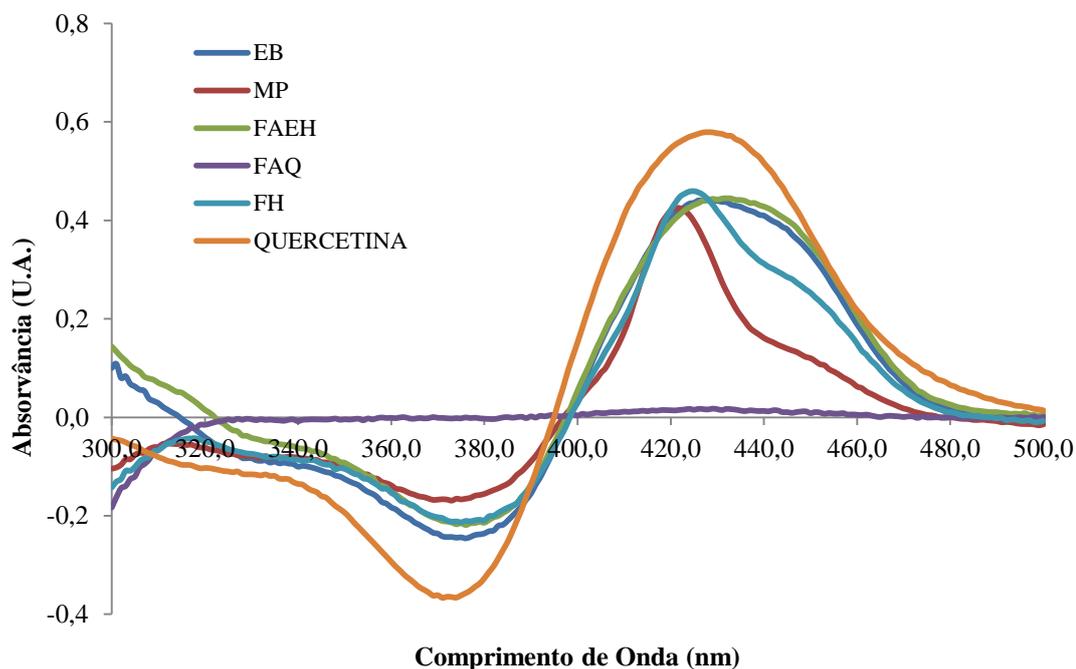
**Figura 13** - Espectros de Varredura para os padrões (A) e para a matéria prima (B) por doseamento direto e após hidrólise ácida.



Fonte: Autoria própria.

O comprimento de onda determinado através da varredura foi de 425 nm. O mesmo máximo de absorção após complexação com  $AlCl_3$  foi observado para todas as amostras. Nesta etapa também foram avaliadas as frações, com a finalidade de verificar o comportamento destas perante a metodologia, e evidenciar o perfil de cada fração.

**Figura 14** - Espectros de varredura para matéria prima, extrato bruto, frações enriquecidas, após hidrólise ácida e padrão em complexação com  $\text{AlCl}_3$ .



Fonte: Autoria própria.

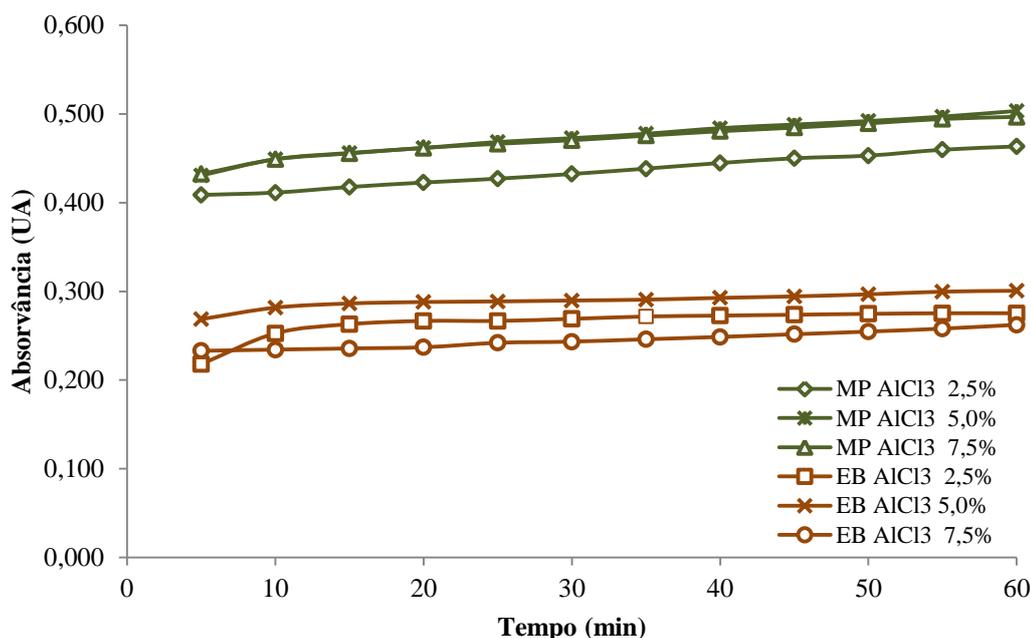
Na Figura 14 o comportamento das amostras é bastante semelhante, exibindo máximos de absorção iguais, indicando que os constituintes se distribuem também nas frações. Porém, a fração aquosa possui um comportamento diferenciado apresentando absorvâncias muito baixas e espectro de varredura próximo de zero. O que indica pequenas concentrações das substâncias de interesse.

#### *Determinação do tempo de leitura e concentração de $\text{AlCl}_3$*

A figura 15 apresenta as cinéticas de formação do complexo flavonoide- $\text{AlCl}_3$  nas matrizes estudadas em diferentes níveis e concentração de cloreto de alumínio. A inclinação das curvas evidencia um rápido aumento na resposta lida nos primeiros 10 minutos, seguido por tendência a estabilização na formação do complexo após 20 minutos para o extrato bruto e a partir de 30 minutos para a matéria prima. Além da manutenção dos complexos durante o experimento, mesmo após a estabilização. Considerando a influência da concentração de  $\text{AlCl}_3$ , a concentração do agente complexante que apresentou melhor desempenho foi 5%, independente da matriz testada (droga vegetal ou extrato bruto).

Em relação à matéria prima, as curvas exibem uma maior inclinação, e menor uniformidade quando comparada ao extrato bruto. As matrizes também diferem quanto ao tempo de estabilização da formação dos complexos, na qual a matéria prima possui um tempo superior de estabilização. Este desempenho diferenciado entre as matrizes pode ser atribuído as substâncias provenientes dos diferentes modos de preparação dos extratos.

**Figura 15** - Cinética de complexação do cloreto de alumínio na matéria prima e extrato bruto após hidrólise ácida.

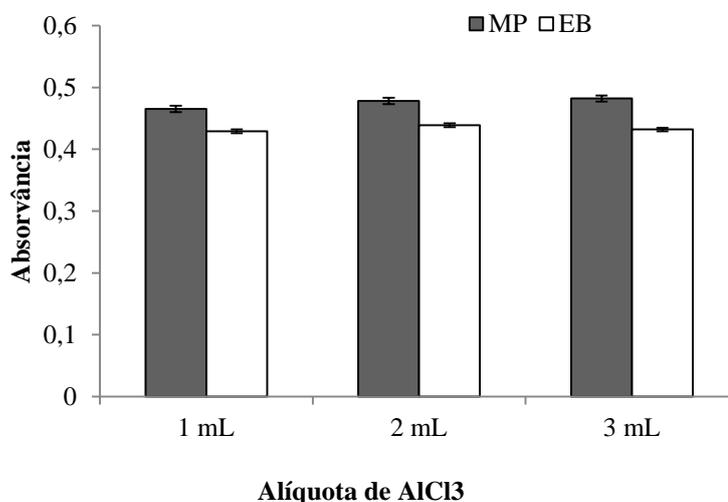


Fonte: Autoria própria.

#### *Avaliação da alíquota de AlCl<sub>3</sub>*

Na avaliação da quantidade de cloreto de alumínio necessária para a complexação eficaz, foram realizados teste utilizando diferentes alíquotas (1, 2 e 3 mL) do AlCl<sub>3</sub> a 5% em metanol. Neste sentido, foi possível observar que mesmo diante do aumento do volume das alíquotas do reagente, não houve diferenças significativas entre as respostas obtidas entre as diferentes alíquotas do cloreto de alumínio (Figura 16), nas duas matrizes estudadas (matéria prima e extrato bruto).

**Figura 16** - Influência da alíquota de  $\text{AlCl}_3$  5% nas absorvâncias das amostras de matéria prima e extrato bruto de *E. uniflora* após hidrólise ácida.



MP – Matéria Prima; EB – Extrato Bruto;  
Fonte: Autoria própria.

Estes resultados indicam que a concentração de  $\text{AlCl}_3$  presente na menor alíquota possibilita a complexação com a totalidade dos flavonoides presentes em solução. Permitindo a escolha da alíquota de 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  para o prosseguimento dos experimentos. A alíquota de 1 mL para a metodologia após hidrólise diverge da metodologia de doseamento direto, onde são utilizadas 2 mL de solução de  $\text{AlCl}_3$  a 5%. Esta diferença de volumes das alíquotas pode ser explicada pelo menor número de interferentes presentes na solução após hidrólise. Isto ocorre porque há um menor número de substâncias presentes na solução de análise devido afinidade com o solvente orgânico na etapa de partição.

Através da otimização das variáveis experimentais, foi possível estabelecer as condições experimentais adequadas para quantificação de flavonoides totais por hidrólise ácida na matéria prima e extrato bruto de *E. uniflora*. As condições estabelecidas para extração foram: 0,5 g da droga vegetal utilizando 2 mL de ácido para o extrato por refluxo da matéria prima e 1 mL para hidrólise no extrato bruto. Para metodologia de quantificação de flavonoides após hidrólise ácida foram escolhidos 425 nm como comprimento de onda de leitura, 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  a 5% em metanol, com leituras realizadas após 30 minutos de reação, tanto para os extratos por refluxo quanto para o extrato bruto.

Após a seleção das melhores condições as metodologias estabelecidas foram validadas seguindo os parâmetros estabelecidos pela RE 899.

### 5.2.3 Avaliação de metodologia farmacopeica (HA)

A Farmacopeia Brasileira apresenta entre suas monografias uma para *E. uniflora*, na qual encontra-se a quantificação de flavonoides por hidrólise ácida. Porém, esta metodologia ainda não havia sido aplicada a derivados da espécie, como extratos brutos e frações. Portanto, para definir a melhor forma de realizar o controle de qualidade da espécie através da quantificação de flavonoides (tanto na matéria prima quanto nos seus derivados, extratos brutos e frações), foram avaliados vários parâmetros da metodologia farmacopeica após hidrólise ácida, otimizando-os quando necessário, com a finalidade de obter melhores performances.

Para confirmar a influência que as modificações proporcionaram sobre a resposta da metodologia, as condições testadas neste estudo foram comparadas com a metodologia preconizada pela monografia da pitangueira na Farmacopeia Brasileira. Os resultados obtidos para a matéria prima demonstraram que as modificações introduzidas proporcionam respostas superiores às obtidas pelo método farmacopeico. O teor médio de quercetina foi de 1,67 g%  $\pm$  0,0000 (0,0%), enquanto o procedimento farmacopeico apresentou teor médio de 1,35 g%  $\pm$  0,0107 (2,7%). As respostas apresentaram diferença de 11% na resposta metodológica, além de maior reprodutibilidade nas respostas (DPR%).

A avaliação dos teores médios obtidos para ambas as metodologias (hidrólise ácida e doseamento direto), permitiu observar também que a metodologia por doseamento direto pode ser empregada em substituição à metodologia por hidrólise ácida. Podendo ser tomada como uma ferramenta alternativa para o controle de qualidade da espécie devido às vantagens, como menos etapas operacionais e ausência de solventes orgânicos.

Entretanto, o método de doseamento direto só é equiparável a metodologia após hidrólise quando a análise é realizada empregando como referência um padrão que seja representativo da classe de flavonoide majoritária nas folhas de *E. uniflora*. De acordo com os relatos na literatura, os flavonoides presentes na pitangueira são da classe dos flavonóis. Ou seja, o padrão precisa ser do tipo flavonol heterosídeo, para que os teores não sejam sub ou superestimados. Por este motivo, estudos acerca do padrão/marcador mais representativo devem ser conduzidos para uma melhor estimativa dos teores.

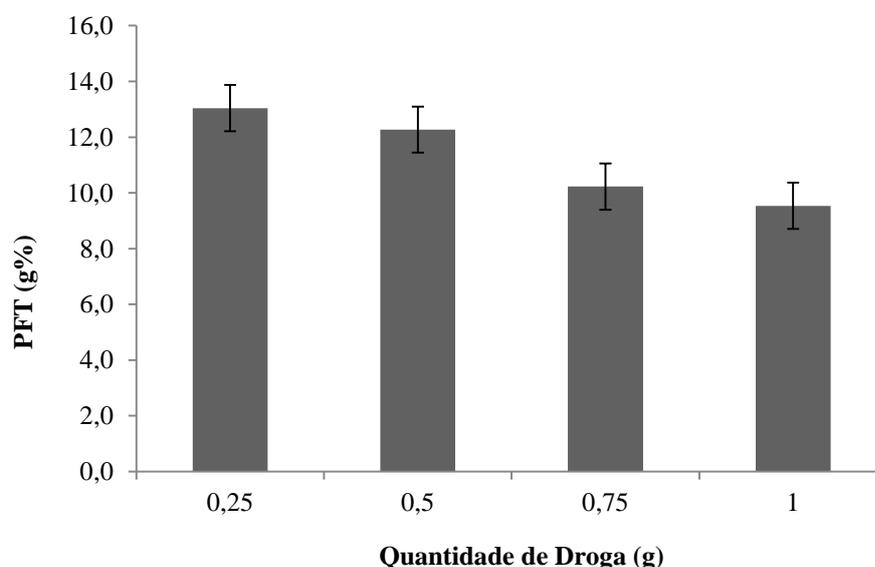
### 5.2.3 Avaliação de Metodologia Analítica Para Quantificação de Taninos Totais

#### 5.2.3.1 Avaliação de procedimento de preparação da amostra a partir da droga vegetal

##### *Avaliação de quantidade de droga*

Para determinar a melhor quantidade de droga a ser utilizada na etapa de extração foram testadas diferentes massas da matéria prima vegetal (0,25-1,0 g). As respostas obtidas evidenciaram que não houve diferença significativa na resposta analítica para amostras de 0,25 e 0,5 g, com teores médios de polifenóis totais de 13,04 e 12,27 g % expressos como ácido gálico, respectivamente. Estes resultados foram seguidos pelas respostas de 10,22 g% para 0,75 g de amostra e de 9,53 g% para a amostra de 1,0 g de droga vegetal (Figura 17). Os resultados revelam que a melhor condição para maior resposta em teor de polifenóis e consequentemente de taninos, foi obtido com a utilização de 0,25 g de droga, portanto esta quantidade foi escolhida para a validação da metodologia na matéria prima. O aumento da quantidade de droga pode levar a menores teores de polifenóis, visto que o líquido extrator pode ser saturado e impedir a solubilização de uma maior quantidade das substâncias desejadas. Isto explica os menores rendimentos apresentados pelas quantidades de 0,75 e 1,0 g.

**Figura 17** - Comparação entre teores de polifenóis totais (PFT g%) obtidos em diferentes quantidades de droga e expressos como ácido gálico.



Fonte: Autoria própria.

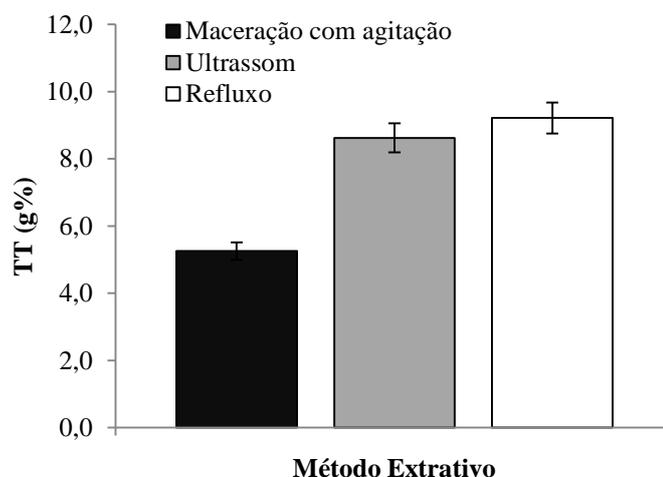
### *Avaliação de metodologia extrativa*

A metodologia de extração dos analitos da matriz vegetal é um ponto crítico para análise. Deve-se levar em conta a seletividade da metodologia na remoção dos compostos de interesse da matriz complexa, além das etapas operacionais e custos relacionados (COTTA et al., 2009). A determinação do melhor processo de extração é necessária, pois fatores inerentes às metodologias podem interferir na eficiência da remoção da substância de interesse. Neste contexto, foram avaliadas diferentes metodologias extrativas, que se diferenciam em aspectos como aplicação de temperatura e agitação, que são parâmetros que podem influenciar diretamente na eficiência de extração. Portanto, para obter os melhores teores de taninos totais, foram testados os métodos extrativos refluxo, ultrassom e maceração. Nesta avaliação, os ensaios de precipitação foram realizados utilizando o pó de pele, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira 5ª ed..

Nesta etapa da otimização, os teores foram expressos em duas diferentes substâncias, o ácido gálico e o pirogalol, para a análise da melhor substância química de referência. Estas substâncias são comumente utilizadas para expressar teores de taninos em espécies vegetais. No caso do ácido gálico, sua utilização é justificada por ele ser um monômero de tanino hidrolisável, representando com fidelidade este tipo de substância em espécies vegetais. Já o pirogalol tem seu uso difundido para expressar resultados quantitativos de taninos, devido principalmente ao seu alto coeficiente de absorção específica, e ao grande número de hidroxilas em sua estrutura (BUENO et al., 2012; BLAINSKI et al., 2013).

Na figura 18 pode ser observado que o método de maceração com agitação obteve valores muito inferiores as técnicas de ultrassom e banho maria sob refluxo, indicando menor eficiência deste método. As metodologias de refluxo e ultrassom obtiveram respostas aproximadas, com teores médios de 9,2 e 8,6 g% expressos como ácido gálico, e de 6,26 e 6,69 g% expressos como pirogalol. Porém, a preparação da amostra através de refluxo resultou em teores mais elevados para os taninos totais, como pode ser observado na figura 18, sendo a metodologia de escolha. Com os teores obtidos também se pode concluir que o ácido gálico obtém melhores teores de taninos totais, sendo o ácido gálico escolhido como substância de referência da metodologia.

**Figura 18** - Comparação entre teores de taninos totais (TT) obtidos em diferentes métodos extrativos, expressos em g% de ácido gálico.



Fonte: Autoria própria.

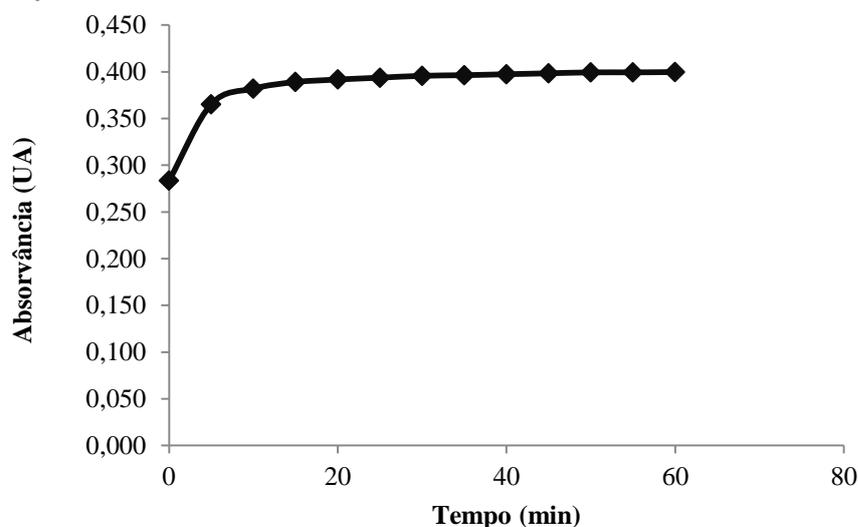
#### *Avaliação do tempo de leitura*

Quando se trata de metodologias analíticas em que as respostas dependem do tempo de reação é necessário que se determine o tempo ideal de leitura para evitarem-se erros de mensuração devido à ausência de estabilização nas reações. Leituras realizadas em tempo menor que o ideal podem levar subestimação de resultados e leituras em tempo superiores podem levar ao decaimento das respostas devido à quebra de complexos formados ou deslocamento de equilíbrio químico.

Neste sentido, para determinar o tempo ideal para as leituras foi realizado um ensaio de cinética, onde as amostras preparadas foram lidas em intervalos de 5 minutos durante uma hora.

Como pode ser observado na figura 19, há um rápido aumento na absorvância lida nos primeiros 5 a 10 minutos, seguido por tendência a estabilização na reação de formação do cromóforo azul na reação de Folin Ciocalteu que atinge platô após 15 minutos. Assim o tempo de 15 minutos foi determinado como apropriado para as leituras da metodologia

**Figura 19** - Cinética de formação de cromóforo através de reação de Folin Ciocalteu para quantificação de polifenóis em *E. uniflora*.



Fonte: Autoria própria.

#### *Avaliação da influência dos reagentes Folin-Ciocalteu e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>*

Um dos problemas frequentemente encontrados na elaboração de experimentos é a influência de uma ou mais variáveis sobre as respostas de interesse, e geralmente a otimização de processos e métodos se dá através da avaliação de uma variável por vez (univariado). Os processos univariados possuem algumas desvantagens associadas, principalmente por necessitar de mais tempo e materiais para que todas as variáveis sejam analisadas e por não conseguirem avaliar os efeitos de possíveis interações entre as variáveis que influenciam o processo (CUNICO et al., 2008).

Para driblar as dificuldades dos processos univariados, podem ser utilizados planejamentos que utilizam diversas variáveis ao mesmo tempo e com número reduzido de ensaios através de planejamento fatorial. Este tipo de abordagem, geralmente, é empregada em virtude de sua eficiência para identificar e quantificar o efeito de dois ou mais fatores sobre as propriedades relacionadas a uma determinada operação. Dessa forma, é possível estabelecer as combinações de níveis de cada fator e determinar qual(is) causa(m) compatibilidade(s) ou incompatibilidade(s). Assim, o planejamento fatorial através de análise de superfície de respostas, é uma coletânea de técnicas matemáticas e estatísticas que têm sido utilizadas com sucesso para desenvolver, melhorar e otimizar processos (MONTGOMERY, 1991; DAVIES, 1993; MORGAN, 1995; CUNICO et al., 2008; BARROS NETO, 2010).

Nesse sentido, anteriormente a validação foi realizado um experimento fatorial para avaliar as influências das concentrações de reagentes sobre a resposta analítica a fim de

determinar como a quantidade do reagente Folin Ciocalteu e a concentração de Carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) poderiam interferir no desempenho do procedimento (Tabela 3).

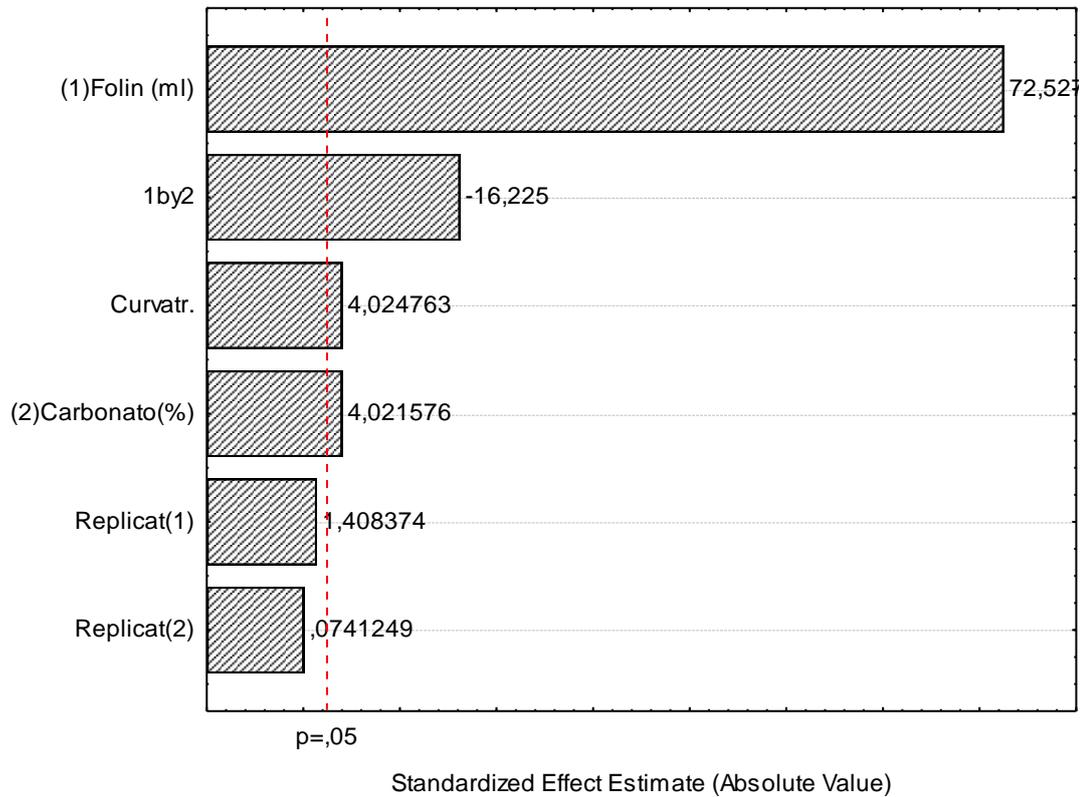
**Tabela 3** - Matriz do Desenho de Composto Central para avaliar a influência da quantidade de Folin Ciocalteu e concentração de Carbonato sobre a resposta do método em absorvância.

Variáveis Naturais		Variáveis Codificadas		Abs (U.A.)		
Folin (mL)	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (%)	Folin (mL)	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (%)	Média	DP	DPR%
1	10,75	-1	-1	0,504	0,00208	0,41276
3	10,75	1	-1	0,611	0,00100	0,16367
1	20	-1	1	0,529	0,00551	1,04179
3	20	1	1	0,596	0,00252	0,42201
2	15	0	0	0,562	0,00100	0,17794
2	15	0	0	0,564	0,00100	0,17730
2	15	0	0	0,565	0,00306	0,54040

Fonte: Autoria própria.

As análises dos efeitos padronizados através do gráfico de paretos (Figura 20) seguida de comparação de médias através do Teste-*t* revelaram que os fatores principais (reagente de FC e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), quanto a interação dos fatores foram os principais responsáveis pela variabilidade da resposta experimental (intensidade da absorvância), sendo estatisticamente significativos no nível de confiança de 95%. Considerando as intensidades dos efeitos, pode ser observado no gráfico de paretos que o fator FC foi o mais importante (+72,5), ultrapassando a linha de significância, seguido pela interação dos fatores (-16,2) e o fator  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  foi o último (+4,0). Em relação a contribuição de cada um dos fatores principais (FC e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), os resultados apontam que o aumento dos níveis foram responsáveis por contribuição positiva; ou seja, o aumento na concentração de cada um dos reagentes proporciona aumento na resposta metodológica (absorvância lida). Por outro lado, a interação entre os fatores revelou que a passagem simultânea dos níveis inferiores para os superiores, desfavorece a resposta. Portanto, o resultado do ajuste conjunto é menor do que a soma da contribuição individuais de cada um dos fatores.

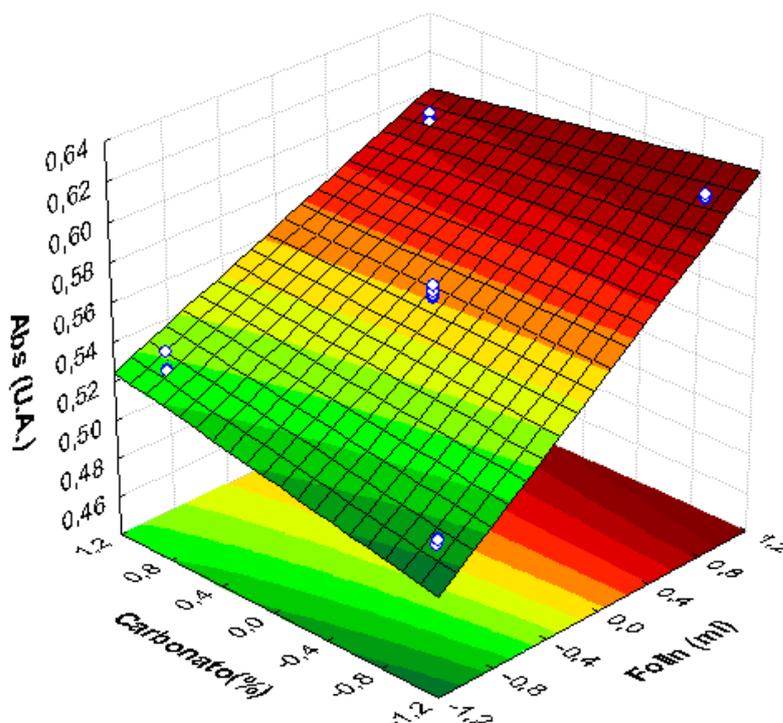
**Figura 20** - Gráfico de Paretos para efeitos padronizados do fatorial 2<sup>2</sup>.



Fonte: Autoria própria.

As influências das variáveis sobre a resposta do método ficam mais nítidas quando observada a superfície de respostas gerada a partir dos dados da matriz experimental (Figura 21). No que pese as contribuições individuais positivas dos fatores principais, concentração de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e volume do reagente FC, a combinação dos fatores ocasiona resposta menor do que esperado, inclusive inferior as respostas observadas para a contribuição individual do FC.

**Figura 21** - Superfície de resposta para o fatorial.



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, a análise dos dados indicam que as condições reacionais mais apropriadas para realização da reação são FC em seu nível máximo (3 mL) combinado com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em seu nível inferior (10,75 %). Ademais, o fator deletério observado para o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  merece especial atenção em razão do número elevado de relatos empregando o reagente em concentrações superiores a 20%. Por fim, estas condições foram adotadas para a realização dos demais estudos de avaliação do desempenho do método.

#### *Avaliação do Agente complexante*

A avaliação de agente complexante mais apropriado para a formação de complexos com os taninos presentes na amostra foi conduzida tanto na matéria prima quanto no extrato bruto. Os agentes testados foram os mais comumente relatados na literatura: caseína (de natureza proteica), polivinilpirrolidona (PVP, de natureza não proteica) e Pó de pele (MONTEIRO et al., 2005; SOARES et al., 2006).

A investigação do perfil de complexação de taninos tem papel importante no desempenho da metodologia geral de quantificação de taninos por Folin Ciocalteu. As condições reacionais podem interferir na afinidade e na estabilidade dos complexos formados entre o agente complexante e os taninos, podendo apresentar variações significativas na

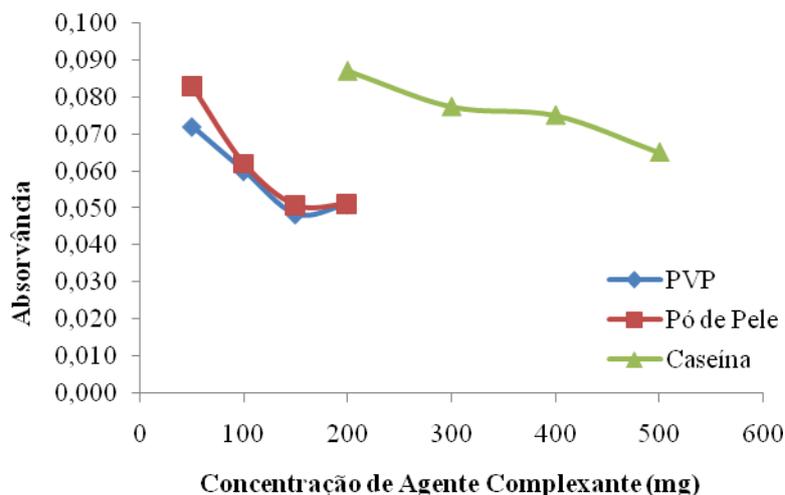
resposta analítica a drogas e compostos diferentes. Por esta razão os métodos não podem ser diretamente transpostos para drogas diferentes e muitas vezes a mesma eficácia não pode ser observada para os mesmo agentes precipitantes. Embora a busca por agentes precipitantes universais seja relatada na literatura (SOARES, 2002; VERZA, 2006; 2008), o emprego do pó-de-pele permanece como um dos agentes mais usados até os dias de hoje.

No que pese a significativa afinidade que o pó-de-pele apresenta pelos taninos, sua variabilidade intrínseca e o elevado custo de aquisição tem estimulado a pesquisa por novos agentes precipitantes; Entre as macromoléculas mais estudadas destacam-se a caseína e a polivinilpirrolidona (PVP), e estes agentes precipitantes de taninos tem sido a mola motora para a investigação e a proposição de agentes precipitantes alternativos para a quantificação de taninos (SOARES et al., 2006; VERZA, 2006).

Os dados deste estudo permitiram determinar o agente complexante mais apropriado e a melhor concentração para a metodologia de quantificação de taninos em folha de pitangueira.

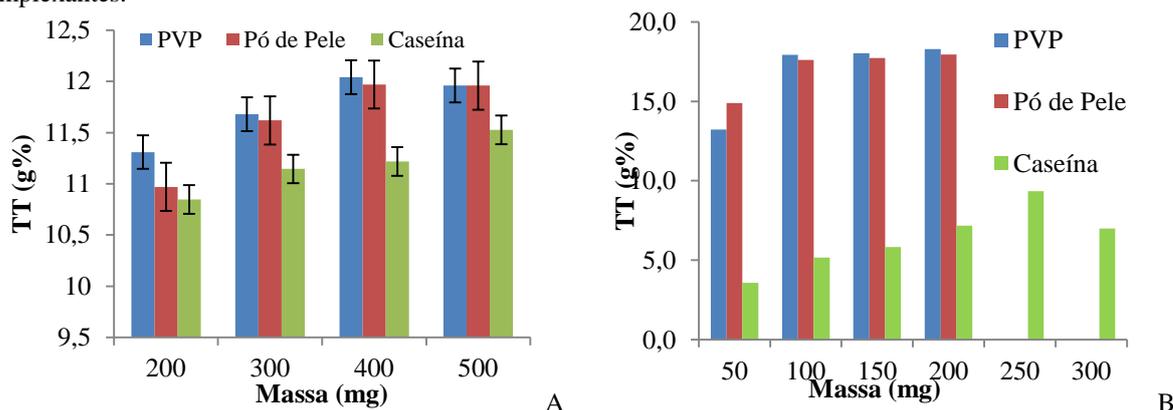
Os resultados obtidos para a análise avaliação do agente complexante para a matéria prima, tanto em absorvância (Figura 22) quanto em teores de taninos totais (Figura 23A), apresentaram comportamentos semelhantes para o pó de pele e para o PVP. O desempenho destas duas substâncias evidencia que elas foram mais eficientes na formação dos complexos com os taninos, apresentando menores absorvâncias. Foi possível observar também que as máximas respostas foram obtidas a partir de 150 mg dos agentes complexantes PVP e pó de pele, não havendo diferenças significativas em quantidades superiores. Já a caseína não foi capaz de formar complexos com todos os taninos presentes, mesmo nas concentrações mais altas, ainda que superiores as concentrações das outras macromoléculas.

**Figura 22** - Absorvâncias da fração não adsorvida nos agentes complexantes da matéria prima em diferentes concentrações.



Fonte: Autoria própria.

**Figura 23** - Teor de taninos totais da matéria prima (A) e do extrato bruto (B) de acordo com diferentes agentes complexantes.

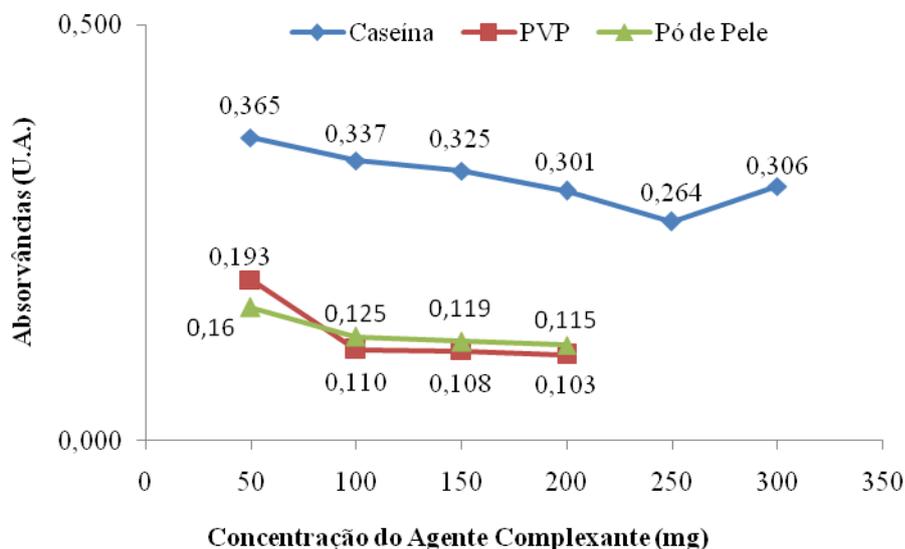


Fonte: Autoria própria.

Os dados obtidos para a análise do extrato bruto evidenciaram comportamento semelhante ao observado para a análise da droga vegetal. Novamente, o emprego de pó-de-pele e PVP foram mais eficazes na formação e manutenção dos complexos formados com os taninos. Os dados também permitiram observar que nas amostras adicionadas de 100 mg de PVP ou do pó-de-pele como complexante, não houve mais modificações significativas na resposta do método para o teor de taninos totais (Figura 23B). O mesmo não ocorre para a caseína que, além da menor capacidade de sequestrar taninos, apresenta reversão do equilíbrio dos complexos em proporções mais elevadas (a partir de 300 mg).

A figura 24 apresenta os valores em absorvância dos resultados para avaliação do extrato bruto.

**Figura 24** - Absorvâncias obtidas para o extrato bruto na fração não adsorvida de acordo com diferentes agentes complexantes.



Fonte: Autoria própria.

Alguns estudos evidenciaram que o emprego de polímeros sintéticos, tais como polivinilpirrolidona e polietilenoglicol, podem obter maior efetividade como complexantes de taninos do que alguns derivados proteicos (LUCK et al., 1994; SOARES, 2002; VERZA, 2006; 2008). O mecanismo para a complexação do PVP com os polifenóis é associado a estrutura altamente hidrofílica do PVP, o que leva a formação de ligações de hidrogênio entre estas substâncias (VERZA et al., 2008). Perante os resultados obtidos foi possível observar que o PVP apresentou performances sem diferenças significativas das obtidas pelo pó de pele, que é o complexante utilizado pelo método geral.

O PVP tem recebido grande destaque pelo fato de que, ao contrário da maioria dos derivados proteicos, os complexos formados entre polifenóis e povidona são geralmente mais estáveis a variações tal como de pH. Os relatos na literatura demonstram que a povidona apresenta maior eficiência na formação de complexos com taninos, do que outras substâncias, tais como caseína, gelatina e albumina sérica bovina (LUCK et al., 1994, FICKEL et al., 1999).

Levando em consideração as vantagens do PVP, tal como maior capacidade de complexação com taninos que a caseína, a baixa variabilidade experimental, homogeneidade, e, baixo custo quando comparado ao pó-de-pele; a macromolécula foi escolhida como agente complexante para os demais ensaios de avaliação da metodologia de quantificação de taninos na matéria prima vegetal e no extrato bruto das folhas da pitangueira.

## 5.2.4 Validação das Metodologias Analíticas por Espectrofotometria UV-Vis

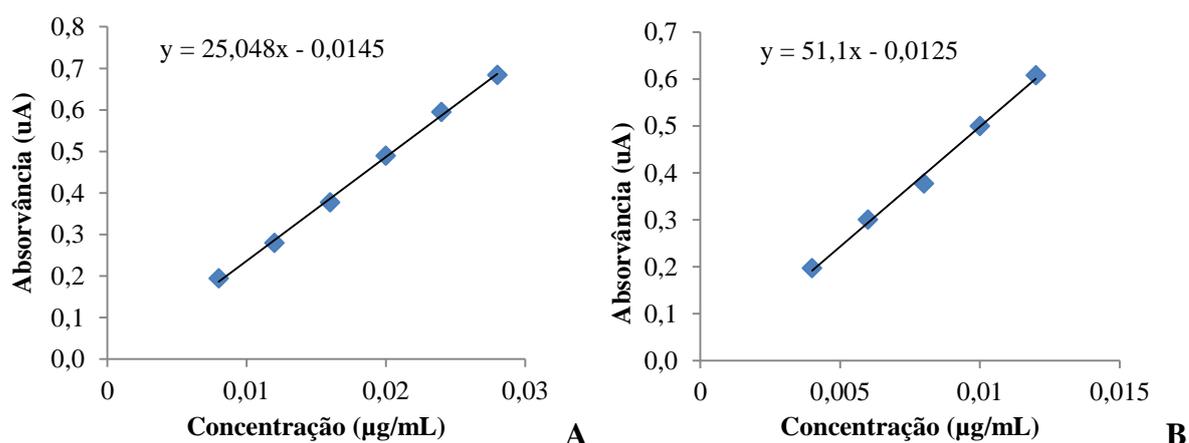
### 5.2.4.1 Linearidade

No que se refere a metodologias analíticas o ensaio de linearidade desponta um importante papel, pois a partir das curvas de calibração é possível a determinação de um modelo matemático que estabelece relações entre a resposta instrumental e a concentração do analito nas determinadas faixas de estudo. Neste sentido, o ensaio de linearidade reflete a capacidade do método de obter respostas diretamente proporcionais à presença do analito em intervalos específicos (RIBEIRO et al., 2007; CASSIANO et al., 2009).

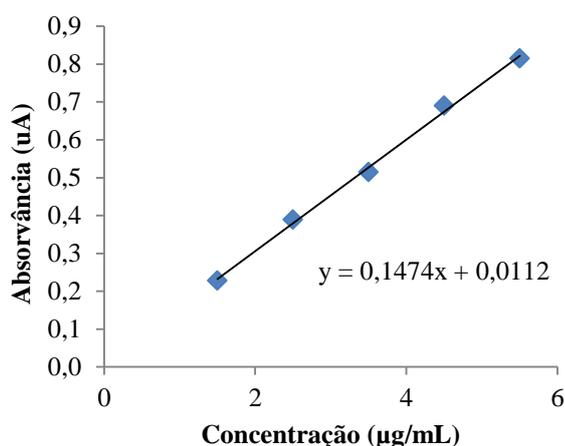
#### Curvas analíticas para os padrões

Para o método de quantificação de flavonoides por doseamento direto foram elaboradas as curvas de calibração dos padrões rutina e quercetina. As curvas analíticas foram elaboradas em triplicata, gerando três curvas independentes para cada padrão, nas faixas de 4 a 12  $\mu\text{g/mL}$  para a quercetina e de 8 a 28  $\mu\text{g/mL}$  para a rutina (Figura 25). Em relação ao método após hidrólise ácida, também foram geradas três curvas para o padrão quercetina na faixa de 3 a 11  $\mu\text{g/mL}$ . E a curva média obtida está representada graficamente na Figura 26.

**Figura 25** - Curvas de linearidade médias da rutina (A) e quercetina (B) pelo método de doseamento direto.



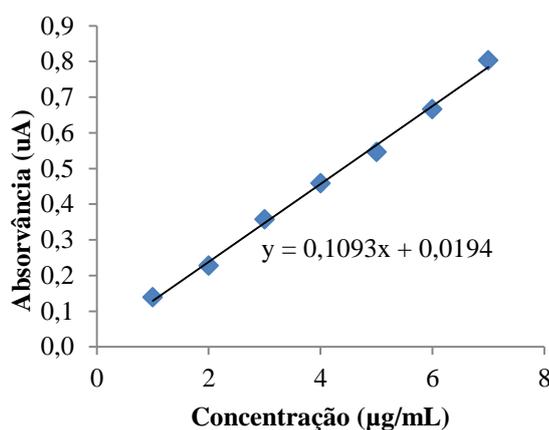
Fonte: Autoria própria.

**Figura 26** - Curva de calibração média da quercetina.

Fonte: Autoria própria.

Em relação a metodologia de quantificação de taninos totais, uma curva analítica foi construída para o ácido gálico, empregando as condições experimentais ótimas escolhidas pelo ensaio fatorial. O ensaio realizado em triplicata originou três curvas independentes para o padrão, nas faixas 1 a 7 µg/mL. A curva média está representada na figura 27.

As curvas obtidas para os padrões nas três diferentes metodologias foram analisadas pelo método estatístico ANOVA, a qual forneceu os resultados da análise de regressão linear, os quais encontram-se descritos na Tabela 4.

**Figura 27** - Curva de calibração média do padrão ácido gálico.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados da análise de regressão linear evidenciaram que as substâncias estudadas apresentam linearidade nas faixas de concentração estudadas, apresentando coeficientes de determinação superiores a 0,99, como o preconizado pela legislação. Ou seja, mais que 99% das respostas obtidas podem ser explicadas pelos modelos obtidos nas metodologias,

indicando que as respostas obtidas são diretamente proporcionais as concentrações analisadas. Na tabela 4 podem ser encontrados os valores de  $R^2$  e do teste F obtidos na regressão linear dos padrões nas metodologias propostas. O teste F indica variações nas respostas perante a variação da concentração, e além disso, faz inferência sobre os valores dos resíduos. Valores calculados superiores aos tabelados indicam que os resíduos possuem distribuição normal. A análise dos resíduos e do ajuste (Apêndice A) entre a resposta obtida e a resposta prevista pelo modelo indicam que não houve falta de ajuste nas médias.

**Tabela 4** - Análise estatística realizada para as curva analíticas médias dos padrões.

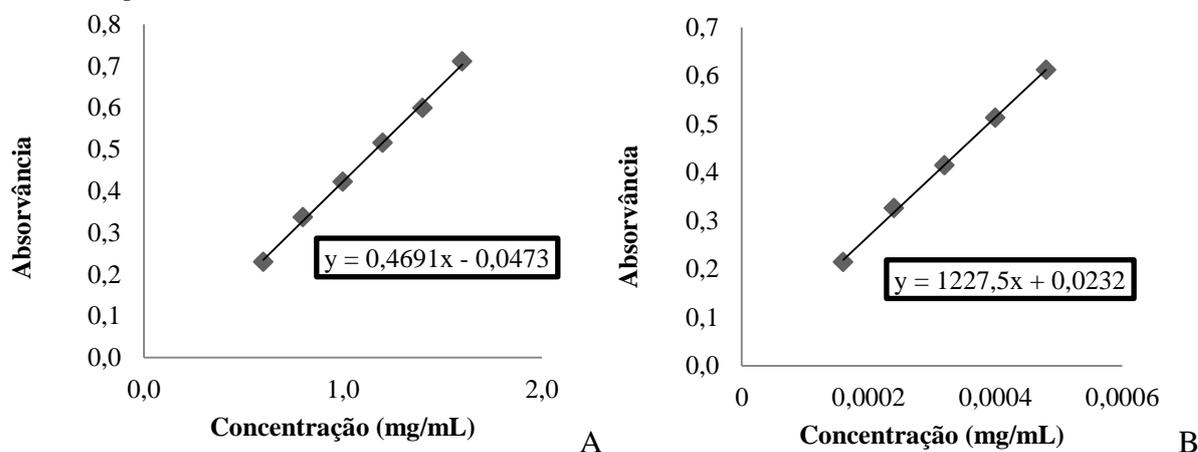
Parâmetro	Flavonoides Doseamento Direto		Flavonoides Hidrólise Ácida	Taninos Totais
	Quercetina	Rutina	Quercetina	Ácido Gálico
$R^2$	0,9955	0,9984	0,9975	0,9966
F	2561,727	4533,118	4347,920	5348,043

$\alpha$ : 0,05. Fonte: Autoria própria.

Curvas analíticas para as amostras de Matéria Prima (MP) e Extrato Bruto (EB)

Em relação à quantificação de flavonoides por doseamento direto, os estudo de linearidade foi realizado nas faixas de 0,6 - 1,6 mg/mL para a matéria prima e de 0,16 - 0,48 mg/mL para o extrato bruto. As curvas analíticas foram construídas em triplicata e as respectivas curvas médias podem ser observadas na figura 28. Os resultados da análise de regressão linear demonstram a alta correlação apresentada pelo  $R^2$ , tanto para matéria prima quanto para o extrato bruto.

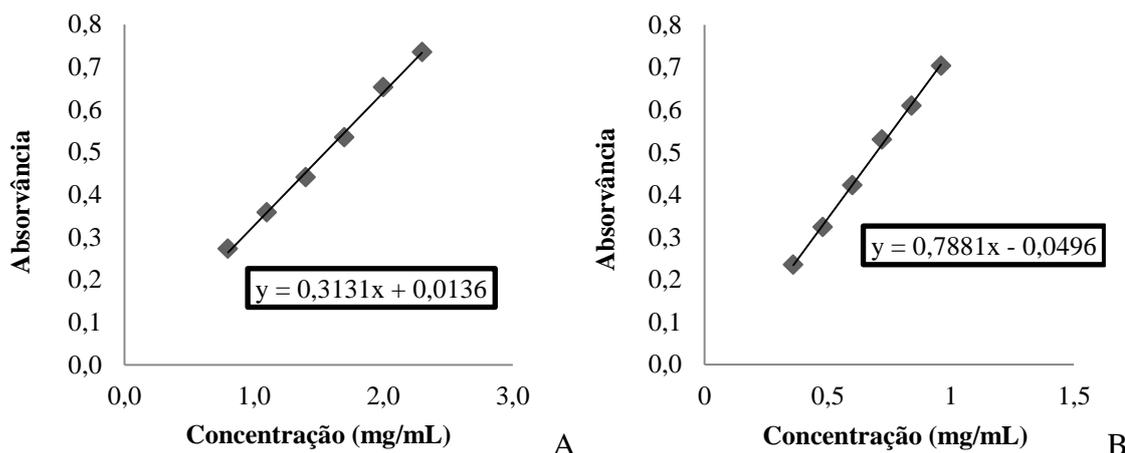
**Figura 28** - Curvas de linearidade da matéria prima (A) e extrato bruto (B) na metodologia de quantificação de flavonoides por Doseamento Direto.



Fonte: Autoria própria.

Nas análises realizadas empregando a técnica com hidrólise ácida para quantificação de flavonoides, as linearidades foram avaliadas nas faixas de 0,8 a 2,3 mg/mL para a matéria prima; e, de 0,36 a 0,96 mg/mL para o extrato bruto. A curva média apresentada na figura 29 evidencia que as respostas também foram lineares nas faixas estudadas.

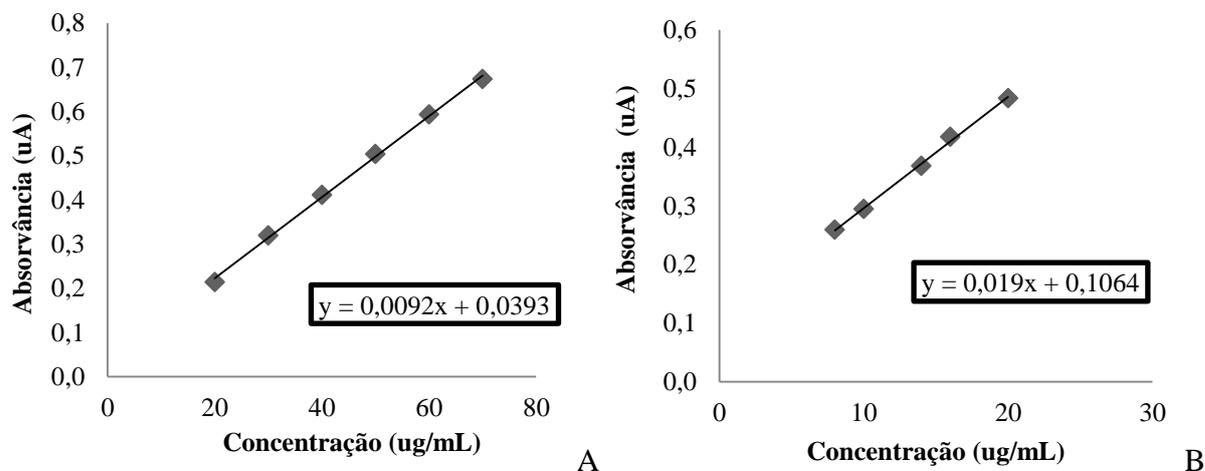
**Figura 29** - Curvas de linearidade médias da matéria prima(A) e extrato bruto (B) na metodologia de quantificação de flavonoides após Hidrólise Ácida.



Fonte: Autoria própria.

Em relação à metodologia de quantificação de taninos totais, o ensaio de linearidade também forneceu respostas analíticas que se apresentaram comportamento linear nas faixas estudadas (figura 30).

**Figura 30** -Linearidades médias da metodologia de Taninos Totais na matéria prima (A) e extrato bruto (B) das folhas de *E. uniiflora*.



Fonte: Autoria própria.

Na tabela 5 estão resumidos os dados obtidos na regressão linear obtidos para as três metodologias propostas nas duas matrizes estudadas. Os dados apresentados evidenciam as altas correlações obtidas nas curvas de linearidade para a matéria prima e extrato bruto nas metodologias propostas. O teste F mostra a significância destes resultados, apontando as respostas sofrem alterações expressivas com a alteração das concentrações. Os valores de F calculados superiores aos tabelados indicam ausência de falta de ajustes para as médias.

**Tabela 5** - Análise de Variância (ANOVA) realizada para as curva analíticas médias dos padrões.

Parâmetro	Flavonoides		Flavonoides		Taninos Totais	
	Doseamento Direto		Hidrólise Ácida		MP	EB
	MP	EB	MP	EB		
$R^2$	0,9983	0,9991	0,9968	0,9988	0,9984	0,9975
F	4277,495	10366,22	2920,312	5747,808	6054,96	2341,689

Fonte: Autoria própria.

Os dados de regressão linear, a plotagem dos resíduos e ajuste entre as respostas estão sumarizados no Apêndice A.

#### 5.2.4.2 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a para os padrões a partir dos dados de suas respectivas das curvas de calibração. Assim, a metodologia para quantificação de flavonoides por doseamento direto apresentou limites de detecção e quantificação de 0,0094  $\mu\text{g/mL}$  e de 0,0286  $\mu\text{g/mL}$  para a rutina; e de 0,0138  $\mu\text{g/mL}$  e de 0,0419  $\mu\text{g/mL}$  para a quercetina.

Na metodologia de quantificação de flavonoides após hidrólise ácida, os valores encontrados foram de 0,094  $\text{mg/mL}$  como limite de detecção e de 0,0286  $\mu\text{g/mL}$  como limite de quantificação. Curiosamente, os dados encontrados para o padrão de quercetina foram os mesmos em ambas as metodologias; O achado evidencia que, apesar das fontes de variação inerentes aos métodos espectrofotométricos, a resposta metodológica apresenta dependencia importante do analito e do agente complexante. No que pesem as diferenças operacionais/reacionais de cada uma das metodologias, a formação do complexo apresentou elevada robustez frente as variáveis experimentais..

Já para a metodologia de quantificação de taninos totais, os resultados encontrados para os limites de detecção e quantificação foram de 0,2694 µg/mL e de 0,8166 µg/mL para o ácido gálico.

Portanto, estes são os valores mínimos que podem ser detectados e quantificados com precisão e exatidão pelas metodologias propostas para o doseamento de flavonoides e taninos totais por espectrofotometria UV-VIS.

#### 5.2.4.3 Especificidade/Seletividade

A especificidade/seletividade representa a capacidade da metodologia de detectar as substâncias de interesse na presença de interferentes. Para confirmar a seletividade/especificidade dos métodos testados, foi utilizado o método de adição do padrão. Os resultados encontrados evidenciaram o paralelismo entre as retas obtidas, o que demonstra a capacidade dos métodos de detectar seletivamente as substâncias pesquisadas nas matrizes estudadas (matéria prima e extrato bruto). O paralelismo das retas (linearidade e especificidade) pode ser observado graficamente nas figuras 31 e 32 e pela semelhança entre coeficientes angulares (Tabela 6), evidenciando a habilidade das metodologias de obter respostas para as substâncias de interesse.

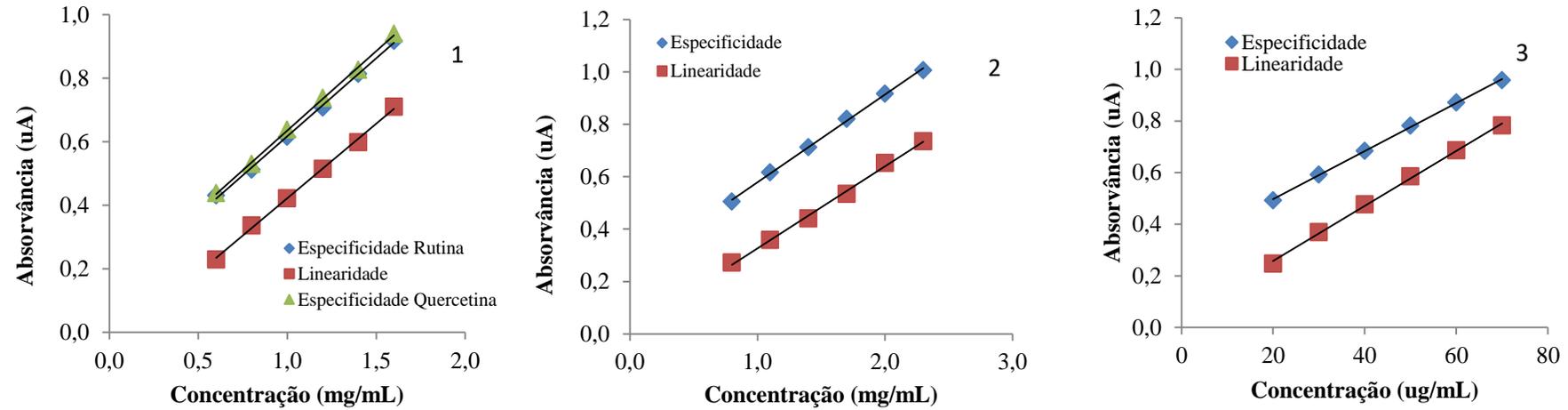
**Tabela 6** - Equações das retas obtidas para os ensaios de especificidade e linearidade.

		Linearidade	Especificidade
Flavonoides DD	<b>MP</b>	$y = 0,4691x - 0,0473$	$y = 0,4998x + 0,1357$ (Rutina) $y = 0,4903x + 0,127$ (Quercetina)
	<b>EB</b>	$y = 1227,5x + 0,0232$	$y = 1141,2x + 0,5919$ (Rutina) $y = 1485,8x + 0,204$ (Quercetina)
Flavonoides HA	<b>MP</b>	$y = 0,3131x + 0,0136$	$y = 0,3349x + 0,2437$
	<b>EB</b>	$y = 0,7881x - 0,0496$	$y = 0,8305x + 0,1796$
Taninos Totais	<b>MP</b>	$y = 0,0107x + 0,0442$	$y = 0,0093x + 0,3104$
	<b>EB</b>	$y = 0,0294x + 0,1355$	$y = 0,0324x + 0,2963$

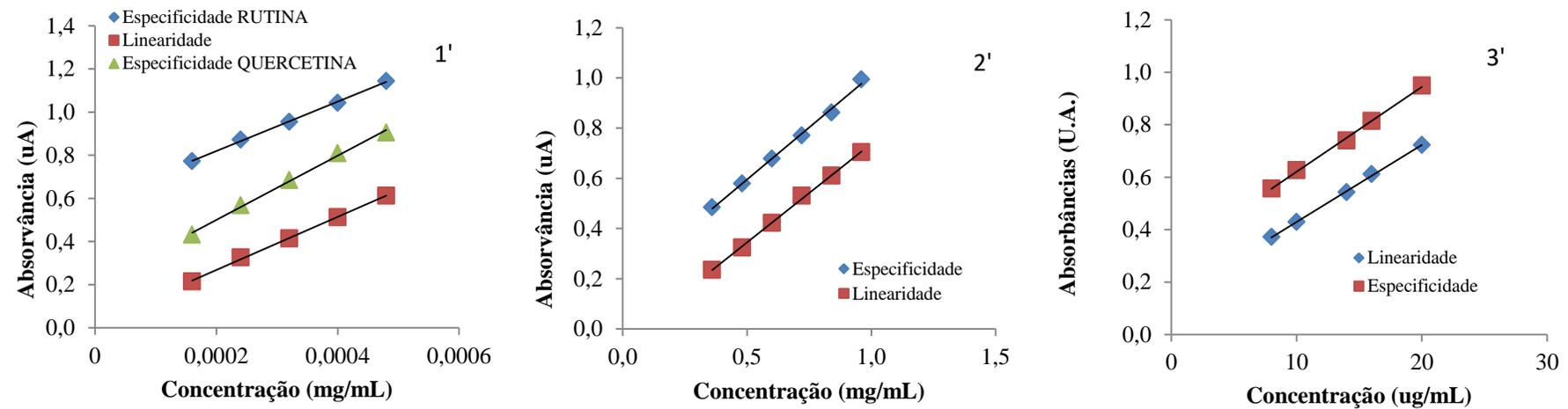
DD – Doseamento direto; HA – Hidrólise ácida.

Fonte: Autoria própria.

**Figura 31** - Curvas de especificidade e linearidade obtidas por Doseamento Direto (1), Hidrólise ácida (2), Taninos totais (3) na matéria prima.



**Figura 32** - Curvas de especificidade e linearidade obtidas por Doseamento Direto (1'), Hidrólise ácida (2'), Taninos totais (3') no extrato bruto.



Fonte: Autoria própria.

As metodologias avaliadas apresentaram a mesma resposta para os padrões mesmo quando adicionados dos componentes da matriz. Estes resultados confirmam a capacidade dos métodos espectrofotométricos avaliadas de quantificar especificamente a(s) substância(s) de interesse presentes nas amostras mesmo na presença de outros componentes da matriz, confirmando a seletividade/especificidade dos métodos.

#### *5.2.4.4 Precisão*

Uma das principais etapas na avaliação da confiabilidade de um método é a verificação dos resultados quando operados sequencialmente, com a finalidade de observar se estes se repetem. Esta etapa denomina-se precisão, e esta pode ser avaliada através de repetições sistêmicas e sob situações adversas (LEITE, 2008; RIBANI, et al., 2008). Neste ensaio de precisão, as metodologias propostas foram avaliadas em dois níveis, a repetibilidade e a precisão intermediária.

#### *Repetitividade*

No caso da repetitividade ou precisão intracorrída, é avaliado o grau de concordância das respostas metodológicas obtidas por um mesmo analista e dia (repetição sistêmica). Os dados encontrados para as absorvâncias e para os teores encontram-se resumidos na tabela 7. Em todos os casos, as variabilidades observadas através dos DPR, encontram-se dentro do limite requisitado pela legislação. De acordo com a RE 899, as metodologias devem apresentar DPR máximo de 5%. Tanto a matéria prima quanto o extrato bruto obtiveram resultados satisfatórios no que diz respeito a este ensaio. Os teores médios encontrados nas amostras para flavonoides totais por Doseamento Direto foram expressos em g% de quercetina e rutina (Tabela 7).

Na metodologia de quantificação de flavonoides após hidrólise ácida, os resultados foram expressos em g% de quercetina, pois o processo de hidrólise retira as possíveis cadeias glicosídicas existentes no composto da espécie, sendo necessário que os resultados sejam expressos através de uma aglicona (Tabela 7). Tanto a matéria prima quanto o extrato bruto obtiveram resultados adequados no quesito repetitividade.

Para a metodologia de quantificação de taninos totais, o padrão escolhido para expressar os resultados obtidos foi o ácido gálico, onde esta substância é representativa da espécie de taninos existentes nas folhas de *E. uniflora*, os taninos hidrolisáveis, e sendo um correspondente próximo da realidade por estar presente na amostra. Tanto a matéria prima quanto o extrato bruto obtiveram resultados satisfatórios na avaliação deste parâmetro, como pode ser observado na tabela 7.

**Tabela 7** - Dados de Repetibilidade para as metodologias de Doseamento direto, hidrólise ácida e taninos totais.

Matriz	Método						
	Flavonóides (DD)			Flavonóides (HA)		Taninos	
	Abs (UA)	Teor (g%) <sup>1</sup>	Teor (g%) <sup>2</sup>	Abs (UA)	Teor (g%)	Abs (UA)	Teor (g%)
Matéria prima	0,421 ± 0,0044 (1,05)	1,821± 0,0190 (1,05)	0,97 ± 0,0099 (1,05)	0,477 ± 0,0071 (1,49)	1,72 ± 0,0257 (1,49)	0,415 ± 0,0065 (1,57)	10,121 ± 0,1584 (1,57)
Extrato Bruto	0,407 ± 0,0044 (1,07)	4,905± 0,0525 (1,07)	2,54 ± 0,0272 (1,07)	0,442 ± 0,0044 (0,99)	3,905± 0,0038 (0,99)	0,381 ± 0,0053 (1,39)	21,116 ± 0,0294 (1,39)

DD – Doseamento direto; HA – Hidrólise ácida.

Os resultados foram expressos como Média ± Desvio padrão (Desvio Padrão Relativo).

<sup>1</sup>(g%) de Rutina; <sup>2</sup>(g%) de Quercetina;

Fonte: Autoria própria.

### *Precisão Intermediária*

Na precisão intermediária, ou precisão intercorrida, são avaliadas as concordâncias entre os resultados obtidos por analistas diferentes em dias diferentes. Para este ensaio a legislação preconiza que os valores de DPR estejam abaixo de 5%. Portanto, os dados encontrados permitem afirmar que as metodologias propostas para quantificação de flavonoides e taninos totais podem ser consideradas precisas, pois atendem aos requisitos determinados pela RE 899, como pode ser observado na tabela 8.

A média global das 12 determinações em diferentes dias e operadores para o ensaio com a MP foi de 1,82 g% e 0,94 g%, de 2,59 g% e 5,00 g% para o EB, em relação à quercetina e rutina, respectivamente. Com desvios padrões relativos menores que 5%, estando de acordo com o preconizado pela RE 899.

A resposta média dos teores das determinações em diferentes dias e operadores para o ensaio com a matéria prima foi de 1,68 g%, e no extrato bruto foi de 3,90 g%, expressos em quercetina na metodologia após hidrólise ácida; com desvios padrão relativos de 1,98% e 4,01%, respectivamente, estando os resultados de acordo com o preconizado pela RE 899.

O teor de taninos totais referente à média das 12 determinações em diferentes dias e operadores para o ensaio com a matéria prima, foi de 9,86 g% expresso em ácido gálico, com desvio padrão relativo de 0,60%. Em relação ao extrato bruto, a média global foi de 21,06 g% expressos em ácido gálico, e desvio padrão relativo de 1,94%.

Os resultados obtidos evidenciam que as metodologias desenvolvidas possuem precisão compatível as finalidades propostas, evidenciando a concordância entre as respostas obtidas mesmo com diferentes dias e diferentes operadores.

**Tabela 8** - Dados de precisão intermediária obtidos pelas metodologias de quantificação de flavonoides e taninos por espectrofotometria.

	Amostras	Flavonoides Doseamento Direto		Flavonoides Hidrólise ácida	Taninos totais	
		Q (g%)	R (g%)	TFT(g%)	TT(g%)	
MP	D1	OP1	0,90±0,0022(0,24)	1,83±0,0043(0,24)	1,73 ± 0,0181 (1,04%)	10,13± 0,1078 (1,06%)
		OP2	0,93±0,0144(1,54)	1,83±0,0283(1,54)	1,66 ± 0,0042 (0,25%)	9,68± 0,0714 (0,74%)
	D2	OP1	0,96±0,0056(0,59)	1,88±0,0111(0,59)	1,67 ± 0,0271 (1,62%)	9,85± 0,0795 (0,81%)
		OP2	0,94±0,0072(0,76)	1,85±0,0142(0,76)	1,71 ± 0,0108 (0,63%)	9,80±0,1362 (1,39%)
EB	D1	OP1	2,61±0,0841(3,21)	5,04±0,1621(3,21)	3,93± 0,0230 (0,59%)	21,00±0,3891 (1,85%)
		OP2	2,53±0,0130(0,51)	4,88±0,0251(0,51)	3,65 ± 0,0230 (0,63%)	21,39±0,5100 (2,38%)
	D2	OP1	2,64±0,0651(2,46)	5,09±0,1254(2,46)	4,06± 0,0175 (0,43%)	21,10±0,2060 (0,97%)
		OP2	2,58±0,0676(2,61)	4,98±0,1303(2,61)	3,94± 0,0533 (1,35%)	20,77± 0,0415 (1,99%)

Q = quercetina; R= rutina; TFT = Teor de flavonoides totais expressos como quercetina; TT = Taninos totais expressos como ácido gálico. Fonte: Aatoria Própria.

#### 5.2.4.5 Exatidão/Recuperação

A exatidão é o ensaio que reflete a concordância entre os valores obtidos experimentalmente e os valores verdadeiros presentes nas matrizes analisadas (LEITE, 2008). De forma a determinar a exatidão das metodologias desenvolvidas ou avaliar se os resultados refletem os valores reais presentes nas amostras, estas foram fortificadas com os padrões e o parâmetro da exatidão foi calculado a partir da recuperação do conteúdo total pesquisado na metodologia proposta.

Para a metodologia de quantificação de flavonoides totais por Doseamento Direto na matéria prima vegetal foram obtidos valores de recuperação de 96 a 98% utilizando quercetina; e, de 100 a 101% utilizando rutina. Em relação ao extrato bruto, os valores obtidos foram de 93 a 98% utilizando quercetina, e de 93 à 98% quando utilizada a rutina.

Para a metodologia de quantificação de flavonoides totais após hidrólise ácida para a matéria prima foram obtidos valores de recuperação entre 92 e 98%, e de 96 a 103% para o extrato bruto, utilizando quercetina como padrão.

Já para a quantificação de taninos totais, foram encontrados valores de recuperação 104 à 107% para a matéria prima no extrato por refluxo e de 95 a 99% para o extrato bruto, ambos utilizando ácido gálico como padrão.

A partir destes resultados, pode-se inferir que os procedimentos quantitativos propostos estão em conformidade com os requisitos priorizados pela legislação em vigor, fornecendo resultados confiáveis, principalmente quando levado em conta a natureza complexa da matriz vegetal.

#### 5.2.4.6 Robustez

Para avaliar a robustez, foram utilizadas pequenas e deliberadas variações nas metodologias analíticas. Dessa forma, os parâmetros avaliados (diferentes fabricantes de solvente; a realização da leitura espectrofotométrica em dias diferentes; a presença ou ausência de luz; e, diferentes equipamentos, diferentes concentrações de reagente, no caso da metodologia de doseamento de taninos totais no extrato bruto) não afetaram significativamente os teores encontrados, indicando que os métodos propostos são resistentes a alterações nas condições propostas. Os resultados estão resumidos nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Dados de Robustez obtidos para a matéria prima.

Parâmetros	Flavonoides Doseamento Direto		Flavonoides Hidrólise Ácida	Taninos Totais	
	Q(g%)	R(g%)	TFT (g%)	(g%)	
Luminosidade	Ausência de luz	0,93 ± 0,0181 (1,94)	1,80 ± 0,0350 (1,94)	1,64 ± 0,0273 (1,66)	9,59 ± 0,1077 (1,12%)
	Presença de luz	0,92 ± 0,0170 (1,84)	1,78 ± 0,0328 (1,84)	1,68 ± 0,0704 (4,18)	10,15 ± 0,0935 (0,92%)
Estabilidade da SE	Dia 1	0,92 ± 0,0170 (1,84)	1,78 ± 0,0328 (1,84)	1,68 ± 0,0704 (4,18)	9,59 ± 0,1077 (1,12%)
	Dia 3	0,96 ± 0,0216 (2,25)	1,85 ± 0,0417 (2,25)	1,69 ± 0,0312 (1,84)	9,58 ± 0,0142 (0,14%)
Espectrofotômetro	Thermoscientific	0,98 ± 0,0207 (2,12)	1,88 ± 0,0400 (2,12)	1,74 ± 0,0535 (3,07)	9,46 ± 0,2155 (2,27%)
	Micronal	0,98 ± 0,0220 (2,23)	1,90 ± 0,0425 (2,23)	1,68 ± 0,0704 (4,18)	9,59 ± 0,1077 (1,12%)
Solvente	Vetec	0,95 ± 0,0140 (1,46)	1,84 ± 0,0270 (1,46)	1,67 ± 0,0271 (1,62)	-
	Dinâmica	0,92 ± 0,0170 (1,84)	1,78 ± 0,0328 (1,84)	1,68 ± 0,0704 (4,18)	-

Q = quercetina; R= rutina; TFT = Teor de flavonoides totais expressos como quercetina; TT = Taninos totais expressos como ácido gálico.

Tabela 10 - Dados de Robustez obtidos para o extrato bruto.

Parâmetros	Flavonoides Doseamento Direto		Flavonoides Hidrólise Ácida	Taninos Totais	
	Q(g%)	R(g%)	TFT (g%)	(g%)	
Luminosidade	Ausência de luz	2,57 ± 0,0072 (0,28)	4,95 ± 0,0239 (0,28)	4,34 ± 0,1253 (2,88)	21,31 ± 0,034 (1,60%)
	Presença de luz	2,54 ± 0,0219 (0,84)	4,91 ± 0,0423 (0,86)	4,26 ± 0,0394 (0,92)	21,71 ± 0,059 (2,73%)
Estabilidade da SE	Dia 1	2,57 ± 0,0072 (0,28)	4,95 ± 0,0239 (0,28)	4,26 ± 0,0394 (0,92)	-
	Dia 3	2,67 ± 0,0130 (0,49)	5,14 ± 0,0706 (0,49)	4,18 ± 0,0394 (0,35)	-
Espectrofotômetro	Thermoscientific	2,52 ± 0,0191 (0,76)	4,86 ± 0,0368 (0,76)	4,11 ± 0,0645 (1,55)	-
	Micronal	2,47 ± 0,0321 (1,30)	4,76 ± 0,0618 (1,30)	4,15 ± 0,0413 (0,99)	-
Solvente	Vetec	2,59 ± 0,0187 (0,72)	5,00 ± 0,0361 (0,72)	4,22 ± 0,0304 (0,72)	-
	Dinâmica	2,57 ± 0,0072 (0,28)	4,95 ± 0,0239 (0,28)	4,26 ± 0,0394 (0,92)	-
Concentração de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10,75%	-	-	-	21,96 ± 0,037 (1,69%)
	15%	-	-	-	21,75 ± 0,018 (0,84%)

Q = quercetina; R= rutina; TFT = Teor de flavonoides totais expressos como quercetina; TT = Taninos totais expressos como ácido gálico.

Os métodos propostos mostraram-se robustos dentro das variações a que foram submetidos. Nenhuma das variáveis introduziu variabilidade superior ao limite preconizado pela legislação (RSD <5%). Além disso, é possível observar que os valores obtidos no ensaio de robustez foram semelhantes àqueles encontrados para os testes de precisão. Maior variabilidade foi observada para os ensaios de exposição à luminosidade e de estabilidade, indicando que os ajustes metodológicos foram satisfatórios e que não necessitam de ajustes ou de cuidados excessivos em relação aos passos analíticos.

#### 5.2.5 Avaliação quantitativa nas frações

Com as metodologias validadas e asseguradas de que as respostas analíticas são confiáveis, foi possível a aplicação destas na análise quantitativa de flavonoides e taninos também nas frações enriquecidas. Os resultados encontrados estão sumarizados na tabela 11.

De acordo com os resultados encontrados, a operação de fracionamento a partir dos extratos brutos proporcionou enriquecimento das frações obtidas. A fração obtida com acetato de etila (FAC) foi a que resultou em maior enriquecimento em flavonoides. O incremento no teor de flavonoides na FAC foi superior 200% em relação ao teor de flavonoides observado para o EB na metodologia de doseamento direto. Levando em consideração que a cada 1g de EB, cerca de 49,05 mg sejam correspondentes à flavonoides (4,90% expressos em g% de rutina) e a FAC obteve teores de flavonoides entre 17,72%, relativos a 177,2 mg/g de fração demonstrando grande enriquecimento. Foram observados na fração hexânica teores semelhantes aos encontrados no EB, com aproximadamente 45 mg de flavonoides a cada grama de fração hexano. Na fração aquosa foram encontradas quantidades muito pequenas de flavonoides, cerca de 6,5 mg/g de fração.

Na metodologia após hidrólise ácida os teores obtidos tiveram respostas semelhantes às obtidas por doseamento direto. Possuindo a mesma ordem crescente nos valores dos teores de flavonoides para as frações, onde o teor de quercetina na FAq < FH < FAC.

Estes resultados indicam que parte dos flavonoides presentes na amostra podem apresentar-se na forma de heterosídeos ou como flavonoides polihidroxilados, já que estes compostos possuíram maior afinidade com o solvente de polaridade intermediária acetato de etila. Essa maior afinidade com o solvente de polaridade intermediária pode explicar o porquê que os flavonoides foram melhor extraídos com a solução hidroalcoólica de maior proporção (80%), com maior caráter orgânico entre as testadas.

Para a avaliação analítica dos teores de taninos totais nas frações, as repostas apresentam-se de forma semelhante aos teores obtidos para flavonoides, onde é possível observar que as frações seguiram a mesma ordem crescente nos teores: FAq < FH < FAc. A fração aquosa apresentou os menores teores de taninos, equivalentes a 34,5 mg/ de fração (g% de ácido gálico). Estes resultados ainda são consideráveis, visto que a espécie é rica em taninos.

A fração hexano obteve teores relativamente próximos aos obtidos para o extrato bruto. No extrato bruto foram obtidos cerca de 211 mg/g de taninos expressos em ácido gálico, enquanto que a fração hexano obteve 186 mg/g. Esses resultados indicam que a fração hexano não foi enriquecida com os taninos. Devido a alta lipofilia deste solvente, apenas parte das substâncias foi extraída por este solvente além das substâncias gordurosas, em razão da baixa afinidade dos taninos com o hexano.

A fração acetato de etila apresenta maiores teores de taninos em sua matriz. A FAc apresenta aproximadamente o dobro dos teores apresentados pelo o EB, com cerca de 466 mg/g de taninos, demonstrando a eficiência na operação de enriquecimento. Isto acontece em virtude da maior afinidade dos compostos polifenólicos presentes na matriz com o acetato de etila.

Estes dados indicam que as metodologias propostas podem ser aplicadas com facilidade ao controle de qualidade das frações obtidas do extrato bruto, servindo também como forma de avaliação das etapas de transformação, como o enriquecimento/fracionamento, estratégia utilizada com frequência para elevar o teor das substâncias ativas presentes em extratos.

**Tabela 11** - Determinação de teores de flavonoides e taninos por espectrofotometria nas frações enriquecidas de *E. uniflora*.

Amostras	Flavonoides			Flavonoides		Taninos totais	
	Doseamento Direto			Hidrólise ácida			
	Abs (UA)	Q (g%)	R (g%)	Abs (UA)	TFT(g%)	Abs (UA)	TT(g%)
<b>EB</b>	0,407 ± 0,0044 (1,07)	2,54 ± 0,0272 (1,07)	4,905 ± 0,0525 (1,07)	0,442 ± 0,0044 (0,99)	3,905 ± 0,0038 (0,99)	0,381 ± 0,0053 (1,39)	21,116 ± 0,0294 (1,39)
<b>FAq</b>	0,054 ± 0,0015 (2,79)	0,34 ± 0,0095 (2,79)	0,65 ± 0,0361 (2,79)	0,026 ± 0,002 (7,69)	0,220 ± 0,017 (7,69)	0,031 ± 0,004 (13,28)	3,45 ± 0,4585 (13,28)
<b>FAc</b>	1,471 ± 0,0210 (1,43)	9,19 ± 0,0131 (1,43)	17,72 ± 0,0253 (1,43)	1,574 ± 0,0025 (0,15)	13,800 ± 0,0220 (0,15)	0,509 ± 0,0065 (1,28)	46,63 ± 0,6008 (1,28)
<b>FH</b>	0,374 ± 0,0030 (0,80)	2,33 ± 0,0187 (0,80)	4,50 ± 0,0361 (0,80)	0,603 ± 0,0028 (0,47)	5,29 ± 0,0253 (0,47)	0,169 ± 0,0060 (3,55)	18,64 ± 0,6638 (3,55)

Q = quercetina; R= rutina; TFT = Teor de flavonoides totais expressos como quercetina; TT = Taninos totais expressos como ácido gálico.

Fonte: Autoria Própria.

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E FLAVONOIDES POR CLAE-DAD

5.3.1 Desenvolvimento de metodologia CLAE-DAD para quantificação de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides presentes na matéria prima, extrato bruto e frações das folhas de *E. uniflora*

Para a obtenção do perfil cromatográfico por CLAE foi necessário o desenvolvimento de um método de separação. Através de modificações nos parâmetros possíveis, as condições estabelecidas foram coluna de fase reversa C<sub>18</sub> com 25 cm, metanol e água purificada acidificadas com ácido trifluoro acético na proporção de 0,05%, tempo de corrida de 31 minutos e fluxo de fase móvel de 0,8 mL/minuto utilizando modo gradiente como mostrado na tabela a seguir.

**Tabela 12** - Método gradiente utilizado na análise por CLAE do extrato bruto das folhas de *E. uniflora*.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Proporção de fase B (metanol)</b>
<b>0</b>	10%
<b>10</b>	25%
<b>15</b>	40%
<b>25</b>	75%
<b>30</b>	75%
<b>31</b>	10%

Fonte: Autoria própria.

O método foi estabelecido após a separação eficiente das substâncias presentes na matriz vegetal, considerando picos resolvidos, simétricos e ausentes de *fronting* ou *tailing*. Como pode ser visualizado na Figura 33, os picos apresentaram simetria tanto para os cromatogramas da matéria prima e quanto do extrato bruto, permitindo reconhecer e identificar as substâncias conhecidas nas amostras. A identificação das substâncias foi realizada por comparação com os tempos de retenção e respectivos espectros de varredura.

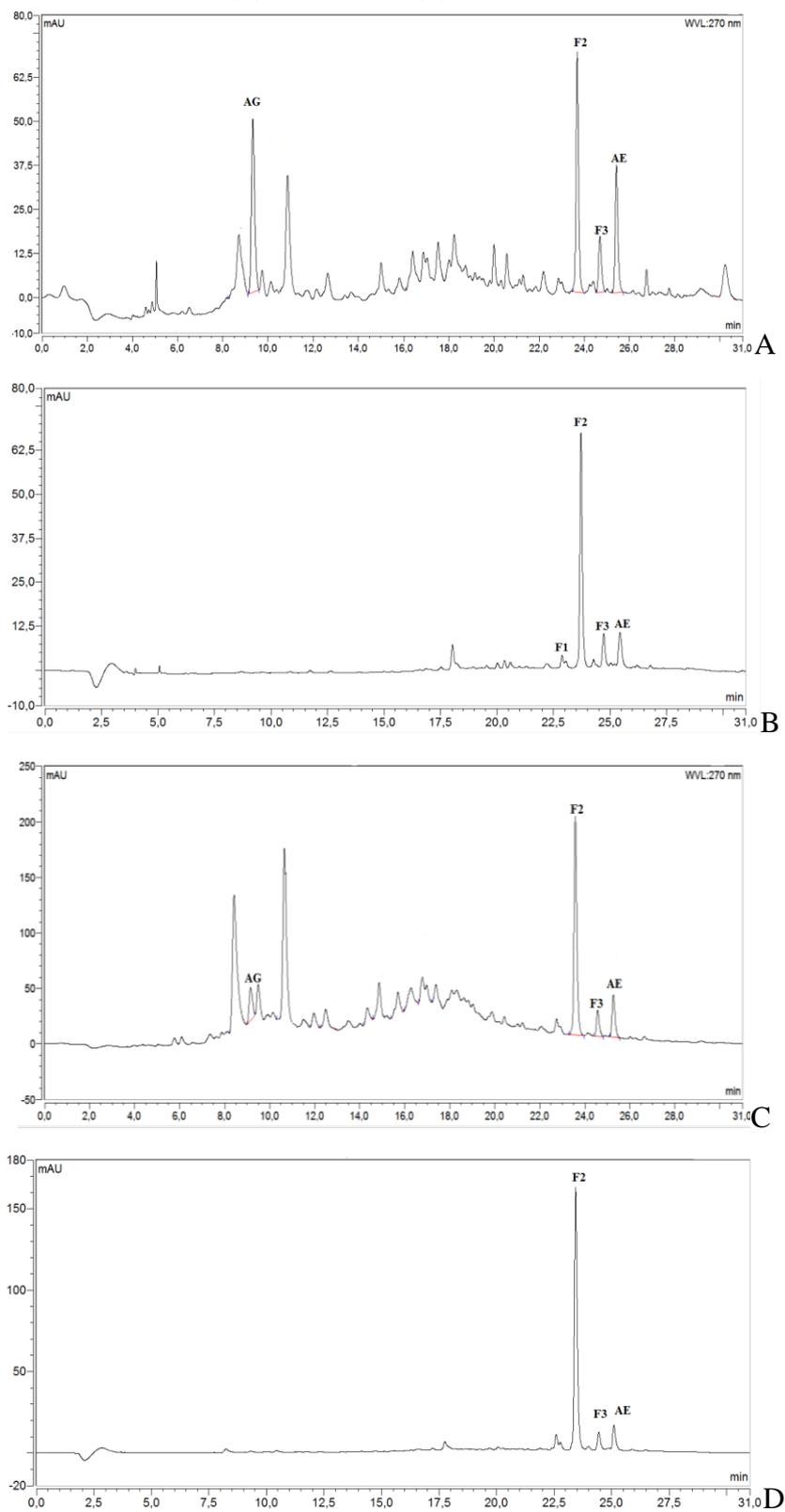
As análises cromatográficas do extrato bruto e da matéria prima permitiram separar e identificar o de ácido gálico, com tempo de retenção de aproximadamente 8,7 minutos; e o ácido elágico, com tempo de retenção de 25,1 minutos; ambas as substâncias reconhecidas como monômeros de taninos hidrolisáveis. A confirmação da identidade foi realizada pela

comparação com os dados cromatográficos dos padrões e pela análise de amostras fortificadas com os padrões. Deste modo, as áreas correspondentes aos padrões nas amostras apresentaram aumento das respectivas áreas com manutenção dos espectros de varredura típicos.

Também foram detectadas substâncias com espectros típicos para flavonoides, nomeados flavonoides 1, 2 e 3 de acordo com a ordem de detecção (com tempos de retenção de aproximadamente 22,2, 23,3 e 24,5 minutos, respectivamente). Os espectros destes compostos flavonoídicos foram comparados com espectros de outros flavonoides presentes na biblioteca do equipamento, mas não foram encontradas compatibilidades que pudessem sugerir características estruturais para os mesmos.

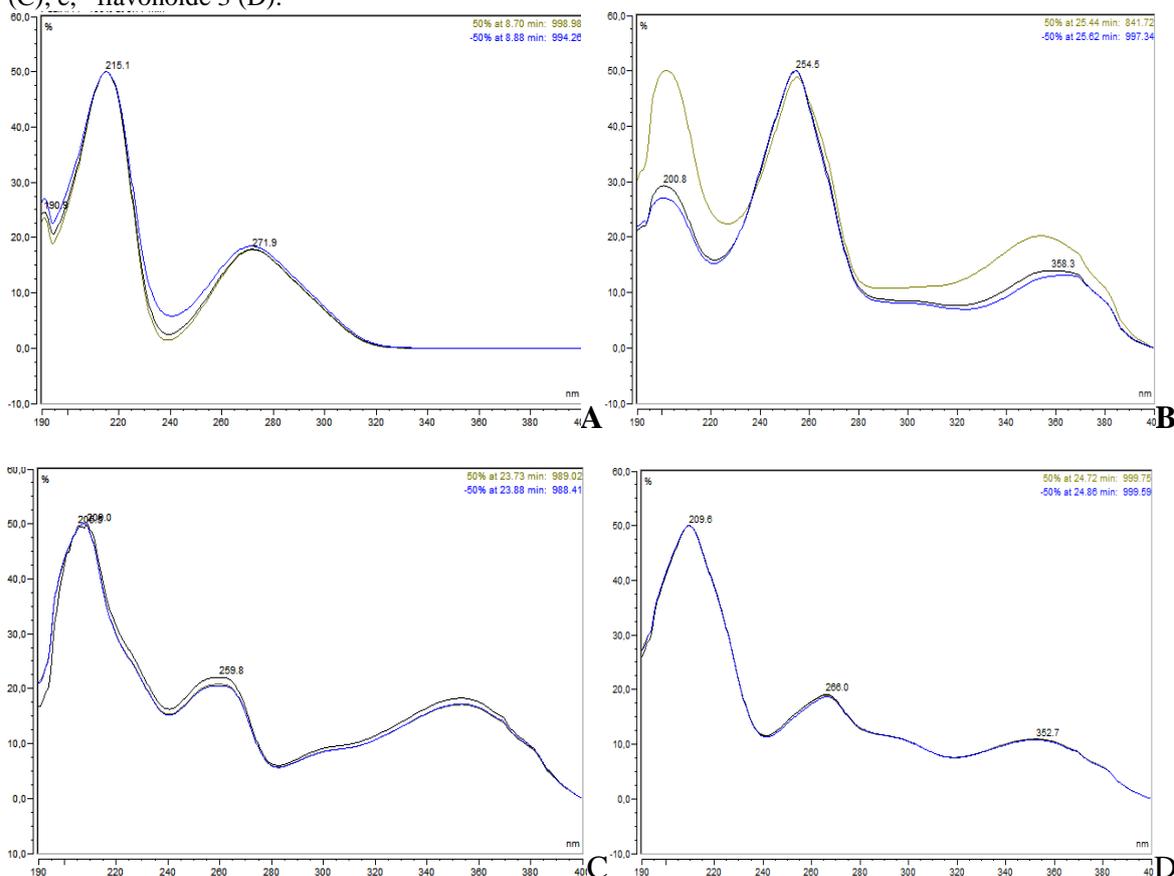
O comprimento de onda para análise foi estabelecido após a realização de varreduras na faixa de 190 a 400 nm. De acordo com os espectros obtidos, as condições para detecção dos padrões foram estabelecidas em 254 nm para o ácido elágico, em 270 nm para o ácido gálico. As substâncias com espectros típicos de flavonoides apresentam duas bandas de absorção nas faixas de 260-270 e 340-360.

**Figura 33** - Cromatogramas obtidos pela metodologia desenvolvida para matéria prima em 270 nm (A) e em 350 nm (B); para o extrato bruto em 270 nm (C); e em 350 nm (D).



Fonte: Autoria própria.

**Figura 34-** Espectros de varredura das substâncias em análise: ácido gálico (A); ácido elágico (B); flavonoide 2 (C); e, flavonoide 3 (D).



### 5.3.2 Validação do método de referência – CLAE

O desenvolvimento de um novo método analítico ou a adaptação, ou ainda, a aplicação de um método conhecido, envolve um processo de avaliação que ateste a sua eficiência em usos em rotina, denominado validação (ARAGÃO et al., 2009). Assim, mesmo aqueles métodos desenvolvidos e capazes de detectar as substâncias de interesse, necessitam de validação para assegurar a competência deste para separação, identificação e quantificação dos taninos e flavonoides presentes nas folhas de *E. uniflora*.

A metodologia desenvolvida neste estudo foi capaz de detectar e separar os ácidos gálico e ácido elágico, além de ao menos três flavonoides presentes nas matrizes estudadas. Porém a quantificação foi realizada em apenas duas destas substâncias flavonoídicas, devido às concentrações muito baixas do F1, que não permitiram sua quantificação.

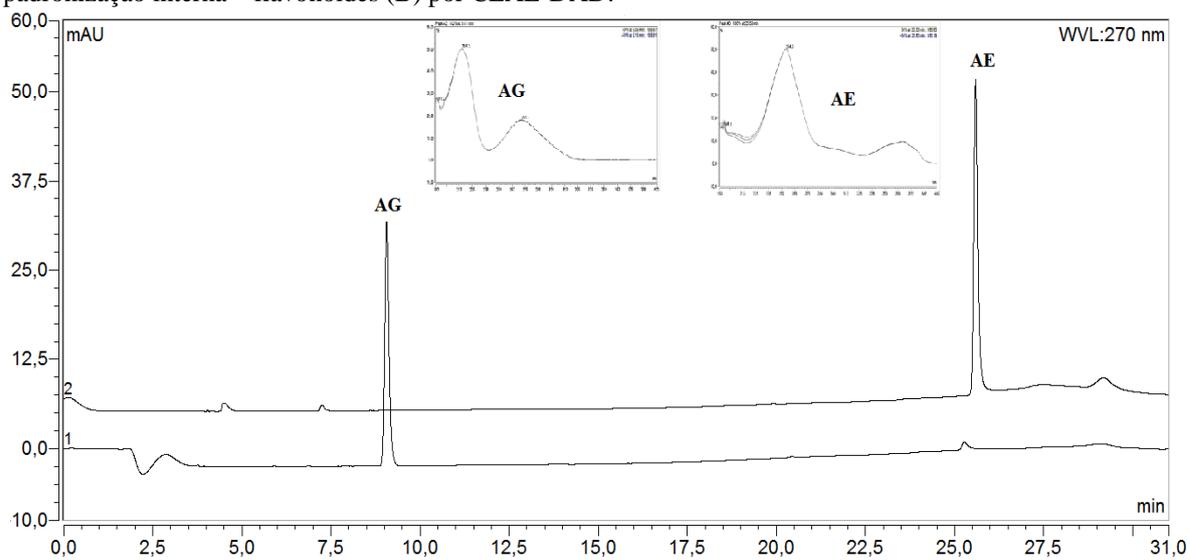
A validação dos métodos para quantificação dos compostos de interesses pro CLAE-DAD, tanto na matéria prima quanto no extrato bruto das folhas de *E. uniflora*, foram

adotados os parâmetros preconizados pela legislação em vigor. Porém, para a quantificação dos flavonoides foi empregada a padronização interna. Este tipo de abordagem é realizada quando os compostos não são totalmente esclarecidos ou não há disponibilidade das substâncias padrões de referência para as substâncias presentes na amostra. Entretanto, o padrão interno escolhido deverá ser semelhante à(s) substância(s) a serem quantificadas, com características e cromatográficas similares aos analitos como o tempo de retenção e a altura de picos (concentração). Porém, os padrões internos não podem estar presentes na amostra. (COLLINS et al., 2010).

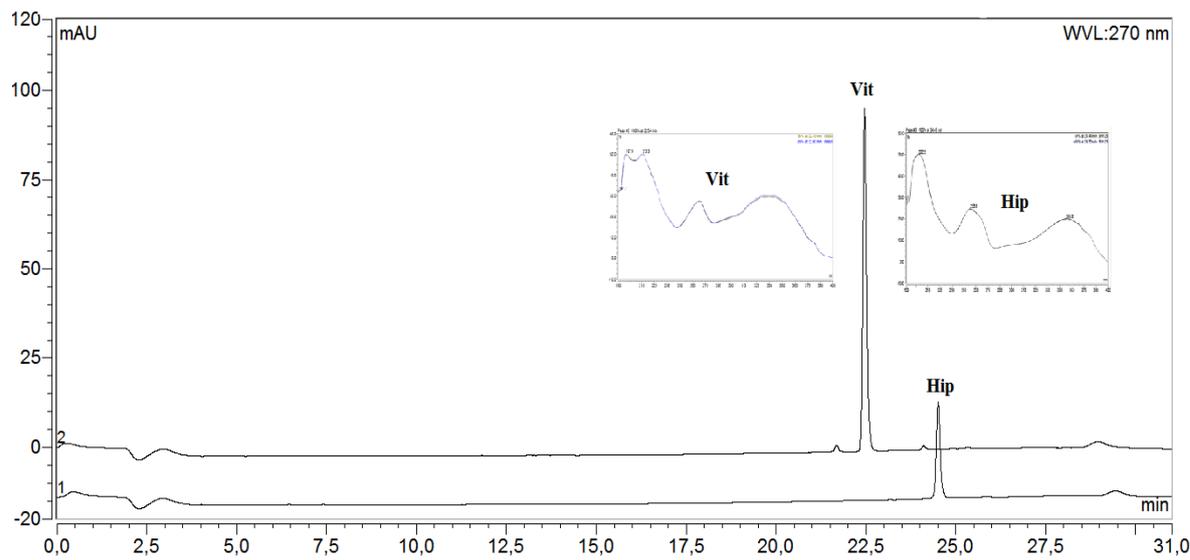
A escolha dos padrões internos para análise dos flavonoides foi conduzida com os flavonoides quercetina, rutina, vitexina e hiperosídeo. Em razão do tempo de retenção muito diferentes dos componentes da amostra, os flavonoides rutina e quercetina foram descartados. Por outro lado, os flavonoides vitexina e hiperosídeo apresentaram tempos de retenção médios de 22,6 e 24,1 minutos, respectivamente; próximos dos tempos de retenção das substâncias de interesse presentes nas amostras (23,3min para o flavonoide 2 e 24,4min para o flavonoide 3)

Na figura 35 estão apresentados os cromatogramas dos padrões, enquanto na figura 36 encontram-se os cromatogramas sobrepostos evidenciando as semelhanças para os tempos de retenção das amostras e para os padrões.

**Figura 35** - Cromatogramas obtidos para os padrões de calibração externa – monômeros de taninos (A) e padronização interna – flavonoides (B) por CLAE-DAD.



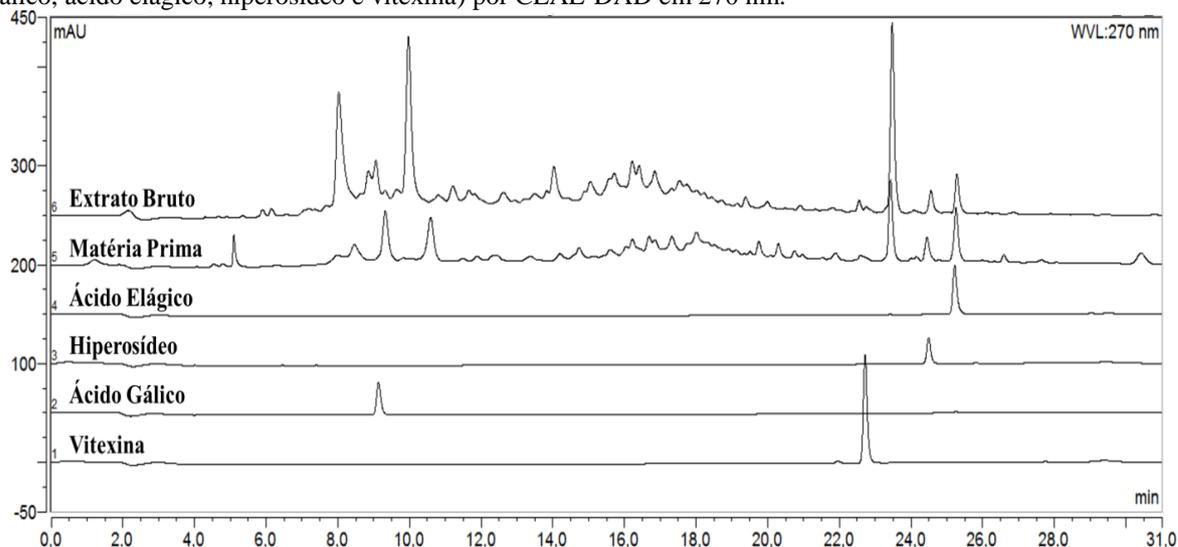
A



B

Fonte: Autoria própria.

**Figura 36** - Cromatogramas sobrepostos das matrizes analisadas (matéria prima e extrato bruto) e padrões (ácido gálico, ácido elágico, hiperosídeo e vitexina) por CLAE-DAD em 270 nm.



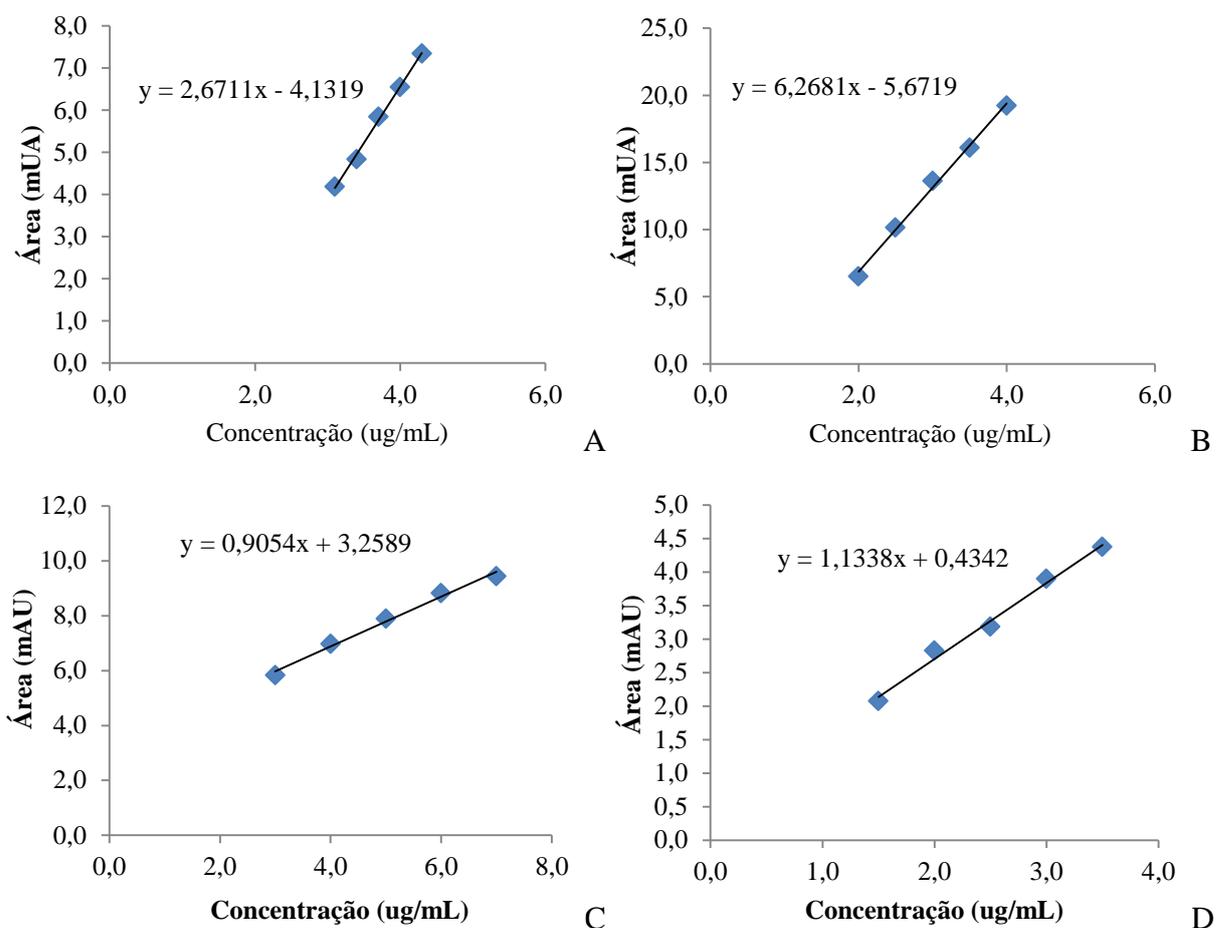
Fonte: Autoria própria.

### 5.3.2.1 Linearidade

A linearidade é o ensaio que avalia e relaciona as respostas instrumentais (área/altura de pico cromatográfico) e as concentrações das substâncias presentes nos analitos (CASSIANO et al., 2009). Para construir as curvas de linearidade, devem ser analisados ao menos 5 concentrações diferentes em faixas de variação de acordo com as determinadas pelas agências de regulação e legislações vigentes (LEITE, 2008).

Os dados brutos para as áreas dos picos estão apresentados no apêndice B. As curvas médias estão apresentadas na figura 37, e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) estão apresentados na tabela 13.

**Figura 37** - Curvas analíticas médias para os padrões obtidos para a verificação da linearidade do método. A – Ácido Gálico; B – Ácido Elágico; C – Vitexina; D – Hiperosídeo.



Fonte: Autoria própria.

A avaliação das curvas por regressão linear (método dos mínimos quadrados) evidenciou que as respostas apresentaram altos coeficientes de determinação para as substâncias padrões, com valores superiores a 0,99. Onde quanto mais próximos de 1 ou -1 menor será o erro em y, e melhor será o ajuste ao modelo matemático obtido para a curva de linearidade (RIBEIRO et al., 2008). Demonstrando que as amostras estudadas apresentaram linearidade nas faixas determinadas. O alto valor obtido no teste F indica que há distribuição normal dos resíduos, o que indica que não houve falta de ajuste para as médias neste modelo.

**Tabela 13** - Análise estatísticas das curvas de regressão para os padrões utilizados em calibração externa e padronização interna.

Parâmetro	Padrões			
	Ac. Gálico	Ac. Elágico	Vitexina	Hiperosídeo
<i>F</i>	882,200	600,566	738,134	1042,412
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,9963	0,9954	0,9902	0,9903

Fonte: Autoria Própria.

Os dados de regressão linear para os padrões por CLAE estão apresentados no apêndice C.

Após a avaliação do padrão, o método analítico foi testado para a matéria prima vegetal e respectivo extrato bruto das folhas de *E. uniflora*. Assim, as curvas analíticas foram construídas nas faixas de concentração de 800 a 1200 µg/mL para o extrato bruto, e de 1600 a 2400 µg/mL para a matéria prima.

A análise por regressão linear demonstrou que as curvas de calibração construídas para a matéria prima vegetal apresentaram comportamento linear devido ao alto valor dos coeficientes de correlação, nas faixas de concentração estudadas para as quatro substâncias de interesse. A figura 38 exhibe as curvas analíticas médias obtidas para a MP correspondentes ao ácido gálico, ácido elágico e flavonoides 2 e 3. Os dados também mostraram confirmaram também que os coeficientes de determinação obtidos para as diferentes substâncias nesta metodologia foram superiores 0,99, como exigem as especificações da legislação brasileira para validação de métodos analíticos (RE 899 de 2003).

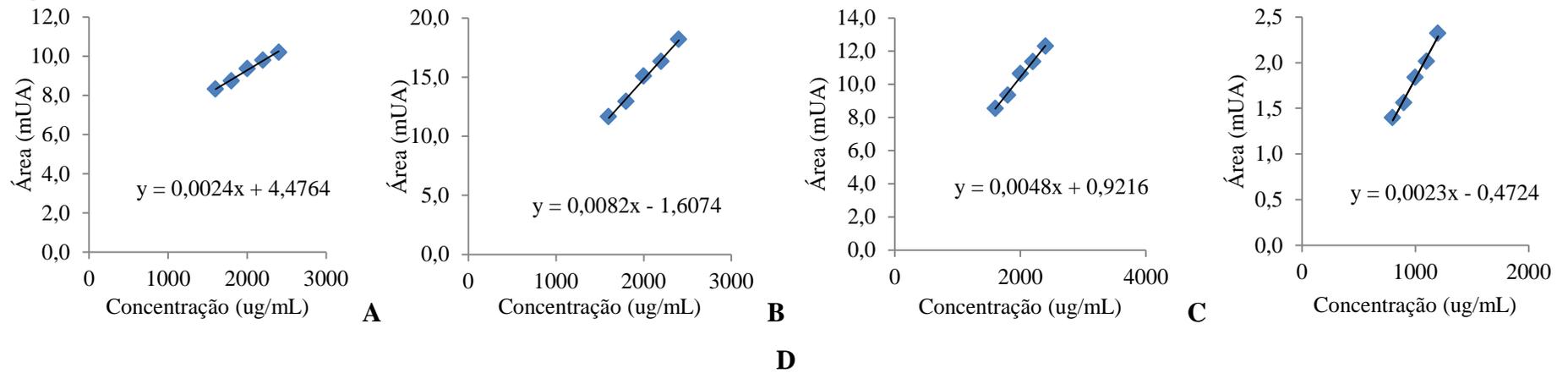
Os resultados obtidos para o extrato bruto também apresentaram linearidade (Figura 35) nas faixas de concentração testadas, obtendo coeficientes de determinação dentro do limite especificado pela legislação em vigor. Quanto aos resultados de regressão linear expressos pelo  $R^2$  e teste F (Tabela 14) e pelos gráficos de resíduo e ajuste de variáveis (Apêndice C) evidenciam que para as substâncias pesquisadas, os dados foram considerados estatisticamente significativos, sem falta de ajustes para as médias.

**Tabela 14** - Análise de regressão das curvas para as substâncias pesquisadas nas amostras.

Parâmetro	Matriz							
	Materia prima vegetal				Extrato bruto			
	AG	AE	F2	F3	AG	AE	F2	F3
$F$	373,291	1701,834	1325,224	717,559	2045,612	1435,351	2077,12	912,890
$R^2$	0,9942	0,994	0,9926	0,99	0,9949	0,9958	0,9945	0,9971

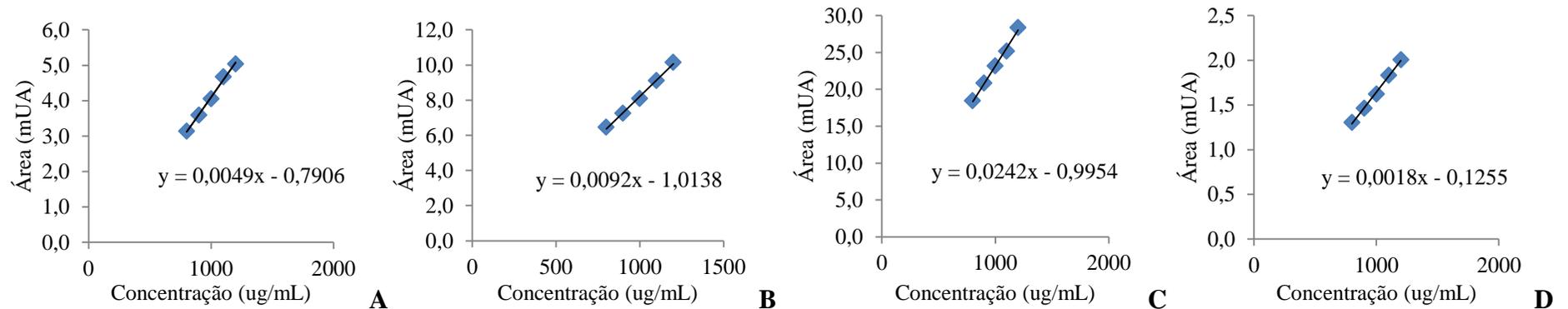
Fonte: Autoria própria.

**Figura 38** - Curvas analíticas médias da matéria prima de folhas de pitanga obtidas para a verificação da linearidade do método. Em relação ao ácido gálico (A), Ácido Elágico (B), Flavonoide 2 (C) e Flavonoide 3 (D).



Fonte: Autoria própria.

**Figura 39** - Curvas analíticas médias do extrato bruto de folhas de pitanga obtidas para a verificação da linearidade do método. Em relação ao ácido gálico (A), Ácido Elágico (B), Flavonoide 2 (C) e Flavonoide 3 (D).

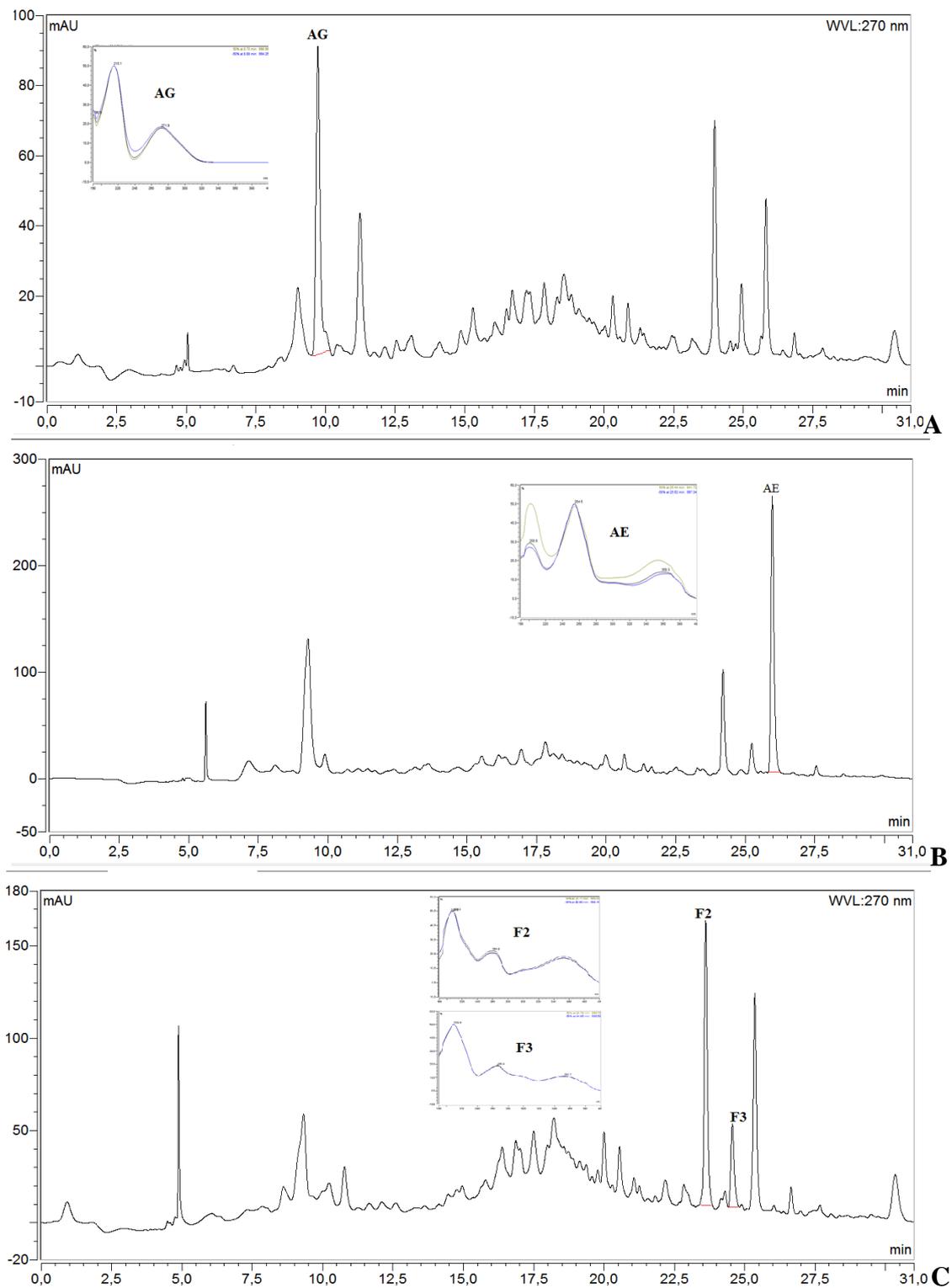


Fonte: Autoria própria.

### 5.3.2.2 *Especificidade*

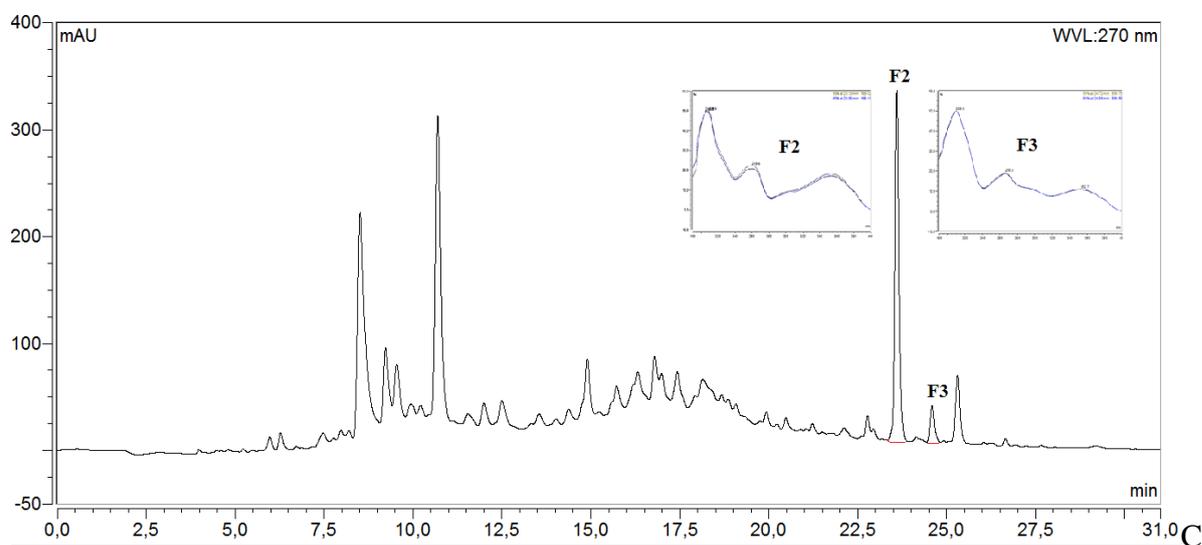
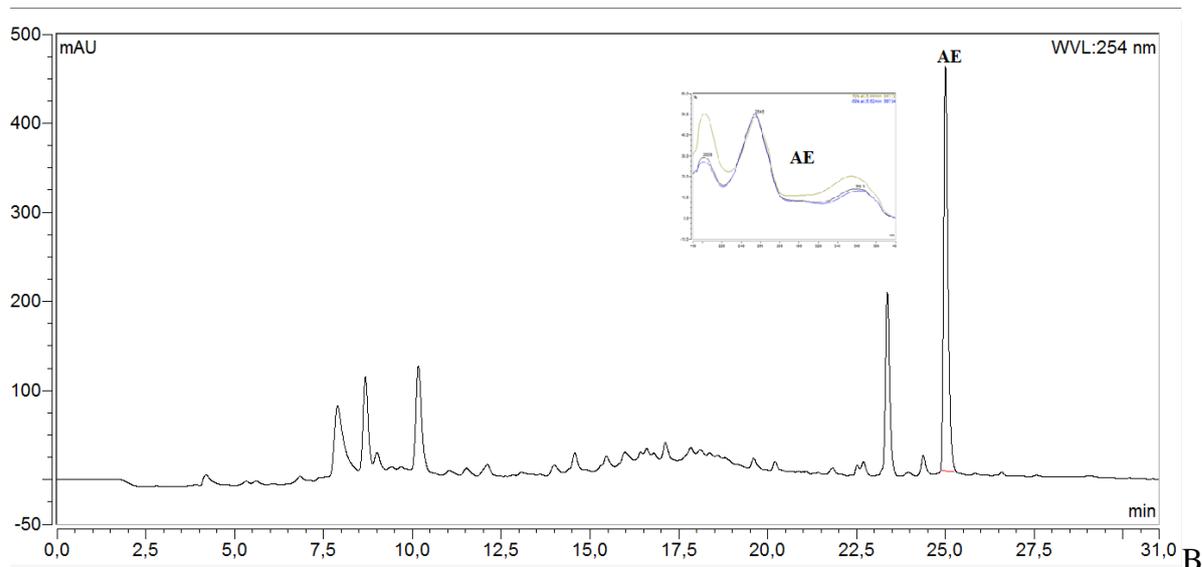
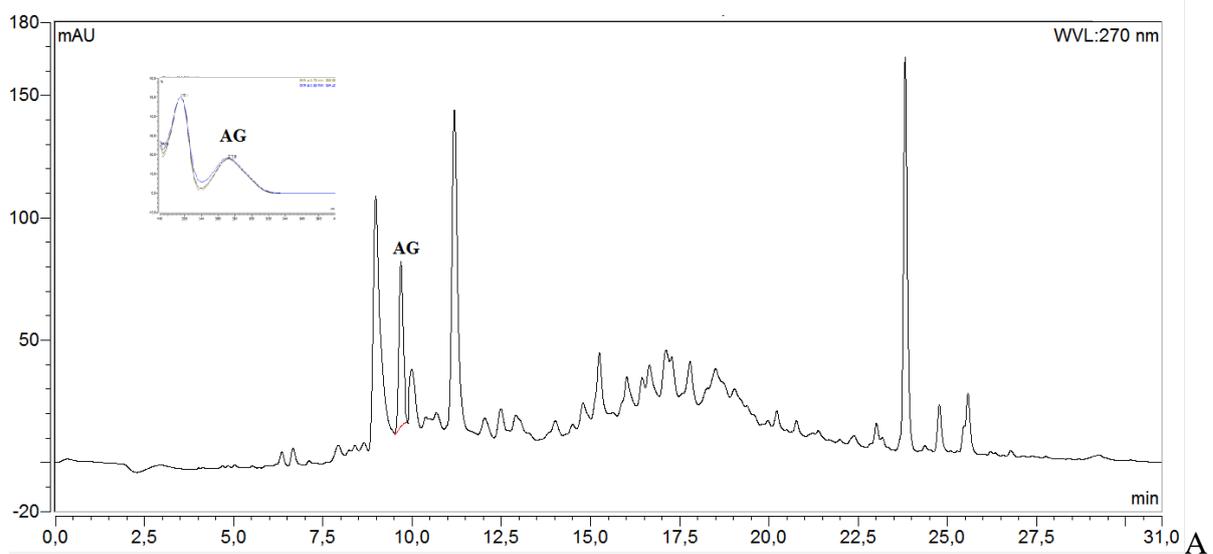
A especificidade em metodologias por CLAE é avaliada através da determinação de pureza de pico. A pureza de pico revela se existem substâncias em co-eluição ou mesmo produtos de degradação, o que pode interferir nos máximos de absorção no caso da CLAE-DAD. O espectro também foi empregado para confirmar a identidade do composto de interesse, a partir de varredura da matéria prima e da matéria prima adicionada intencionalmente dos padrões (ácido gálico e ácido elágico) e da própria amostra (padronização interna) para verificar a ocorrência ou a inexistência de desvio do comprimento de onda máximo. Como não ocorreram variações nos máximos de absorção e nem mudanças nos tempos de retenção médios obtidos para as substâncias pesquisadas, os picos obtidos tanto na matéria prima quanto no extrato bruto foram considerados puros, sem a presença de substâncias interferentes, e o método foi considerado com especificidade compatível para os fins propostos.

**Figura 40** - Parâmetro de especificidade referente à substâncias pesquisadas (A: ácido gálico; B: ácido elágico; C: flavonoide 2 e flavonoide 3) presentes na matéria prima de *E. uniflora*.



Fonte: Autoria própria.

**Figura 41** - Parâmetro de especificidade referente às substâncias pesquisadas (A: ácido gálico; B: ácido elágico; C: flavonoide 2 e flavonoide 3) presentes no extrato bruto de *E. uniflora*.



Fonte: Autoria própria.

### 5.3.2.3 Limites de Detecção e Quantificação

Qualquer técnica a ser empregada na análise de substâncias responde com sinais para determinadas quantidades de amostra. Porém, para que esta resposta seja exibida é necessário que a amostra esteja em uma quantidade mínima para que o sistema utilizado consiga detectar. Essa quantidade mínima permite a determinação dos limites de quantificação e detecção, as quais são as quantidades mínimas das substâncias analisadas que podem ser detectadas e quantificadas com precisão nas condições adotadas (RIBANI et al., 2004; LEITE, 2008).

Na tabela 15 estão apresentados os resultados dos limites de detecção e quantificação do ácido gálico, elágico e flavonoides 2 e 3 nas amostras pelo método por CLAE. Os dados dos limites de detecção e quantificação calculados conforme preconizado pela literatura (a partir do erro padrão do intercepto da curva e de sua inclinação). Os resultados encontrados indicam que o método analítico apresenta sensibilidade apropriada para a quantificação de ácido gálico, elágico e flavonoides presentes na matéria prima e extrato bruto das folhas de *E. uniflora*.

**Tabela 15** -Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para ácido gálico, ácido elágico e flavonoides na matéria prima e extrato bruto das folhas de *E.uniflora*.

Parâmetro	Matriz							
	Materia prima vegetal				Extrato bruto			
	AG	AE	F2	F3	AG	AE	F2	F3
<i>LD</i>	0,18	0,82	0,94	0,61	0,45	0,80	1,77	1,55
<i>LQ</i>	0,56	2,50	2,86	1,84	1,38	2,42	5,38	4,71

\*Limites de Detecção e Quantificação expressos em µg/mL. Fonte: Autoria Própria.

### 5.3.2.4 Precisão

A precisão de um método é considerada a concordância entre vários valores experimentais obtidos. Quanto mais próximos os valores entre si, menor será a amplitude, e quanto menor a amplitude maior a precisão obtida (RIBANI et al., 2004; LEITE, 2008). A precisão foi avaliada em dois níveis: intercorrida e intracorrida. A tabela 16 apresenta os resultados obtidos no ensaio de repetitividade, valores de área e teor, para o método de quantificação de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides na matéria prima de *E. uniflora* por CLAE realizado em sextuplicata no mesmo dia e pelo mesmo operador.

**Tabela 16** - Ensaios de repetibilidade para ácido gálico, ácido elágico e flavonoides por CLAE na matéria prima e extrato bruto das folhas de *E. uniflora*.

<b>AMOSTRA</b>				
<b>Composto</b>	<b>Matéria prima</b>		<b>Extrato bruto</b>	
	<b>Área (mUA)</b>	<b>Teor (%m/m)</b>	<b>Área (mUA)</b>	<b>Teor (%m/m)</b>
Ácido gálico	7,335± 0,0194 (0,26)	0,0567± 0,0002 (0,76)	4,262±0,0580 (1,36)	0,0417± 0,0004 (1,99)
Ácido elágico	15,242± 0,0841 (0,55)	0,0680± 0,0011 (1,64)	9,2455±0,0013 (0,01)	0,1005±0,0014 (2,72)
Flavonoide 2	10,389± 0,0206 (0,20)	0,1333± 0,0014 (2,04)	23,103±0,1023 (0,44)	0,5978±0,0033 (1,04)
Flavonoide 3	1,950± 0,0125 (0,64)	0,0096± 0,0001 (1,60)	1,640±0,069 (0,42)	0,0161± 0,0001 (0,79)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

Na avaliação da matéria prima, a precisão intermediária quando realizada no primeiro dia, apresentou desvios padrões relativos (DPR%) de 2,08% e 3,80%, para ácido gálico e ácido elágico, respectivamente. Já para o extrato bruto, foram encontrados no primeiro dia desvios padrões relativos de 3,77% e 2,19%. Quanto às análises realizadas no segundo dia, os desvios padrões relativos ou coeficientes de variação apresentaram valores de 0,42% e 3,30%, na matéria prima, e de 1,81% e 2,76% no extrato bruto, para o ácido gálico e ácido elágico. Na tabela 17 estão apresentados todos os dados de precisão intermediária obtidos para as substâncias pesquisadas.

Além disso, os desvios padrões obtidos para as 12 determinações destas substâncias, foram inferiores a 5%. Encontrando valores de 2,36% e 3,51% de DPR% para o ácido gálico, na matéria prima e extrato bruto, e de 4,72% e 2,76% para o ácido elágico, na matéria prima e extrato bruto, respectivamente. Estes resultados representam alta concordância entre os valores obtidos, mesmo variando operadores e dias de análises. O que indica que a metodologia apresenta a precisão necessária para reprodução, evidenciando que mesmo sob alterações de condições específicas, a variação está dentro dos limites aceitáveis pela legislação em vigor.

**Tabela 17** - Ensaios de de precisão intermediária para o método de quantificação dos componentes nos farmacógenos de *E. uniflora* por CLAE.

Parâmetro	Ácido gálico		Ácido Elágico		Flavonóide 2		Flavonóide 3		
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	
Matéria prima	Operador 1	0,0566 ±	0,0576 ±	0,0675 ±	0,0604 ±	0,1326 ±	0,1314 ±	0,0095 ±	0,0090±
		0,0012	0,0002	0,0025	0,0019	0,0040	0,0019	0,0003	0,0001
	(2,04)	(0,39)	(3,68)	(3,23)	(3,00)	(1,42)	(3,63)	(2,54)	
	Operador 2	0,0546 ±	0,0577 ±	0,0633 ±	0,0625 ±	0,1256 ±	0,1325 ±	0,0089 ±	0,0089±
0,0002		0,0003	0,0001	0,0018	0,0001	0,0002	0,000	0,0001	
		(0,37)	(0,48)	(0,16)	(2,89)	(0,11)	(0,16)	(0,15)	(2,47)
Extrato bruto	Operador 1	0,0420 ±	0,0449 ±	0,0980 ±	0,0960 ±	0,5998 ±	0,5829 ±	0,0162 ±	0,0155 ±
		0,0016	0,0004	0,0022	0,0015	0,0076	0,0048	0,0002	0,0001
	(3,91)	(0,80)	(2,22)	(1,61)	(1,27)	(0,82)	(1,08)	(0,74)	
	Operador 2	0,0449 ±	0,0456 ±	0,1002 ±	0,0956 ±	0,5862 ±	0,5767 ±	0,0158 ±	0,0156 ±
0,0004		0,0011	0,0005	0,0031	0,0017	0,0140	0,0001	0,0002	
		(0,80)	(2,35)	(0,50)	(2,32)	(0,29)	(2,44)	(0,35)	(1,19)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado na tabela 17, todos os desvios padrões relativos obtidos nas análises de precisão encontram-se dentro dos limites preconizados pela RE 899. Além das médias individuais, os valores de desvio padrão relativo obtidos para as 12 determinações dos flavonoides 2 e 3 foram de DPR% 2,44 e DPR% 3,08 na matéria prima e de DPR% 1,86 e DPR% 1,87 no extrato bruto. Tais resultados demonstraram que o método apresenta precisão apropriada na quantificação dos flavonoides presentes na espécie.

Os resultados obtidos perante as diferentes substâncias e matrizes estudadas permitem assegurar a alta reprodutibilidade do sistema analítico, além de conformidade com as especificações da legislação vigente mesmo frente às flutuações encontradas pelas respostas.

#### 5.3.2.5 Exatidão

O ensaio de exatidão realizado para a matéria prima apresentou valores de recuperação que ficaram ranqueados entre 86,40 e 103,74%. Os representantes dos taninos apresentaram menores valores de recuperação com resultados entre 86,40 e 90,13% para o ácido gálico e entre 88,67 a 93,10% para ácido elágico. Os derivados flavonoídicos apresentaram performances um pouco maiores, com recuperação entre 97,03 e 103,22% para o flavonoide 2 e entre 102,69 a 103,74% para o flavonoide 3.

Considerando a teste de recuperação para o extrato bruto, os dados ficaram dentro de faixa um pouco mais alta, entre 98,90 e 110,37%. Para este derivado, as diferenças de performance entre os padrões foi menor, com o ácido gálico apresentando recuperação entre 99,04 a 107,71%; o ácido elágico entre 97,07 e 107,01%; o flavonoide 2 de 98,90 a 109,64% e o flavonoide 2 de 101,11 a 110,37%.

Estes resultados demonstram que o método desenvolvido possui exatidão compatível com o recomendado pela RE 899 de 2003, assim não há discrepância entre as respostas analíticas e os valores reais de compostos presentes nas matrizes estudadas. Todos os compostos apresentaram taxa de recuperação dentro dos limites de 85-115%, preconizados pela legislação em vigor para matrizes complexas tal como drogas vegetais.

### 5.3.2.5 Robustez

As tabelas 18 e 19 mostram os dados de robustez perante as variações determinadas. Para a variação do fornecedor do solvente utilizado na preparação das fases móveis, os resultados mostraram baixa variabilidade da resposta analítica para esta fonte de variação.

Para a mudança de fluxo de fase móvel utilizado, os teores obtidos para as substâncias pesquisadas não exibiram diferenças significativas perante a variação em questão tanto para a matéria prima quanto para o extrato bruto.

Enquanto que os resultados obtidos com a mudança de pH da fase móvel utilizada em dois níveis, (pH 3,0/4,0 (A e B) e pH 2,0/3,0 (A e B)), foi observado que esta variação apresentou influencia sobre os teores obtidos das substâncias pesquisadas, principalmente na matéria prima, em relação ao ácido elágico e aos flavonoides, resultando em menores teores quando o pH da fase móvel encontrava-se na faixa de 2,0/3,0.

Para a mudança na temperatura do forno da coluna utilizada em dois níveis, (21 °C e 24 °C), a variação das respostas não apresentou grande influência sobre os teores das substâncias pesquisadas tanto na matéria prima como no extrato bruto. Exceto pelo teor de ácido elágico na matéria prima que apresentou queda nos teores na temperatura de 24 °C.

**Tabela 18** - Robustez: avaliação do método por CLAE para quantificação dos metabólitos nas folhas de *E. uniflora*.

		Solvente		Fluxo (mL/min)		pH		Temperatura da coluna (° C)	
		Tedia	JT Baker	0,79	0,81	3,0/4,0	2,0/3,0	21	24
AG	Área (mUA)	7,454±0,0293 (0,39)	7,336±0,0185 (0,25)	7,363±0,1590 (2,16)	7,819±0,2459 (3,14)	7,454±0,0293 (0,39)	7,524±0,0535 (0,71)	7,454±0,0293 (0,39)	7,513±0,0743 (0,99)
	Teor (%m/m)	0,058±0,0002 (0,39)	0,057±0,0001 (0,25)	0,057±0,0012 (2,16)	0,060±0,0019 (3,14)	0,058±0,0002 (0,39)	0,058±0,0002 (0,71)	0,058±0,0002 (0,39)	0,058±0,0006 (0,39)
AE	Área (mUA)	14,973±0,3076 (2,05)	15,101±0,0352 (0,23)	14,919±0,3076 (2,05)	15,101±0,0352 (0,23)	14,973±0,3076 (2,05)	11,717±0,5252 (4,48)	14,973±0,3076 (2,05)	13,390±0,4320 (3,23)
	Teor (%m/m)	0,068±0,0014 (2,05)	0,068±0,0002 (0,23)	0,068 ± 0,0014 (2,05)	0,068 ± 0,0002 (0,23)	0,068±0,0014 (2,05)	0,053±0,0024 (4,48)	0,068±0,0014 (2,05)	0,060±0,0019 (3,23)
F2	Área (mUA)	10,205±0,0188 (0,18)	10,069±0,0822 (0,82)	10,982±0,1635 (1,59)	10,618±0,4531 (4,27)	10,205±0,0188 (0,18)	8,808±0,1608 (1,83)	10,205±0,0188 (0,18)	10,187±0,1450 (1,42)
	Teor (%m/m)	0,132±0,0002 (0,18)	0,130±0,0011 (0,82)	0,133 ± 0,0021 (1,59)	0,137 ± 0,0058 (4,7)	0,132±0,0002 (0,18)	0,114±0,0021 (1,83)	0,132±0,0002 (0,18)	0,131±0,0019 (1,42)
F3	Área (mUA)	1,935±0,0058 (0,30)	1,872±0,0578 (3,09)	2,223 ± 0,0704 (3,16)	2,195±0,0730 (3,32)	1,935±0,0058 (0,30)	1,248±0,0747 (5,98)	1,935±0,0058 (0,30)	1,929±0,0115 (0,60)
	Teor (%m/m)	0,010±0,0001 (0,30)	0,009±0,0003 (3,09)	0,011± 0,0003 (3,16)	0,011±0,0004 (3,32)	0,010±0,0001 (0,30)	0,006±0,0004 (5,98)	0,010±0,0001 (0,30)	0,009±0,0001 (0,60)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), Fonte: Autoria própria. AG – ácido gálico; AE – ácido elágico; F2 – flavonóide 2; F3 – flavonóide 3.

**Tabela 19** - Robustez: avaliação do método por CLAE para quantificação dos metabólitos no extrato bruto de *E. uniflora*.

		Solvente		Fluxo (mL/min)		pH		Temperatura da coluna (° C)	
		Tedia	JT Baker	0,79	0,81	3,0/4,0	2,0/3,0	21	24
AG	Área (mUA)	4,544±0,1921 (4,23)	4,592±0,0444 (0,97)	4,799 ± 0,2045 (4,26)	4,913 ± 0,0307 (0,63)	4,544±0,1921 (4,23)	4,895±0,0351 (0,72)	4,544±0,1921 (4,23)	4,578±0,0367 (0,80)
	Teor (%m/m)	0,045±0,0019 (4,23)	0,045±0,0004 (0,97)	0,047 ± 0,0020 (4,26)	0,048 ± 0,0003 (0,63)	0,045±0,0019 (4,23)	0,048±0,0003 (0,72)	0,045±0,0019 (4,23)	0,045 ± 0,0004 (0,80)
AE	Área (mUA)	8,909±0,2558 (2,87)	8,730±0,1406 (1,61)	8,479 ± 0,3168 (3,74)	8,566± 0,0442 (0,52)	8,730±0,1406 (1,61)	8,306±0,5057 (4,09)	8,730±0,1406 (1,61)	8,773±0,1099 (1,25)
	Teor (%m/m)	0,098±0,0028 (2,87)	0,096±0,0015 (1,61)	0,093 ± 0,0035 (3,74)	0,094±0,0005 (0,52)	0,096±0,0015 (1,61)	0,091±0,0056 (4,09)	0,096±0,0015 (1,61)	0,096± 0,0012 (1,25)
F2	Área (mUA)	22,73±0,0653 (0,29)	24,88±0,6376 (2,56)	26,518± 0,3403 (1,28)	25,727± 0,3135 (1,22)	22,729±0,0653 (0,29)	20,316±0,6397 (3,15)	22,73±0,0653 (0,29)	22,599±0,1855 (1,81)
	Teor (%m/m)	0,586±0,0017 (0,29)	0,642±0,0016 (2,56)	0,684 ± 0,0088 (1,28)	0,664±0,0081 (1,22)	0,586±0,0017 (0,29)	0,524±0,0017 (3,15)	0,586±0,0017 (0,29)	0,583±0,0048 (0,82)
F3	Área (mUA)	1,645±0,0053 (0,32)	1,729±0,0281 (1,62)	1,788 ± 0,0658 (3,68)	1,692 ± 0,0638 (3,77)	1,645±0,0053 (0,32)	1,500±0,0388 (2,59)	1,645±0,0053 (0,32)	1,574±0,0116 (0,74)
	Teor (%m/m)	0,016±0,0001 (0,32)	0,017±0,0003 (1,62)	0,018 ± 0,0006 (3,68)	0,017 ± 0,0006 (3,77)	0,016±0,0001 (0,32)	0,015±0,0004 (2,59)	0,016±0,0001 (0,32)	0,015±0,0001 (0,74)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), Fonte: Autoria própria. AG – ácido gálico; AE – ácido elágico; F2 – flavonóide 2; F3 – flavonóide 3.

A robustez pode ser considerada a susceptibilidade da condição analítica em atender a determinação da substância pesquisada perante variações do sistema analítico (LEITE, 2008), e corresponde a um parâmetro empregado para estabelecer e avaliar variáveis críticas que possam introduzir variabilidade à metodologia. Entretanto, não se trata de um parâmetro com caráter de aprovação da metodologia, mas indica quais as variáveis precisam de maior controle durante implementação e execução de um método analítico.

Deste modo, o método investigado apresentou desempenho robusto dentro algumas das variações a que foi submetido. A afirmação baseia-se na quantificação da variabilidade introduzida pelas variáveis, através da determinação do desvio padrão relativo. E uma vez que os valores de DPR obtidos permanecem dentro do limite estabelecido pela legislação (<5%). Porém, a variação dos teores frente a variação de pH de fase móvel na faixa de 2,0/3,0 indica susceptibilidade do método perante esta alteração. Assim, é preciso ter maior atenção sobre essa variável, sendo necessária a manutenção do pH da fase móvel entre 3,0/4,0. Além disso, alteração na temperatura também foi um parâmetro que apresentou variações, pois os teores do ácido elágico apresentaram queda na temperatura de 24°C. Neste sentido, a temperatura também necessita de um maior controle durante as análises.

Conforme esperado, a variação de fluxo apresentou desvio dos tempos de retenção, porém não comprometeu a pureza dos picos mantendo estáveis os teores para todos os compostos analisados. Além disso, foi possível observar que os valores obtidos de robustez não tiveram variabilidade das respostas analíticas superiores àqueles encontrados nos ensaios de precisão para todas as substâncias pesquisadas. Indicando uma elevada reprodutibilidade do sistema.

Portanto, o método desenvolvido para a matéria prima e extrato bruto (derivado vegetal) de *Eugenia uniflora*, apresenta as características de desempenho apropriadas, sendo adequado a análises de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides em amostras provenientes das folhas da espécie. Logo, com o método validado, é possível assegurar a confiabilidade dos resultados.

### 5.3.3 Metodologias UV-Vis x CLAE

Tendo validadas metodologias analíticas para a quantificação de taninos e flavonoides por espectrofotometria UV-Vis e CLAE-DAD, estes métodos tornam-se ferramentas apropriadas para o doseamento destas substâncias em matrizes derivadas das folhas de *E. uniflora*. Porém, uma correlação entre estas técnicas é dificultada pela diferença de

especificidade, uma vez que o UV-VIS vigora como uma técnica de baixa seletividade, em razão da sobreposição espectral das substâncias que absorvem em mesma região (ROCHA, et al. 2004; MARQUES et al., 2012); enquanto que a CLAE que possui grande especificidade em razão da possibilidade de separação dos componentes antes de sua detecção. O detector DAD também analisa as substâncias no campo do eletromagnético na faixa UV-Vis, porém por ser acoplada ao cromatógrafo, as substâncias são analisadas separadamente, de acordo com ordem de eluição. Apesar de ambas as técnicas permitirem varreduras para a detecção dos compostos em solução, a grande diferença vigora na sobreposição de bandas por espectrofotometria, dado que as substâncias são analisadas em grupo, e não separadamente como na CLAE.

Os resultados obtidos por CLAE na matéria prima e extrato bruto apresentam valores diferentes dos obtidos principalmente na pesquisa de taninos, visto que na CLAE só foi realizada a quantificação dos monômeros livres dos taninos hidrolisáveis, pois a análise dos taninos propriamente ditos é dificultada pelo tamanho das moléculas dos taninos hidrolisáveis (SIMÕES et al., 2010), principalmente porque os taninos relatados na espécie são macrocíclicos (LEE et al., 1999). No caso dos flavonoides também é difícil a correlação devido a presença de substâncias em concentrações que são detectáveis, mas não quantificáveis por CLAE nas amostras analisadas, o que inviabiliza a comparação com os métodos espectrofotométricos que quantificam todas as substâncias de mesma classe em solução, após a utilização do reagente específico.

Mesmo perante as discrepâncias entre resultados, e diante do fato de que valores absolutos obtidos não possam ser comparados, o desempenho analítico de ambas as técnicas pode ser semelhante. Isto é, quando determinado o marcador da espécie, a performance das técnicas deverá ser semelhante (MARQUES, 2011; 2013).

Ademais, como ainda não foram determinados os marcadores ativos farmacologicamente para esta espécie, e baseado no fato de que misturas complexas de substâncias podem atuar sinergicamente, a quantificação de grupos ainda vigora como uma excelente ferramenta para o controle da quantidade da *E. uniflora*. (WAGNER, 2011; RODRIGUEZ et al., 2012). Principalmente pela existência de diferentes agliconas e glicosídeos, além dos taninos hidrolisáveis que têm sua detecção dificultada por CLAE devido ao alto peso molecular. Neste ponto, a CLAE pode ser considerada em desvantagem, por detectar isoladamente as substâncias que podem ou não estar correlacionadas com as atividades farmacológicas. Além disso, a CLAE ainda possui maior custo associado a sua

instrumentação, reagentes com maior grau de pureza, pré-colunas, colunas e maior tempo de análise. Ao contrário da espectrofotometria UV-Vis, que possui menor custo associado a sua instrumentação e é uma técnica rápida e simples o que a torna muito mais acessível.

Sendo assim, ambas as técnicas podem ser aplicadas ao controle de qualidade, porém, para que sejam correlacionados os dados obtidos, algumas estratégias podem ser empregadas, como: hidrólise dos taninos (CLAE), espectrofotometria derivativa, estudos de correlação (métodos estatísticos) e utilização de um marcador representativo para estabelecer uma relação entre os resultados obtidos nestas duas técnicas.

#### 5.3.4 Doseamento de ácido gálico, ácido elágico e flavonoides nas frações das folhas de *E. uniflora*

Após a validação do método, onde foi assegurado que as respostas obtidas pela metodologia apresentam a confiabilidade necessária para sua aplicação no controle de qualidade de amostras provenientes das folhas de *Eugenia uniflora*, foi realizado o doseamento das substâncias marcadoras da espécie (ácido gálico, ácido elágico e flavonoides) também nas frações obtidas a partir do extrato bruto das folhas.

A análise quantitativa do ácido gálico nas frações evidenciou concentrações na fração aquosa (Tabela 20) pouco inferiores as encontradas no extrato bruto, isso ocorre pela polaridade da substância, que é polihidroxilada contando com um grupamento ácido carboxílico, o que resulta em afinidade/solubilidade razoável em água. Essa polaridade é evidenciada no fato de que ácido gálico apresentou nas amostras um tempo de retenção médio de 8,9 min, onde o gradiente de eluição ainda está superior a 75% de água. A fração acetato de etila, possui maiores teores da substância devido a maior afinidade desta substância por este solvente de polaridade intermediária, já que mesmo com afinidade ainda se trata de uma substância orgânica aromática. Na fração hexano foram encontrados teores médios de 0,0053%, muito menores que os evidenciados nas outras frações, devido à polaridade baixa do solvente.

Já para o ácido elágico, a fração aquosa não evidenciou teores (Tabela 20) semelhantes as apresentadas pelo extrato bruto, devido à baixa afinidade desta substância pela água, como pode ser observado pelo tempo de retenção desta substância no método utilizado. Neste

método o gradiente de fase móvel atinge seu maior nível do modificador orgânico (75% de metanol) por volta dos 25 min, evidenciando um caráter menos polar da substância. As frações acetato e hexano apresentaram teores bem superiores aos da FAq, principalmente a FAc, devido ao caráter intermediário de lipofilia do acetato de etila, atingindo teores superiores aos obtido no extrato bruto.

Para os flavonoides pesquisados, a fração aquosa obteve teores baixíssimos, quando em comparação com o extrato bruto, não sendo detectado o flavonoide 3, presente nas demais amostras. Na fração acetato houve um grande enriquecimento das amostras, elevando os teores dos dois flavonoides pesquisados, quando comparado ao extrato bruto. A fração hexano também obteve teores superiores aos obtidos para o extrato bruto, porém não com tanta intensidade quanto a FAc, como pode ser observado na tabela 20.

A análise dos teores nas frações permitiu a verificação da etapa de fracionamento, indicando quando houve enriquecimento das substâncias. Estes dados apontam que a metodologia proposta para a quantificação de monômeros de taninos e flavonoides na matéria prima e extrato bruto, também pode ser aplicada ao controle de qualidade de outros derivados da espécie com eficiência e segurança, sendo capaz de avaliar também as etapas de transformação como fracionamento/enriquecimento.

**Tabela 20** - Quantificação de taninos e flavonoides por CLAE no extrato bruto (EB) nas frações enriquecidas (FAq – aquosa; FAc - Acetato de Etila; FH – Hexano).

Amostras	Ácido Gálico		Ácido Elágico		Flavonóide 2		Flavonóide 3	
	Área (mU.A.)	Teor (g%)	Área (mU.A.)	Teor (g%)	Área (mU.A.)	Teor (g%)	Área (mU.A.)	Teor (g%)
EB	4,262 ± 0,0580 (1,36)	0,0417 ± 0,0004 (1,99)	9,2455±0,0013 (0,01)	0,1005 ± 0,0014 (2,72)	23,103±0,1023 (0,44)	0,5978±0,0033 (1,04)	1,640±0,069 (0,42)	0,0161± 0,0001 (0,79)
FAq	3,346±0,1008 (3,01)	0,0328±0,0010 (3,01)	1,697 ± 0,0661 (3,90)	0,0187±0,0007 (3,90)	0,7923 ± 0,0374 (4,72)	0,0204±0,0010 (4,72)	-	-
FAc	8,893±0,0747 (0,84)	0,0872±0,0007 (0,84)	14,679 ± 0,5946 (4,05)	0,1614±0,0065 (4,05)	85,684 ± 0,2203 (0,26)	2,2100±0,0057 (0,26)	11,493 ± 0,0574 (0,50)	0,1129±0,0006 (0,50)
FH	0,544±0,0234 (4,32)	0,0053±0,0002 (4,32)	6,623 ± 0,0578 (0,87)	0,0728±0,0006 (0,87)	24,169 ± 0,0060 (4,79)	0,6301±0,0302 (4,79)	4,035 ± 0,1619 (4,01)	0,0396±0,0016 (4,01)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), Fonte: Autoria própria.

## 5.4 AVALIAÇÃO DE PERFIS QUÍMICOS (*fingerprints*) POR CCD E CCD-AE E CLAE-DAD PARA MATÉRIA PRIMA, EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

### 5.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada é uma ferramenta analítica bastante difundida na avaliação de materiais vegetais. Esta técnica possui algumas vantagens sobre outras técnicas cromatográficas tais como: simplicidade, baixo custo, além da rápida obtenção dos resultados que podem ser facilmente interpretados (VERMAAK et al., 2010); tornando esta técnica uma grande aliada no estudo de misturas complexas tal como as investigações fitoquímicas. Através desta técnica é possível separar de misturas complexas auxiliando na detecção e identificação de substâncias marcadoras (NICOLLETI, 2011).

Neste contexto destaca-se a cromatografia de camada delgada de alta eficiência, CCD-AE, a qual possui maior reprodutibilidade, devido ao seu sistema (semi-)automatizado, que viabiliza a obtenção do perfil de substâncias presentes na matriz vegetal, possibilitando assim a identificação e o controle de qualidade de espécies vegetais. Quando são utilizadas as placas de CCD-AE, a capacidade de separação é muito maior, graças aos menores tamanhos das partículas da fase estacionária que determinam um grande aumento na eficiência da separação dos compostos.

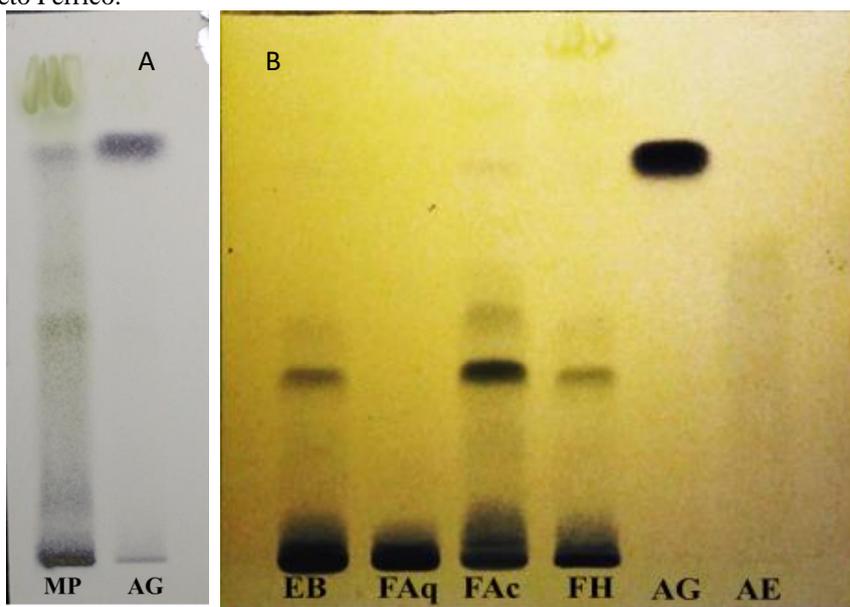
A matéria prima, o extrato bruto e as frações foram, inicialmente, caracterizados por CCD clássica através da pesquisa pelas classes mais importantes de substâncias do metabolismo secundário vegetal tais como: taninos (hidrolisáveis e condensados), flavonoides, derivados cinâmicos, triterpenos/esteroides, antraquinonas, açúcares redutores, alcaloides e cumarinas. Posteriormente os resultados positivos foram transportados para CCD-AE.

A avaliação fitoquímica realizada por CCD na matéria prima, extrato bruto e frações das folhas de *E. uniflora*, indicaram presença de taninos hidrolisáveis, flavonoides, triterpenos/esteroides, antraquinonas e açúcares redutores. Os dados estão de acordo com o relato de Fiúza (2008), e podem ser facilmente confirmados nas cromatoplas obtidas.

A figura 42 apresenta as fotografias das cromatoplas obtidas para a pesquisa de taninos hidrolisáveis na matéria prima, extrato bruto e frações. O sistema foi desenvolvido empregando fase móvel de características intermediárias de polaridade (acetato de etila: ácido

acético: ácido fórmico; 90:5:5, v/v/v); e, após revelação com cloreto férrico, foi possível observar sob luz visível, bandas acinzentadas correspondentes ao padrão de ácido gálico na matéria prima (placa A), e com intensidade fraca no extrato bruto e fração enriquecida acetato de etila (placa B) onde foram apresentadas mesma coloração e Rf exibidos pelo padrão (tabela 21).

**Figura 42** - Cromatograma para taninos hidrolisáveis na Matéria prima (A) e no Extrato Bruto e Frações (B). Revelador: Cloreto Férrico.



MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; AG: Ácido Gálico; AE: Ácido Elágico.

Fonte: Autoria própria.

Para a matéria prima, a visualização da banda do ácido gálico é bastante evidente. Porém quando se trata do extrato bruto e frações, as condições de iluminação e fotográficas não possibilitaram a mesma visualização, resultando apenas a observação de uma fraca banda correspondente ao ácido gálico na fração acetato. A menor intensidade no extrato bruto e nas frações, em comparação com a matéria prima, pode ser decorrente da preparação da amostra, concentração da solução aplicada ou até mesmo em virtude da solubilidade do extrato bruto e frações. Os resultados confirmam a presença dos metabólitos na espécie. O padrão ácido elágico é dificilmente detectado por este revelador, aparecendo como uma mancha suave que não pode ser percebida nas amostras (presença de cauda, devido a difícil solubilização para aplicação nas cromatoplas). Outras bandas foram observadas e indicam também tratar-se de polifenóis.

**Tabela 21** – Resultados em valores de RF para cromatoplaca para pesquisa de taninos hidrolisáveis. Placa revelada com cloreto férrico e observada sob luz visível

	Placa A		Placa B					
	MP	AG	EB	FAq	FAc	FH	AG	AE
<b>Rf1</b>	-	-	0,11	0,11	0,11	0,09		-
<b>Rf2</b>	-	-	0,36	-	0,37	0,35	-	-
<b>Rf3</b>	0,52	-	0,47	-	0,47	0,45	-	-
<b>Rf4</b>	0,80	0,80	0,74	-	0,74	-	0,74	-

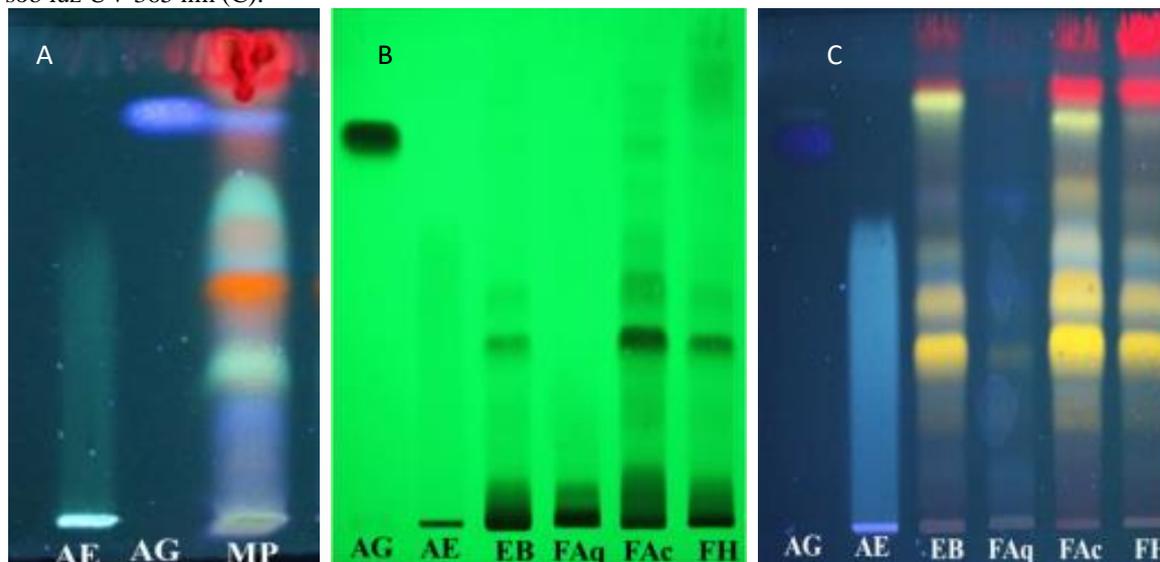
MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; AG: Ácido Gálico; AE: Ácido Elágico.

Fonte: Autoria própria.

Ainda na pesquisa por taninos hidrolisáveis, a cromatoplaca revelada com NEU seguido de PEG observada sob luz UV 365 nm (Figura 43A) demonstra com clareza a presença de ácido gálico e elágico na matéria prima, exibindo bandas de mesma coloração e Rf dos padrões, no caso do ácido gálico. A banda correspondente ao padrão de ácido elágico apresentou baixa intensidade e migração (placa 43A).

Na cromatoplaca para o extrato bruto e as frações, quando observada sob luz UV 254 nm (Figura 43B), apresenta uma banda de baixa intensidade correspondente ao padrão de ácido gálico na fração acetato (Rf = 0,75). Para o ácido elágico é observada com coloração azul clara com formação intensa de cauda e sem delimitação da banda. O mesmo resultado ocorre em menor intensidade para as amostras de do extrato bruto e em maior intensidade para fração acetato de etila e fração hexano; sugerindo que houve maior distribuição do composto nas frações. A mesma cromatoplaca observada sob luz UV 365 nm apresenta uma banda com coloração azul escura para o padrão ácido gálico (Figura 43C). O ácido gálico não pôde ser visualizado nas amostras. Ademais, uma banda de coloração amarelada ocorre nas amostras em posição muito próxima à esperada para o ácido gálico. Os Rfs estão descritos na tabela 22.

**Figura 43** - Cromatogramas para taninos hidrolisáveis. Revelador: NEU + PEG, observado sob luz UV 365 nm. Matéria prima (A) extrato bruto e frações observados sob luz UV 254 nm (B); extrato bruto e frações observados sob luz UV 365 nm (C).



MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; AG: Ácido Gálico; AE: Ácido Elágico.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 22** – Resultados em valores de Rfs para a cromatoplaça para pesquisa de taninos hidrolisáveis. Placa revelada com NEU e PEG e observada sob luz UV em 254 (B) e 365 nm (AC).

	Placa A			Placa BC					
	AE	AG	MP	AG	AE	EB	FAq	FAc	FH
<b>Rf1</b>	-	-	0,22	-	-	0,18	0,18	0,18	0,18
<b>Rf2</b>	-	-	0,30	-	-	0,24	0,24	0,24	0,24
<b>Rf3</b>	-	-	0,39	-	-	0,41	0,41	0,41	0,41
<b>Rf4</b>	-	-	0,49	-	-	0,47	0,47	0,47	0,47
<b>Rf5</b>	-	-	0,52	-	-	0,56	0,56	0,56	0,56
<b>Rf6</b>	0,65	-	0,54	-	0,64	0,66	0,66	0,66	0,66
<b>Rf7</b>	-	0,80	0,59	0,75	-	-	-	0,75	-
<b>Rf8</b>	-	-	0,80	-	-	0,84	-	0,84	0,84
<b>Rf9</b>	-	-	0,89	-	-	0,86	-	0,86	0,86

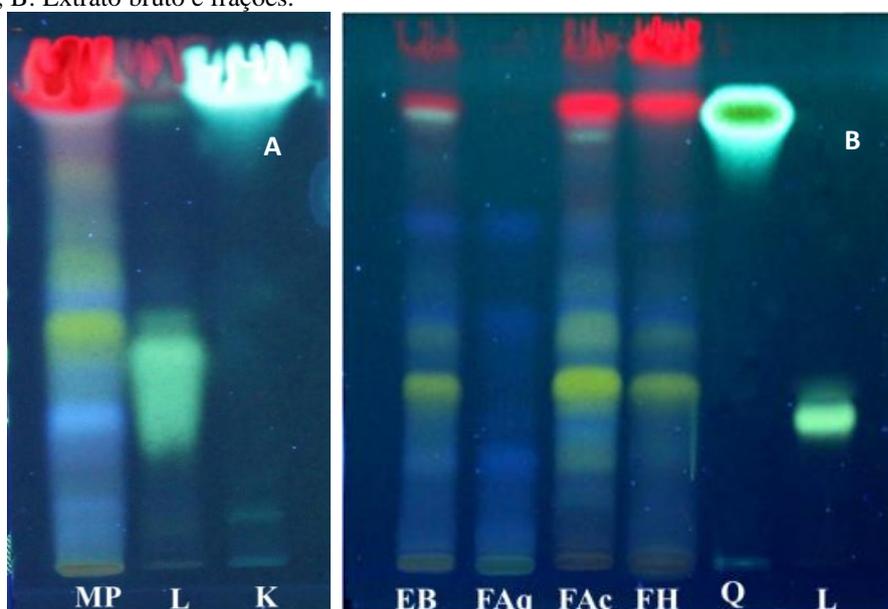
MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; AG: Ácido Gálico; AE: Ácido Elágico.

Fonte: Autoria própria.

A figura 44 apresenta as fotografias obtidas para as cromatoplaças correspondentes à pesquisa de flavonoides, obtidas nas mesmas condições de eluições que os taninos hidrolisáveis. Porém o cloreto de alumínio foi utilizado como revelador (SUBRAMANIAN et al., 2014). Neste caso o revelador é responsável pela coloração esverdeada de bandas

correspondentes aos flavonoides. O revelador utilizado na evidencia a presença bandas tanto na matéria prima (Figura 44A) quanto no extrato bruto e frações (Figura 44B). As manchas apresentadas nas amostras possuem Rf (tabela 23) e coloração esverdeada, semelhantes a observada para padrão Luteolina-7-O-glicosídeo. Os padrões quercetina e kaempferol podem ser observados junto ao “fronte” de eluição da fase móvel, juntamente com bandas avermelhadas que estão presentes nas amostras da matéria prima, do extrato bruto e nas frações (acetato de etila e hexano). Esta banda avermelhada pode ser um tipo de derivado da clorofila, que possui coloração avermelhada sob luz UV. A ausência desta banda na fração aquosa corrobora com esta suposição, visto que a clorofila é um composto lipofílico.

**Figura 44** - Cromatograma para flavonoides. Revelador: Cloreto de alumínio, observada sob luz UV 365 nm. A: Matéria prima; B: Extrato bruto e frações.



MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; K:Kaempferol; L:Luteolina-7-O-glicosídeo; Q: Quercetina.

Fonte: Autoria própria.

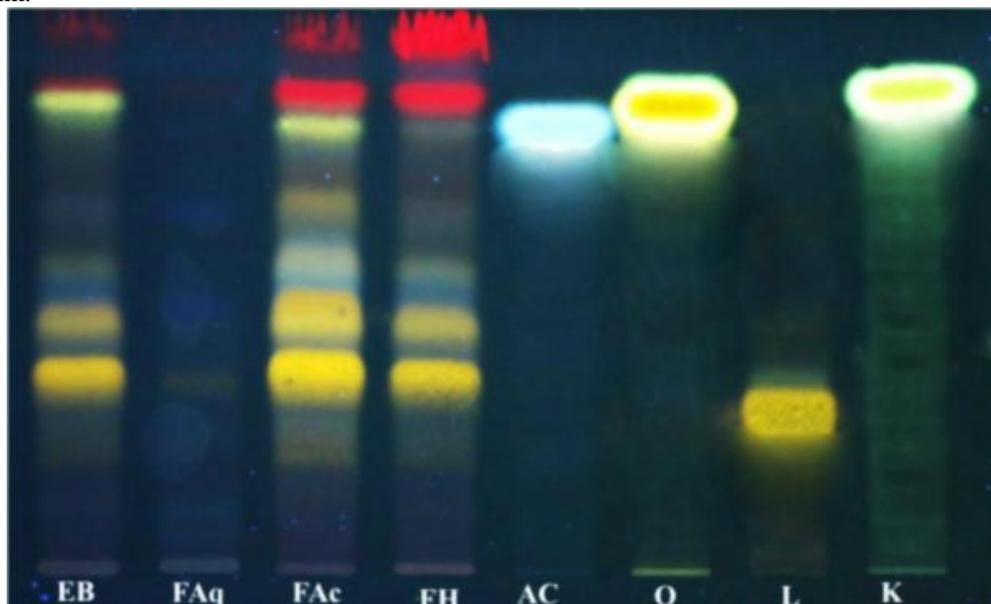
**Tabela 23** – Resultados em valores de Rfs para cromatoplaça para pesquisa de flavonóides. Placa revelada com cloreto de alumínio e observada sob luz UV em 365 nm.

	Placa A				Placa B				
	MP	L	K	EB	FAq	FAc	FH	Q	L
<b>Rf1</b>	0,18	-	-	0,19	0,21	0,19	-	-	-
<b>Rf2</b>	0,30	-	-	0,34	-	0,34	0,34	-	0,33
<b>Rf3</b>	0,43	-	-	0,42	-	0,42	0,42	-	-
<b>Rf4</b>	0,52	0,48	-	0,48	0,48	0,48	0,48	-	-
<b>Rf5</b>	0,54	-	-	0,63	0,63	0,63	0,63	-	-
<b>Rf6</b>	0,56	-	-	0,82	-	0,82	0,82	-	-
<b>Rf7</b>	0,87	-	0,89	0,84	-	0,84	0,86	0,85	-

MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; K:Kaempferol; L:Luteolina-7-O-glicosídeo; Q: Quercetina. Fonte: Autoria própria.

Na pesquisa de flavonoides/derivados cinâmicos no extrato bruto e frações (Figura 45), revelada com o NEU + PEG não foram evidenciadas bandas com coloração correspondente ao ácido cafeico (padrão para derivados cinâmicos). Entretanto, foram evidenciadas bandas que sugerem a presença de flavonoides, como as bandas amareladas presentes no extrato bruto e frações aquosa (intensidade fraca), acetato de etila e hexano, cujos Rfs são semelhantes ao do padrão quercetina utilizado. Além disso, também foram observadas bandas amareladas nas mesmas amostras, que possuem coloração e Rfs semelhantes ao do padrão luteolina-7-O-glicosídeo. Ainda são observadas bandas amareladas na parte inferior da placa, o que sugere que sejam flavonoides mais hidrofílicos (devido ao baixo Rf (Tabela 24)). De acordo com Wagner e Bladt (1996), flavonóis como quercetina e miricetina e seus glicosídeos apresentam coloração amarela/alaranjada quando reveladas com NEU, o que confirmaria a presença destas substâncias nas folhas de *E. uniflora*.

**Figura 45** - Cromograma para Flavonoides/Derivados Cinâmicos. Revelador: NEU +PEG, observada sob luz UV 365 nm.



EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; AC: Ácido Cafeico; Q: Quercetina; L:Luteolina-7-O-glicosideo; K:Kaempferol.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 24 – Resultados em valores de Rfs para placa para pesquisa de flavonóides. Placa revelada com NEU PEG e observada sob luz UV em 365 nm.

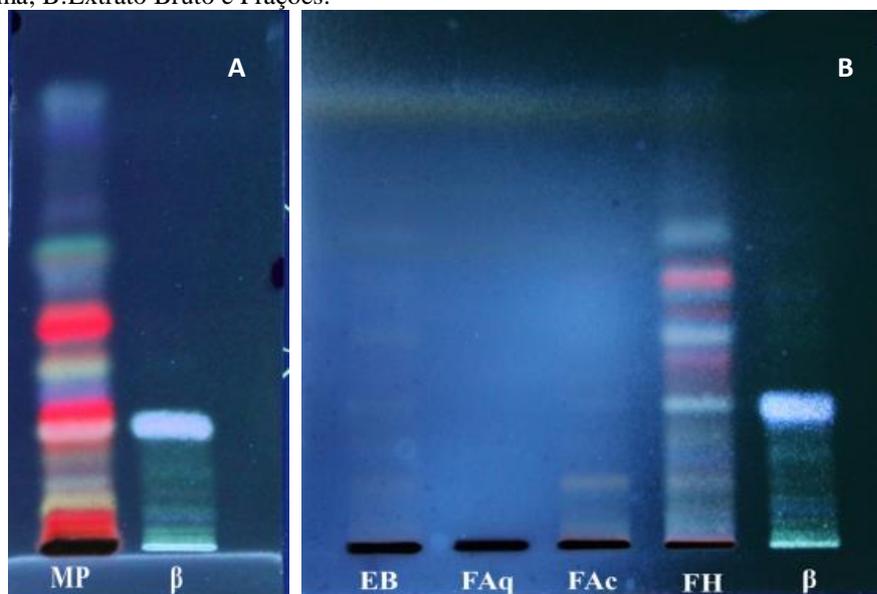
Amostra	EB	FAq	FAc	FH	Ác Cafeico	Quercetina	Luteolina	Kaepmferol
<b>Rf1</b>	0,18	0,18	0,18	0,18	-	-	-	-
<b>Rf2</b>	0,24	0,24	0,24	0,24	-	-	-	-
<b>Rf3</b>	-	-	-	-	-	-	0,33	-
<b>Rf4</b>	0,41	0,41	0,41	0,41	-	-	-	-
<b>Rf5</b>	0,47	0,47	0,47	0,47	-	-	-	-
<b>Rf6</b>	0,56	0,56	0,56	0,56	-	-	-	-
<b>Rf7</b>	0,66	0,66	0,66	0,66	-	-	-	-
<b>Rf8</b>	0,84	-	0,84	0,84	0,81	-	-	-
<b>Rf9</b>	0,86	-	0,86	0,86	-	0,87	-	0,89

EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; AC: Ácido Cafeico; Q: Quercetina; L:Luteolina-7-O-glicosideo; K:Kaempferol.

Fonte: Autoria própria.

Na pesquisa de triterpenos e esteroides (Figura 46), nas cromatoplasas foram eluídas com fase móvel de características apolares (tolueno: acetato de etila; 90:10, v/v), e reveladas com reagente de Lieberman Burchard. Após revelação, podem ser visualizadas bandas correspondentes a estes compostos na matéria prima com grande intensidade. Já no extrato bruto e nas frações acetato de etila são visualizadas bandas com pouquíssima intensidade e na fração hexano podem ser observadas manchas mais intensas evidenciando o enriquecimento da fração hexano por compostos lipofílicos. Não foram encontrados resultados positivos na fração aquosa devido a natureza lipofílica dos compostos triterpênicos/esteroidais. Na matéria prima (Figura 46A) e fração hexânica (Figura 46B) podem ser observadas claramente bandas correspondentes ao padrão  $\beta$ -sitosterol, possuindo mesma coloração e Rf (0,26 MP e 0,28 FH, tabela 25). Ainda foram evidenciadas bandas de coloração azulada/esverdeada que podem corresponder a outros compostos de origem esteroidal e bandas avermelhadas que podem corresponder a substâncias de origem triterpênica. Essas colorações são causadas pela acetilação dos compostos esteroidais/triterpênicos pelo reagente de Lieberman.

**Figura 46** - Cromatograma para Triterpenos/Esteroides. Revelador: Lieberman, observada sob luzUV 365 nm. A: Matéria Prima; B: Extrato Bruto e Frações.



MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano;  $\beta$ : Beta sitosterol.

**Tabela 25** - Resultados em valores de Rfs para placa para pesquisa de triterpenos/esteroids. Placa revelada com reagente de Liebermann e observada sob luz UV em 365 nm.

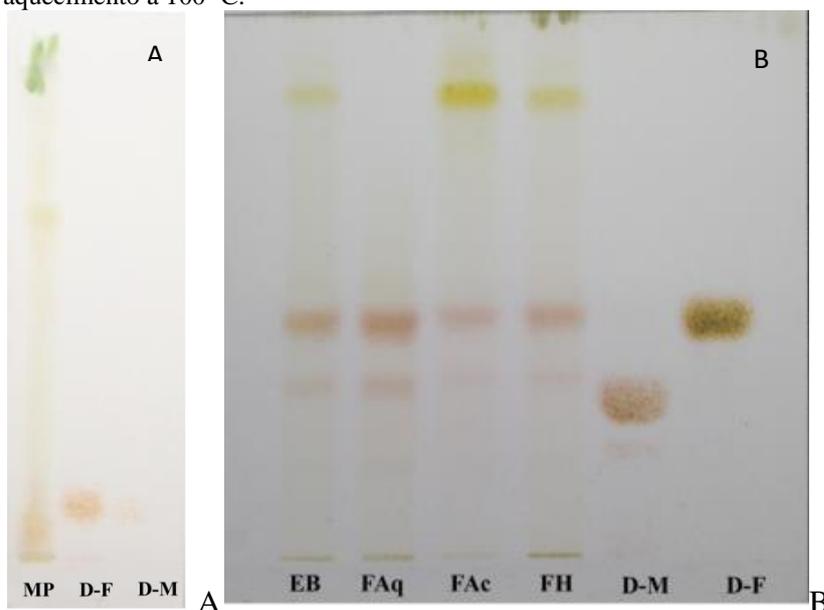
Amostra	Placa A			Placa B			
	MP	$\beta$	EB	FAq	FAC	FH	B
<b>Rf1</b>	0,08	-	0,08	-	0,08	0,08	-
<b>Rf2</b>	0,12	-	0,15	-	-	0,15	-
<b>Rf3</b>	0,15	-	0,28	-	0,28	0,28	0,28
<b>Rf4</b>	0,20	-	-	-	-	0,34	-
<b>Rf5</b>	0,24	-	0,42	-	-	0,42	-
<b>Rf6</b>	0,26	0,26	-	-	-	0,46	-
<b>Rf7</b>	0,28	-	0,51	-	-	0,51	-
<b>Rf8</b>	0,31	-	0,60	-	-	0,60	-
<b>Rf9</b>	0,34	-	-	-	-	-	-
<b>Rf10</b>	0,37	-	-	-	-	-	-
<b>Rf11</b>	0,42	-	-	-	-	-	-

MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAC: Fração acetato; FH: Fração hexano;  $\beta$  : Beta sitosterol.

Fonte: Autoria própria.

Os cromatogramas obtidos para açúcares redutores (Figura 47) apresentam uma série de bandas de coloração rósea em todas as amostras (matéria prima, figura 47A e extrato bruto e frações, figura 47B), possuindo menor intensidade na matéria prima e maior intensidade no extrato bruto e principalmente na fração aquosa, o que ocorre devido à natureza hidrofílica dos açúcares. A menor intensidade das bandas na matéria prima pode ter ocorrido devido à extração em metanol. A presença destas substâncias no extrato bruto pode ser explicada pelo método extrativo, que apesar de utilizar acetona como solvente extrator, o rompimento do tecido da matéria prima pode ter levado a extração destas substâncias. Foram utilizados os padrões D-maltose e D-frutose, onde todas as amostras apresentaram bandas de coloração e Rfs semelhantes aos padrões (Tabela 26). Além de outras bandas fracamente visualizadas devido à baixa concentração destes compostos.

**Figura 47** - Cromatograma para açúcares redutores. A – Extrato bruto e Frações; B – Matéria Prima. Revelador: Timol seguido de aquecimento a 100 °C.



MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; D-M: D-Maltose; D-F: D-Frutose.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 26** - Resultados em valores de Rfs para placa para pesquisa de açúcares redutores. Placa revelada com timol e observada sob luz visível.

Amostra	Placa A			Placa B					
	MP	D-F	D-M	EB	FAq	FAc	FH	D-M	D-F
<b>Rf1</b>	0,10	-	-	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	-
<b>Rf2</b>	0,13	0,15	0,14	0,44	0,44	0,45	0,45	-	0,46
<b>Rf3</b>	-	-	-	0,51	0,50	-	-	-	-
<b>Rf4</b>	-	-	-	0,86	-	0,86	0,86	-	-
<b>Rf5</b>	-	-	-	0,92	-	0,92	0,92	-	-

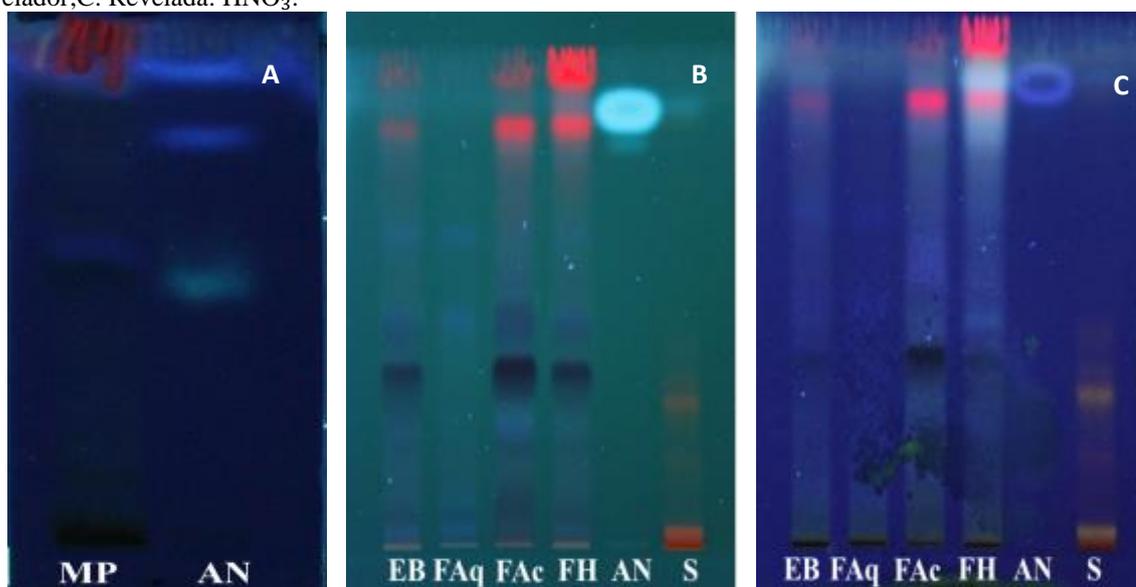
MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; D-M: D-Maltose; D-F: D-Frutose.

Fonte: Autoria própria.

Na cromatoplaça para a matéria prima (figura 48 A) é possível observar banda de mesma coloração do padrão antraquinona após revelação com ácido nítrico, semelhantes ao do padrão, porém não apresentou Rf semelhante. Neste caso apenas a coloração indica a presença destas substâncias na amostra. Na figura 48B pode ser observada a fotografia obtida para o cromatogramapara extrato bruto e frações, no qual são visualizadas bandas presentes no extrato bruto e frações acetato (fracamente visualizadas) e hexano, com Rf correspondente ao padrão antraquinona e duas bandas correspondentes aos padrões senosídeos A e B no canto inferior direito da placa, com baixa intensidade. Após a utilização do ácido nítrico como

revelador (Figura 48C) as bandas com Rf semelhantes ao padrão antraquinona tornam-se mais intensas sugerindo a presença de derivados antracênicos nas amostras. Os Rfs podem ser verificados na tabela 27.

**Figura 48** - Cromatogramas para derivados antracênicos. A: Matéria prima; B: Extrato bruto e frações sem revelador; C: Revelada: HNO<sub>3</sub>.



MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; NA: Antraquinona; S: Senosídeos A e B.  
Fonte: Autoria própria.

**Tabela 27** - Resultados em valores de Rfs para placa para pesquisa de derivados antracênicos. Placa revelada com ácido nítrico e observada sob luz UV em 365 nm.

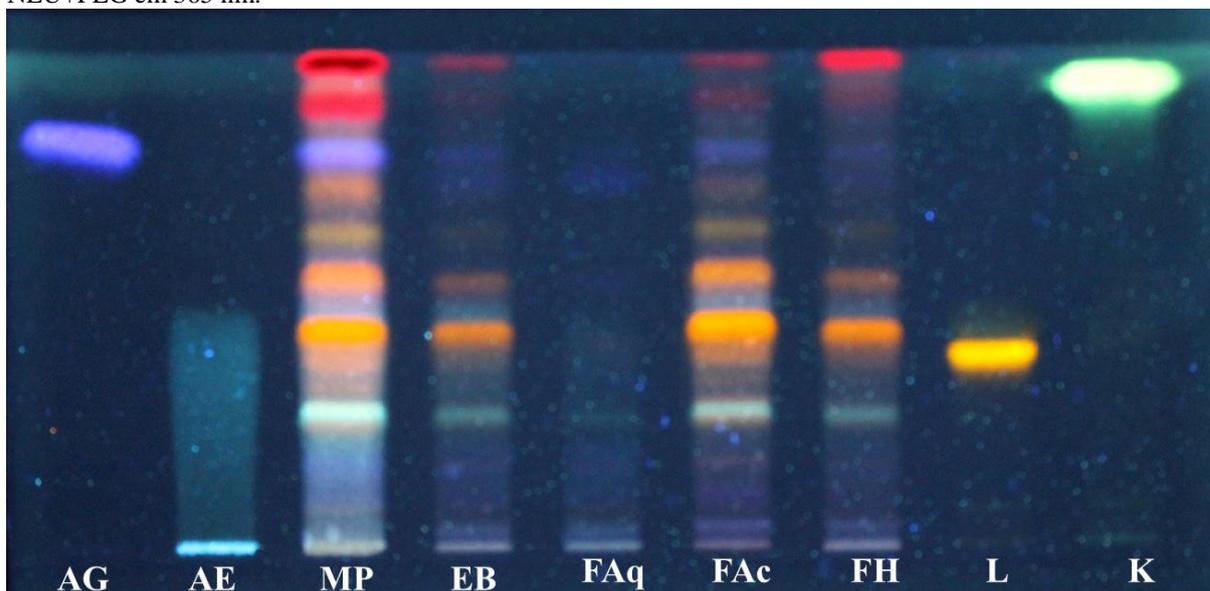
Amostra	Placa A		Placa BC					Senosídeos A e B
	MP	na	EB	FAq	FAc	FH	AN	
<b>Rf1</b>	-	-	-	-	-	-	-	0,15
<b>Rf2</b>	-	-	-	-	-	-	-	0,29
<b>Rf3</b>	-	-	0,36	-	0,36	0,35	-	-
<b>Rf4</b>	0,56	0,51	0,64	0,63	-	0,64	-	-
<b>Rf5</b>	-	-	0,81	-	0,81	0,81	-	-
<b>Rf6</b>	-	0,79	0,84	-	0,84	0,84	-	-
<b>Rf7</b>	0,89	0,89	0,88	-	0,88	0,88	0,88	-

MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; NA: Antraquinona; S: Senosídeos A e B.  
Fonte: Autoria própria.

### Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE)

Após a obtenção dos perfis químicos relativos aos mais importantes metabólitos das folhas de *E. uniflora*, foi obtido o *fingerprint* por CCD-AE das diferentes matrizes estudadas (matéria prima, extrato bruto e frações) visando auxiliar a identificação da espécie como referência a ser utilizada devido à presença das substâncias marcadoras na espécie visualizadas. Neste sentido, o *fingerprint* baseou-se na pesquisa de taninos e flavonoides, tendo como revelador o reagente natural A (NEU) + PEG. Na figura 49 é possível observar o cromatograma contendo a matéria prima, extrato bruto e frações das folhas de *Eugenia uniflora*, além dos padrões de taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico) e de flavonoides (luteolina-O-glicosídeo e Kaempferol). Os Rfs das amostras estão resumidos na tabela 28. Este cromatograma realizado em CCD-AE, quando comparado aos obtidos anteriormente por CCD convencional, apresenta eficiência muito superior, evidenciando bandas que aparentemente foram sobrepostas nos cromatogramas anteriores. Esta maior eficiência está relacionada com a fase estacionária utilizada, que possui tamanhos de partículas menores que as utilizadas convencionalmente, o que aumenta a superfície de contato e a capacidade de separação.

**Figura 49** - Cromatograma para taninos e flavonoides da matéria prima, extrato bruto e frações. Revelador: NEU+PEG em 365 nm.



AE: Ácido Elágico; AG: Ácido Gálico; MP: Matéria prima; EB: Extrato Bruto; FAq: Fração aquosa; FAc: Fração acetato; FH: Fração hexano; AC: Ácido Cafeico; L: Luteolina-7-O-glicosídeo; K: Kaempferol.  
Fonte: Autoria própria.

**Tabela 28** - Resultados em valores de Rfs para *fingerprint* de taninos e flavonóides. Placa revelada com NEU PEG e observada sob luz UV em 365 nm.

<b>Amostra</b>	<b>AG</b>	<b>AE</b>	<b>MP</b>	<b>EB</b>	<b>FAq</b>	<b>FAc</b>	<b>FH</b>	<b>L</b>	<b>K</b>
<b>Rf1</b>		-	0,22	0,18	0,05	0,18	0,18	-	-
<b>Rf2</b>	-	-	0,30	0,24	0,24	0,24	0,24	-	-
<b>Rf3</b>	-	-	0,39	0,41	-	0,41	0,41	-	-
<b>Rf4</b>	-	-	0,49	0,47	-	0,47	0,47	-	-
<b>Rf5</b>	-	-	0,52	0,56	-	0,56	0,56	-	-
<b>Rf6</b>	-	0,54	0,54	0,66	-	0,66	0,66	0,45	-
<b>Rf7</b>	-	-	0,59	-	-	0,75	-	-	0,94
<b>Rf8</b>	-	-	0,84	0,84	0,80	0,84	0,84	-	-
<b>Rf9</b>	0,85	-	0,95	0,95	-	0,95	0,95	-	-

Fonte: Autoria própria.

#### 5.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

A impressão digital cromatográfica é um método de identificação abrangente e capaz de revelar uma grande quantidade informações químicas de extratos vegetais. Essa abordagem tem o potencial para caracterizar/identificar os componentes marcadores e os componentes desconhecidos num sistema complexo. Algumas agências regulatórias, como Food and Drug Administration (FDA) e European Medicines Agency (EMA), já exigem *fingerprints* cromatográficos para identificação e determinação da qualidade do material vegetal. Além disso, relatos da literatura sugerem que todos os cromatogramas de espécies medicinais sejam avaliados pelas suas similaridades e diferenças. Entre as diversas técnicas utilizadas para a obtenção de impressões digitais cromatográficas e avaliação qualitativa e autenticação de produtos de origem vegetal, os *fingerprints* obtidos por CLAE são os mais amplamente utilizados devido à seletividade e sensibilidade da técnica (GU et al., 2004; LI et al., 2010; MA et al., 2011; LI et al., 2015).

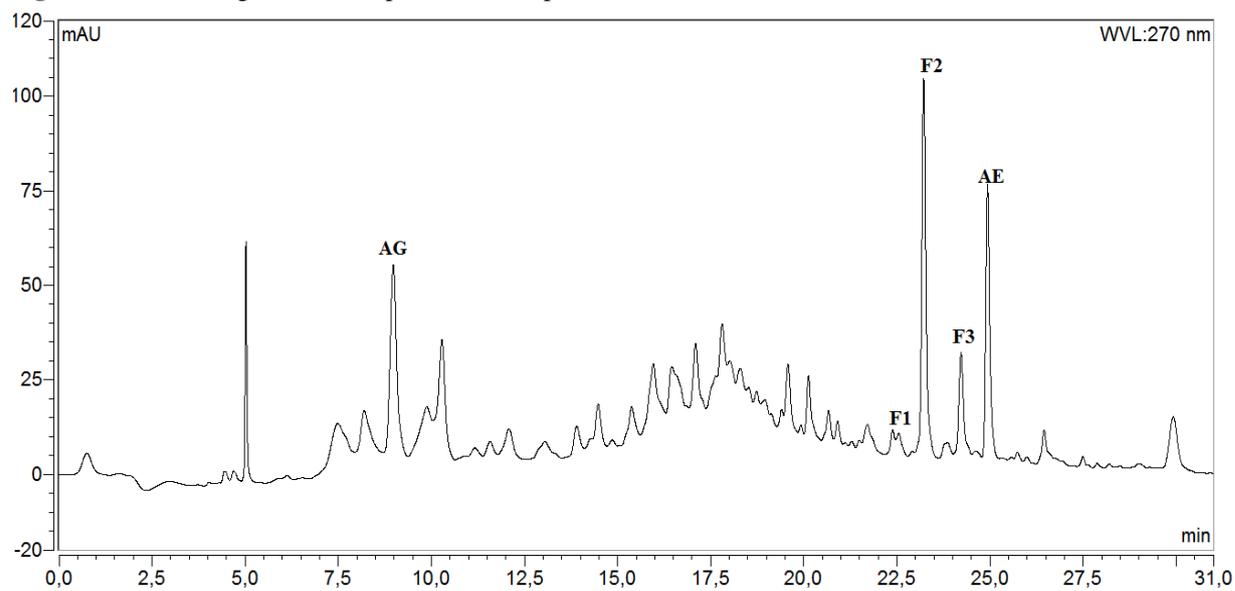
Nas análises das matrizes provenientes da pitanga, as regiões de similaridades são principalmente encontradas nos intervalos de 7 a 11 e de 22 a 27 minutos, como pode ser observado nas figuras 50-53 e 54. Nestas regiões dos cromatogramas podem ser detectadas as substâncias majoritárias da espécie. Além dos ácidos gálico e elágico, podem ser observados picos cujos espectros correspondem a flavonoides.

Dentre os flavonoides relatados por Schmeda-Hirshmann em 1987, nas folhas da pitangueira encontram-se quercetina, quercitrina e miricetina. Diante dos flavonoides encontrados através dos ensaios por CLAE e dos relatos dos flavonoides para a espécie, foi realizada uma comparação dos espectros de flavonoides encontrados e os espectros relatados na literatura, a fim de confirmar a presença das substâncias descritas.

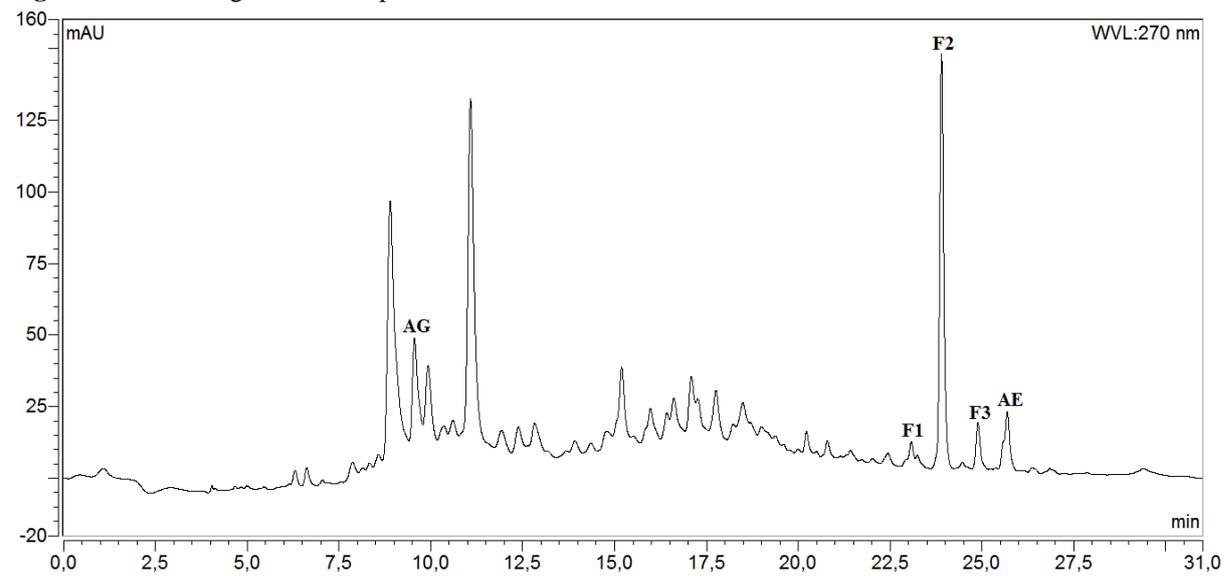
Perante os resultados obtidos pelas amostras, os espectros dos flavonoides encontrados não correspondem aos dados apresentados na literatura para a quercetina (MABRY, 1970). Confirmando os resultados obtidos anteriormente por CCD. O espectro do flavonoide quercitrina, também relatado para a espécie, possui espectros com máximos de 265 e 350 nm (MABRY, 1970), o que o torna bastante semelhante ao terceiro flavonoide observado nas amostras, de acordo com a ordem de detecção, nomeado F3 que possui máximos de 265 e 352 nm. O que sugere que este composto seja semelhante a quercitrina ou que possa se tratar da quercitrina. O último flavonoide relatado para a espécie, miricetina, também difere nos máximos observados nas amostras, possuindo maior absorção nas regiões de 254 e 374 nm.

Avaliação dos espectros de varredura presentes na literatura não indicou quais substâncias os flavonoides 1 e 2, podem ser. Já que os espectros obtidos não foram compatíveis com as substâncias relatadas para a espécie. Porém, uma enorme variedade de derivados e glicosídeos destas substâncias está disponível na natureza, o que não descarta a possibilidade de flavonoides derivados da quercetina e miricetina estarem presentes nas amostras.

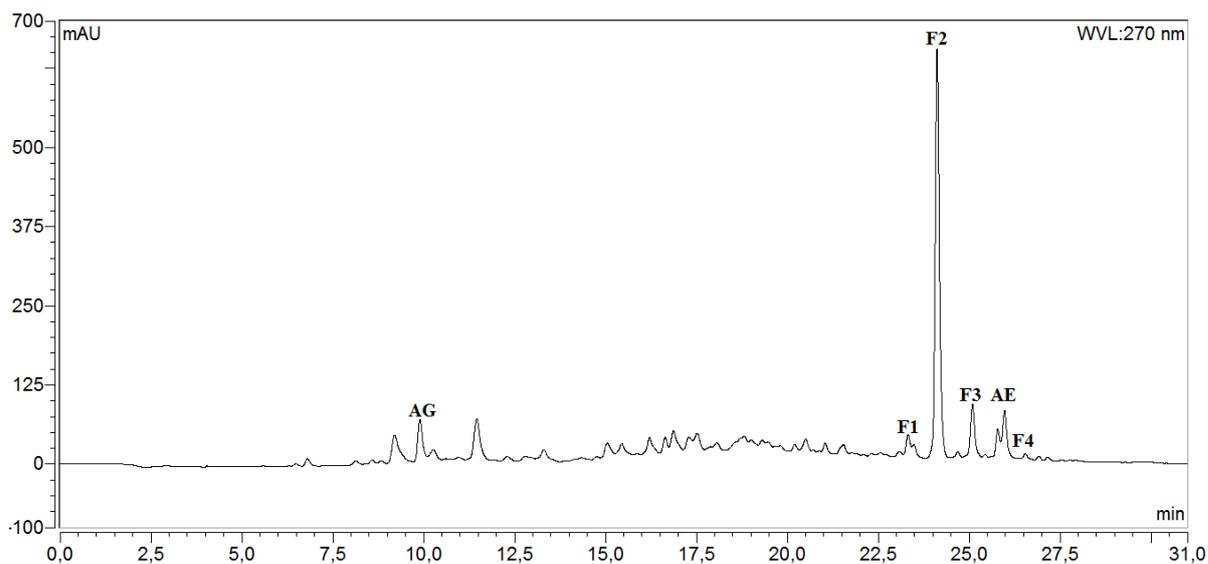
Nas amostras, ainda pode ser encontrado o ácido gálico ( $\lambda_{\text{max}}=270$  nm), com aproximadamente 8,6 min de tempo de retenção, encontrado em pequena quantidade nas matrizes estudadas. A partir destes perfis obtidos para as amostras é possível realizar a identificação das amostras a partir das semelhanças e diferenças com os cromatogramas obtidos. Além disso, a determinação das semelhanças é essencial para a caracterização dos perfis típicos, pois estas regiões de similaridades evidenciam a presença das substâncias marcadoras essenciais para atividades da espécie. Os *fingerprints* por CLAE podem ainda oferecer informações quali e quantitativas que suportem a padronização do material vegetal, assegurando sua eficácia terapêutica. Para isso são necessários estudos farmacológicos que estabeleçam relações entre as substâncias presentes nas amostras e dados quantitativos destas substâncias.

**Figura 50** - Cromatograma obtido para a matéria prima.

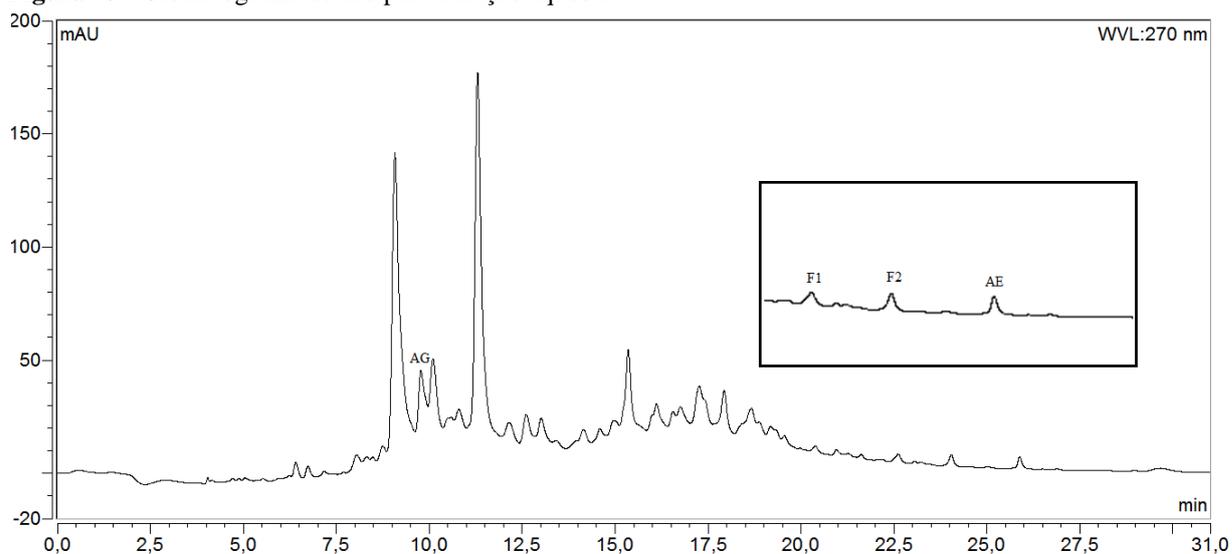
Fonte: Autoria própria.

**Figura 51** - Cromatograma obtido para o extrato bruto.

Fonte: Autoria própria.

**Figura 52** - Cromatograma obtido para a fração acetato.

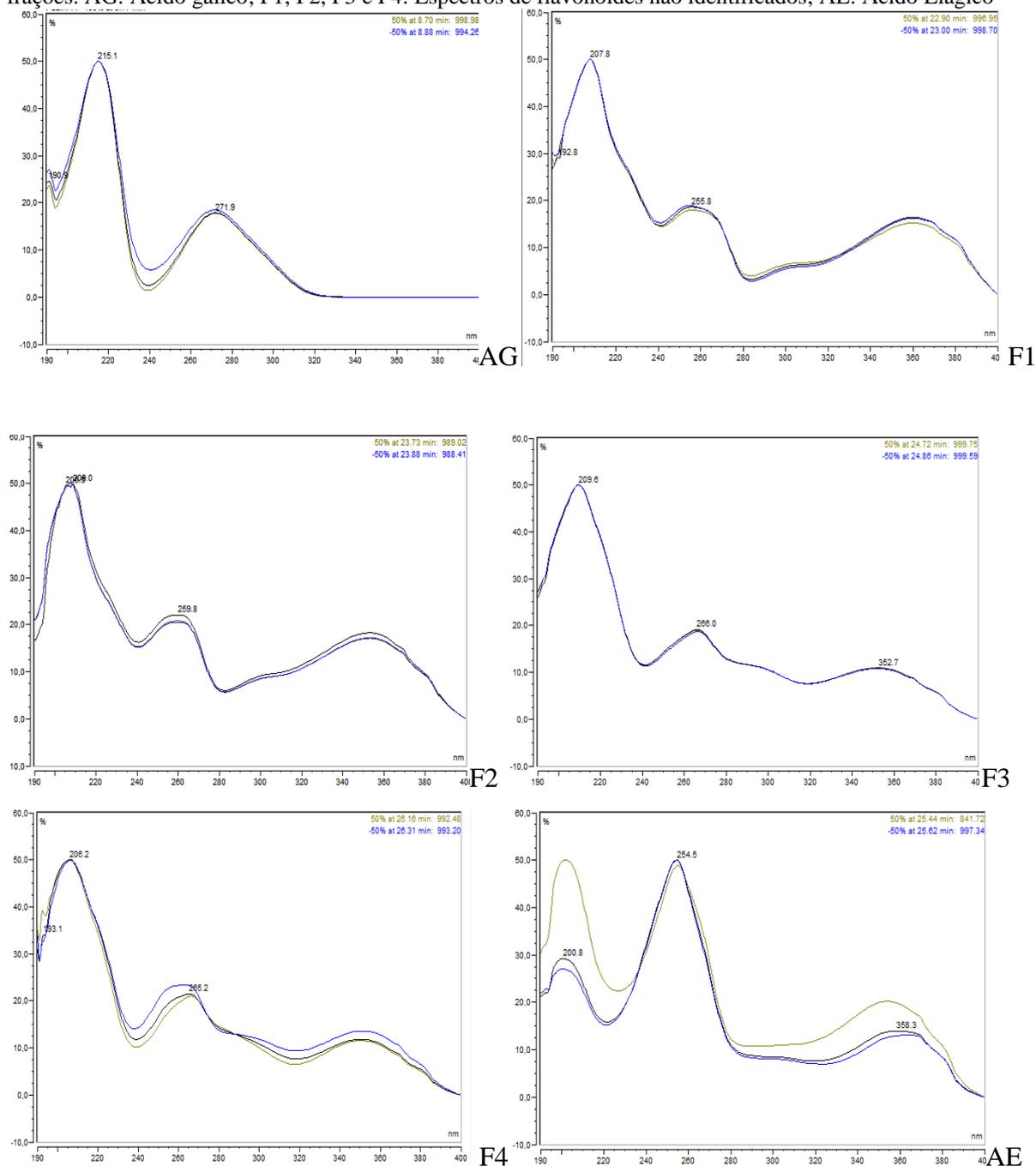
Fonte: Autoria própria.

**Figura 53** - Cromatograma obtido para a fração aquosa.

Fonte: Autoria própria.

A fração aquosa possui áreas muito pequenas de algumas das substâncias de interesse (flavonoides e ácido elágico), devido às baixas concentrações de substâncias lipofílicas nesta fração, o que dificulta sua detecção. Como esperado, no intervalo de tempo de retenção de 7 a 11 minutos estão localizados os picos correspondentes as substâncias de maior polaridade, dentre elas o ácido gálico, uma das substâncias marcadoras da espécie.

**Figura 54** - Espectros de absorção de varredura das substâncias presentes na matéria prima, extrato bruto e frações. AG: Ácido gálico; F1, F2, F3 e F4: Espectros de flavonoides não identificados; AE: Ácido Elágico



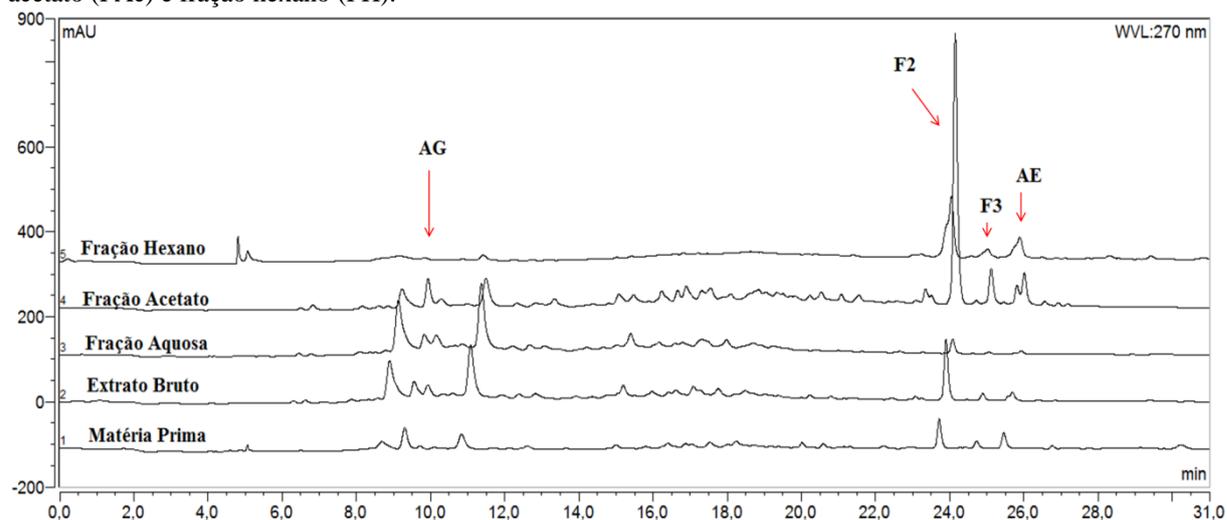
Fonte: Autoria própria.

É possível observar na figura 55 as regiões de semelhança entre os extratos a partir da sobreposição dos cromatogramas, como esperado na análise de derivados da mesma matriz. Em contrapartida, estas zonas de similaridade poderão ser tomadas como referência quando forem comparadas a diferentes amostras de *E. uniflora*.

As semelhanças presentes entre a matéria prima e o extrato bruto e frações podem ser melhor observadas individualmente, pois a matéria prima possui áreas muito menores que o

extrato bruto e suas frações, devido à fatores de preparação da amostra (método extrativo, diluição), o que acaba por dificultar a visualização quando os cromatogramas estão sobrepostos. Esta dificuldade não é encontrada entre o extrato bruto e suas frações, onde as semelhanças são facilmente visualizadas nos intervalos de 7-11 e de 22-27 minutos.

**Figura 55** - Cromatogramas sobrepostos da matéria prima (MP), extrato bruto (EB), fração aquosa (FAq), fração acetato (FAc) e fração hexano (FH).



Fonte: Autoria própria.

#### 5.4.3 Aplicação de fingerprints cromatográficos na identificação de diferentes amostras de extratos brutos de *Eugenia uniflora* L.

Os *fingerprints* vêm sendo utilizados como uma ferramenta bastante eficaz na identificação e controle de qualidade de espécies vegetais. Isso ocorre devido ao perfil de substâncias que o *fingerprint* oferece, pois normalmente as atividades de uma espécie vegetal de uso medicinal estão relacionadas com a atuação da matriz complexa, contendo diversas substâncias que atuam sinergicamente em um ou diversos receptores ao mesmo tempo. Nesse contexto, o perfil químico típico oferece uma imagem completa das substâncias que compõem a matriz, evidenciando as substâncias que possuem atividade farmacológica (LIANG et al., 2004; ZHANG et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2012).

Neste sentido, foram realizados ensaios comparativos em diferentes amostras de extratos brutos das folhas de pitanga com o objetivo de realizar o controle da qualidade das amostras atestando sua identidade através de *fingerprints* cromatográficos por CCD-

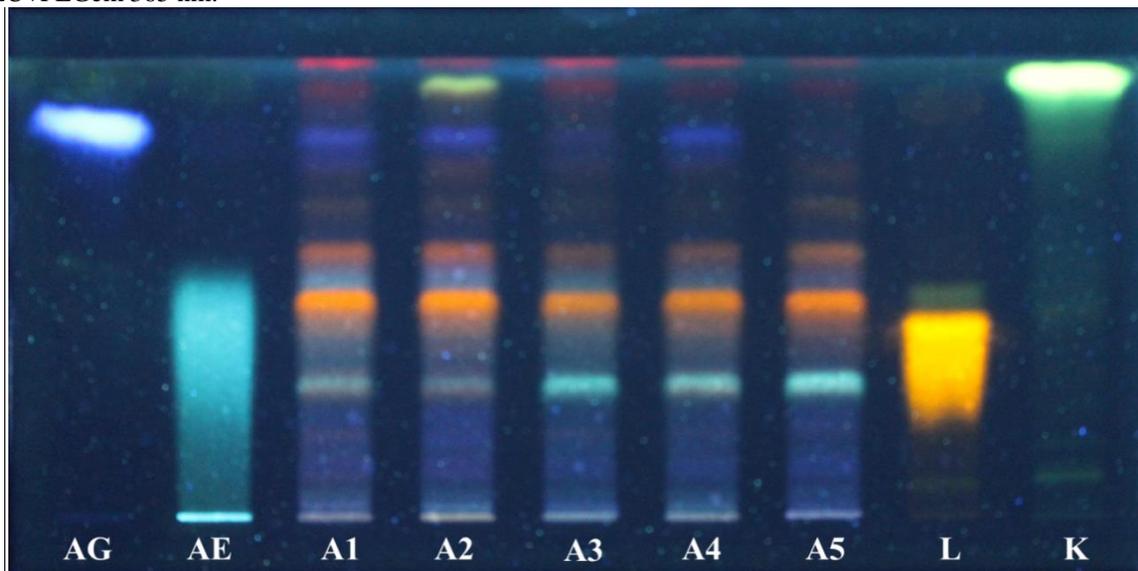
AE e CLAE-DAD. A amostra tomada como referência foi coletada em Porto de Galinhas (PE) identificada no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e utilizada em todas as metodologias utilizadas neste trabalho. As amostras comparadas com a referência foram coletadas em outros municípios de Pernambuco (Olinda – A2, Recife – A3, Paulista – A4 e Camaragibe – A5), e submetidas aos mesmos processos de estabilização e extração que a amostra 1, sendo obtidos quatro diferentes extratos brutos para a comparação com a amostra de referência.

Para a realização da CCD-AE, foram utilizadas as mesmas condições utilizadas no *fingerprint* de polifenóis, com aplicação dos padrões: ácido gálico, ácido elágico (taninos hidrolisáveis) e luteolina e kaempferol (flavonoides) e revelação com reagente natural A (NEU) seguido de PEG. Na figura 56 pode ser observado o cromatograma para as diferentes amostras de extrato bruto das folhas de pitanga.

Em relação aos taninos, são evidenciadas bandas azuladas referentes aos padrões de ácido gálico e elágico, bandas correspondentes a estas substâncias em todas as amostras. As manchas apresentam diferentes intensidades nas amostras, o que indica distintos graus de concentração. O cromatograma torna evidente que as amostras 3 e 5 possuem quantidades menores destas substâncias dado a menor intensidade das bandas relativas a elas.

Neste mesmo cromatograma, são visualizadas bandas relativas aos padrões utilizados para flavonoides. Um heterosídeo, luteolina-7-O-glicosídeo que apresenta coloração amarela/alaranjada e uma aglicona, Kaempferol de coloração esverdeada. Estas substâncias servem de referência, indicando a presença de heterosídeos e agliconas na amostra de acordo com o fator de retenção exibido. Nas amostras é possível identificar bandas relativas aos flavonoides com colorações que variam do amarelo ao laranja, totalizando ao menos 5 bandas com diferentes intensidades. As bandas apresentam Rf distintos, algumas assemelhando-se ao padrão luteolina.

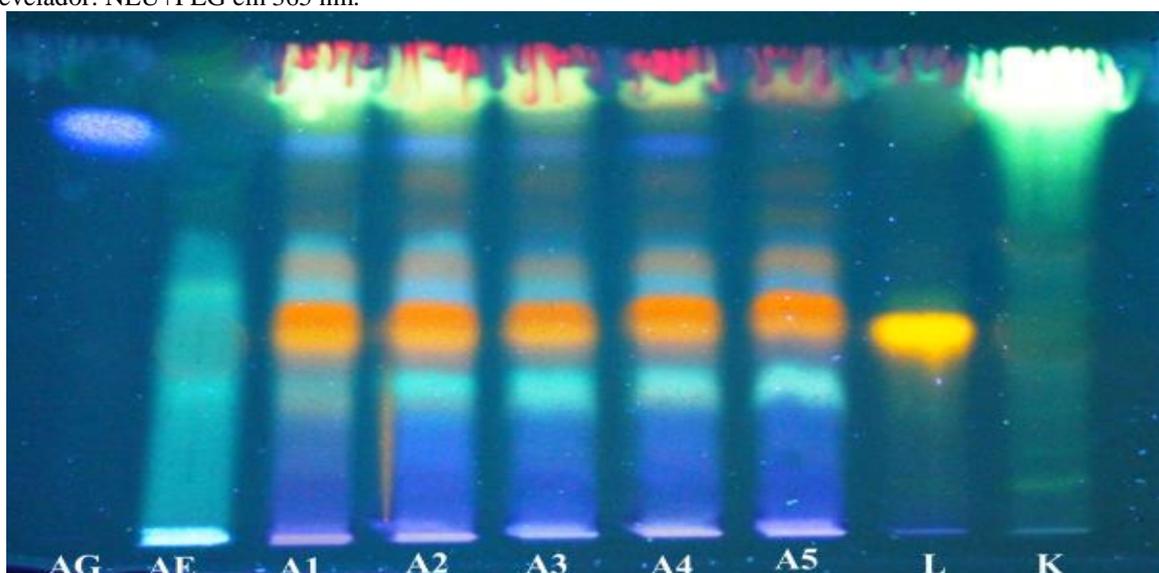
**Figura 56** - Fingerprint por CCD-AE para diferentes amostras de extrato bruto de *E. uniflora*. Revelador: NEU+PEGem 365 nm.



Fonte: Autoria própria.

Através dos resultados obtidos, pôde-se concluir que as amostras apresentaram o mesmo perfil para taninos e flavonoides, evidenciando as mesmas bandas, apenas com diferentes intensidades. Com excessão da amostra 2, que apesar de conter o mesmo perfil, apresenta uma banda amarelada junto ao fronte de eluição, que não foi exibida pelas outras amostras. Além disso, é possível verificar a eficiência da separação dos componentes dos extratos brutos pela CCD-AE. As bandas possuem maior separação e resolução do que a CCD convencional (Figura 57), evidenciando com maior clareza as bandas.

**Figura 57** - Fingerprint por CCD convencional para diferentes amostras de extrato bruto de *E. uniflora*. Revelador: NEU+PEG em 365 nm.



Fonte: Autoria própria.

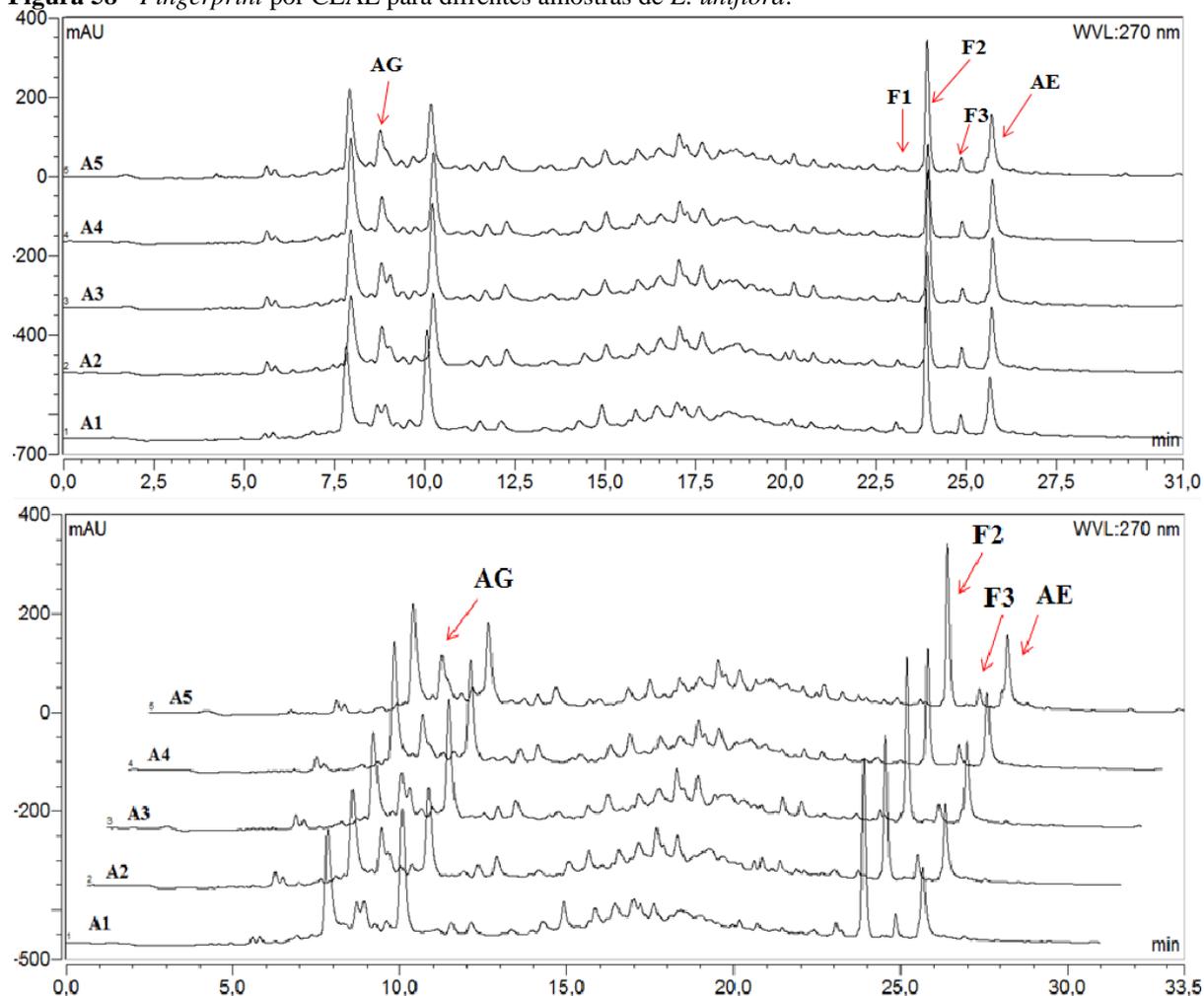
Com o *fingerprint* por CLAE (Figura 58), foi possível observar similaridades entre as amostras, inclusive comparar tempos de retenção e espectros de varredura das substâncias presentes nas amostras de diferentes localizações. Nesta análise foram encontrados em média 30 picos em comum nas amostras. Além disso, foram evidenciadas as presenças de ácido gálico, ácido elágico e dos flavonoides 1, 2 e 3, com diferentes concentrações, porém sempre com o mesmo perfil. É possível observar nos cromatogramas, as regiões de similaridades nos intervalos de tempo de 7-11 min e de 22-27 min, como o determinado na amostra de referência. Neste sentido, as substâncias encontradas nestes intervalos, foram eleitas como “picos característicos de *fingerprint*” nesta espécie, pois representam as principais características apresentadas pelas amostras. Incluindo a presença das substâncias marcadoras (ácido gálico e elágico, além dos flavonoides) (MA et al., 2011; LI et al., 2015).

Como pode ser observado nos cromatogramas, a maioria dos picos evidenciados na amostra de referência também foram observados nas outras amostras. Este achado permite a confirmação das identidades das amostras 2, 3, 4 e 5 como provenientes de folhas de *Eugenia uniflora*. Comprovando a existência do perfil químico com as mesmas características da amostra de referência. Esta semelhança obtida nos fingerprints por CCD-AE e CLAE podem estar correlacionadas com a origem das amostras, pois as cinco amostras adquiridas para análise foram provenientes de regiões litorâneas do estado de Pernambuco. O que indica que estas amostras possuem praticamente a mesma influência de fatores climáticos, o que acarretou em pequenas variações na produção de metabólitos, as quais não comprometeram o perfil cromatográfico das diferentes amostras de *E. uniflora*.

Estes resultados apontam que os *fingerprints* por CCD-AE e CLAE fornecem uma ferramenta simples e útil na identificação de espécies vegetais. Além disso, o perfil químico evidenciado pode fornecer dados para a padronização e suporte às atividades terapêuticas das espécies vegetais.

Assim, diante das diversas atividades farmacológicas da pitangueira relacionadas à presença de taninos e flavonoides, estes *fingerprints* podem ser considerados como referência no controle de qualidade de matérias primas e derivados vegetais provenientes das folhas de pitanga.

**Figura 58** - *Fingerprint* por CLAE para diferentes amostras de *E. uniflora*.



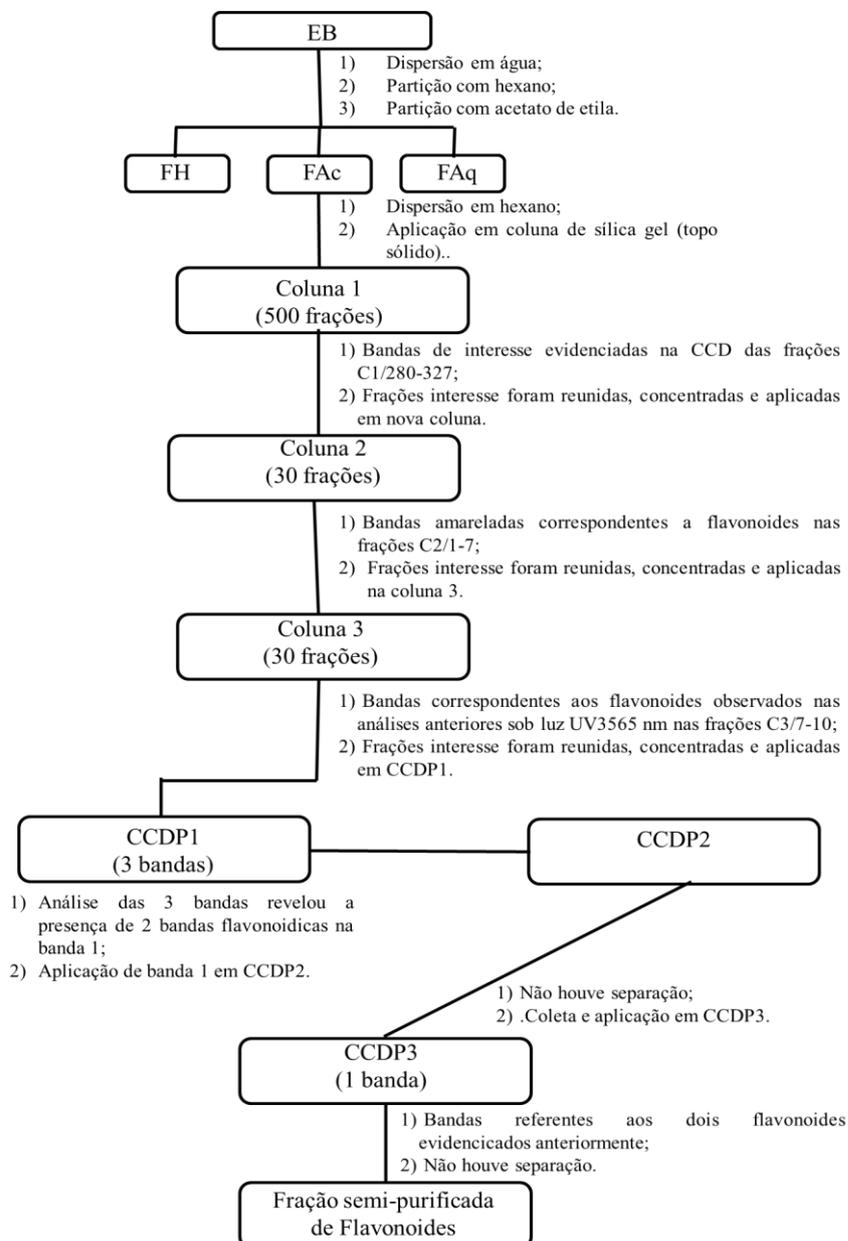
Fonte: Autoria própria.

## 5.5 FRACIONAMENTO PRELIMINAR DOS CONSTITUINTES DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L.

O processo de purificação de substâncias presentes em espécies vegetais, uma das principais vertentes da fitoquímica, é um procedimento demorado, dispendioso e com muitas etapas operacionais. Para obtenção de substâncias com a pureza necessária para a elucidação estrutural, é preciso aplicar mais de uma técnica de separação. O que torna o isolamento de substâncias muito difícil, principalmente devido às pequenas concentrações das substâncias nos vegetais (HARBORNE, 1984; CARMONA; PEREIRA, 2013). Para a investigação dos constituintes presentes nas folhas de *E. uniflora* foi realizado um fracionamento utilizando

diferentes processos cromatográficos, incluindo cromatografias em coluna e de camada delgada preparativa, seguindo o fluxograma abaixo (esquema 3):

**Esquema 3** - Sequência de fracionamento das substâncias presentes nas folhas de *Eugenia uniflora*.



### 5.5.1 Cromatografia em coluna aberta com gel de sílica (1)

Os estudos preliminares para obtenção dos compostos flavonoídicos das folhas de *E. uniflora* foram inicialmente conduzidos por cromatografia em coluna empregando gel de sílica como fase estacionária a partir da fração acetato de etila. A eluição foi realizada com hexano, diclorometano, etanol e misturas dos mesmos, sempre com polaridade crescente. Este

sistema com fase estacionária de características polares e fases móveis de serie eluotrópica crescente de polaridade (hexano → hexano:diclorometano → diclorometano → diclorometano:etanol → etanol) foi baseado no fracionamento de extratos provenientes de *E. uniflora* realizado por Schmeda Hirschmann (1987). Sistemas semelhantes também foram utilizados em outras metodologias para isolamento de flavonoides (BELTRAME et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003). Embora muitos relatos tragam o clorofórmio como um dos solventes, em nosso estudo o reagente foi substituído por diclorometano em razão da similaridade da força eluição, conforme parâmetro de polaridade de Snyder: 0,40 e 0,42 para o clorofórmio e diclorometano, respectivamente (COLLINS et al., 2010).

O fracionamento resultou em 500 frações recolhidas em tubos de ensaio. As frações foram analisadas por espectrofotometria e CCD. A análise por espectrofotometria foi feita através de varredura de 200 a 900 nm, e foram avaliados máximos e bandas existentes nas frações. As frações também foram analisadas por CCD, onde foram aplicadas através de capilares, alíquotas das frações obtidas, eluidas com fase móvel 90:5:5 e avaliadas sob luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. A análise por CCD se destaca por conseguir evidenciar a presença de diversas substâncias, sendo muito mais discriminativa que a análise por UV, que apenas permite a visualização de bandas sobrepostas em um único espectro. Além disso, a utilização de reveladores nas CCDs permitem ainda a identificação dos compostos de interesse. Após estas análises as frações semelhantes foram reunidas.

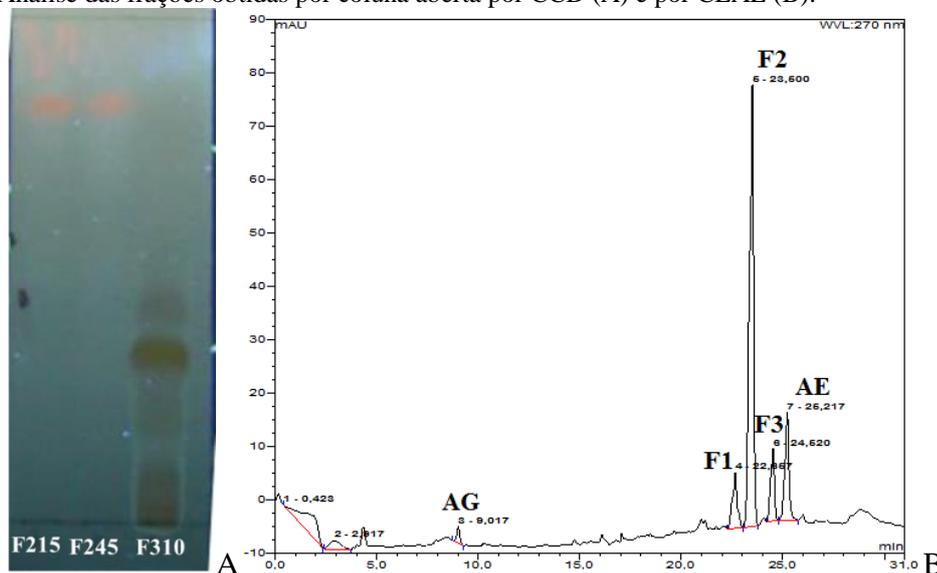
Nas frações hexano e hexano:diclorometano não foram encontradas as substâncias de interesse (polifenóis) nas avaliações por CCD e UV. Mas foi possível observar nas frações obtidas com as fases móveis de diclorometano:etanol (a partir da proporção 90:10) primeiramente por UV, a presença de bandas e máximos de absorção nas faixas de 270 e 400 nm, que serviram como guia para verificação da presença de substâncias. Em seguida as análises por CCD evidenciaram a presença de diversas manchas, algumas relativas as substâncias de interesse.

Na análise por CCD, bandas avermelhadas foram verificadas nas frações 215 e 245 (fase móvel de 90:10 diclorometano:etanol), estas bandas podem ser substâncias derivadas de clorofila, um pigmento presente em folhas que possui esta coloração sob luz UV. Estes resultados corroboram com os dados obtidos pela análise destas frações por espectrofotometria, na qual foi possível observar bandas com máximos de absorção nos comprimentos de onda de 410, 506, 540, 610 e 667 nm, de forma similar a apresentada por espectros de varredura da clorofila A, em trabalho obtido por Maestrin e colaboradores

(2009). A fração 310 (fase móvel 70:30) apresentou ao menos três bandas, de coloração ligeiramente amarelada, visualizadas em luz ultravioleta 365 nm indicando a presença de flavonoides nas frações, como pode ser observado no cromatograma onde foram aplicadas estas 3 frações (Figura 59A).

As frações 245 e 310 foram avaliadas também por CLAE, e apenas a fração 310 apresentou as substâncias de interesse (taninos e flavonoides) como pode ser observado no cromatograma da figura 53A, sem revelação. Por CLAE (Figura 59B) foram identificados o ácido gálico em pequenas concentrações, os flavonoides 1, 2 e 3, além do ácido elágico, sem a presença de outras substâncias que podem ser observadas na FAc. Na fração 310, é possível observar ao menos 3 bandas, que podem corresponder aos flavonoides 1, 2 e 3 observados no cromatograma por CLAE. Não foi possível identificar o ácido gálico na CCD, provavelmente devido à sua baixa concentração evidenciada por CLAE, e o ácido elágico também não foi detectado apenas com iluminação UV 366, sendo necessária a revelação da placa. As frações que possuem o mesmo perfil (280 – 327) foram em seguida concentradas para posterior aplicação em outra metodologia preparativa (coluna aberta).

**Figura 59** - Análise das frações obtidas por coluna aberta por CCD (A) e por CLAE (B).

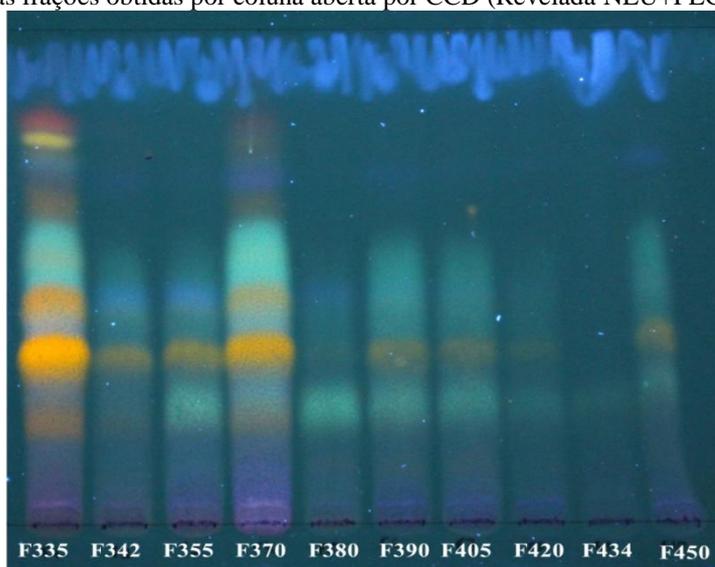


Fonte: Autoria própria.

As frações reunidas foram analisadas por CCD, o que evidenciou que as frações 335-370 possuem o mesmo perfil de substâncias em sua composição apresentando ao menos 5 bandas de coloração amarela, como pode ser observado na figura 60. As frações analisadas por CLAE e apresentaram diferentes perfis, em sua maioria com picos

correspondentes aos flavonoides e ácido elágico, de forma similar as frações anteriores, porém ausentes de ácido gálico e a presença de outras substâncias em seu perfil. Estas frações também foram reunidas, concentradas e liofilizadas para aplicação de novo processo de purificação.

**Figura 60** - Análise das frações obtidas por coluna aberta por CCD (Revelada NEU+PEG em 365 nm).



Fonte: Autoria própria.

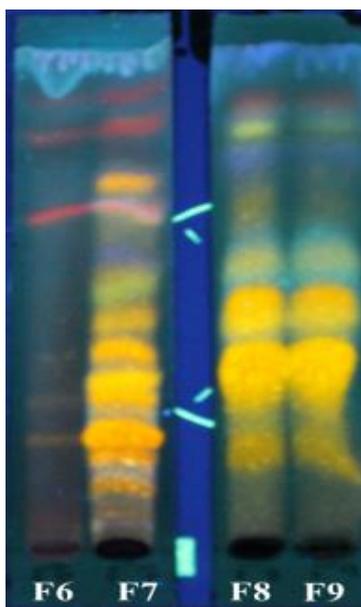
### 5.5.2 Cromatografia em coluna aberta com gel de sílica (2)

A realização da coluna aberta 1 demonstrou-se insuficiente para purificação das substâncias presentes nas folhas de pitanga nas condições utilizadas, servindo com método preliminar para o isolamento dos constituintes. A etapa seguinte, constituiu-se de nova realização de cromatografia em coluna aberta, utilizando sílica gel (nas mesmas especificações anteriores) modificando a fase móvel utilizada 100:11:11:27 (acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água) comumente utilizada em CCD. Esse sistema isocrático resultou em 30 frações, que foram analisadas por CCD. As frações 6, 7, 8 e 9 apresentaram bandas referentes aos flavonoides (substâncias de interesse) (Figura 61).

Devido a presença de mais bandas de interesse (9 bandas de coloração amarela referentes a flavonoides), as frações de 1-7 foram escolhidas para o prosseguimento do fracionamento, sendo reunidas e concentradas em evaporador rotativo para aplicação em novo sistema de eluição em cromatografia em coluna. Estas frações apresentaram mais bandas de interesse nesta etapa no que as frações recolhidas na CC1 (Figura 59), o que leva a crer que

estas substâncias estavam presentes nas frações anteriores porém em concentrações não detectáveis, o que indica que a reunião das frações de perfil semelhante, concentração e posterior aplicação na CC2 levou ao enriquecimento destas substâncias nas frações 1-7, sendo possível a visualização de mais bandas referentes aos flavonoides.

**Figura 61** - Análise de CCD em frações coletadas da coluna aberta 2, revelada com NEU + PEG visualizadas sob luz UV 366.

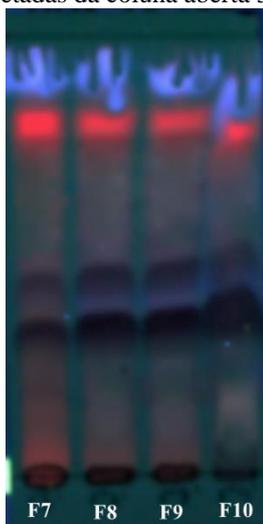


Fonte: Autoria própria.

### 5.5.3 Cromatografia em coluna aberta com gel de sílica (3)

O novo sistema de eluição iniciou-se com acetato de etila e prosseguiu com misturas acetato:etanol (variações de 10%) até proporção de 100% de etanol. Resultando em 60 frações. As frações foram analisadas por CCD e as frações 7-10 apresentaram comportamento semelhante e bandas referentes a flavonoides em comparação com outras análises por CCD, quando observadas sob luz UV 365 nm. Essas frações foram reunidas e concentradas para aplicação em CCD preparativa.

**Figura 62** - Análise de CCD em frações coletadas da coluna aberta 3, observada sob luz UV 366.



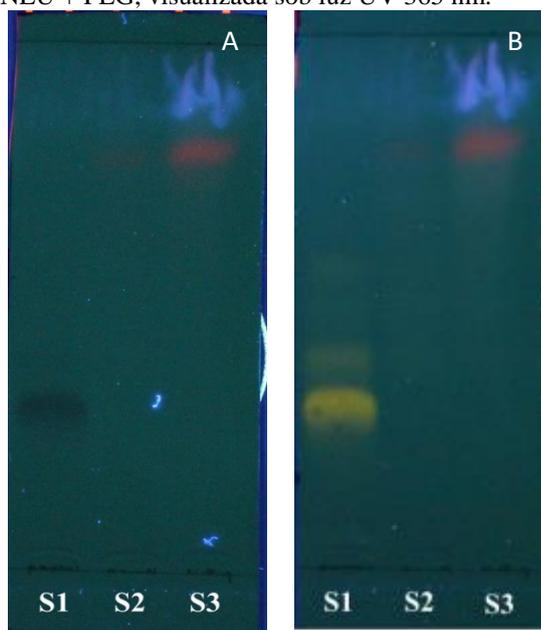
Fonte: Autoria própria.

#### 5.5.4 Cromatografia em camada delgada preparativa

A aplicação em CCD preparativa, eluída com sistema 90:5:5 (acetato de etila: ácido fórmico: água, v/v/v) , resultou em três bandas, visualizadas sob luz UV 365 nm. A placa de vidro foi em seguida raspada, onde as bandas estavam delimitadas para a coleta da sílica. A sílica coletada foi acondicionada em béqueres onde foram lavadas com metanol. As soluções resultantes foram analisadas por CCD.

As análises por CCD antes da revelação evidenciaram a presença de bandas nas soluções 1 e 3 (referentes as respectivas bandas na CCD preparativa). A solução 1 (Figura 63A) apresentou apenas uma banda, o que poderia indicar que a CCD preparativa atingiu o objetivo no isolamento dos constituintes. A solução 2 não apresentou bandas antes da revelação e a solução 3 apresentou duas bandas de coloração vermelha e azul. Após a revelação com reagente natural A (NEU) foi possível observar a presença de duas bandas amarelas correspondentes a flavonoides na solução, o que mostra que esta solução apresenta-se como uma fração semipurificada. A solução 3, após a revelação, apresentou as duas bandas já visualizadas anteriormente, porém não foi possível identificar a classe das substâncias pela coloração. A solução 2 não apresentou bandas na análise por CCD mesmo após revelação.

**Figura 63** - CCD para as soluções obtidas das bandas da CCD preparativa; A – Sem revelação, visualizada sob luz UV 365 nm ; B – revelada NEU + PEG, visualizada sob luz UV 365 nm.



Fonte: Autoria própria.

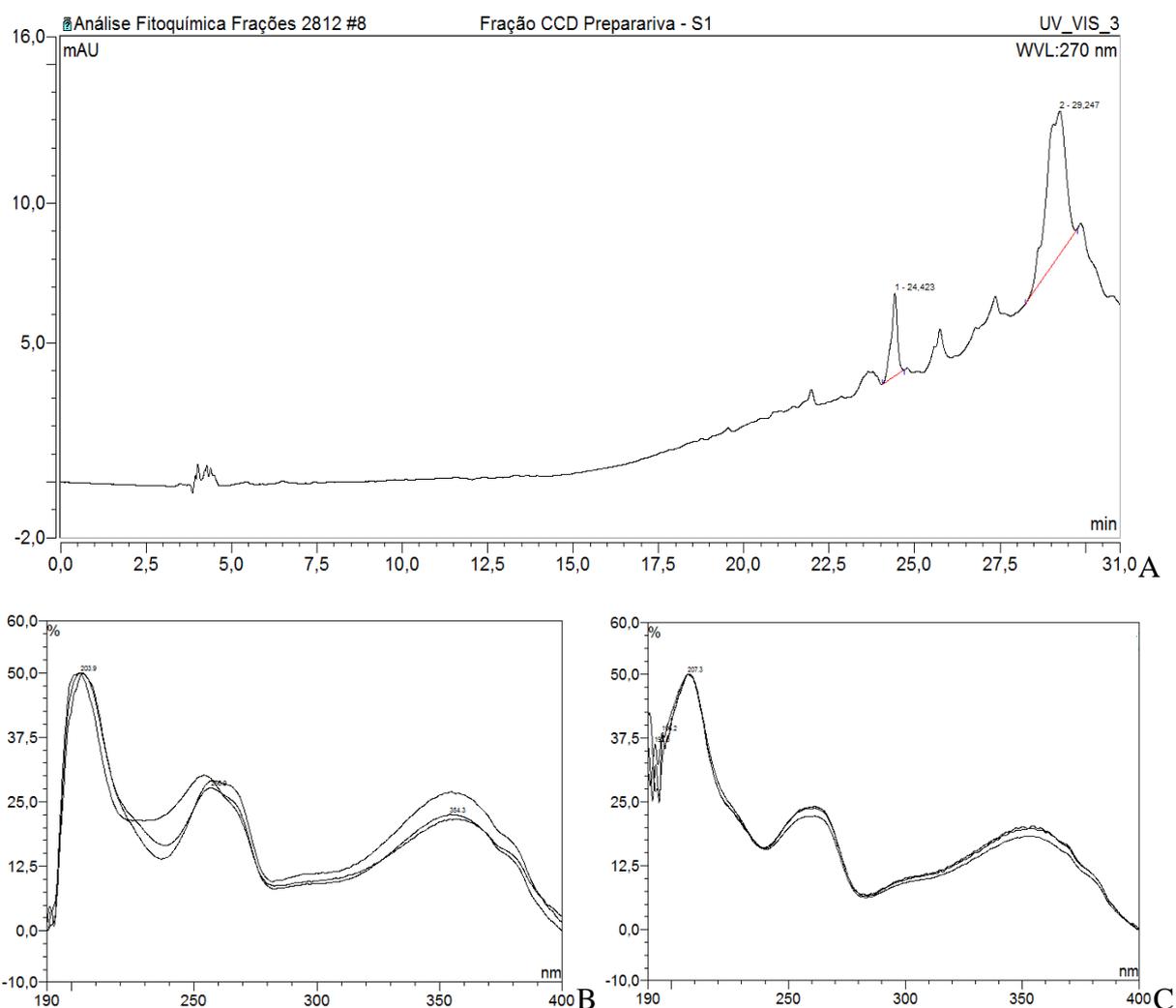
A solução 1 foi concentrada e em seguida submetida a novo sistema de CCD preparativo. Esta nova aplicação utilizou como eluente o sistema 100:11:11:27 (acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água, v/v/v), típico para análises de substâncias flavonoídicas (WAGNER; BLADT, 1996). Após a eluição, não foi visualizada separação das duas bandas apresentadas pela solução 1 na análise anterior. Foi possível apenas observar uma banda única próxima ao fronte de eluição. A banda foi coletada e submetida ao mesmo processo de lavagem descrito anteriormente, resultando na solução 1.P2 e em seguida aplicada em CCD.

A CCD da banda resultante da segunda CCDP evidenciou os mesmos resultados obtidos para a solução 1 proveniente da primeira placa de CCDP, apresentando duas bandas de coloração amarelada correspondentes a flavonoides. Demonstrando que a separação não foi eficaz. A solução 1.P2 foi concentrada em evaporador rotativo e em seguida aplicada em nova placa preparativa.

A terceira placa preparativa foi eluída com novo sistema de eluição baseado no sistema utilizado na primeira aplicação em CCDP. O novo eluente (95:5:5, acetato de etila: ácido fórmico: água, v/v/v), também não apresentou resultados satisfatórios, não separando as substâncias aplicadas. A sílica da placa preparativa foi coletada em sua totalidade e submetida a lavagem para recuperar a amostra. Devido as perdas de material envolvidas nas diferentes aplicações em CCDP, o processo de purificação foi interrompido nesta etapa.

Foi realizada uma análise por CLAE da solução resultante da CCP3 (Figura 64), onde foi possível observar a presença de dois picos relativos a flavonoides, porém as áreas exibidas foram muito pequenas devido à diluição das amostras. Estes resultados apontam que o fracionamento preliminar obteve uma fração semi-purificada de dois flavonoides, possibilitando a partir deste ponto a purificação total e identificação de dois possíveis marcadores para a espécie.

**Figura 64** - Cromatograma obtido para fração de CCDP (A); Espectro flavonoide 1 (B); Espectro flavonoide 2 (C).



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento analítico a partir das folhas de *Eugenia uniflora* levou a obtenção de metodologias de desempenho comprovado experimentalmente, capazes de avaliar de maneira satisfatória a qualidade da droga vegetal e derivados da espécie vegetal. Todas as metodologias espectrofotométricas avaliadas para quantificação de taninos e flavonoides atenderam todas as exigências recomendadas na literatura para a análise das matrizes estudadas (matéria prima, extrato bruto e frações). No caso dos flavonoides, a metodologia por doseamento direto merece destaque pela já reportada simplicidade de execução, com menor número de passos analíticos e com resultados comparáveis com os obtidos pela metodologia farmacopeica (após hidrólise ácida) quando utilizado um padrão de referência representativo para o tipo de flavonoide em análise. No caso do doseamento direto foram utilizados flavonóis (aglicona - quercetina e heterosídeo - rutina) e após hidrólise apenas um flavonol do tipo aglicona (quercetina). Já para a metodologia de quantificação de taninos, o emprego de PVP como agente complexante dos taninos apresentou desempenho similar ao pó-de-pele e pode ser considerada uma alternativa viável a metodologia farmacopeica.

Considerando as metodologias por CLAE-DAD, todos os procedimentos analíticos atenderam aos requisitos preconizados pela legislação e, portanto, permitiram a quantificação de taninos e flavonoides na droga e produtos derivados de *E. uniflora*. Entretanto, para a quantificação de flavonoides foi necessária a padronização interna em razão da ausência do respectivo padrão. Desta forma, os estudos preliminares de purificação por cromatografia em coluna e por CCD preparativa indicam a possibilidade de separação e identificação de dois compostos flavonoídicos promissores marcadores da espécie.

Quanto à avaliação do perfil químico da droga vegetal, os *fingerprints* cromatográficos por CCD-AE e CLAE-DAD revelaram zonas cromatográficas relevantes para a padronização química de derivados da droga vegetal (extrato bruto e frações) que poderão compor um perfil químico típico para auxiliar na identificação e qualificação de produtos derivados das folhas de *E. uniflora*.

Com a realização deste trabalho foi possível inferir que as metodologias avaliadas podem ser facilmente aplicadas em rotinas de laboratório como ferramentas úteis para o controle da qualidade de *Eugenia uniflora*. Fornecendo importantes informações que poderão ser empregadas tanto para o estabelecimento de especificações de qualidade para droga vegetal, quanto para a avaliação de operações de transformação em produtos intermediários e

produtos acabados. Oferecendo dados significativos para assegurar a viabilidade da espécie e seus derivados, possibilitando sua aplicação na terapêutica.

Como perspectivas futuras sugere-se o completo isolamento das substâncias flavonoidicas presentes na amostra, assim como a realização de testes biológicos nas substâncias isoladas visando avaliar a viabilidade destas substâncias como agentes terapêuticos. Têm-se ainda como propostas futuras a execução de novos estudos no âmbito tecnológico para aplicação desta espécie no desenvolvimento de novos fitoterápicos, visando sua aplicação na terapêutica para que possam ser utilizados principalmente na atenção primária realizada pelo SUS.

**REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- ABADI, M. D. M.; ASHRAF, N.; CHAMSAZ, M.; SHEMIRANI, F; An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV–Vis spectrophotometry. **Talanta**, v. 99, p. 1-12, 2012.
- ADEBAJO, A.C.; OLOKE, K.J.; ALADESANMI, A.J. Antimicrobial activities and microbial transformations of volatiles oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**, v. 50, 451–5, 1989.
- ALVES, I.A.B.S.; MIRANDA, H.M.; BARBOSA, A. P.; RANDAU, K. P.; SOARES, L.A.L. 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, p. 37-47, 2015.
- AMORIM, A.C.L.; LIMA, C.K.F.; HOVELL, A.M.C.; MIRANDA, A.L.P.; REZENDE, C.M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) **Phytomedicine** v.16 p. 923–928, 2009.
- ANDRADE, C.A.S.; OLIVEIRA, M.D.L.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; CORREIA, M.T.S.; MELO, C.P.; Comparison of the interfacial properties of *Eugenia uniflora* and *Triticum vulgare* lectins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v.68 p. 7–12, 2009.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; YAMAGUTI, E.; UHEMURA, L. M.; DE MELLO, J. C. P.. Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* HBK var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, 23, 383-386, 2004.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B.. Validação de métodos cromatográficos de análise—um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 68(1), 307-314, 1999.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62 p. 55-61, 2003.
- BARNI, S. T.; CECHINEL-FILHO, V.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19, 865-870, 2009.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria**. Campinas: UNICAMP, 2010.
- BELTRAME, F. L.; SARTORETTO, J. L.; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G.; FERNANDES, L. C.; TCHAIKOVSKI, O; Estudo fitoquímico e avaliação do

potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L.(Vitaceae). **Química nova**, v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and analysis of the Folin-Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v.18, p.6852-6864, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. **Disposições sobre registro de medicamentos fitoterápicos**, Brasília: ANVISA, 2014.

BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006.

BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, 2009.

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.

BROWN, J. P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 75, n. 3, p. 243-277, 1980.

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

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology** v. 100 p. 131–134, 2005.

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**, 41(3), 845-856, 2006.

CARMONA, F.; PEREIRA, A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.23(2), p.379-385, 2013.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices. **Química Nova**, 32(4), 1021-1030, 2009.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T.; Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v.44, p. 2442–2451, 2011.

- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2005. 273p.
- CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G.; Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 57-63, 2002.
- CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.N.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology** v. 66 p. 33–39, 1999.
- COOK, N. C.; SAMMAN, St. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.
- COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, 32(8), 2026-2033, 2009.
- CUNICO, M. W. M. et al. PLANEJAMENTO FATORIAL: UMA FERRAMENTA ESTATÍSTICA VALIOSA PARA A DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS EMPREGADOS NA PESQUISA CIENTÍFICA. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, 2008.
- da COSTA CÉSAR, I.; BRAGA, F.C.; VIANNA-SOARES, C.D. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17(4), p. 616-625. 2007.
- DAVIES L. **Efficiency in Research, Development: The Statistical Design and Analysis of Chemical Experiments**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p. 73-86.
- DHOOGHE, L. et al. The quantification of ellagic acid in the crude extract of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn.(Euphorbiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 4, p. 361-366, 2011.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B.. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v.112, p. 4-29, 2016.
- EMA. European Medicines Agency. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products. EMEA/CVMP/814/00. 2006.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, n. 10, p. 851-874, 2004.
- FALKOWSKI, G.J.S.; JACOMASSI, E.; TAKEMURA, O.S. Qualidade e autenticidade de amostras de chá de camomila (*Matricaria recutita* L.-Asteraceae). **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 68, n. 1, p. 64-72, 2009.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5ª ed. Volume I. Brasília: ANVISA, 2010.

FARMACOPEIA EUROPEIA. 8ª Ed. 2013.

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

FERNANDES, A. J. D.; FERREIRA, M. R. A.; RANDAU, K. P.; DE SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R.R. ; LANGASSNER, S. M. Z. ; MELLO, J.C.P. ; SVIDZINSK, T.I.E. ; SOARES, L. A. L. . Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, p. 3008-3013, 2013.

FIÚZA, T.S.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; PAULA, J.R.; TRESVENZOL, L.M.F.; PIMENTA, F.C. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 29, p. 245-50, 2008.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F.. Long optical path length spectrophotometry in conventional double-beam spectrophotometers: a simple alternative for investigating samples of very low optical density. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009.

GARMUS, T.T.; PAVIANI, L.C.; QUEIROGA, C.L.; MAGALHÃES, P.M.; CABRAL, F.A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents; **Journal of Supercritical Fluids** 86, 4-14, 2014.

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

GLASL, H.; BECKER, H. Flavonol-*O*-Glykoside: photometrische Gehaltsbestimmung. **Deutsche apotheker zeitung** 124, 2147-2152, 1984.

GU, M.; ZHANG, G., SU, Z.; OUYANG, F. Identification of major active constituents in the fingerprint of *Salvia miltiorrhiza* Bunge developed by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, n. 1, p. 239-243, 2004.

GUNALAN, G.; SARASWATHY, A.; VIJAYALAKSHMI, K. HPTLC fingerprint profile of *Bauhinia variegata* L. leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S21-S25, 2012.

HAGERMAN, A. E. **The Tannin Handbook**. Miami University, Oxford. 2002.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.. 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HARBORNE, Jeffrey B. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. Springer Science & Business Media, 1998.

HASLAM, E. Vegetable tannins—Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22, p. 2713-2721, 2007.

HE, JIAO; WU, X.; KUANG, Y.; WANG, T.; BI, K.; LI, Q. Quality assessment of chrysanthemum indicum flower by simultaneous quantification of six major ingredients using a single reference standard combined with HPLC fingerprint analysis. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2015.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 31, p. 1378-1384, 2008.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I.A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126 p. 1821–1835, 2010.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; GOLC, WONDRA. A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time **Journal of Food Engineering**., v. 71, p. 214–222, 2005.

LEE, M. H.; CHIOU, J. F.; YEN, K. Y.; YANG, L. L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Letters**, v.154, p. 131-136, 2000.

LEE, M. H.; NISHIMOTO, S.; YANG, L.L.; YEN, K. Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T.. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343-1349, 1997.

LEITE, Flávio. **Validação em análise química**. Átomo, 5º Edição, 2008.

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

LI, Y.; WU, T.; ZHU, J.; WAN, L.; YU, Q.; LI, X.; GUO, C. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 52, n. 4, p. 597-602, 2010.

LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines (Review). **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 53-70, 2004.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIU, X.; ZHAN, H.; QIAO, Z.; ZHENG, M.; LIU, W.; FENG, F.; YAN, F. Chemometric analysis based on HPLC multi-wavelength fingerprints for prediction of antioxidant components in *Turpiniae folium*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.152, 54-61 2016.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LUCK, G., LIAO, H.; MURRAY, N. J.; GRIMMER, H. R.; WARMINSKI, E. E. WILLIAMSON, M. P.; HASLAM, E. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. **Phytochemistry**, 37(2), 357-371, 1994.

MA, T.; HUANG, C.; MENG, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, L.; LV, X.; LI, J. Fingerprint analysis of Hawk-tea by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 551-556, 2011.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. 1970.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 429-438, 2002.

MAESTRIN, A.P.J.; NERI, C. R.; DE OLIVEIRA, K. T.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1670-1672, 2009.

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.

MARQUES, G. S.. Desenvolvimento e avaliação de metodologias analíticas para quantificação de flavonóides totais e canferitrina em folhas de *Bauhinia forficata* Link. 2011. [Dissertação de Mestrado]

MARQUES, G. S.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F., XAVIER, H. S.; ROLIM-NETO, P. J.. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de *Bauhinia forficata* Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 33(1), 57-62, 2012.

MARQUES, G.S.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; MONTEIRO, R.P.M.; ROLIM, L.A.; XAVIER, H.S.; ROLIM NETO, P.J.; SOARES, L.A.L. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 51-57, 2013.

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

MELO, J.G.; MARTINS J.D.G.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21 p. 27-36, 2007.

De MESQUITA, M. L.; LEÃO, W. F.; FERREIRA, M.R.A.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; SOARES, L. A. L. Reversed-phase-liquid chromatography method for separation and quantification of gallic acid from hydroalcoholic extracts of *Qualea grandiflora* and *Qualea parviflora*. Article in press. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, (Suppl 2), S316, 2015.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. Tecmed, 2004.

MIGUEL, C.; MEDIAVILLA, M.J. Abordagem actual da gota. **Acta Med Port**. v. 24: p.791-798, 2011.

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

MONTGOMERY, DC. **Diseño y análisis de experimentos**. México: Iberoamérica, 1991.

MORGAN, ED. **Chemometrics: Experimental Design**. London: John Wiley, 1995.

NICOLETTI, M. HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of botanicals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 818-823, 2011.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A.. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American journal of clinical nutrition**, 74(4), 418-425, 2001.

OGUNWANDE, I.A.; OLAWORE, N.O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T.M.; SCHMIDT, J.M.; SETZER, W.N.. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v.15, p. 147–152, 2005.

OLIVEIRA, A. L.; LOPES, R. B.; CABRAL, F. A.; EBERLIN, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, v.99, p. 1–5, 2006.

OSSIPOVA, S.; OSSIPOV, V.; HAKKIOJA, E.; LOPONEN, J.; PIHLAJA, K. Proanthocyanidins of mountain birch leaves: Quantification and properties. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 2, p. 128–133, 2001.

OU-YANG, Z.; CAO, X.; WEI, Y.; ZHAO, M.; DUAN, J. A. Pharmacokinetic study of rutin and quercetin in rats after oral administration of total flavones of mulberry leaf extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 776-782, 2013.

PATRA, K. C.; PARETA, S. K.; HARWANSH, R. K.; KUMAR, K. J. Traditional approaches towards standardization of herbal medicines-A review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 11, p. 372-379, 2010.

PETRY, R. D.; DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; GONZALEZ ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmacia**, 79, 7-10, 1998.

- PETRY, R. D.; ORTEGA, G. González; SILVA, W. B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride--flavonoid complex. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 6, p. 465-470, 2001.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.
- PINELO, M.; DEL FABBRO, P.; MANZOCCO, L.; NUNEZ, M. J.; NICOLI, M. C. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by products. **Food Chemistry**, v. 92, p. 109-117, 2005.
- PINHEIRO, L. et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* Mart (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 157-160, 2003.
- PRATHAP, B.; AKALANKA, D.; SRINIVASA RAO, G. H.; JOHNSON, P.; ARTHANARISWARAN, P. A Review - Importance of RP-HPLC in Analytical Method Development. **International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 15-23, 2013.
- RATES, S.M.K; Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11 n.2 p.57-69, 2001.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27 (5), 771-780, 2004.
- RIBEIRO, F. A.L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C., DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, 31(1), 164-171, 2008.
- RIJKE, E., OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A.T.; Analytical separation and detection methods for flavonoids; **Journal of Chromatography A**, 1112, p. 31-63, 2006.
- ROCHA, F.R.P; TEIXEIRA, L.SG. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.
- RODRIGUEZ, M.V.; MARTÍNEZ, M. L.; CORTADI, A.; CAMPAGNA, M. N.; DI SAPIO, O.; DERITA, M.; ZACCHINO, S.; GATTUSO, M.. Quality Control of Herbal Medicines with Spectrophotometry and Chemometric Techniques - Application to *Baccharis L.* Species Belonging to Sect - *Caulopterae* DC. (Asteraceae), **Macro To Nano Spectroscopy Edited by Jamal Uddin**, p. 399, 2012.
- ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004-2008: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p. 22-44, 2009.
- ROSS, JULIE A.; KASUM, CHRISTINE M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 19-34, 2002.

- RÜCKER, G.; BRASIL E SILVA, G.G.A.; BAUER, L.; SCHIKARSKI, M. New constituents of *Stenocalyx michelii* **Planta Medica**, v.31, n.4, p. 322–327, 1987.
- SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462-471, 2010.
- SALDANHA, T.C.B.; ARAÚJO, M.C.U.; NETO, B. B. Análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 847-853, 1999.
- SANT'ANA, P.J.P.; ASSAD, A.L.D. Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da CEME. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 508-512, Junho, 2004.
- SANTOS, K.K.A.; MATIAS, E. F.F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E.S.A.; BRAGA, M. F.B.M.; GUEDES, G. M.M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I. R.A.; COUTINHO, H. D.M. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 130–132, 2012.
- SANTOS, K.K.A.; ROLÓN, M.; VEGA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I. R.A.; COUTINHO, H. D.M. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.34, n.1, p. 47-50, 2013.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v. 16, p. 373-74, 1995.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; DE ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p.183-186, 1987.
- SCHMIDT, P. C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Passionsblumenkraut-Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von Passiflorae herba. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 133, n. 47, p. 17-28, 1993.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21–40, 2001.
- SHERMA, J. Biennial review of planar chromatography: 2009-2011. **Journal of AOAC International**, v. 95, p. 992-1009, 2012.
- SHEWIYO, D. H.; KAALE, E. A. K. K.; RISHA, P. G.; DEJAEGHER, B.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDER HEYDEN, Y. HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: a review of the method development and validation steps. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 66, p. 11-23, 2012.
- SILVA-ROCHA, W. P.; LEMOS, V. L. B. ; FERREIRA, M. R. A. ; SOARES, L. A. L. ; Svidzinsk, T.I.E. ; Milan, E.P. ; CHAVES, G. M. . Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **BMC Complementary and Alternative Medicine** (Online), v. 15, p. 6, 2015.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. 1104p. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thompson Learning, 2006.

SOARES, L. A. L. Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek-Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. 2002 [Tese de doutorado].

SOARES, L.A.L.; MAIA, A.; OLIVEIRA, A.L.; PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; Avaliação de Complexos Formados por Catequina e Macromoléculas; **Acta Farm. Bonaerense** 25 (1), 10-6, 2006.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10560>>. Acesso em: 26 Mar. 2015

SUBRAMANIAN, S.; MANORAMA, S.; Hptlc densitometric quantification of secondary metabolites from *Polycarpaea corymbosa* Lam. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**; 5(7), 2834-2840, 2014.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

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

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

TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, p. 29–40, 2003.

TZANAVARAS, P.D.; THEMELIS, D. G. Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 588, n. 1, p. 1-9, 2007.

VERMAAK, I.; HAMMAN, J. H.; VILJOEN, A. M. High performance thin layer chromatography as a method to authenticate *Hoodia gordonii* raw material and products. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 1, p. 119-124, 2010.

VERZA, S. G. Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona. 2006. [Dissertação de Mestrado]

VERZA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V.; HENRIQUES, A. T.; ORTEGA, G. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v. 30, p. 815–820, 2007.

VERZA, SIMONE G.; PAVEL, CABRAL; ORTEGA, GEORGE G. Study of the specificity of cross-povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1627-1633, 2008.

VICTORIA, F. N.; ANVERSA, R. G.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Essential oils of *E. uniflora* leaves protect liver injury induced by acetaminophen. **Food Bioscience**, v. 4, p. 50-57, 2013.

VICTORIA, F. N.; DE SIQUEIRA BRAHM, A.; SAVEGNAGO, L.; LENARDÃO, E. J. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience letters**, 544, 105-109, 2013.

WAGNER, H.. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34-37, 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S.. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 1996.

WAZLAWIK, E.; SILVA, M.A.; PETERS, R.R.; CORREIA, J.F.G.; FARIAS, M.R.; CALIXTO, J.B.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Analysis of the Role of Nitric Oxide in the Relaxant Effect of the Crude Extract and Fractions from *Eugenia uniflora* in the Rat Thoracic Aorta **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v.49 p. 433-437, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).Regional office for the Western Pacific.**The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, p. 12, 2011.

XIE, R.F.; SHI, Z. N.; LI, Z. C.; CHEN, P. P.; LI, Y. M.; ZHOU, X. Optimization of high pressure machine decocting process for Dachengqi Tang using HPLC fingerprints combined with the Box–Behnken experimental design. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 110-119, 2015.

XIE, Y.; JIANG, Z. H.; ZHOU, H.; CAI, X.; WONG, Y. F.; LIU, Z. Q.; LIU, L. Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 43(1), 204-212, 2007.

YUNES, R.A; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quimica Nova**, Vol. 24, No. 1, 147-152, 2001.

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

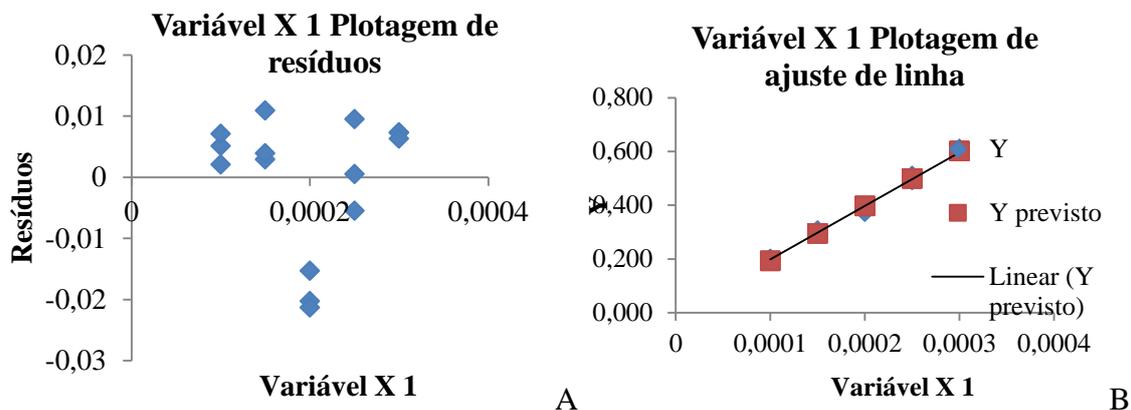
ZHANG, J. L.; CUI, M.; HE, Y.; YU, H. L.; GUO, D. A. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC–UV and HPLC–MS methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 36(5), 1029-1035, 2005.

**APÊNDICES**

## APÊNDICE A – Dados de Regressão Linear – Amostras UV-Vis

Padrões

**Figura 1** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o padrão quercetina por doseamento direto.



Autoria própria.

**Tabela 1** – Regressão linear da curva da quercetina por doseamento direto.

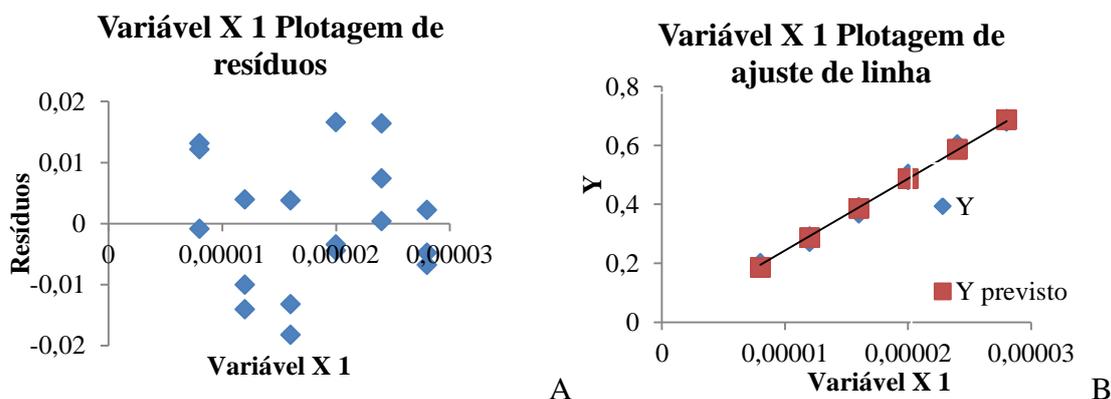
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,4718	0,47182	4277,495	7,32E-21	
Resíduo	16	0,0017	0,00011			
Total	17	0,4735				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-0,05384	0,0083	-6,450	8,02E-06	-0,0715	-0,0361
Variável X 1						
1	0,474	0,0072	65,402	7,32E-21	0,45863	0,48936

Autoria própria.

**Figura 2** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o padrão Rutina por doseamento direto.



Autoria própria.

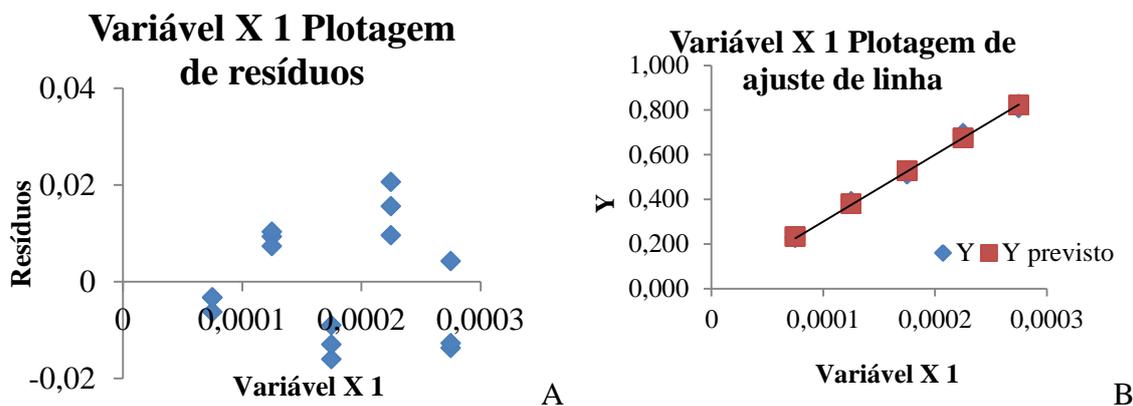
**Tabela 2** – Regressão linear da curva da rutina por doseamento direto.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,5270	0,5270	4533,118	4,61E-21
Resíduo	16	0,0018	0,00011		
Total	17	0,5288			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interseção	-0,015	0,007	-2,028	0,060	-0,030	0,001
Variável X						
1	25047,619	372,021	67,328	0,000	24258,969	25836,269

Autoria própria.

**Figura 3** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o padrão Quercetina após hidrólise ácida.

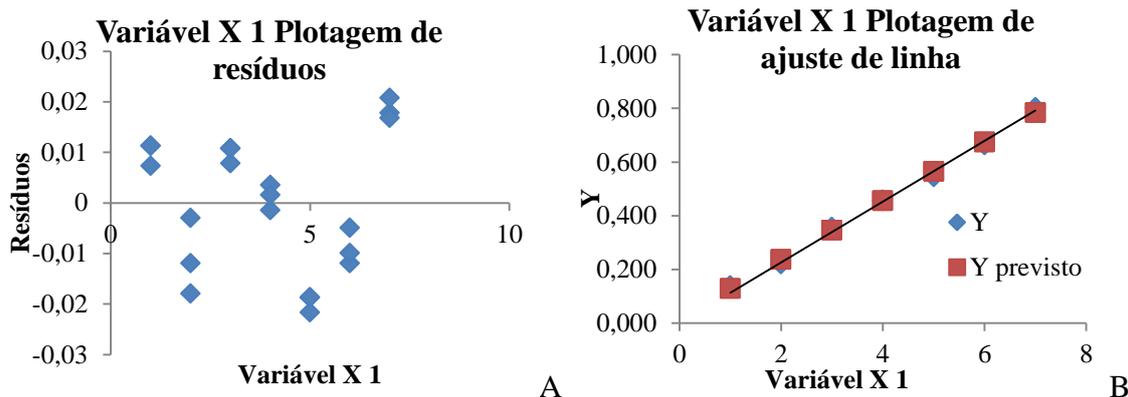


**Tabela 3** – Regressão linear da curva da quertina na metodologia por hidrólise ácida.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,4700	0,4700	5747,808	6,93E-22
Resíduo	16	0,0013	8,18E-05		
Total	17	0,4713			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interseção	-0,04957	0,00718	-6,8968	3,59E-06	-0,0648	-0,0343
Variável X						
1	0,788098	0,01039	75,8143	6,93E-22	0,76606	0,81013

**Figura 4** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o padrão ácido gálico no doseamento de taninos totais.



Autoria própria.

**Tabela 4** – Regressão linear da curva do ácido gálico na metodologia de doseamento de taninos totais.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1,0026	1,0026	5348,043	9,4E-25
Resíduo	19	0,0035	0,00018		
Total	20	1,0061			

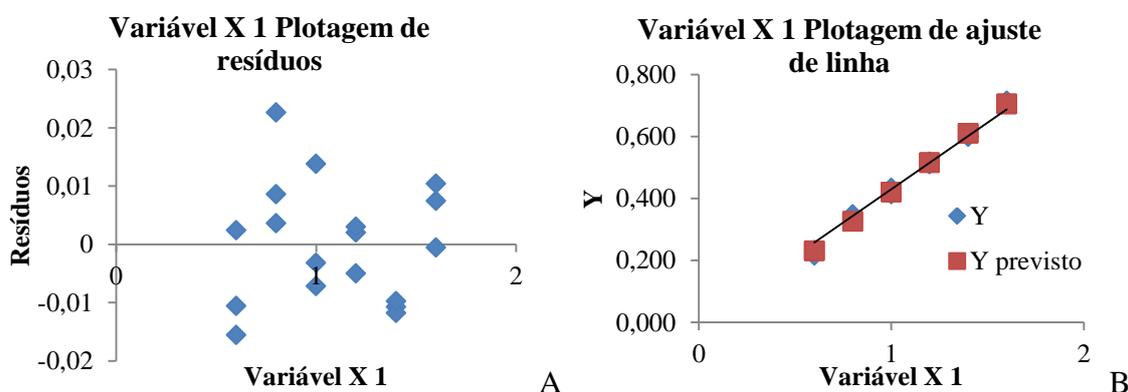
  

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interseção	0,0194	0,0066	2,9080	0,0090	0,0054	0,0334
Variável X 1	0,1092	0,0014	73,1303	9,4E-25	0,1061	0,1123

Autoria própria.

Amostras

**Figura 5** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para a matéria prima na metodologia de doseamento direto.



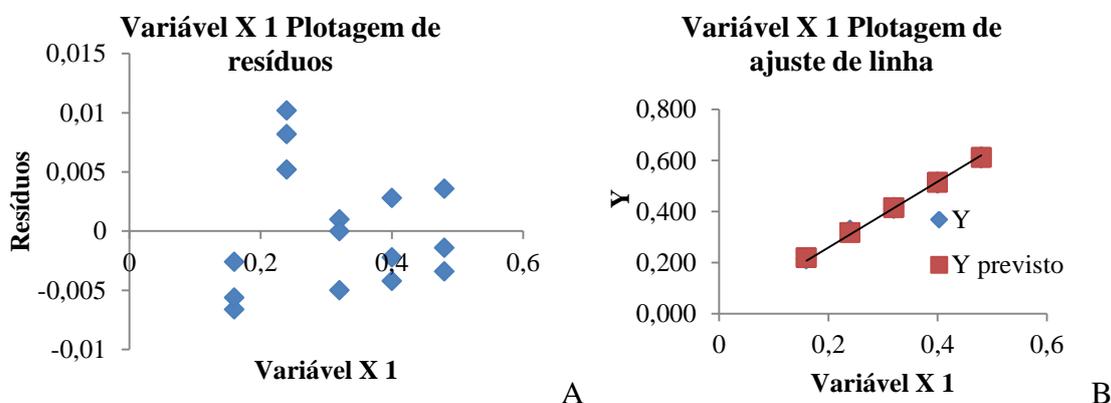
Autoria própria.

**Tabela 5** – Regressão linear da curva da matéria prima da metodologia por doseamento direto.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,4718	0,4718	4277,495	7,32E-21
Resíduo	16	0,0017	0,00011		
Total	17	0,4735			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interseção	-0,0538	0,0083	-6,4502	8,02E-06	-0,0715	-0,0361
Variável X 1	0,474	0,0072	65,4025	7,32E-21	0,4586	0,4893

Autoria própria.

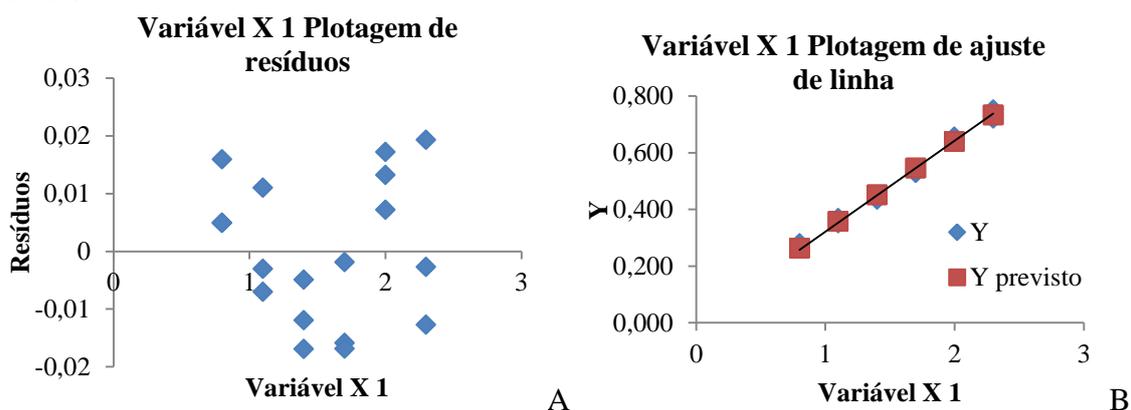
**Figura 6** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o extrato bruto na metodologia de doseamento direto.**Tabela 6** – Regressão linear da curva Do extrato bruto por doseamento direto.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,2892	0,2892	10366,22	2,97E-20
Resíduo	13	0,0004	2,79E-05		
Total	14	0,2896			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,0232	0,0040	5,6695	7,67E-05	0,0143	0,0320
Variável X 1	1,2275	0,0120	101,8146	2,97E-20	1,2014	1,2535

Autoria própria.

**Figura 7** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para a matéria prima na metodologia após hidrólise ácida.



Autoria própria.

**Tabela 7** – Regressão linear da curva da matéria prima após hidrólise ácida.

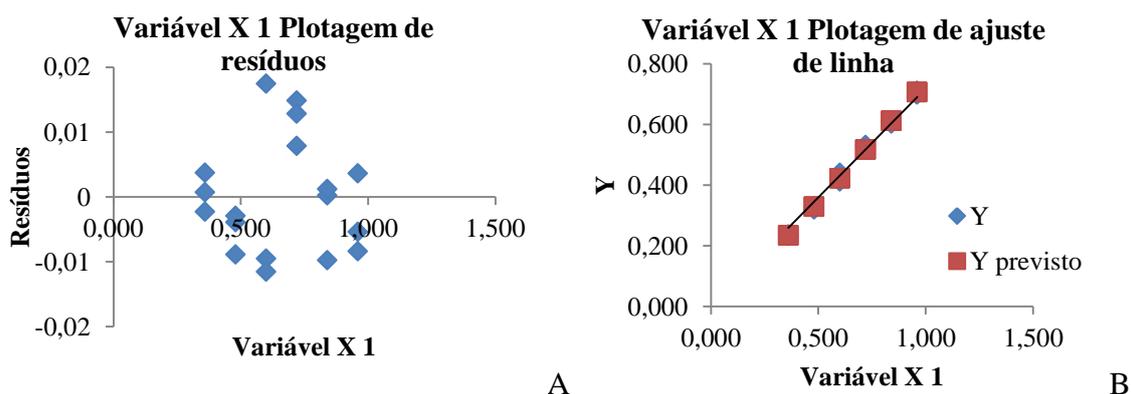
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,4631	0,463138	2920,312	1,53E-19
Resíduo	16	0,0025	0,00015		
Total	17	0,4656			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,0136	0,0094	1,4396	0,169245	-0,0064	0,0336
Variável						
X 1	0,3130	0,0057	54,0399	1,53E-19	0,3007	0,3253

Autoria própria.

**Figura 8** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o extrato bruto na metodologia após hidrólise ácida.



Autoria própria.

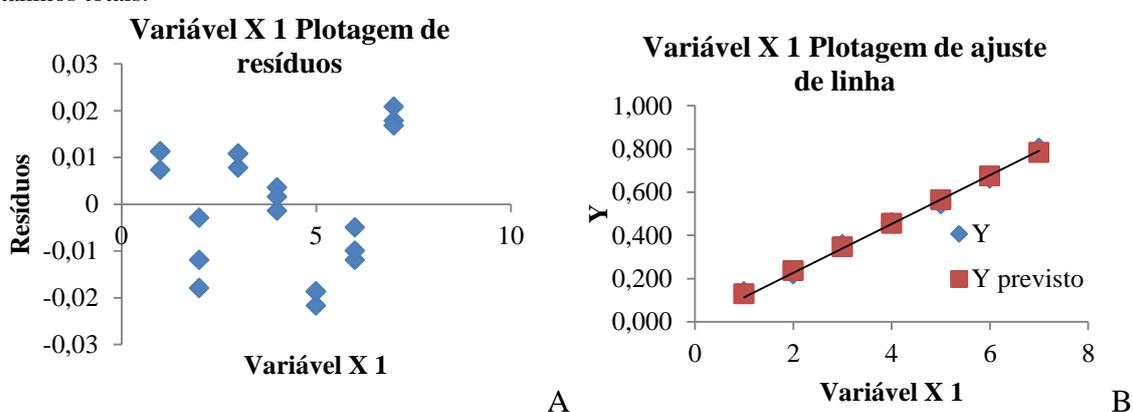
**Tabela 8** – Regressão linear da curva do extrato bruto após hidrólise ácida.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de</i> <i>significação</i>
Regressão	1	0,4700	0,4700	5747,808	6,93E-22
Resíduo	16	0,0013	8,18E-05		
Total	17	0,4713			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-0,0496	0,0071	-6,8968	3,59E-06	-0,0648	-0,0343
Variável						
X 1	0,7880	0,0104	75,8143	6,93E-22	0,7660	0,8101

Autoria própria.

**Figura 9** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para a matéria prima no doseamento de taninos totais.

Autoria própria.

**Tabela 9** – Regressão linear da curva da matéria prima no doseamento de taninos totais.

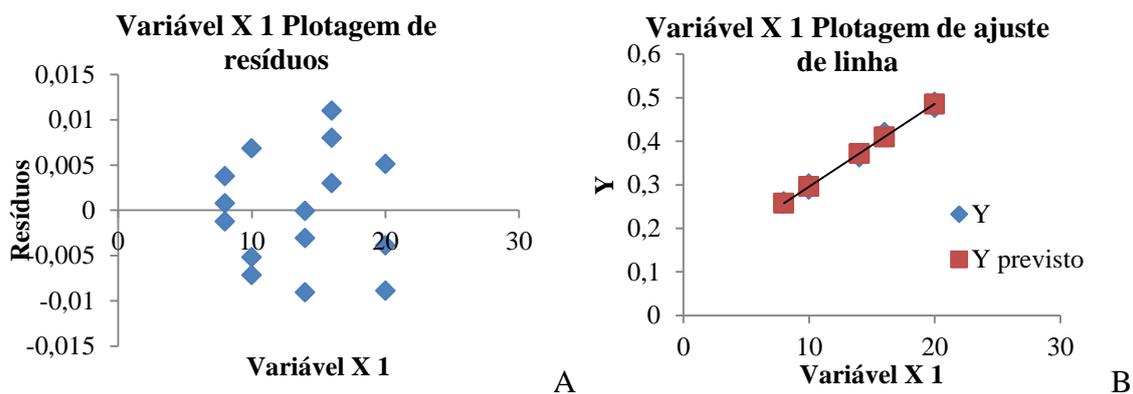
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de</i> <i>significação</i>
Regressão	1	0,4419	0,441971	6054,96	4,58E-22
Resíduo	16	0,0011	7,3E-05		
Total	17	0,4430			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,0393	0,0057	6,931102	3,38E-06	0,0273	0,0513
Variável				4,58E-		
X 1	0,0092	0,00012	77,81362	22	0,0089	0,0094

Autoria própria.

**Figura 10** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o extrato bruto no doseamento de taninos totais.



Autoria própria.

**Tabela 9** – Regressão linear da curva do extrato bruto no doseamento de taninos totais.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,0985	0,0985	2341,689	4,58E-16
Resíduo	13	0,0005	4,21E-05		
Total	14	0,0990			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,1064	0,0056	19,04616	7,03E-11	0,0944	0,1185
Variável X 1	0,0190	0,0004	48,391	4,58E-16	0,0181	0,0198

Autoria própria.

## APÊNCIDE B – Dados Brutos dos Ensaio de Linearidade por CLAE

**Tabela 1** - Áreas obtidas para a curva de linearidade do ácido gálico, com seus respectivos valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Amostra	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	DPR
2,0	4,1861	4,1511	4,2286	4,1886	0,0388	0,93
2,5	4,8273	4,8198	4,8593	4,8355	0,0210	0,43
3,0	5,8412	5,9074	5,7882	5,8456	0,0597	1,02
3,5	6,5917	6,5244	6,5257	6,5473	0,0385	0,59
4,0	7,4106	7,2689	7,3386	7,3394	0,0709	0,97
$R^2$	0,9966	0,9925	0,9976	0,9963	-	-

DP: Desvio padrão, DPR: Desvio padrão relativo (%). Fonte: Autoria própria.

**Tabela 2** - Áreas obtidas para a curva de linearidade do ácido elágico, com seus respectivos valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Amostra	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	DPR
2,0	6,2557	6,5835	6,7507	6,5300	0,2518	3,86
3,0	9,8072	10,0229	10,6537	10,1613	0,4399	4,33
4,0	13,8180	13,4352	13,6654	13,6395	0,1927	1,41
5,0	16,0237	15,8147	16,4627	16,1004	0,3307	2,05
6,0	19,7495	18,3975	19,5448	18,5639	1,1117	5,99
$R^2$	0,9936	0,9929	0,9961	0,9954	-	-

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 3** - Áreas obtidas para a curva de linearidade da vitexina, com seus respectivos valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Amostra	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	DPR
3,0	5,8344	5,8308	5,8219	5,8290	0,0064	0,11
4,0	6,7690	6,9490	7,1759	6,9646	0,2039	2,93
5,0	7,8973	7,9617	7,8149	7,8913	0,0736	0,93
6,0	8,5789	8,8717	8,9860	8,8122	0,2100	2,38
7,0	9,3820	9,4155	9,4991	9,4322	0,0603	0,64
$R^2$	0,9928	0,9857	0,9791	0,9902	-	-

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 4** - Áreas obtidas para a curva de linearidade do hiperosídeo, com seus respectivos valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Amostra	Área 1	Área 2	Área 3	Média	DP	DPR
2,0	2,1336	2,0414	2,0367	2,0706	0,0546	2,64
2,5	2,8261	2,8269	2,8226	2,8252	0,0023	0,08
3,0	3,1422	3,2485	3,1569	3,1825	0,0576	1,81
3,5	3,9480	3,8655	3,8706	3,8947	0,0462	1,19
4,0	4,4481	4,3197	4,3429	4,3702	0,0684	1,57
$R^2$	0,9878	0,9901	0,9880	0,9903	-	-

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 5** - Áreas obtidas para a curva de linearidade da matéria prima de *E. uniflora*, com seus respectivos valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo, para as substâncias pesquisadas.

<b>Ácido Gálico</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
1600	8,2828	8,3368	8,3328	8,3175	0,0301	0,36
1800	8,6709	8,7145	8,8416	8,7423	0,0887	1,01
2000	9,2627	9,3512	9,4620	9,3586	0,0999	1,07
2200	10,0993	9,6909	9,6104	9,8002	0,2621	2,67
2400	10,2992	10,2025	10,0723	10,1913	0,1139	1,12
<b>Ácido Elágico</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
1600	11,6645	11,7358	11,5653	11,6552	0,0856	0,73
1800	13,1009	12,8527	12,8335	12,9290	0,1492	1,15
2000	15,1376	15,0090	15,0673	15,0713	0,0644	0,43
2200	16,4904	16,2125	16,2584	16,3204	0,1490	0,91
2400	18,2327	18,0808	18,2225	18,1787	0,0849	0,47
<b>Flavonoide 2</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
1600	8,5116	8,6086	8,5169	8,5457	0,0545	0,64
1800	9,4196	9,3437	9,2385	9,3339	0,0909	0,97
2000	10,6807	10,6056	10,6304	10,6389	0,0383	0,36
2200	11,5001	11,2495	11,3108	11,3535	0,1306	1,15
2400	12,2927	12,2430	12,3387	12,2915	0,0479	0,39
<b>Flavonoide 3</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
1600	1,3986	1,4096	1,3853	1,3978	0,0122	0,87
1800	1,5863	1,5532	1,5513	1,5636	0,0197	1,26
2000	1,8372	1,8525	1,8267	1,8388	0,0130	0,71
2200	1,9372	2,0314	2,0730	2,0139	0,0696	3,45
2400	2,3079	2,3040	2,3558	2,3226	0,0288	1,24

DP: Desvio padrão, DPR: Desvio padrão relativo (%).Fonte: Autoria própria.

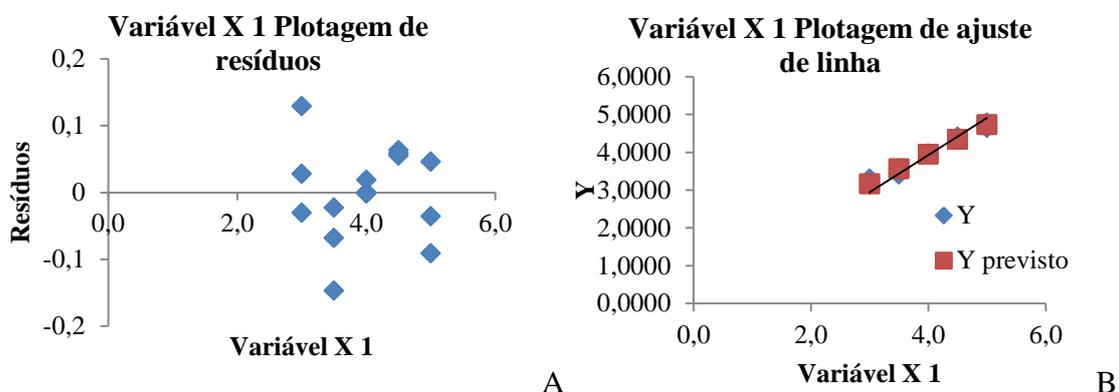
**Tabela 6** - Áreas obtidas para a curva de linearidade do extrato bruto de *E. uniflora*, com seus respectivos valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação, para as substâncias pesquisadas.

<b>Ácido Gálico</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
800	3,0946	3,1474	3,1634	3,1351	0,0360	1,15
900	3,5597	3,5871	3,6212	3,5893	0,0308	0,86
1000	4,0409	4,0636	4,0679	4,0575	0,0145	0,36
1100	4,6786	4,6927	4,6644	4,6786	0,0142	0,30
1200	5,0353	5,0769	4,9941	5,0354	0,0414	0,82
<b>Ácido Elágico</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
800	6,7028	6,3639	6,3450	6,4706	0,2013	3,11
900	7,2774	7,2783	7,2197	7,2585	0,0336	0,46
1000	8,1353	7,9708	8,1731	8,0931	0,1076	1,33
1100	9,1107	9,0779	9,1691	9,1192	0,0462	0,51
1200	10,2522	10,1138	10,1048	10,1569	0,0826	0,81
<b>Flavonoide 2</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
800	18,4099	18,5031	18,4394	18,4508	0,0476	0,26
900	20,8372	20,8988	20,7405	20,8255	0,0798	0,38
1000	23,1329	23,2182	23,1402	23,1638	0,0473	0,20
1100	25,3799	25,1951	24,9474	25,1741	0,2170	0,86
1200	28,2623	28,4510	28,4054	28,3729	0,0985	0,35
<b>Flavonoide 3</b>						
<b>Amostra</b>	<b>Área 1</b>	<b>Área 2</b>	<b>Área 3</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>DPR</b>
800	1,2862	1,3196	1,3053	1,3037	0,0168	1,29
900	1,4612	1,4640	1,4607	1,4620	0,0018	0,12
1000	1,6285	1,6151	1,6184	1,6207	0,0070	0,43
1100	1,8084	1,9063	1,7795	1,8314	0,0665	3,63
1200	2,0053	2,0275	1,9789	2,0039	0,0243	1,21

DP: Desvio padrão, DPR: Desvio padrão relativo (%).Fonte: Autoria própria.

## APÊNDICE C – Regressão Linear - Amostras por CLAE

**Figura 1** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o padrão ácido gálico por CLAE.



Autoria própria.

**Tabela 1** – Regressão linear da curva do padrão ácido gálico por CLAE.

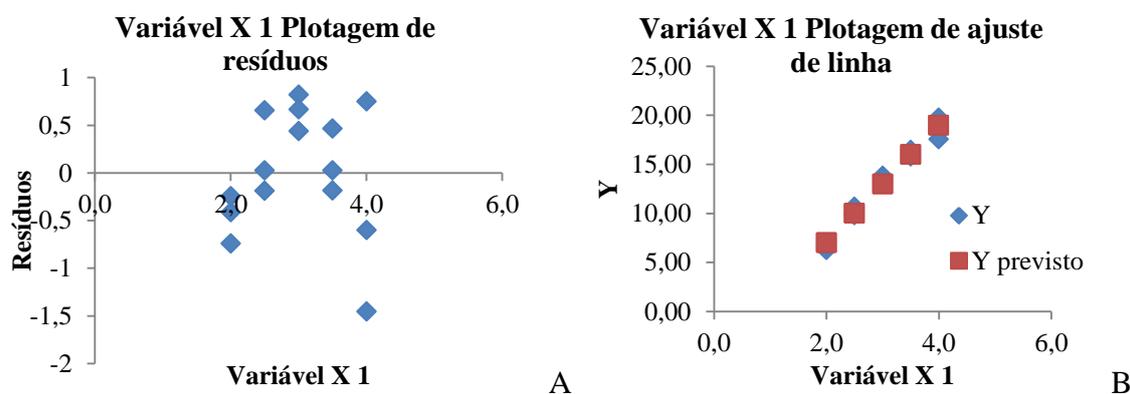
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de</i> <i>significação</i>
Regressão	1	4,5899	4,5899	882,2006	2,469E-13
Resíduo	13	0,0676	0,0052		
Total	14	4,6575			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	95% <i>inferiores</i>	95% <i>superiores</i>
Interseção	0,8217	0,1069	7,6750	3,51E-06	0,5899	1,0522
Variável X 1	0,7823	0,0263	29,7018	2,46E-13	0,7253	0,8392

Autoria própria.

**Figura 2** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o padrão ácido elágico por CLAE.



Autoria própria.

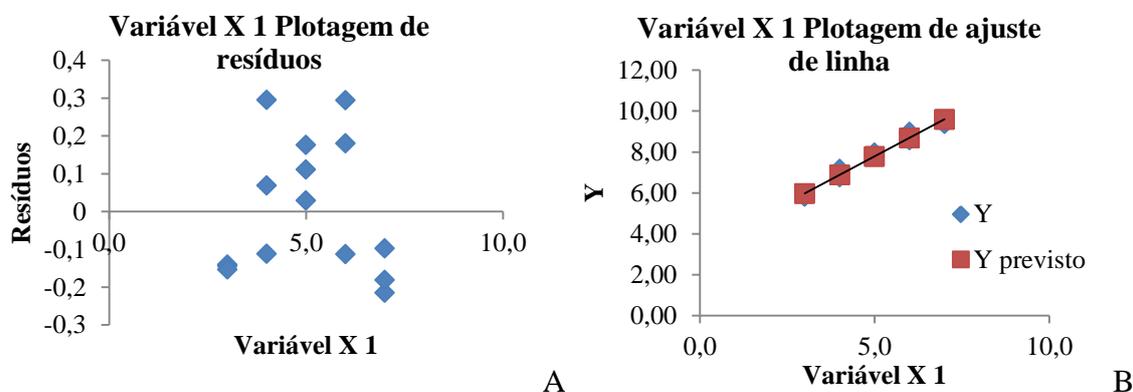
**Tabela 2** – Regressão linear da curva do padrão ácido elágico por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	270,1266	270,1266	600,5658	2,88E-12	
Resíduo	13	5,8472	0,4497			
Total	14	275,9738				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-5,0052	0,7548	-6,6311	1,635E-05	-6,6358	-3,3745
Variável X 1	6,0014	0,2448	24,5064	2,885E-12	5,4723	6,5304

Autoria própria.

**Figura 3** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o padrão hiperosídeo por CLAE.

Autoria própria.

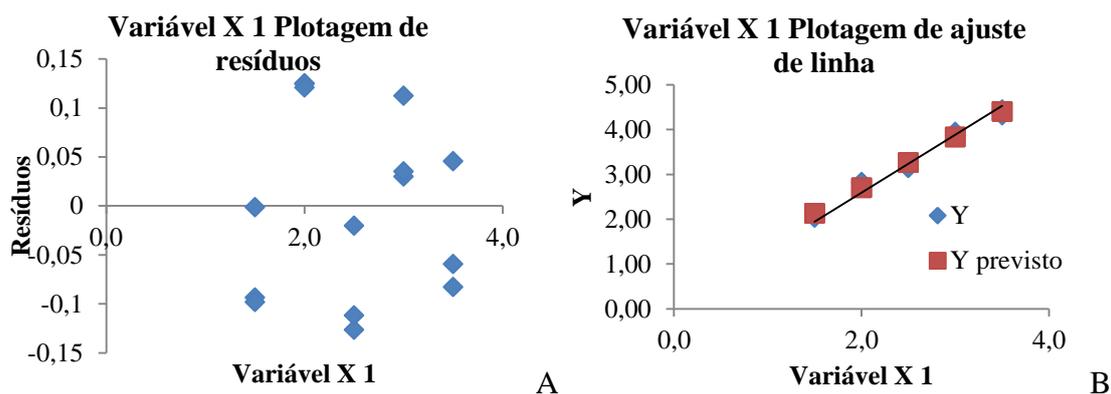
**Tabela 3** – Regressão linear da curva do padrão vitexina por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	24,5919	24,5919	738,133	7,73352E-13	
Resíduo	13	0,4331	0,0333			
Total	14	25,0250				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	3,2589	0,1731	18,8201	8,16886E-11	2,8848	3,6330
Variável X 1	0,9053	0,0333	27,16861	7,73352E-13	0,8333	0,9773

Autoria própria.

**Figura 5** – Gráfico de resíduos (A) e ajustes de modelo (B) para o padrão vitexina por CLAE.

Autoria própria.

**Tabela 4** – Regressão linear da curva do padrão ácido elágico por CLAE.

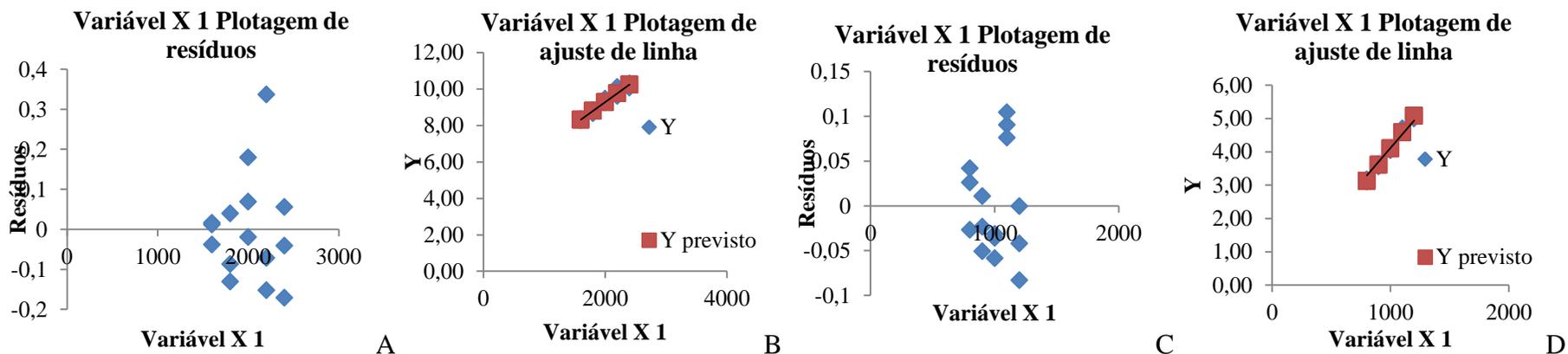
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	9,6407	9,6407	1042,41198	8,4595E-14	
Resíduo	13	0,1202	0,0092			
Total	14	9,7609				

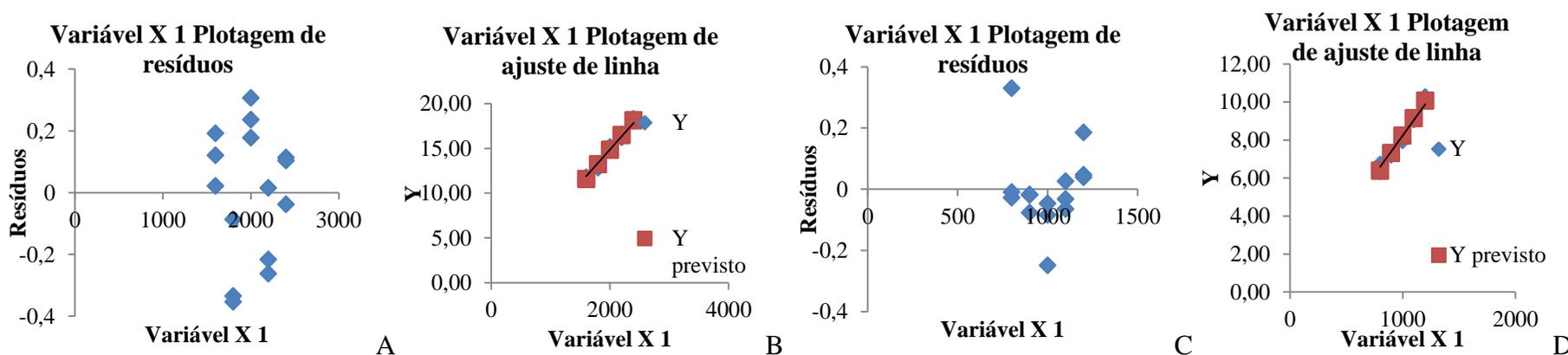
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,4342	0,0912	4,7595	0,00037	0,2371	0,6313
Variável X						
1	1,1337	0,0351	32,2864	8,459E-14	1,0579	1,2096

Autoria própria.

**Figura 6** – Gráfico de resíduos (A) matéria prima e (B) extrato bruto; gráfico de ajustes de modelo (C) matéria prima e (D) extrato bruto para o padrão ácido gálico por CLAE.

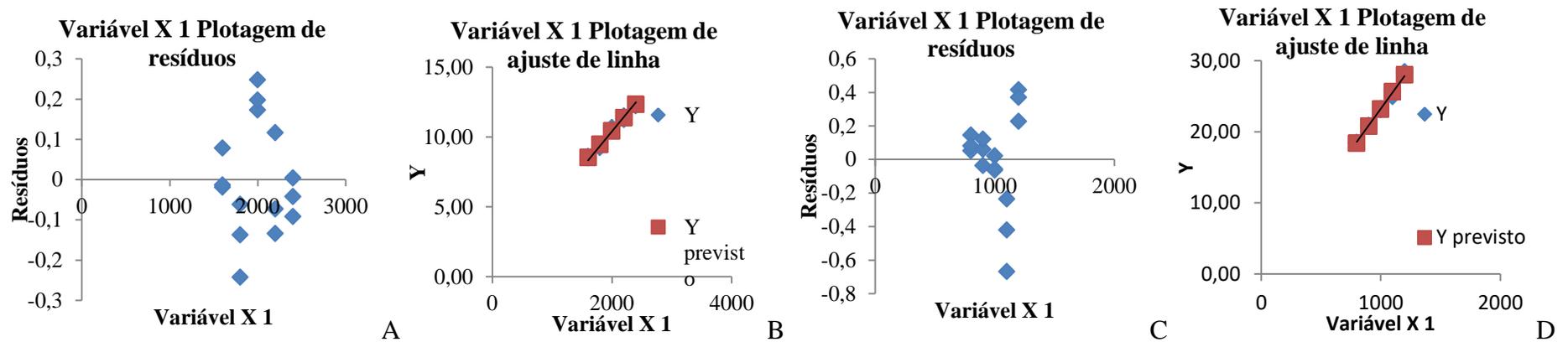


**Figura 7** – Gráfico de resíduos (A) matéria prima e (B) extrato bruto; gráfico de ajustes de modelo (C) matéria prima e (D) extrato bruto para o padrão ácido elágico por CLAE.

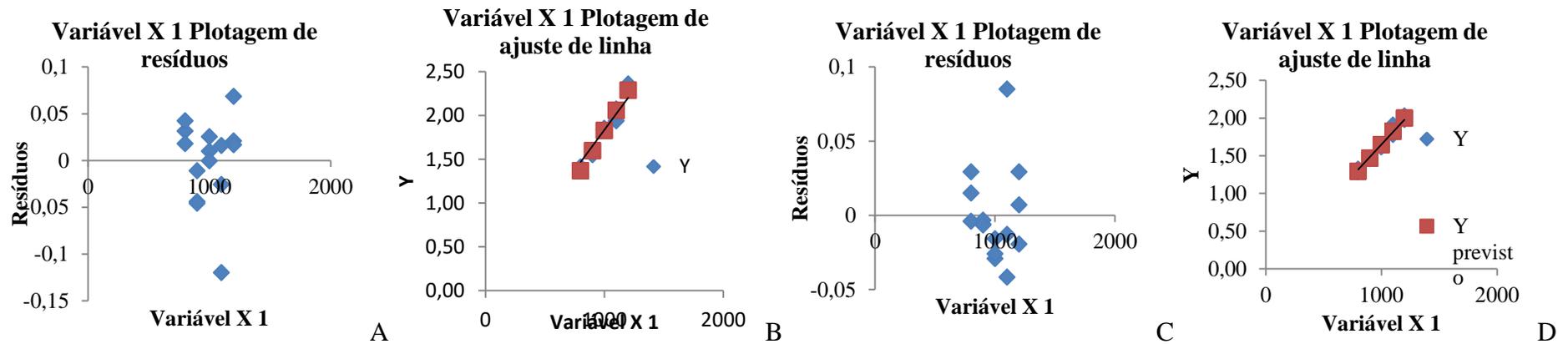


Autoria própria.

**Figura 8** – Gráfico de resíduos (A) matéria prima e (B) extrato bruto; gráfico de ajustes de modelo (C) matéria prima e (D) extrato bruto para o flavonoide 2 por CLAE.



**Figura 9** – Gráfico de resíduos (A) matéria prima e (B) extrato bruto; gráfico de ajustes de modelo (C) matéria prima e (D) extrato bruto para o flavonoide 3 por CLAE.



Autoria própria.

**Tabela 5** – Regressão linear da curva do ácido gálico na matéria prima por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	6,9281	6,9281	373,2911	5,871E-11	
Resíduo	13	0,2412	0,0185			
Total	14	7,1693				

	<i>Coefficiente s</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	4,4763	0,25120	17,8198	1,620E-10	3,9337	5,0190
Variável X 1	0,0024	0,00012	19,3207	5,871E-11	0,0021	0,0026

Autoria própria.

**Tabela 6** – Regressão linear da curva do ácido gálico no extrato bruto por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	7,1731	7,1731	2045,612	1,1E-15	
Resíduo	13	0,0456	0,0035			
Total	14	7,2187				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-0,7906	0,1092	-7,2410	6,54E-06	-1,0265	-0,5547
Variável X 1	0,0048	0,00011	45,2284	1,1E-15	0,0046	0,00512

Autoria própria.

**Tabela 7** – Regressão linear da curva do ácido elágico na matéria prima por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	81,0656	81,06564	1701,834	3,6E-15	
Resíduo	13	0,6192	0,047634			
Total	14	81,6848				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-1,60741	0,4024	-3,99417	0,00153	-2,4768	-0,7379
Variável X 1	0,00822	0,0002	41,25329	3,6E-15	0,00779	0,0086

Autoria própria.

**Tabela 8** – Regressão linear da curva do ácido elágico no extrato bruto por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	25,5772	25,5772	1435,35	1,08E-14	
Resíduo	13	0,2317	0,0178			
Total	14	25,8089				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-1,0139	0,2461	-4,1189	0,00121	-1,5456	-0,4821
Variável X	0,0092	0,0002	37,8860	1,08E-14	0,0087	0,0098

Autoria própria.

**Tabela 9** – Regressão linear da curva do flavonoide 2 no extrato bruto por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	27,1381	27,1381	1325,225	1,805E-14	
Resíduo	13	0,2662	0,0205			
Total	14	27,4043				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,9216	0,2638	3,4927	0,0039	0,3515	1,49168
Variável X 1	0,0048	0,00013	36,4036	1,8E-14	0,0044	0,0051

Autoria própria.

**Tabela 10** – Regressão linear da curva do flavonoide 2 no extrato bruto por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	175,5879	175,588	2077,12	9,94E-16	
Resíduo	13	1,0989	0,0845			
Total	14	176,6868				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-0,9954	0,53611	-1,8567	0,08615	-2,1536	0,16279
Variável X				9,94E-		
1	0,0242	0,00053	45,5754	16	0,0230	0,02534

**Tabela 11** – Regressão linear da curva do flavonoide 3 na matéria prima por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	1,5866	1,5866	717,559	9,265E-13	
Resíduo	13	0,0288	0,0022			
Total	14	1,6154				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-0,4724	0,0867	-5,4483	0,00011	-0,6597	-0,2850
Variável X 1	0,00223	8,5E-05	26,7873	9,26E-13	0,0021	0,0024

Autoria própria.

**Tabela 12** – Regressão linear da curva do flavonoide 3 no extrato bruto por CLAE.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	0,9397	0,9397	912,8905	1,98E-13	
Resíduo	13	0,0133	0,0010			
Total	14	0,9530				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-0,12551	0,05916	-2,1215	0,053673	-0,25331	0,0023
Variável X 1	0,00177	5,86E-05	30,2141	1,98E-13	0,00164	0,0019

Autoria própria.

## APÊNDICE D – Dados Brutos da Precisão por CLAE

### Repetibilidade

**Tabela 1** - Resultados (área – mUA; teor – %m/m) do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de ácido gálico nas folhas de *E. uniflora* por CLAE.

n	MP		EB	
	Área (mUA)	Teor (%m/m)	Área (mUA)	Teor (%m/m)
1	7,2979	0,0564	4,2354	0,0415
2	7,3554	0,0568	4,2154	0,0413
3	7,3733	0,0570	4,2704	0,0419
4	7,3227	0,0566	4,3275	0,0424
5	7,3574	0,0568	4,2413	0,0416
6	7,3249	0,0566	4,2172	0,0414
<b>Média ± DP (DPR)</b>	7,335± 0,0194 (0,26)	0,0567±0,0002 (0,76)	4,262±0,0580 (1,36)	0,0417± 0,0004 (1,99)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 2** - Resultados (área – mUA; teor – %m/m) do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de ácido elágico nas folhas de *E. uniflora* por CLAE.

n	MP		EB	
	Área (mUA)	Teor (%m/m)	Área (mUA)	Teor (%m/m)
1	14,6192	0,0659	8,9665	0,0986
2	15,0447	0,0678	9,0665	0,0997
3	15,1218	0,0682	9,0464	0,0995
4	15,1776	0,0684	9,2463	0,1017
5	15,2104	0,0686	9,2437	0,1017
6	15,3369	0,0692	9,2452	0,1017
<b>Média ± DP (DPR)</b>	15,242± 0,0841 (0,55)	0,0680± 0,0011 (1,64)	9,2455±0,0013 (0,01)	0,1005±0,0014 (2,72)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 3** - Resultados (área – mUA; teor – %m/m) do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de flavonoide 2 nas folhas de *E. uniflora* por CLAE.

n	MP		EB	
	Área (mUA)	Teor (%m/m)	Área (mUA)	Teor (%m/m)
1	10,1226	0,1305	23,1746	0,5977
2	10,3600	0,1336	23,2274	0,5991
3	10,3544	0,1335	23,3591	0,6025
4	10,3649	0,1337	23,2212	0,5989
5	10,4018	0,1341	23,0424	0,5943
6	10,3991	0,1341	23,0457	0,5944
<b>Média ± DP (DPR)</b>	10,389± 0,0206 (0,20)	0,1333± 0,0014 (2,04)	23,103±0,1023 (0,44)	0,5978±0,0033 (1,04)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 4** - Resultados (área – mUA; teor – %m/m) do ensaio de repetibilidade para o método de quantificação do teor de flavonoide 3 nas folhas de *E. uniflora* por CLAE.

n	MP		EB	
	Área (mUA)	Teor (%m/m)	Área (mUA)	Teor (%m/m)
1	1,9285	0,0095	1,6463	0,0162
2	1,9678	0,0097	1,6492	0,0162
3	1,9367	0,0095	1,6390	0,0161
4	1,9397	0,0095	1,6435	0,0161
5	1,9638	0,0096	1,6307	0,0160
6	1,9458	0,0096	1,6415	0,0161
<b>Média ±</b>	1,950± 0,0125	0,0096± 0,0001	1,640±0,069(0,42	0,0161± 0,0001 (0,79)
<b>DP (DPR)</b>	(0,64)	(1,60)	)	

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

### Precisão Intermediária

**Tabela 5** - Resultados, expressos em área e teor, do ensaio de precisão intermediária (dia 1) para o método de quantificação do teor de ácido gálico MP e EB das folhas de *E. uniflora* por CLAE.

	Parâmetro	n	Área	Teor	Média ± DP (DPR)
MP	Op1Dia1	1	7,2979	0,0564	0,0566 ±0,0012 (2,04)
		2	7,3733	0,0570	
		3	7,3227	0,0566	
	Op2Dia1	1	7,0594	0,0545	0,0546 ±0,0002 (0,37)
		2	7,0393	0,0544	
		3	7,0906	0,0548	
EB	Op1Dia1	1	4,2413	0,0416	0,0420 ± 0,0016 (3,91)
		2	4,3275	0,0424	
		3	4,2704	0,0419	
	Op2Dia1	1	4,6141	0,0453	0,0449 ±0,0004 (0,80)
		2	4,5781	0,0449	
		3	4,5408	0,0445	

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 6** - Resultados, expressos em área e teor, do ensaio de precisão intermediária (dia 2) para o método de quantificação do teor de ácido gálico em MP e EB das folhas de *E. uniflora* por CLAE.

	<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>Área</b>	<b>Teor</b>	<b>Média ± DP (DPR)</b>
<b>MP</b>	<b>Op1Dia2</b>	1	7,4728	0,0577	0,0576 ± 0,0002 (0,39)
		2	7,4681	0,0577	
		3	7,4199	0,0573	
	<b>Op2Dia2</b>	1	7,4405	0,0575	0,0577 ± 0,0003 (0,48)
		2	7,5119	0,0580	
		3	7,4698	0,0577	
<b>EB</b>	<b>Op1Dia2</b>	1	4,6141	0,0453	0,0449 ± 0,0004 (0,80)
		2	4,5781	0,0449	
		3	4,5408	0,0445	
	<b>Op2Dia2</b>	1	4,7421	0,0465	0,0456 ± 0,0011(2,35)
		2	4,6828	0,0459	
		3	4,5300	0,0444	

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 7** - Resultados, expressos em área e teor, do ensaio de precisão intermediária (dia 1) para o método de quantificação do teor de ácido elágico MP e EB das folhas de *E. uniflora* por CLAE.

	<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>Área</b>	<b>Teor</b>	<b>Média ± DP (DPR)</b>
<b>MP</b>	<b>Op1Dia1</b>	1	14,6192	0,0659	0,0675 ± 0,0025 (3,68)
		2	15,1218	0,0682	
		3	15,1776	0,0684	
	<b>Op2Dia1</b>	1	14,0216	0,0632	0,0633 ± 0,0001(0,16)
		2	14,0567	0,0634	
		3	14,0146	0,0632	
<b>EB</b>	<b>Op1Dia1</b>	1	8,6137	0,0947	0,0980 ± 0,0022 (2,22)
		2	9,0665	0,0997	
		3	9,0464	0,0995	
	<b>Op2Dia1</b>	1	9,0852	0,0999	0,1002 ± 0,0005 (0,50)
		2	9,1612	0,1007	
		3	9,0806	0,0999	

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 8** - Resultados, expressos em área e teor, do ensaio de precisão intermediária (dia 2) para o método de quantificação do teor de ácido elágico MP e EB das folhas de *E. uniflora* por CLAE.

	<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>Área</b>	<b>Teor</b>	<b>Média ± DP (DPR)</b>
<b>MP</b>	<b>Op1Dia2</b>	1	12,9050	0,0582	0,0604 ± 0,0019 (3,23)
		2	13,7334	0,0619	
		3	13,5320	0,0610	
	<b>Op2Dia2</b>	1	13,7617	0,0621	0,0625 ± 0,0018 (2,89)
		2	14,2875	0,0644	
		3	13,5023	0,0609	
<b>EB</b>	<b>Op1Dia2</b>	1	8,8918	0,0978	0,0960 ± 0,0015(1,61)
		2	8,6546	0,0952	
		3	8,6425	0,0950	
	<b>Op2Dia2</b>	1	8,6940	0,0956	0,0956 ± 0,0031 (2,32)
		2	8,4126	0,0925	
		3	8,9824	0,0988	

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 9** - Resultados, expressos em área e teor, do ensaio de precisão intermediária (dia 1) para o método de quantificação do teor de flavonoide 2 MP e EB das folhas de *E. uniflora* por CLAE.

	<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>Área</b>	<b>Teor</b>	<b>Média ± DP (DPR)</b>
<b>MP</b>	<b>Op1Dia1</b>	1	10,1226	0,1305	0,1326 ± 0,0040 (3,00)
		2	10,3544	0,1335	
		3	10,3649	0,1337	
	<b>Op2Dia1</b>	1	9,7315	0,1255	0,1256 ± 0,0001 (0,11)
		2	9,7378	0,1256	
		3	9,7522	0,1258	
<b>EB</b>	<b>Op1Dia1</b>	1	23,1746	0,5977	0,5998 ± 0,0076 (1,27)
		2	23,2274	0,5991	
		3	23,3591	0,6025	
	<b>Op2Dia1</b>	1	22,7910	0,5878	0,5862 ± 0,0017 (0,29)
		2	22,7364	0,5864	
		3	22,6610	0,5845	

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 10** - Resultados, expressos em área e teor, do ensaio de precisão intermediária (dia 2) para o método de quantificação do teor de flavonoide 2 MP e EB das folhas de *E. uniflora* por CLAE.

	<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>Área</b>	<b>Teor</b>	<b>Média ± DP (DPR)</b>
<b>MP</b>	<b>Op1Dia2</b>	1	10,0342	0,1294	0,1314 ± 0,0019 (1,42)
		2	10,3225	0,1331	
		3	10,2048	0,1316	
	<b>Op2Dia2</b>	1	10,2849	0,1326	0,1325 ± 0,0002 (0,16)
		2	10,2792	0,1326	
		3	10,2547	0,1322	
<b>EB</b>	<b>Op1Dia2</b>	1	22,3950	0,5776	0,5829 ± 0,0048 (0,82)
		2	22,7574	0,5870	
		3	22,6450	0,5841	
	<b>Op2Dia2</b>	1	22,7490	0,5867	0,5767 ± 0,0140 (2,44)
		2	21,7383	0,5607	
		3	22,5953	0,5828	

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 11** - Resultados, expressos em área e teor, do ensaio de precisão intermediária (dia 1) para o método de quantificação do flavonoide 3 em MP e EB das folhas de *E. uniflora* por CLAE.

	<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>Área</b>	<b>Teor</b>	<b>Média ± DP (DPR)</b>
<b>MP</b>	<b>Op1Dia1</b>	1	1,9285	0,0095	0,0095 ± 0,0003(3,63)
		2	1,9367	0,0095	
		3	1,9397	0,0095	
	<b>Op2Dia1</b>	1	1,8097	0,0089	0,0089 ± 0,000 (0,15)
		2	1,8044	0,0089	
		3	1,8072	0,0089	
<b>EB</b>	<b>Op1Dia1</b>	1	1,6463	0,0162	0,0162 ± 0,0002(1,08)
		2	1,6492	0,0162	
		3	1,6390	0,0161	
	<b>Op2Dia1</b>	1	1,6166	0,0159	0,0158 ± 0,0001(0,35)
		2	1,6073	0,0158	
		3	1,6174	0,0159	

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 12** - Resultados, expressos em área e teor, do ensaio de precisão intermediária (dia 2) para o método de quantificação do teor de flavonoide 3 em MP e EB das folhas de *E. uniflora* por CLAE.

	<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>Área</b>	<b>Teor</b>	<b>Média ± DP (DPR)</b>
<b>MP</b>	<b>Op1Dia2</b>	1	1,8200	0,0089	0,0090± 0,0001 (2,54)
		2	1,8630	0,0091	
		3	1,8260	0,0090	
	<b>Op2Dia2</b>	1	1,8250	0,0090	0,0089± 0,0001 (2,47)
		2	1,7810	0,0087	
		3	1,8088	0,0089	
<b>EB</b>	<b>Op1Dia2</b>	1	1,5720	0,0154	0,0155 ± 0,0001(0,74)
		2	1,5630	0,0153	
		3	1,5860	0,0156	
	<b>Op2Dia2</b>	1	1,5825	0,0155	0,0156 ± 0,0002 (1,19)
		2	1,5721	0,0154	
		3	1,6088	0,0158	

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de amostras. Fonte: Autoria própria.