

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

MARCOS AURÉLIO MORAES GALVÃO

**ESTABELECIMENTO DE MÉTODO POR UV/VIS PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DAS CASCAS E FRUTOS DE
Libidibia ferrea (MART. EX TUL.) L.P. QUEIROZ**

Recife

2015

MARCOS AURÉLIO MORAES GALVÃO

**ESTABELECIMENTO DE MÉTODO POR UV/VIS PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DAS CASCAS E FRUTOS
DE *Libidibia ferrea* (MART. EX TUL.) L.P. QUEIROZ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título 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

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Galvão, Marcos Aurélio Moraes

Estabelecimento de métodos por UV/VIS para o controle de qualidade das cascas e frutos de *Libidia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz / Marcos Aurélio Moraes Galvão- Recife: O Autor, 2015.

80 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui referências

1. Plantas medicinais 2. Plantas da Caatinga 3. Taninos I. Soares, Luiz Alberto Lira (orient.) II. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 428

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: GALVÃO, Marcos Aurélio Moraes

Título: Estabelecimento de método por UV/Vis para controle de qualidade das cascas e frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz.

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

Aprovada em: 25/02/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Instituição:

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Karina Perrelli Randau

Instituição:

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Mariana Laundry de Mesquita

Instituição:

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as três maravilhosas Marias que tive o prazer de ter em minha vida, Maria José Arruda de Albuquerque *in memoriam*, Célia Maria de Albuquerque Galvão *in memoriam* e Rosa Maria de Albuquerque Galvão. Sem elas nada teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Luiz Alberto Lira Soares, por toda a confiança, incentivo, dedicação, e todas as oportunidades concedidas a mim durante minha graduação e pós-graduação.

A querida professora Dra. Karina Perrelli Randau, por sua amizade, confiança e incentivo. Agradeço também pelos conselhos e disponibilidade de tempo sempre que precisei de sua ajuda.

À minha prezada companheira de laboratório, Msc. Magda Rhayanny Assunção Ferreira, que desde o princípio me acolheu, me ensinou, me apoiou e contribuiu plenamente para o meu crescimento como profissional pesquisador.

Aos amigos de laboratório, pelo aprendizado e vivência, Alice Arruda, Alana Guimarães, Alysson Clayderman, Júlia Souza, Rafaela Damasceno, Isabelle Ferraz, Rebeka Monteiro, Hyalyne Barbosa, Layanne Feitosa, Suellen Karla e Wliana Viturino. As minhas três amigas queridas, Vanessa Luna, Larissa Cabral e Camila Almeida. Em especial gostaria de agradecer pela amizade, carinho e companheirismo a Waleska Leão e Sarah Luanne, e principalmente pelas palavras de apoio nas horas mais difíceis e necessárias.

À amizade construída com os alunos dos Laboratórios de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) e Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC), Graziela Marques, Caio Andrade, Lariza Alves, Ricardo, Maria Luiza, Amanda Quincas, Camila Figuerêdo, Cybelly Marques, e em especial a Salvana Costa, Leslie Raphael e a Prof.^a Dra. Larissa Rolim que sempre me ajudaram e auxiliaram em momentos de necessidade.

À minha família e amigos pessoais, que me apoiaram em todos os momentos difíceis da minha trajetória de vida, a minha querida irmã Márcia Galvão e à minha tia Aline Ranzolin que me inspira e me motiva a fazer pesquisa. Em especial agradeço a minha querida tia Rosa Galvão, pela amizade, carinho, companheirismo e apoio, sem ela, meus sonhos seriam mais difíceis de serem alcançados.

*“Um leitor vive mil vidas antes de morrer,
O homem que nunca lê vive apenas uma.”*

George R. R. Martin

RESUMO

GALVÃO, Marcos Aurélio Moraes. Estabelecimento de método por UV/Vis para controle de qualidade dos frutos e das cascas do caule de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz. 2015. 0080f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, o jucá, é uma planta medicinal nativa do bioma caatinga e comumente encontrada na região Nordeste do Brasil. A espécie é extensamente utilizada pela população e objeto de interesse da indústria farmacêutica. Porém, ainda não possui especificações farmacopeias. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral, avaliar, padronizar e aperfeiçoar a metodologia de Folin-Ciocalteu (FC) para doseamento de taninos totais aplicada ao controle de qualidade dos frutos ou das cascas do caule de *L. ferrea*. Para tanto, três amostras de cada farmacógeno foram analisadas. Após secagem e moagem, as amostras foram submetidas à caracterização físico-química segundo metodologias farmacopeias (FB5, 2010). Os resultados demonstraram que as drogas avaliadas estão dentro dos limites especificados pelo compêndio, tal como ausência de matéria estranha (< 2%), teor de cinzas totais (< 6,5 %), além de umidade residual abaixo do limite preconizado (<14%). Para todos os lotes de ambas as drogas, o teor de extrativos foi de aproximadamente 1%. Considerando a triagem fitoquímica por CCD foi observada a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, açúcares redutores e taninos hidrolisáveis nos dois farmacógenos; e, taninos condensados apenas para as cascas do caule. A metodologia para o doseamento de taninos foi baseada no método da Farmacopeia Europeia, adotando adequações quando necessárias. Portanto, durante o processo de padronização do método foram investigados os parâmetros: tempo de reação, quantidade de droga, agentes precipitantes e reagente colorimétrico. Em seguida, o método foi validado para cada uma das drogas em conformidade com a legislação vigente. De acordo com os dados, as condições otimizadas e padronizadas para análise dos taninos nas cascas ou nos frutos de *L. ferrea* foram de 30 minutos de reação; comprimento de onda de 760 nm; 1,0 mL do reagente de FC; solução de carbonato de sódio 29% (m/v); e, pó-de-pele como complexante. Os ensaios de validação relevaram que o método mostrou ser adequado para a análise quantitativa de taninos, cumprindo todos os critérios de validação preconizados (especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez), podendo ser aplicado com êxito ao controle de qualidade da espécie, garantindo assim a sua capacidade de avaliar a reprodutibilidade dos atributos de produtos desenvolvidos à base de matérias primas a partir dos frutos e cascas do caule de *L. ferrea*.

Palavras-chave: *Libidibia ferrea*. Folin-Ciocalteu. Controle de qualidade. Taninos. Validação.

ABSTRACT

GALVÃO, Marcos Aurélio Moraes. Establishment of method by UV / Vis for application in quality control of bark and fruits of *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz. 2015. 0080f. Master's thesis. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) LP Queiroz, known as jucá, is a medicinal plant native of Caatinga biome and commonly found in Northeast region of Brazil. The species is widely used by the population and it is object of interest in the pharmaceutical industry, however, has not yet quality specifications described in official compendia. Given these considerations, the objective of the present study was to evaluate the Folin-Ciocalteu methodology for assay of tannins applied to quality control of bark and fruits of *L. ferrea*. For this purpose, three samples of each pharmacogens were tested. After drying and grinding, the samples were subjected to physicochemical characterization methodologies second pharmacopoeia (FB5, 2010). The results showed that the tested drugs are within the limits specified by the compendium, such as the absence of foreign matter (<2%), total ash content (<6.5%), and residual moisture below the recommended limit (<14 %). For all batches of both drugs, the extractives content was approximately 1%. Considering the phytochemical screening by TLC was observed the presence of flavonoids, cinnamic derivatives, reducing sugars and hydrolysable tannins in both pharmacogens; and condensed tannins only for the stem bark. The methodology for the determination of tannins was based on the European Pharmacopoeia method, adopting when necessary adjustments. Therefore, during the optimization process parameters were investigated: reaction time, amount of drug, precipitants and colorimetric reagent. Then the method was validated for each one of the drugs in accordance with current legislation. According to the data, the optimal conditions for the analysis of tannin in the bark or fruits of the *L. ferrea* is 30 minutes of reaction; wavelength 760 nm; 1,0 ml of FC reagent; sodium carbonate solution 29% (w/v); and powder-skin as a complexation agent. Validation tests show that the method proved to be suitable for quantitative analysis of tannins, fulfilling all the recommended validation criteria (specificity, linearity, precision, accuracy and robustness) and can be successfully applied to quality control of the species, ensuring so their ability to assess the reproducibility of product attributes developed based on raw materials from pharmacogens *L. ferrea*.

Keywords: *Libidibia ferrea*. Folin-Ciocalteu. Quality control. Tannins.

Validation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 <i>Libidibia ferrea</i> (MART. EX TUL.) L.P. QUEIROZ	15
3.2 QUALIDADE DE DROGAS VEGETAIS	17
3.3 TANINOS	18
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS POR UV-VIS	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	23
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	24
4.2.1 Matéria estranha	24
4.2.2 Perda por dessecação – Método gravimétrico	24
4.2.3 Determinação de cinzas totais	25
4.2.4 Determinação granulométrica	25
4.2.5 Determinação de substâncias extraíveis por água – Extração a quente	26
4.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA	26
4.3.1 Obtenção dos extratos	26
4.3.2 Sistemas de eluição	27
4.3.3 Sistema cromatográfico (CCD)	26
4.3.4 Teste de afrogenicidade	28
4.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE TANINOS TOTAIS	29
4.4.1 Solução estoque	29
4.4.2 Solução amostra para polifenóis totais (PFT)	29
4.4.3 Solução amostra para polifenóis não adsorvidos por pó de pele (FNT)	30
4.4.4 Solução padrão	30
4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E REACIONAIS DO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU	31
4.5.1 Determinação do comprimento de onda e do tempo de leitura	31
4.5.2 Determinação do padrão de referência	31
4.5.3 Avaliação da proporção droga:solvente	32
4.5.4 Avaliação da influência do reagente de Folin-Ciocalteu e de Na_2CO_3	32
4.5.6 Avaliação do agente complexante	32

4.6 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS ICH (2005) E RE 899 (2003)	33
4.6.1 Linearidade	33
4.6.2 Especificidade	33
4.6.3 Limites de detecção e quantificação	34
4.6.4 Precisão	34
4.6.5 Exatidão	34
4.6.6 Robustez	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	36
5.1.1 Matéria estranha	36
5.1.2 Perda por dessecação – Método gravimétrico	36
5.1.3 Determinação de cinzas totais	37
5.1.4 Determinação granulométrica	38
5.1.5 Determinação de substâncias extraíveis por água – Extração a quente	40
5.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA	41
5.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E REACIONAIS DO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU	47
5.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS	59
5.4.1 Curvas de Linearidade, Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)	59
5.4.2 Especificidade	60
5.4.3 Precisão, exatidão e robustez	62
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais possuem grande interesse clínico e são alternativas terapêuticas extensamente utilizadas na medicina popular ou como matérias-primas para a produção de medicamentos fitoterápicos. Com o passar dos anos o interesse acerca destes produtos têm crescido exponencialmente, representando um mercado farmacêutico bastante promissor (COUTO et al., 2009; KLEIN et al., 2010; MARQUES et al., 2012a).

Em decorrência do interesse industrial e clínico por algumas espécies medicinais, o Ministério da Saúde do Brasil apresentou em 2008 a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), divulgando uma lista contendo 71 espécies vegetais com potencial terapêutico. Com o objetivo de direcionar pesquisas científicas estimulando a produção nacional de produtos derivados de espécies nativas e a introdução de práticas complementares de assistência à saúde pelo SUS (BRASIL, 2008; NUNES et al., 2009; MARQUES et al., 2012b).

Presente na lista da RENISUS, a espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz tem sido bastante utilizada tradicionalmente devido as suas propriedades medicinais. A espécie é uma árvore de grande porte que pertence à família Fabaceae, conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro e ocorre na caatinga nordestina estendendo-se até a região sudeste (CAVALHEIRO et al., 2009). As cascas do caule são extensamente utilizadas pela população como cicatrizante no tratamento de feridas, contusões, no combate a asma e à tosse crônica. Os frutos são antidiarreicos, anticatarras e cicatrizantes; as raízes são antitérmicas e também possuem usos contra úlceras gástricas, atividades anti-inflamatória e analgésica (SAMPAIO et al., 2009).

Atualmente o Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece uma série de critérios e normatizações para regulamentar o registro de fitoterápicos, sendo assim, as matérias-primas vegetais utilizadas na produção de medicamentos fitoterápicos deverão atender a uma série de pré-requisitos de qualidade que assegurem a eficácia

terapêutica e a segurança clínica do produto (MARQUES; PETROVICK, 2010; KLEIN et al., 2010).

Dentre estas especificações, devido à complexidade dos insumos vegetais e as variações associadas às condições de cultivo, sazonalidade, operações de coleta, variação intraespécies e tratamentos empregados para estabilização destes materiais; faz-se necessário a análise de aspectos físico-químicos, fitoquímicos e de marcadores químicos ou farmacológicos de drogas vegetais a fim de garantir a qualidade e autenticidade da matéria prima utilizada na produção de medicamentos fitoterápicos (BARNI; CECHINEL; COUTO, 2009; MARQUES et al., 2012).

As cascas do caule e os frutos de *L. ferrea* são amplamente utilizadas na fitoterapia e medicina popular, o que a torna objeto de grande interesse científico. Entretanto, apesar de toda a sua importância terapêutica, a droga ainda não consta em monografias e códigos oficiais; além disso, a literatura científica especializada também não apresenta métodos para o controle de qualidade aplicado à espécie (BRANDÃO, 2006). Nesse contexto, é necessário a disponibilização de metodologias analíticas validadas para a quantificação de marcadores na droga, garantindo assim, a qualidade e autenticidade da matéria-prima vegetal, viabilizando o seu uso na fitoterapia. O que poderá agregar valor a espécie e também fortalecer este setor na economia da região Nordeste do Brasil (FRASSON; BITTEM COURT & HEINZMANN, 2003).

Entre as ferramentas analíticas destinadas a quantificação de compostos químicos em fitoterápicos se destaca a espectrofotometria no UV-Vis. A utilização desta técnica para a análise de drogas vegetais está diretamente relacionada às crescentes exigências legais para o controle de qualidade destes produtos (WHO, 1998; GAEDCKE; STEINHOFF, 2000; BRASIL, 2004). Em comparação com técnicas mais complexas que exigem equipamentos e consumíveis de alto custo, como as cromatografias líquida, gasosa e em camada delgada de alta eficiência, a espectrofotometria é uma técnica simples, de baixo custo e dependendo da metodologia empregada apresenta seletividade e especificidade necessária para o doseamento preciso de compostos químicos e/ou grupos de metabólitos secundários em matrizes vegetais (KLEIN, 2010).

A grande vantagem da utilização de espectrofotometria em matrizes vegetais é que em muitos casos o marcador ativo que é a substância utilizada como referência para o controle de qualidade de produtos vegetais não é conhecido (GAEDCKE; STEINHOFF, 2000), nesse sentido, o emprego de métodos para quantificação de grupos de compostos traduz com maior fidelidade a relação entre a resposta analítica e a qualidade da droga, como no caso dos taninos, em que devido a sua grande diversidade estrutural e o alto peso molecular dos seus polímeros, torna-se bastante difícil a análise total destes componentes através da cromatografia, sendo por isso, mais apropriado o doseamento do grupo (SCHMIDT; GONZÁLEZ ORTEGA, 1993; SOARES et al., 2003).

Apesar de grandes vantagens, a espectrofotometria apresenta falhas devido a fenômenos de sobreposição de bandas de absorbância específicas por diferentes metabólitos presentes nas matrizes vegetais podendo comprometer o sucesso de alguns métodos; Desta forma, torna-se necessário a avaliação de reagentes e novos procedimentos analíticos que confirmem à técnica a especificidade e seletividade necessária para o objetivo desejado (PETRY et al., 2001; SOARES et al., 2006; SOLON et al., 2007).

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo realizar a caracterização físico-química, a prospecção fitoquímica e avaliar, otimizar e padronizar o desempenho do método de Folin-Ciocalteu aplicado às drogas vegetais constituídas de cascas do caule e frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, uma vez que, o desenvolvimento destes estudos é de fundamental importância como instrumento de avaliação durante toda a etapa de desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas a base de farmacógenos desta espécie vegetal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar parâmetros físico-químicos de qualidade, perfil fitoquímico e realizar o controle de qualidade químico cascas do caule e frutos da espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Jucá) através da metodologia analítica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteau (1927) para quantificação de taninos totais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar parâmetros de qualidade físico-químicos das matérias-primas vegetais obtidas a partir de cascas do caule e frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Jucá);
- Estabelecer perfil fitoquímico das matérias-primas vegetais de *L. ferrea*;
- Estudar, otimizar, validar e padronizar metodologia analítica por espectrofotometria UV/Vis para o doseamento de taninos presentes nas cascas do caule e frutos de *L. ferrea*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Libidibia ferrea* var. *Ferrea* (MART. EX TUL.) L.P. QUEIROZ.

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz é uma árvore de grande porte que pertence à família Fabaceae, conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro de basinônimo *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (CAVALHEIRO, 2009). A espécie é bem adaptada e comumente encontrada em florestas de clima seco e semiárido, características típicas do bioma Caatinga, onde a espécie possui ampla distribuição (BORGES et al., 2012). Na literatura, é relatada a existência de quatro sub-espécies de *Libidibia* sp: *Libidibia ferrea* var. *ferrea* (Benth) L.P. Queiroz, *L. ferrea* var. *glabrescens* (Benth.) L.P. Queiroz, *L. ferrea* var. *parvifolia* (Benth.) L.P. Queiroz (QUEIROZ, 2009) e *Caesalpinia ferrea* var. *leiostachya*, sendo a variação *Libidibia ferrea* var. *ferrea* e *L. ferrea* var. *glabrescens* restritas a região da Caatinga e as demais restritas as regiões de Floresta atlântica (RIZZINI; MATOS-FILHO, 1968).

A planta possui flores amarelas pequenas em forma de cachos, possui folhas compostas e frutos de coloração marrom escura em forma de vagens. A espécie pode chegar a 10-15 m de altura com tronco curto de 40 a 60 cm de diâmetro possuindo manchas claras em sua superfície. A árvore é geralmente utilizada como ornamental sendo empregada na arborização de ruas e avenidas, como forrageira na região Nordeste, podendo ser aproveitada para plantio em áreas degradadas, além de fornecer matéria prima para a construção civil (PIO, 1084; LORENZI, 2002; NASCIMENTO et al., 2002).

Estudos a cerca da composição química de *L. ferrea* tem evidenciado a presença de flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e outros compostos fenólicos (GONZALEZ et al., 2004). Os taninos têm sido caracterizados como os componentes de maior quantidade e importância medicinal na droga vegetal (tanto de cascas do caule quanto de frutos). Além disso, a esta classe de metabólitos secundários, são atribuídas diversas atividades farmacológicas e agroindustriais (UEDA et al., 2001).

A espécie vegetal é tradicionalmente utilizada na região amazônica para o tratamento de hemorroidas, amebíase, problemas hepáticos,

tuberculose, disenteria, tosse, bem como contra desarranjos menstruais, problemas renais e pulmonares (Di STASI, 2002).

As cascas do caule são utilizadas como cicatrizante no tratamento de feridas, contusões, no combate a asma e à tosse crônica. Nakumura (2002) testou o extrato desta espécie contra o câncer de pele em camundongos observando vários estágios da carcinogênese. O extrato alcoólico de *L. ferrea* demonstrou atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *E. gergoviae* (LM56) (PEREIRA, 2006). No que diz respeito à atividade antimicrobiana atribuída também as cascas, a maioria dos estudos com a droga vegetal tem sido justificados pelo alto teor de polifenóis em composição química, fato que confere a espécie elevada atividade antioxidante (SAMPAIO, 2009; da SILVA PORT'S et al., 2013).

Os frutos são utilizados como antidiarreicos, anticatarrais e cicatrizantes e as raízes como antitérmicas, também são empregadas contra úlceras gástricas, além do uso como anti-inflamatório e analgésico (BACCHI; SERTIE, 1994; BACCHI et al., 1995; HASHIMOTO, 1996; CARVALHO et al., 1996; SAMPAIO, 2009). Carvalho (1996) avaliou a atividade analgésica do extrato alcoólico dos frutos da espécie em camundongo comprovando a atividade anti-inflamatória. Além disso, compostos isolados a partir do fruto são capazes de inibir a aldose redutase sugerindo a atividade antidiabética da espécie, associada a presença de taninos hidrolisáveis na planta medicinal (UEDA et al., 2001).

O extrato metanólico dos frutos de *L. ferrea* ainda tem demonstrado forte atividade contra cepas de patógenos orais como *Candida albicans* (SAMPAIO, 2009). Ainda é relatado que extratos hidroalcoólicos contendo triterpenos apresentaram atividades contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas (SAEED, 2001; SUDHAKAR, 2006). São também relatadas atividades do extrato aquoso contra cepas de vírus Herpes-vírus simple (HSV) *in vitro*, atividade possivelmente associada à presença de polissacarídeos sulfatados no extrato (LOPES et al., 2013).

3.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE DROGAS VEGETAIS

No que diz respeito a fitoterápicos, para obtenção da eficácia, segurança e reprodutibilidade dos efeitos terapêuticos, é necessário garantir a qualidade tanto da matéria prima como do produto final (KLEIN, 2010). Atualmente, o controle de qualidade de drogas vegetais é feito com base no teor de um marcador químico ou farmacológico, entretanto, diversos fatores tais como: variações climáticas, tipo de solo empregado no plantio, época da coleta, condições de secagem e/ou armazenamento, podem influenciar diretamente nas características físico-químicas, no teor de marcador e na qualidade final das drogas vegetais e seus produtos derivados (MICHELIN et al., 2009).

Nesse sentido, é necessário o estabelecimento de protocolos de identificação e caracterização de matérias primas vegetais definindo parâmetros mínimos de identidade, pureza e de teor de constituintes químicos, facilitando a reprodutibilidade e a credibilidade da matéria prima e/ou produto acabado e sendo fundamental para assegurar a eficácia terapêutica (WHO, 1991; YUNES; FILHO, 2012). Em princípio algumas espécies medicinais possuem parâmetros mínimos de qualidade especificados em compêndios e códigos oficiais, entretanto diversas plantas utilizadas tradicionalmente ainda carecem de informações técnicas na literatura, sendo de extrema importância o desenvolvimento e publicação de estudos tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico destas espécies (MICHELIN et al., 2009).

A pesquisa fitoquímica visa estabelecer os constituintes químicos das espécies vegetais e identificar grupos de metabólitos secundários relevantes (SIMÕES, 2010). Dentre os métodos existentes para avaliação fitoquímica de drogas vegetais se destacam as técnicas cromatográficas, pois permitem a identificação e quantificação direta de compostos ativos em matrizes vegetais. A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) tem sido extensamente utilizada para análise de ativos em drogas vegetais, principalmente devido à sua simplicidade, baixo custo e rapidez. A necessidade de processos de separação mais eficientes e o avanço tecnológico na área da cromatografia fez surgir a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), técnica que é muito semelhante à CCD convencional, mas que difere no aspecto

prático, pois é parcialmente ou completamente computadorizada, possuindo consequentemente maior resolução, reprodutibilidade, menor limite de detecção, maior rapidez e eficiência nos processos de separação e identificação de compostos químicos (KLEIN, 2010; COLLINS, 2011).

3.3 TANINOS

Os taninos são metabólitos secundários há muito explorados pelo homem. A cerca de 200 anos atrás, indústrias do couro já utilizavam plantas que possuíam taninos em sua composição química para realizar o processo de curtimento do couro (HASLAM, 1989; ARAPITSAS, 2012). Com o passar dos anos e o avanço da tecnologia química e também devido a grande variabilidade do teor de taninos entre espécies vegetais que eram utilizadas no processo de curtimento do couro, estes metabólitos foram substituídos por agentes químicos inorgânicos ou polímeros sintéticos, entretanto a sua utilização impulsionou pesquisas e o desenvolvimento de diversas técnicas analíticas aplicadas para avaliação e padronização de matérias primas taníferas (ARAPITSAS, 2012).

Os taninos são polifenóis derivados do metabolismo do ácido chiquímico amplamente distribuídos no reino vegetal, são caracterizados como moléculas de alto peso molecular, na faixa entre 500 a 5000 Daltons e solúveis em soluções aquosas. Baseado em suas estruturas químicas os taninos podem ser classificados em dois grupos principais: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; MELLO; HASLAM, 2007; SANTOS, 2010;).

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados por unidades de flavan-3,4-dióis (leucoantocianidinas) ou constituídos por dímeros ou maiores combinações de flavan-3-ol (proantocianidinas condensadas), tais como catequina ou epicatequina, unidas por ligações covalentes entre os carbonos C₄ e C₈ ou carbono C₄ e C₆. Estes compostos podem possuir até cinquenta unidades de catequina e/ou derivados com estruturas complexas resistentes a hidrólise ácido/base, mas podendo ser despolimerizados através do emprego de n-butanol e ácido clorídrico. A denominação proantocianidinas

advém da característica que estas moléculas possuem de formar pigmentos vermelhos após degradação a quente com ácido mineral diluído (MARTINZ, 1998; BRUNETON, 2001; SANTOS; MELLO, 2010; SHOJI et al., 2006; VERZA, 2006).

Os taninos hidrolisáveis são compostos por ésteres de ácido gálico, ácido elágico e/ou seus derivados (ácidos fenólicos) ligados a um açúcar central, possuem ligações éster-carboxila e podem sofrer hidrólise em meio ácido ou básico produzindo carboidratos e ácidos fenólicos (HAGERMAN; BUTLER, 1981). Nesse sentido, devido a grande diversidade estrutural há uma enorme dificuldade no estabelecimento de padrões de referência para a classe, tornando a identificação e quantificação destes metabólitos em matrizes vegetais uma operação complexa (NOZELLA, 2006).

De acordo com a composição dos taninos, estes metabólitos possuem hidroxilas fenólicas em quantidades suficientes para formar ligações covalentes com proteínas, inclusive com proteínas do couro animal, inibindo a putrefação e realizando o processo conhecido como curtimento. Estes também são potentes inibidores enzimáticos e possuem a capacidade de formar um complexo entre suas hidroxilas aromáticas com macromoléculas e metais de transição, produzindo colorações ou diminuindo a sua solubilidade em meio aquoso (MAKKAR, 1987; NACZK et al., 2001).

Muitas características atribuídas aos taninos, tais como adstringência, fungitoxicidade, inibição enzimática e proteica estão relacionadas com a sua capacidade de formar complexos com íons metálicos e macromoléculas, especialmente com proteínas. A formação destes complexos ocorre através de diferentes mecanismos e/ou condições tais como: formação de pontes de hidrogênio, interações hidrófobas, tamanho molecular ou grau de polimerização dos taninos, estrutura das proteínas, pH e força iônica do meio (HASLAM, 1989; SANTOS; MELLO, 2010).

A produção e utilização de medicamentos e preparados a base de extratos de plantas medicinais que contém taninos, se baseiam nas propriedades adstringentes destes metabólitos (MONTEIRO et al., 2005). Estudos mostram que a complexação dos taninos com polissacarídeos, proteínas e íons metálicos, conferem atividades antidiarreicas e hemostáticas a extratos de plantas medicinais que os contém, justificando o uso etnomedicinal

de plantas taníferas contra tais moléstias (BRUNETON, 2001; MONTEIRO, 2005; SANTOS; MELLO, 2010). Além disto, os taninos por precipitarem íons, proteínas e enzimas em solução conferem atividades antifúngicas, antimicrobiana, antiviral e moluscicida aos extratos que os contém (BRUYNE, et al., 1999; BRUNETON, 2001; SANTOS; VERZA, 2006; MELLO, 2010).

Apesar de possuírem vários usos benéficos, os taninos também apresentam efeitos tóxicos e nocivos em animais e humanos, principalmente devido à capacidade de formar complexos com proteínas (LIAO et al., 2003; MONTEIRO, 2005). Liao e colaboradores (2003) sugeriram que os taninos hidrolisáveis possuem maior toxicidade quando comparados aos taninos condensados, devido ao fato de serem facilmente hidrolisados e degradados em sistemas biológicos, sendo os produtos de degradação potencialmente tóxicos para órgãos como rins e fígado. Entretanto ainda não existem estudos que assegurem limites de toxicidade para a utilização de produtos em geral que contenham estes metabólitos.

Estudos tem mostrado que os taninos podem diminuir a absorção de nutrientes, além de promover a diminuição do apetite, ao inibir enzimas digestivas, afetando a absorção e utilização de vitaminas e sais minerais em animais herbívoros, sendo algumas espécies vegetais classificadas até como antinutricionais (SILANIKOVE et al., 2001; LIAO et al., 2003; MAKKAR, 2003; MONTEIRO et al., 2005; NOZELLA, 2006).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS POR UV-VIS

O estudo de taninos pela técnica de espectrofotometria no UV-Vis muitas vezes utiliza a produção ou inclusão de grupos cromóforos nas moléculas de taninos para que haja uma diferenciação deste grupo na solução contendo a matriz vegetal, proporcionando assim, a identificação e quantificação destes metabólitos. Para isto, são comumente utilizados métodos que incluem a despolimerização oxidativa de taninos condensados, reações com o anel A das proantocianidinas com aldeídos aromáticos, reações enzimáticas, inibição microbiana através da comparação entre o halo obtido experimentalmente além de reações colorimétricas de oxido-redução e

procedimentos gravimétricos através da precipitação destas macromoléculas (HARBORNE, 2000; SCHOFIELD et al, 2001; HARVEY, 2001; MONTEIRO et al., 2005; VERZA, 2006).

Para a determinação de taninos condensados pode ser utilizado o método butanol-ácido clorídrico, onde é feita uma catálise ácida oxidativa causando uma despolimerização dos taninos condensados produzindo uma coloração avermelhada devido à presença de antocianinas precipitadas na solução. Os taninos hidrolisáveis não são reativos a este método (HASLAM, 1989; SCHOFIELD; MBUGUA, 2001). Também pode ser utilizado o método de reação com a vanilina em ácido sulfúrico ou clorídrico. A vanilina é um aldeído redutor que possui um anel aromático e em pH ácido reage com as hidroxilas dos taninos condensados acarretando a formação de complexos colorimétricos. Entretanto, a reação é extremamente sensível a diversos fatores tais como tipo de solvente utilizado, tempo de reação, tipo de ácido utilizado para a catálise da reação, temperatura e concentração de vanilina (HAGERMAN, 1998; SUN et al., 1998).

Dentre os métodos de oxi-redução com formação de complexo, tem destaque os métodos de Folin-Denis, Folin-Ciocalteu e azul da prússia. Todos envolvem o doseamento de polifenóis mediante a formação de complexo de coloração mensurável no Vis, derivado da redução dos reagentes com as hidroxilas fenólicas sendo a intensidade da coloração obtida, proporcional ao conteúdo de polifenóis presentes em solução. O método de Folin-Ciocalteu é citado para o doseamento de taninos por alguns compêndios (BP, 2001; DAB, 1998; Ph. Eur., 2002; FB5, 2010)

No método de Folin-Ciocalteu, ocorre uma reação de redução entre o ácido fosfotúngstico e as hidroxilas presentes nos polifenóis, formando um complexo cromóforo azulado constituído de ácido fosfotúngstico-fosfomolibidênio e polifenóis. A absorção máxima deste cromóforo depende do pH da solução e da concentração de compostos fenólicos presentes na amostra. Entretanto, trata-se de uma técnica geral, pois alguns parâmetros podem ser modificados, como a quantidade do reagente Folin-Ciocalteu, concentração de carbonato de sódio, padrão usado e tempo de leitura. Consequentemente, a reação não é específica para taninos (VERZA, 2006).

Dessa forma, entretanto, para contornar essa falta de especificidade, o procedimento é associado ao método de precipitação com proteínas ou polímeros da polividina, sendo capaz de, mediante a adsorção com substratos proteicos, determinar o teor de taninos totais, sendo este, calculado através da diferença entre o teor de polifenóis totais e o teor da fração polifenólica não adsorvida (VERZA, 2007). Quando utilizado para este fim, o método possui a desvantagem de fornecer apenas a estimativa do conteúdo total de taninos, pois não fornece a estimativa individual de cada tipo de taninos. Apesar disto, o método alcança grande destaque devido a sua simplicidade, baixo custo e ampla disponibilidade em laboratórios de pequeno porte que efetuam análises de controle de qualidade deste tipo de metabólito (SOLÓN et al., 2007; CUNHA et al., 2009; FB5, 2010; ADAMCZYK et al., 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As amostras de cascas do caule (JUC1) e frutos (JUF1) para a produção do lote 1 foram coletadas em Limoeiro (Pernambuco – Brasil). Após a coleta, o material botânico foi levado para identificação no Instituto Agronômico de Pernambuco, onde foi depositada uma exsicata sob número de tombamento 88145. As amostras de casca (JUC2 e JUC3) e frutos (JUF2 e JUF3) utilizadas na preparação dos lotes 2 e 3 foram adquiridas no mercado público do bairro de São José na cidade do Recife (Pernambuco – Brasil) e oriundas do município de palmares. As amostras foram submetidas à secagem em estufa, a temperatura de 45 °C durante 96 horas, e em seguida pulverizado em moinho de facas da marca Adamo, modelo Wiley®. A tabela 1 relata a data de coleta, lote e código de identificação atribuído a cada amostra utilizada no estudo.

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *Libidibia ferrea* (MART.) L.P. QUEIROZ

Denominação	Lote	Data de Coleta	Lote/Fornecedor	Local de Coleta
Jucá Casca				
JUC1	001	02/11/2011	Coleta própria	Limoeiro, PE
JUC2	002	10/05/2013	Mercado público	Palmares, PE
JUC3	003	10/05/2013	Mercado público	Palmares, PE
Jucá Fruto				
JUF1	001	02/11/2011	Coleta própria	Limoeiro, PE
JUF2	002	10/05/2013	Mercado público	Palmares, PE
JUF3	003	10/05/2013	Mercado público	Palmares, PE

Fonte: Próprio Autor.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Para o controle de qualidade físico-químico das amostras foram empregados Métodos Gerais em Farmacognosia, secção físico-química, preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5 (BRASIL, 2010). Os dados obtidos para determinação do diâmetro médio das partículas foram analisados por métodos gráficos como o histograma de distribuição e a curvas de retenção e passagem. Ainda foi realizado o teste de determinação de substâncias extraíveis por água. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.1 Matéria estranha

A tomada de amostra para o ensaio foi realizada com auxílio da técnica de quarteamento descrita em compêndio oficial (FB5, 2010), onde foram coletadas amostras com cerca de 50 g de cada lote (peso médio de 500 g por lote) de casca e fruto de jucá, em seguida estas amostras foram espalhadas uniformemente em camada delgada. Por fim, os materiais estranhos às amostras foram separados manualmente, inicialmente a olho nú e, em seguida com o auxílio de lente de aumento (cinco a dez vezes). O material separado foi pesado com base no peso da amostra submetida ao ensaio e foi calculada a percentagem de matéria estranha em porcentagem de massa.

4.2.2 Perda por dessecação – Método gravimétrico

Foram pesados, em pesa-filtros previamente dessecados, cerca de 2 g de cada amostra finamente pulverizada. Em seguida, foram submetidos a aquecimento de 105 °C em estufa durante 5 horas. Os pesa-filtros foram resfriados à temperatura ambiente em dessecador e pesados. Em seguida foram recolocados em estufa por mais 1 hora, resfriados e novamente pesados. O procedimento foi repetido até obtenção de peso constante.

A percentagem de perda por dessecação foi calculada segundo a equação abaixo:

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

Em que:

PD = perda por dessecação; P_a = peso da amostra; P_u = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação; P_s = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

4.2.3 Determinação de cinzas totais

Foram colocados cerca de 3 g dos lotes de casca e fruto de jucá em cadinhos de porcelana previamente dessecados; A droga foi distribuída uniformemente no fundo dos cadinhos, em seguida, estes foram levados a aquecimento de $200\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, seguido de $400\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos e $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 minutos. Após este processo, os cadinhos foram retirados da mufla e resfriados em dessecador a temperatura ambiente, foram pesados e colocados de volta ao aquecimento de $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ até obtenção de peso constante.

4.2.4 Determinação granulométrica

Foram utilizados tamises de abertura: 850, 600, 500, 250, 150 e 90 μm e a base sem abertura. Os tamises foram empilhados em ordem crescente e colocados no tamisador. Para o ensaio, foram pesadas amostras de cerca de 25 g de cada lote e transferidos para o tamis superior de abertura 850 μm , os pós foram distribuídos uniformemente sobre a superfície do mesmo. Após tampar o conjunto de tamises, o aparelho foi ligado durante 15 minutos com a vibração adequada. Após o término, cada tamis foi pesado e, em seguida, foram calculados os diâmetros médios de cada lote das drogas vegetais.

4.2.5 Determinação de substâncias extraíveis por água – Extração a quente

Foram transferidos cerca de 4,0 g das drogas vegetais a erlenmeyers de 250 mL e foram adicionados 100 mL de água destilada, em seguida o conjunto foi pesado, agitado e deixado em repouso por 1 hora. Os erlenmeyers foram levados a aquecimento em banho-maria por 1 h, resfriados e pesados. O peso foi corrigido com o solvente específico para o ensaio. A solução foi misturada e rapidamente filtrada. Em uma cápsula de porcelana foi transferido 25 mL do filtrado e levada à secagem em banho de água. Por fim, as amostras foram submetidas à secagem em estufa a 105 °C durante 6 horas, esfriadas em dessecador por 30 minutos e pesadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de materiais extraídos em mg/g de droga vegetal seca.

4.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA

Os metabólitos secundários avaliados na elaboração do perfil fitoquímico foram: Polifenóis (flavonoides, derivados cinâmicos, cumarinas, derivados antracênicos, taninos hidrolisáveis e condensados), triterpenos, esteroides, saponinas, açúcares redutores e alcaloides.

4.3.1 Obtenção das soluções extrativas

As condições de preparação das soluções extrativas foram baseadas nas metodologias propostas por Wagner & Bladt (2001) e otimizadas de acordo com a afinidade dos metabólitos de interesse pelos solventes utilizados nos processos extrativos (avaliação da constante dielétrica).

4.3.2 Sistema cromatográfico (CCD)

Foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ com 0,2 mm de espessura adsorvida em suporte de alumínio (E. Merck) de dimensões 20 x 10 cm. Para aplicação das amostras nas cromatoplasmas, foi utilizado um aplicador

automático modelo Linomat V da empresa CAMAG (Camag Muttentz, Suíça), equipado com seringa de 100 μ L (CAMAG). A cuba/câmara cromatográfica (CAMAG) com as dimensões 20 x 10 cm foi saturada com o solvente de eluição e uso de papel de filtro contra a parede durante pelo menos 1 hora antes de cada processo de separação.

4.3.3 Sistemas de eluição

Os sistemas de eluição foram preparados de acordo com Wagner & Bladt (2001) e suas polaridades ajustadas de acordo com os fatores de retenção (R_f) obtidos para os padrões de referência utilizados. Os sistemas de eluição, padrões de referência e reveladores utilizados inicialmente para a obtenção dos cromatogramas estão apresentados na tabela 2.

TABELA 2 - SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS EMPREGADOS PARA A OBTENÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DAS CASCAS DO CAULE E FRUTOS DE *L. ferrea*.

Classe de metabólito	Sistema	Padrão	Revelador
Açúcares redutores	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O (100:11:11:27)	D-maltose	Timol 0,5% EtOH
Alcaloides	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O (100:11:11:27)	Pilocarpina	Dragendorff
Antraquinonas	AcOEt - HCOOH - H ₂ O (90:5:5)	Senosídeos A e B	AcNO ₃ (25%)
Cumarinas	EtOEt - Tolueno - AcOH 10% (50:50:50)	Cumarina	KOH + UV 250 nm
Derivados Cinâmicos	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O (100:11:11:27)	Ác. Cafeico	NEU
Flavonoides	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O (100:11:11:27)	Rutina	NEU
Taninos hidrolisáveis	AcOEt - HCOOH - H ₂ O (90:5:5)	Ácido Gálico Ácido elágico	Cloreto Férrico
Taninos Condensados	AcOEt - HCOOH - H ₂ O (90:5:5)	Catequina	Vanilina Clorídrica
Triterpenos/Esteroides	Tolueno - AcOEt (90:10)	β-sitosterol	Lieberman Buchard

Fonte: Próprio Autor.

AcOEt = Acetato de etila; HCOOH = Ácido fórmico; AcOH = Ácido acético; AcNO₃ = Ácido nítrico; EtOH = Álcool etílico; H₂O = Água; KOH = hidróxido de sódio; NEU = ácido etilborilaminoéster a 1% em metanol; UV = ultravioleta.

4.3.4 Teste de afrogenicidade

Foram pesados cerca de 1 g de cada lote e transferidos para erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente. As drogas foram mantidas em decocção por 30 minutos e resfriadas em temperatura ambiente. O conteúdo foi filtrado por papel de filtro para balão volumétrico de 100 mL e o volume preenchido com água destilada, em seguida, o decocto foi distribuído em 10 tubos de ensaio com tampa em série sucessiva de 1 a 10 mL de extrato, o

volume de líquido foi ajustado para 10 mL utilizando água em cada tubo. Os tubos foram tampados e agitados com movimentos verticais por 15 segundos, foram deixados em repouso por 15 minutos e em seguida a altura da espuma foi medida. O índice de espuma foi calculado segundo a equação $1000/A$, onde A é o volume em mL do decocto utilizado para preparação do tubo.

4.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE TANINOS TOTAIS

4.4.1 Solução estoque

Cerca de 0,5 g da droga moída foi transferida para balão de fundo redondo com capacidade para 250 mL e adicionado de 150,0 mL de água destilada. A mistura foi mantida sob refluxo em banho-maria durante 30 minutos sob 85 °C e, em seguida, resfriada até temperatura ambiente. Todo o conteúdo foi transferido para balão volumétrico com capacidade para 250 mL e o volume completado com água destilada. A mistura foi deixada em repouso para decantar, em seguida foi filtrada através de papel de filtro desprezando-se os primeiros 50 mL. O restante do filtrado constituiu a Solução Estoque (SE - 0,002 g/mL).

4.4.2 Solução amostra para polifenóis totais (PFT)

Para preparação da amostra, 5,0 mL de SE foram tomados e diluídos com água destilada em balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, 2,0 mL desta solução, 1,0 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) a 29% (m/v). Após 30 minutos, a absorvância correspondente aos polifenóis totais (PFT) foi mensurada em 760 nm (A_1) utilizando água destilada para ajuste do zero.

4.4.3 Solução amostra para polifenóis não adsorvidos por pó de pele (FNT)

Para preparação da amostra, 10,0 mL da SE foi adicionado do agente precipitante (pó de pele, caseína ou polivinilpirrolidona) e submetidos a agitação em erlenmeyer de 125 mL durante 60 minutos. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro e 5,0 mL do filtrado diluídos com água destilada em balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, 2,0 mL desta solução, 1,0 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) a 29% (m/v). Após 30 minutos, absorvância correspondente a fração não-tanante (FNT) foi mensurada em 760 nm (A_2) utilizando água destilada para ajuste do zero.

4.4.4 Solução padrão

Cerca de 50,0 mg de cada padrão de referência foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Em seguida, 5,0 mL da solução do padrão foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com o mesmo solvente. Por fim, 2,0 mL dessa solução, 1,0 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 10,0 mL de água destilada foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com solução de carbonato de sódio a 29% (m/v). Após 30 minutos, a absorvância da solução padrão foi mensurada em 760 nm (A_3) utilizando água destilada para ajuste do zero.

O teor de taninos totais foi calculado em porcentagem de taninos (droga seca), expressos em g% de padrão, segundo a Equação abaixo:

$$TT = \frac{62,5 \times (A_1 - A_2) \times m_2}{A_3 \times m_1}$$

Onde: TT = teor de taninos totais em g% de pirogalol; A_1 = absorvância da solução amostra para polifenóis totais; A_2 = absorvância da solução amostra para polifenóis não adsorvidos em pó de pele; A_3 = absorvância da solução padrão; m_1 = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água; m_2 = massa do padrão, em gramas.

4.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E REACIONAIS DO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

4.5.1 Determinação do comprimento de onda e do tempo de leitura

Para o estabelecimento do comprimento de onda para a leitura, as amostras e os padrões foram submetidos a varreduras na região de 400 a 900 nm, após 30 minutos da adição do último reagente descrito no procedimento geral para preparação de amostras para PFT. Os dados espectrais foram usados para a escolha do comprimento de onda de máxima absorvância e auxiliaram na avaliação preliminar das diluições.

O tempo de reação foi investigado através de cinética reacional a partir da absorvância lida em função do tempo para as amostras (cascas do caule ou frutos) e os padrões (pirogallol, ácido gálico e catequina). As medidas foram iniciadas 5 minutos após a adição do último reagente (solução de Na_2CO_3 ; 29%, m/v), e repetidas a cada intervalo de 5 minutos durante 60 minutos.

4.5.2 Determinação do padrão de referência

Para eleição do padrão de referência, curvas de calibração para cada uma das substâncias de referência (pirogallol, ácido gálico ou catequina) foram construídas empregando cinco níveis de concentração (1,00 a 5,00 $\mu\text{g/mL}$). As determinações foram realizadas em espectrofotômetro após a execução dos procedimentos reacionais para determinação de PFT. Os resultados foram analisados por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados, e calculado o coeficiente de determinação (R^2). A seleção do padrão de referência para a metodologia foi feita de acordo Bueno (2012) avaliando o coeficiente angular médio de três curvas e a absortividade molar de cada substância calculada através da equação: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, onde A = absorvância (U.A); ϵ = absortividade molar (mol/L); b = caminho óptico da célula (cm); c = concentração da amostra (g/100 mL) (PELILLO et al., 2004; BUENO et al., 2012).

4.5.3 Avaliação da proporção droga:solvente

As amostras foram preparadas empregando quantidades diferentes da droga vegetal (casca do caule ou fruto) em quantidades de 0,50, 0,75 ou 1,00 g para 250 mL de água destilada. Em seguida foram submetidas ao procedimento geral descrito para quantificação do teor PFT (DA COSTA et al., 2011).

4.5.4 Avaliação da influência do reagente de Folin-Ciocalteu e da solução de Na_2CO_3

A influência das condições reacionais sobre o teor de polifenóis totais foi avaliada através de um planejamento fatorial 2^2 , utilizando como variáveis independentes o reagente de Folin-Ciocalteu (1 e 3 mL) e a solução de Na_2CO_3 (10 e 29%, m/v). A matriz foi adicionada de três pontos centrais (Folin = 2 mL; Na_2CO_3 = 15%), e os experimentos executados em triplicata (BARROS NETO et al., 2010). A variável dependente avaliada no estudo foi o teor de PFT expressos em g% dos padrões de referência, a partir da absorvância lida após 30 minutos da adição do último reagente. A análise estatística dos dados foi realizada por ANOVA e os dados foram usados para calcular superfícies de resposta com auxílio dos programas Microsoft Excel e STATISTICA 6.0 (StatSoft,EUA).

4.5.6 Avaliação do agente complexante

Nesta etapa, foram avaliados diferentes tipos de agentes complexantes para verificar a influência destes sobre o teor de taninos totais (MONTEIRO et al., 2005; SÓLON et al., 2007; VERZA et al., 2007). Foram utilizados caseína, polivinilpirrolidona (PVP) e pó de pele, em diferentes quantidades (100, 150 e 200 mg), os teores de taninos totais foram calculados e os resultados expressos como média, desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR%).

4.6 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS ICH (2005) E RE 899 (2003)

O método foi validado de acordo com os parâmetros preconizados pelo International Conference Harmonization (ICH) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), utilizando como parâmetros: linearidade, especificidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. A confiabilidade estatística dos resultados foi estabelecida a partir do desvio padrão relativo (DPR%). Alguns dos resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA) *One-Way* ou *Two-Way* e teste *t*-student, a fim de verificar diferenças significativas entre médias ou variâncias resultantes dos ensaios.

4.6.1 Linearidade

As amostras de cascas e frutos foram preparadas conforme descrito anteriormente, e após as diluições apropriadas, apresentaram faixa de concentrações entre 16,0-48,0 µg/mL para cascas, e de 8,0-40,0 µg/mL para os frutos. Além disso, foram obtidas soluções dos padrões ácido gálico, catequina e pirogalol, com concentrações entre 2,0-8,0 µg/mL, 2,0-7,0 µg/mL e 1,0-5,0 µg/mL, respectivamente, para construção de curvas de calibração. Os resultados foram analisados por regressão linear usando o método dos mínimos quadrados para calcular o coeficiente de determinação (R^2) e outros parâmetros do modelo matemático.

4.6.2 Especificidade

Foram elaboradas curvas de linearidade nas concentrações descritas acima para as soluções de PFT das cascas e frutos, entretanto, os pontos utilizados nas curvas foram contaminados com quantidades definidas dos padrões de referência (25 mg de pirogalol; 50 mg de ácido gálico e catequina). Por fim, a especificidade foi avaliada através da comparação entre as inclinações das curvas (coeficiente angular) obtidas no ensaio de

especificidade e as curvas obtidas no ensaio de linearidade (RIBANI et al., 2004; BUENO et al., 2012).

4.6.3 Limites de detecção e quantificação

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

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde, DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas para a substância de interesse e IC é a inclinação média das 3 curvas de calibração autênticas. Todos os resultados foram expressos em µg/mL.

4.6.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: intra-corrida, através de análise de 6 amostras de mesma concentração (100%), no mesmo dia e pelo mesmo operador; e, precisão inter-corrida, através da análise de 3 amostras de mesma concentração (100%), por dois analistas e em dois dias diferentes. Os resultados foram expressos em g% de cada um dos padrões de referência.

4.6.5 Exatidão

Foi avaliada através de ensaios de recuperação, através do qual amostras da solução extrativa de cada farmacógeno foram fortificadas com o padrão em três níveis de concentrações. A percentagem de recuperação foi calculada pela razão entre as concentrações médias determinadas experimentalmente e as concentrações teóricas esperadas para a solução fortificada. Foram utilizados extratos em concentrações de 16,0 µg/mL da casca e 32,0 µg/mL do fruto e a estes foram adicionadas de três quantidades de ácido gálico e catequina (50,0, 75,0 e 100,0 µg); e (pirogalol (25,0, 50,0 e

75,0 µg), em seguida o procedimento usual foi realizado para determinação das absorvâncias.

4.6.6 Robustez

Para a robustez foi avaliada a estabilidade do produto reacional à exposição à luz ambiente durante todo o processo de manipulação das amostras, bem como a avaliação dos parâmetros de estabilidade das soluções extrativas (0h e 6h) e diferentes equipamentos para a leitura das amostras (Evolution 60s/Thermo e AJ1900/Micronal).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

5.1.1 Matéria estranha

A determinação de material estranho em drogas vegetais é um parâmetro que visa avaliar se a droga vegetal está livre de contaminantes como restos de insetos, fungos, impurezas de origem mineral, tecidos do mesmo vegetal sem atividade medicinal, partes contaminantes de outras plantas e outros materiais contaminantes, pois estes são fatores que diminuem o rendimento das drogas vegetais (SIMÕES, 2010). Através dos resultados obtidos no ensaio, todas as amostras cumprem as exigências legais não apresentando valores superiores a 2% m/m de material estranho (casca: $0,25\% \pm 0,0014$; fruto: $0,08\% \pm 0,0039$).

5.1.2 Perda por dessecação – Método gravimétrico

A avaliação da perda por dessecação do material vegetal visa quantificar os percentuais de umidade residual contidos na droga vegetal, sendo este parâmetro de grande importância para a garantia e preservação da autenticidade da matéria prima vegetal. Nesse sentido, uma elevada quantidade de água presente na droga vegetal poderá ocasionar a proliferação microbiana, aumento de reações químicas e enzimáticas, processos que resultam em mudanças químicas e bioquímicas nas matrizes vegetais, influenciando diretamente na qualidade do produto final (COUTO et al., 2009; SIMÕES, 2010, MARQUES et al., 2012).

Os lotes de casca apresentaram um percentual de umidade $12,31\% \pm 0,81\%$ e para os frutos foi obtido o teor médio de umidade de $14,64\% \pm 0,84\%$. A diferença entre os dados de umidade de casca e fruto pode ser justificada devido a grande quantidade de açúcares hidrossolúveis presentes na composição química do fruto de jucá, que favorecem a retenção e o acúmulo de água nesse tipo de material (LOPES et al., 2013). Os resultados observados

para o fruto são classificados como desconforme segundo os limites preconizados pela Farmacopeia Brasileira (8-14%) (FB4, 2000) para umidade residual presente em drogas vegetais, havendo a necessidade de avaliação e ajuste (aumento do tempo) no processo de secagem deste farmacógeno.

5.1.3 Determinação de cinzas totais

O teor de cinzas totais expressa a quantidade de substâncias obtidas por incineração que não são voláteis, estas, representam a soma do material inorgânico presentes na constituição da droga vegetal e materiais inorgânicos advindos do ambiente ou na etapa de processamento do material vegetal. A Farmacopeia Brasileira preconiza o limite máximo de 14% em diversas monografias oficiais, entretanto quando o teor encontrado está situado acima de 8% é necessário realizar o ensaio de determinação de cinzas insolúveis em ácido para a determinação de materiais silicosos presentes na droga vegetal (BRAGA et al., 2007; SIMÕES et al., 2010).

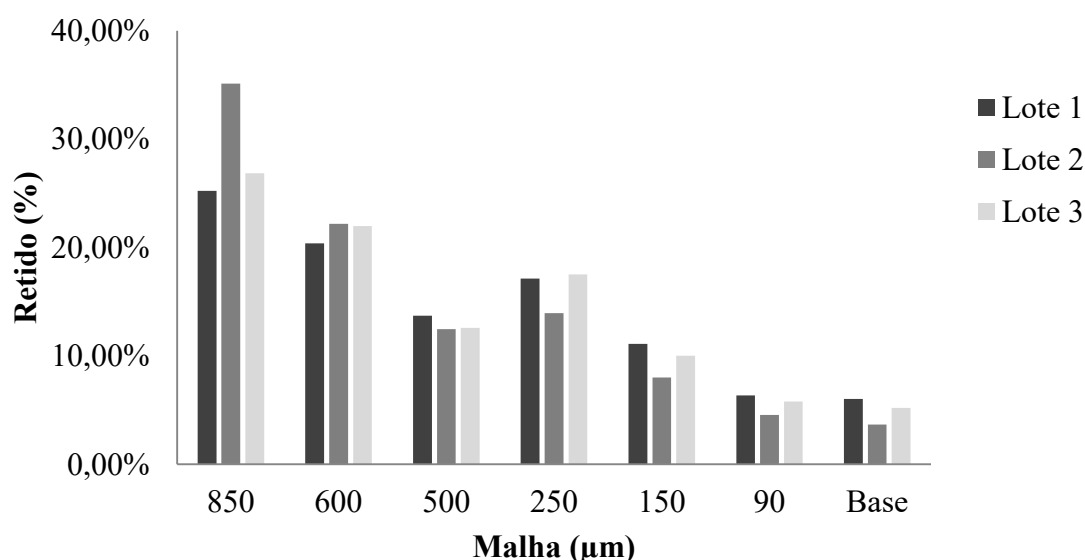
No ensaio foram obtidos os teores de cinzas totais de $6,27\% \pm 1,01\%$ na casca e $3,16\% \pm 0,71\%$ nos frutos. O teor encontrado para a casca do caule é próximo ao teor encontrado por Frasson (2003) em seu estudo de qualidade da droga constituída de caule de jucá. O autor também afirmou que o alto teor de cinzas no caule é justificado pela presença de sais inorgânicos no material vegetal (FRASSON et al., 2003). De acordo com os valores de cinzas totais obtidos, não houve a necessidade de realizar o doseamento de cinzas insolúveis em ácido uma vez que os teores não ultrapassaram o limite preconizado de 8%, estando todos os lotes dentro dos limites de cinzas totais preconizados pela Farmacopeia Brasileira em várias monografias ($<14\%$), indicando que não possuem contaminação por terra ou areia (FB5, 2010; SIMÕES, 2010).

5.1.4 Análise granulométrica

A moagem é um processo que possibilita reduzir mecanicamente a droga vegetal a fragmentos de granulometria pequena, fina e uniforme para possibilitar a homogeneidade do material vegetal e reprodutibilidade dos processos extrativos. A diminuição das partículas leva ao aumento na superfície de contato do material vegetal com o solvente e torna o processo de extração mais eficiente (SONAGLIO et al., 2010; MARQUES, 2012).

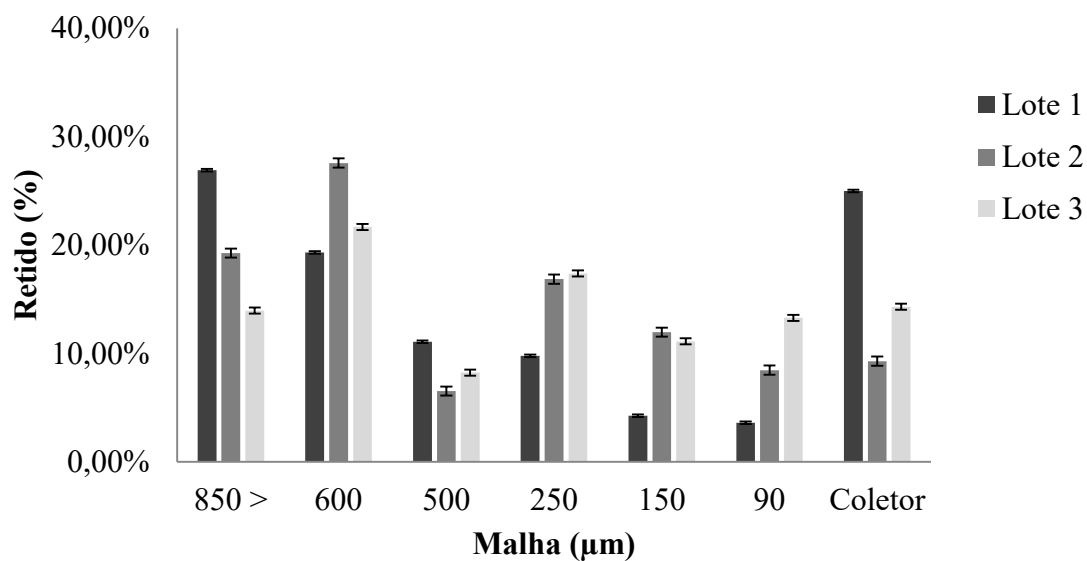
A avaliação granulométrica é um parâmetro de elevada importância a ser determinado, pois representa influência direta sobre a eficiência da extração. Após a realização dos processos de tamisação, os resultados observados nas figuras de 1 a 4 mostram que nos diferentes lotes foi possível estabelecer um diâmetro médio de $611,33 \mu\text{m} \pm 58,57 \mu\text{m}$ para as amostras de cascas do caule e $515,67 \mu\text{m} \pm 91,89 \mu\text{m}$ para as amostras dos frutos, sendo todas as amostras consideradas como pós grossos segundo classificação da Farmacopeia Brasileira 5 Ed. (FB5, 2010), uma vez que as partículas obtidas não passaram em sua totalidade pela malha de $850 \mu\text{m}$ em nenhum lote.

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÕES GRANULOMÉTRICAS REFERENTES AS AMOSTRAS DAS CASCAS DE *L. ferrea*.



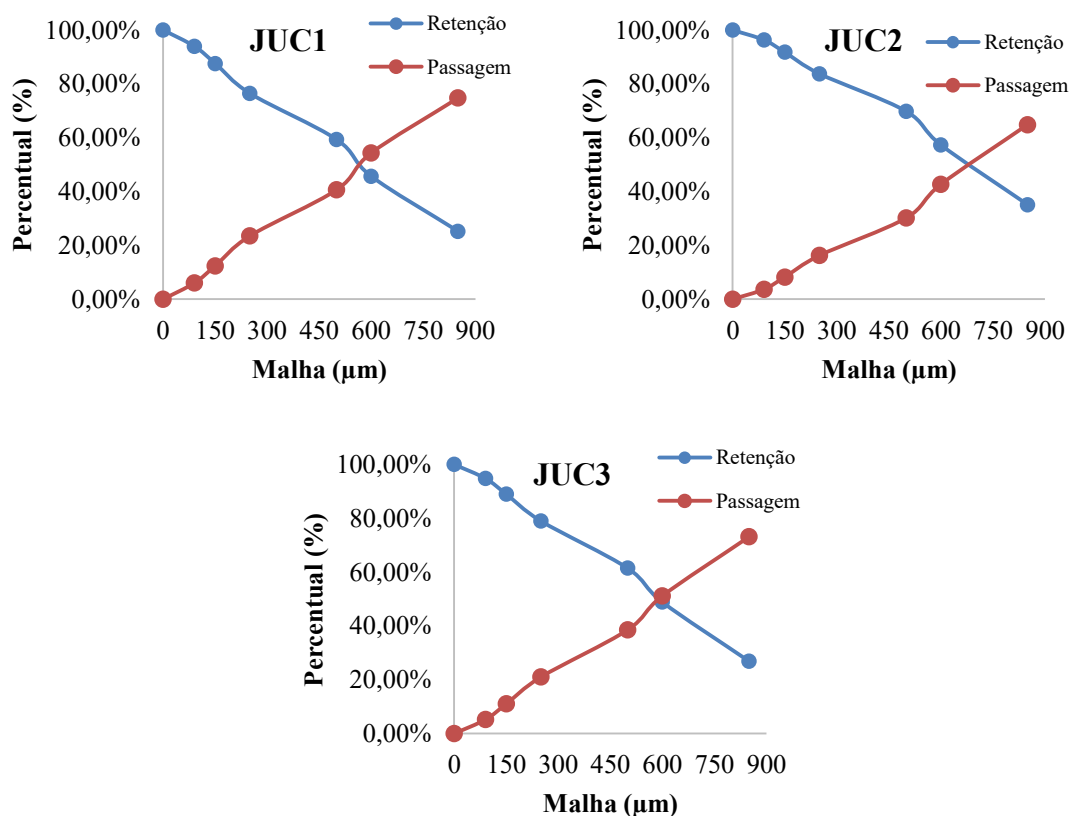
Fonte: Próprio Autor.

FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÕES GRANULOMÉTRICAS REFERENTES AS AMOSTRAS DOS FRUTOS DE *L. ferrea*.



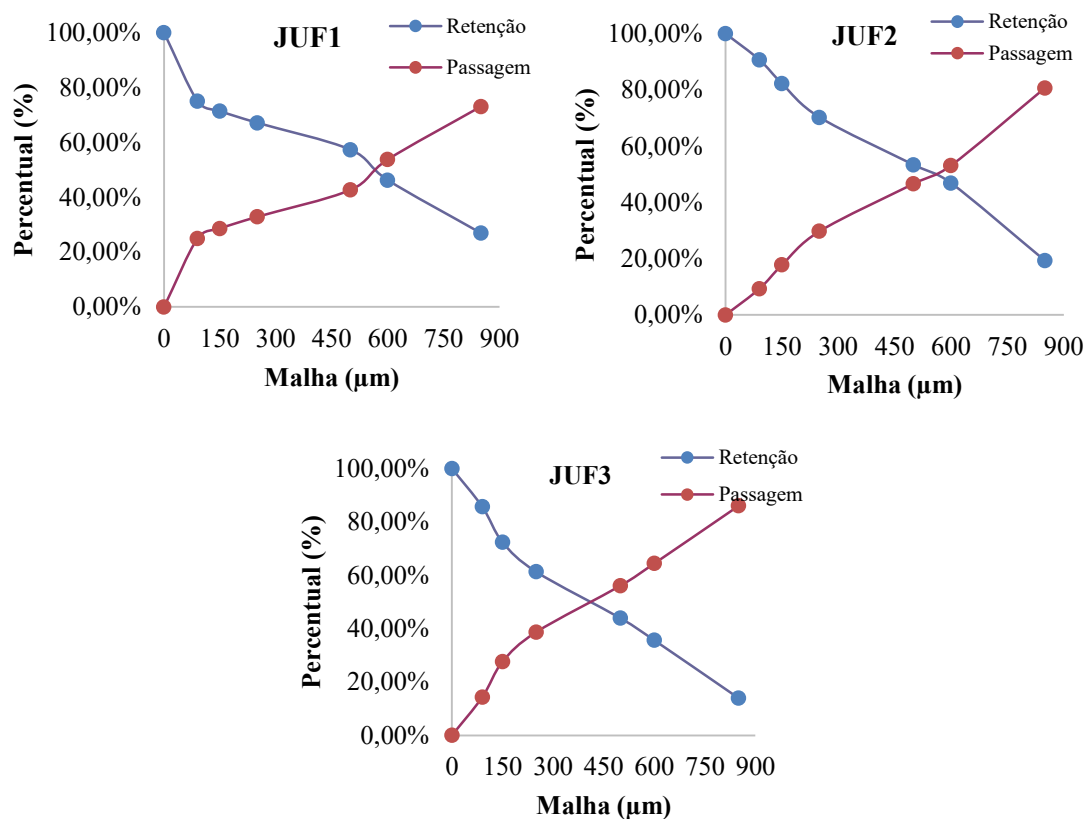
Fonte: Próprio Autor.

FIGURA 3 - CURVAS DE RETENÇÃO E PASSAGEM REFERENTES AS AMOSTRAS DE CASCA DO CAULE DE *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

FIGURA 4 - CURVAS DE RETENÇÃO E PASSAGEM REFERENTES AS AMOSTRAS DE FRUTOS DE *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

5.1.5 Determinação de substâncias extraíveis por água – Extração a quente

A determinação do teor de substâncias extraíveis por água visa determinar a presença de compostos hidrossolúveis presentes no material vegetal, dentre estes podem ser citados: aminoácidos, açúcares, flavonoides glicosilados, mucilagens e diversos metabólitos secundários hidrossolúveis (BARNI et al., 2009; MARQUES et al., 2012).

O rendimento encontrado foi de 0,856 g% $\pm$ 0,019 g% para a casca e 1,37 g% $\pm$ 0,146 g% para o fruto, sendo o teor encontrado nos frutos maior devido à diversidade de compostos químicos do fruto em comparação com a casca, entre os quais a elevada presença de açúcares hidrossolúveis em sua composição química relatada pela literatura (MICHELIN et al., 2010).

TABELA 3 - ANÁLISES DE CONTROLE DE QUALIDADE EM CASCAS E FRUTOS DE *L. ferrea*.

Análise	Lotes de Cascas			Lotes de Frutos			Especificação
	JUC1	JUC2	JUC3	JUF1	JUF2	JUF3	
Matéria estranha	0,06%	0,06%	0,05%	0,09%	0,09%	0,08%	<2% m/m
Umidade	11,25%	12,89%	12,79%	14,51%	15,02%	14,41%	8-14% m/m
Cinzas totais	5,11%	7,37%	6,34%	2,25%	3,61%	3,61%	<14% m/m
Granulometria	568 µm	678 µm	588 µm	577 µm	560 µm	410 µm	-
Teor de extrativos	0,87%	0,86%	0,84%	1,37%	1,52%	1,30%	-

Fonte: Próprio Autor.

5.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA

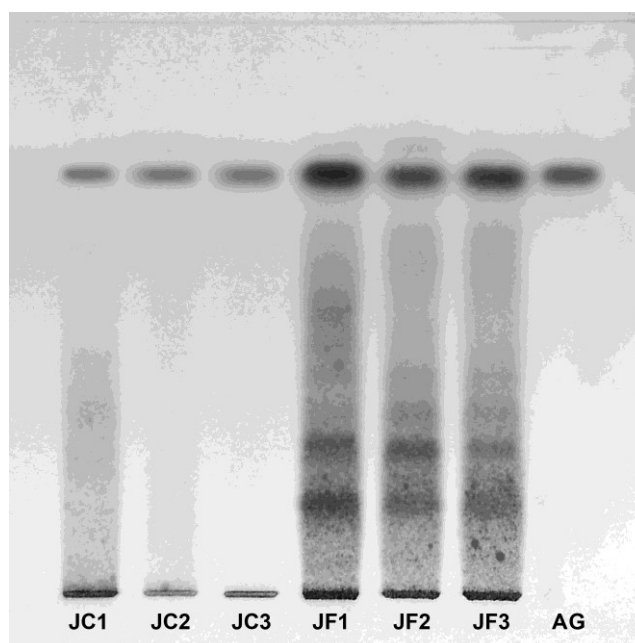
Uma das técnicas mais extensamente utilizadas para o estabelecimento de perfis químicos dos metabólitos presentes em espécies vegetais é a cromatografia em camada delgada (CCD). Associada à sua simplicidade, baixo custo e rapidez, destaca-se a facilidade em detectar qualitativamente a presença ou ausência de determinados compostos com auxílio dos respectivos padrões (KLEIN, 2010; COLLINS, 2011).

O resultado da triagem fitoquímica dos farmacógenos de jucá sugeriu a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, açúcares redutores e taninos hidrolisáveis em ambas as drogas; o ácido elágico só foi observado nos extratos etanólicos dos frutos; derivados da catequina (taninos condensados) só foram observados nas cascas do caule. Frasson (2003) analisou drogas constituídas de caule e folhas da espécie e relatou a presença de triterpenos e esteroides (não observados neste estudo), flavonoides e taninos hidrolisáveis.

Em relação aos taninos hidrolisáveis, foram observadas bandas de mesma coloração e deslocamento que a observada para a solução padrão de ácido gálico (R_f 0,75) em todas as amostras analisadas (Fig. 5). Entretanto, na avaliação dos frutos, a banda correspondente ao padrão apresentou maior intensidade em comparação com as cascas, indicando maior concentração destes metabólitos neste farmacógeno. Além disso, outras bandas detectadas para o fruto (R_f : 0,16; 0,25) sugerem a presença de derivados de taninos hidrolisáveis do tipo gálico. Os resultados obtidos corroboram com a literatura

sendo possível evidenciar a presença de taninos hidrolisáveis em farmacógenos da espécie *L. ferrea* (FRASSON, 2003).

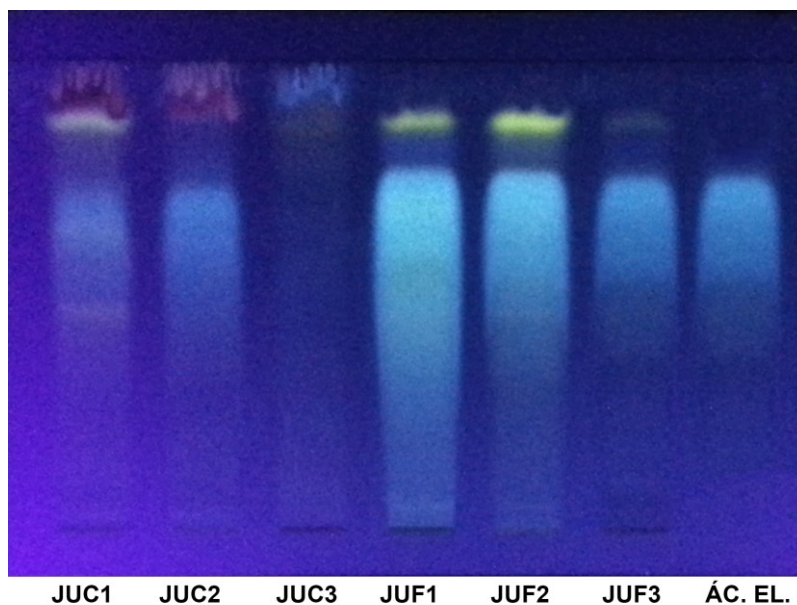
FIGURA 5 - PERFIL EM CCD PARA A AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE TANINOS HIDROSOLÚVEIS EM CASCAS DO CAULE E FRUTOS DE JUCÁ, UTILIZANDO FASE MÓVEL ACOET/HCOOH/H₂O (90:5:5), PADRÃO ÁCIDO GÁLICO E REVELADO COM SOLUÇÃO DE CLORETO FÉRRICO METANÓLICO A 1% (M/V).



Fonte: Próprio Autor.

Na figura 6 ainda pode ser sugerida a presença de ácido elágico de R_f 0,80, este metabólito consiste em um dímero de ácido gálico classificado também como tanino hidrolisável. O cromatograma não evidenciou a presença de ácido elágico na droga JUC3.

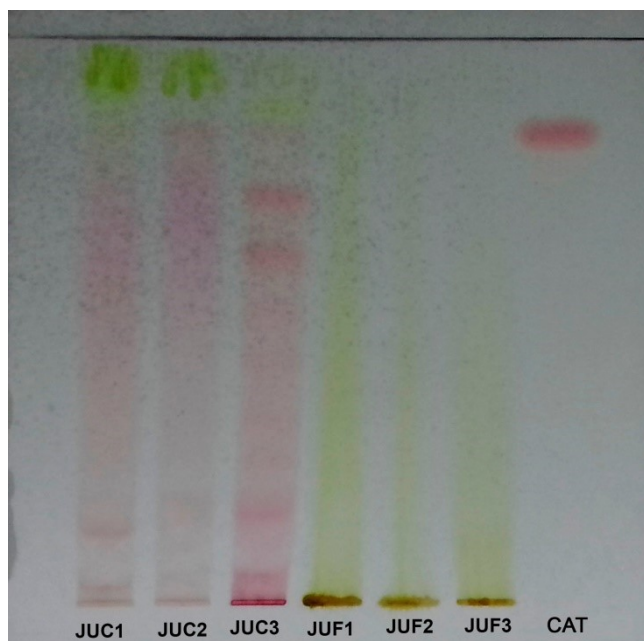
FIGURA 6 - CROMATOGRAMA PARA A AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO ELÁGICO EM CASCAS DO CAULE E FRUTOS DE JUCÁ, UTILIZANDO FASE MÓVEL ACOET/HCOOH/H₂O (90:5:5) PADRÃO ÁCIDO ELÁGICO E REVELADO COM NEU.



Fonte: Próprio Autor.

Na figura 7 não foi possível visualizar a presença de catequina (R_f 0,85) nas amostras avaliadas no ensaio, entretanto a coloração avermelhada específica da reação entre os taninos condensados e a vanilina clorídrica, sugerem a presença de derivados da catequina nas amostras de cascas do caule de jucá (SCHOFIELD, 2001).

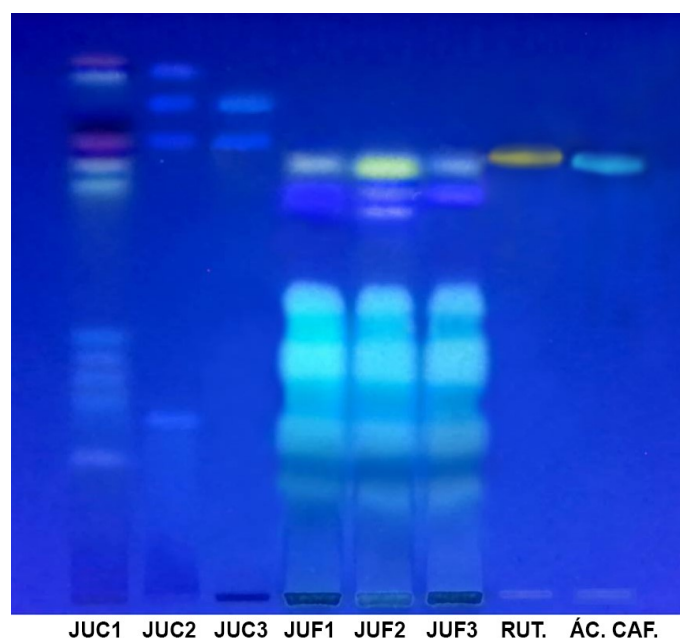
FIGURA 7 - CROMATOGRAMA PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE TANINOS CONDENSADOS EM CASCAS DO CAULE E FRUTOS DE JUCÁ, UTILIZANDO FASE MÓVEL ACOET/HCOOH/H₂O (90:5:5), PADRÃO CATEQUINA E REVELADO COM SOLUÇÃO ETANÓLICA DE VANILINA CLORÍDRICA A 1% (M/V).



Fonte: Próprio Autor.

Na figura 8 não foi possível visualizar a presença de rutina (R_f 0,80) ou ácido cafeico (R_f 0,78) nas amostras, entretanto a coloração amarelada nas amostras de JUC1, JUF1, JUF2 e JUF 3 sugerem a presença de flavonoides, pois estas desenvolveram coloração amarelada quando reveladas com o reagente natural A (NEU) e também a presença de derivados cinâmicos uma vez que algumas bandas apresentaram coloração azul clara quando reveladas com NEU. Nas drogas constituídas de frutos ainda é possível verificar a presença de diversas bandas de coloração parecida com o ácido caféico, entretanto com valores de R_f bem diferentes (0,30, 0,35, 0,50 e 0,60) do derivado cinâmico utilizado como padrão de referência (WAGNER & BLADT, 2001).

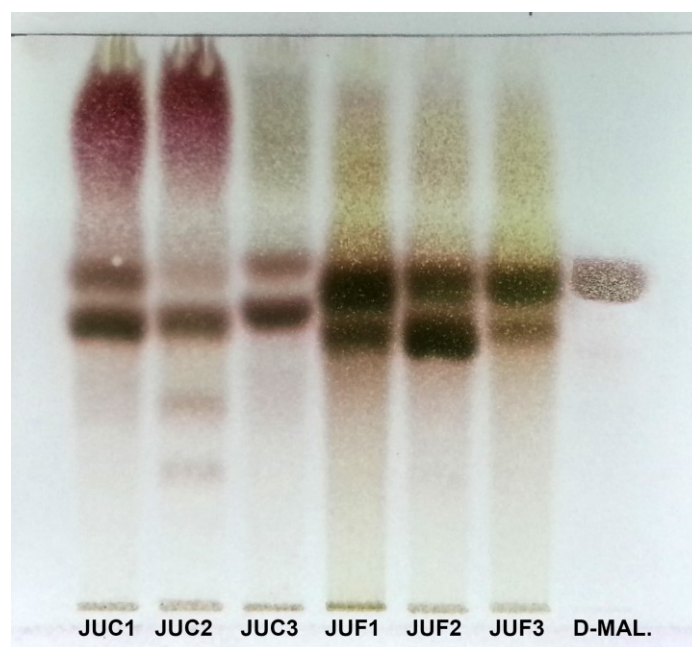
FIGURA 8 - CROMATOGRAMA PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FLAVONOIDES E DERIVADOS CINÂMICOS EM CASCAS DO CAULE E FRUTOS DE JUCÁ, UTILIZANDO FASE MÓVEL ACOET/HCOOH/ACOH/H₂O (100:11:11:27), PADRÕES RUTINA E ÁCIDO CAFÉICO, REVELADO COM NEU.



Fonte: Próprio Autor.

A figura 9 representa o cromatograma obtido na investigação de açúcares redutores, neste é possível verificar a presença de bandas de mesmo R_f (0,55) do padrão d-maltose e também a presença de outros açúcares de mesma coloração e R_f (0,50) parecidos, entretanto não foi possível afirmar qual a identidade das bandas uma vez que não foram utilizados outros padrões de referência nesta análise.

FIGURA 9 - CROMATOGRAMA PARA A AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AÇÚCARES REDUTORES EM CASCAS DO CAULE E FRUTOS DE JUCÁ, UTILIZANDO FASE MÓVEL ACOET/HCOOH/ACOH/H₂O (100:11:11:27), PADRÃO D-MALTOSE E REVELADO COM SOLUÇÃO ETANÓLICA DE TIMOL A 0,5%.



Fonte: Próprio Autor.

No teste de afrogenicidade é verificada se há a presença de saponinas em soluções extrativas de drogas vegetais, as saponinas são metabólitos secundários que possuem a capacidade de formar espuma abundante quando agitados com água, possuem gosto amargo e são irritantes para as mucosas. Devido ao fato de serem irritantes e tóxicos estes metabólitos precisam ser doseados e se apresentarem em baixa concentração em drogas vegetais, sendo este, um quesito essencial para a avaliação da qualidade destas (SIMÕES, 2010). No estudo as soluções extrativas das cascas do caule e frutos de *L. ferrea* não foram identificadas a presença de saponinas, uma vez que os índices afrosimétricos obtidos foram menores do que 100 em todos os tubos, confirmando assim, a ausência destes metabólitos nos farmacógenos estudados.

5.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E REACIONAIS DO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

A metodologia de Folin-Ciocalteu está descrita para diferentes espécies vegetais em diversos compêndios e códigos oficiais. Entretanto, existem diferenças metodológicas relacionadas à composição dos reagentes, tempo de leitura/reação e comprimento de onda utilizado nas análises. A realização de ajustes na metodologia é necessária em decorrência das especificidades de cada matriz vegetal, assim como de cada tecido de um vegetal que seja submetido à análise. Nesse sentido, todos os passos analíticos considerados críticos devem ser revisados sistematicamente e testados experimentalmente com o intuito de padronizar e validar os procedimentos que assegurarão a confiabilidade e reprodutibilidade necessárias para a avaliação quantitativa especificamente para uma determinada droga vegetal (VERZA, 2007).

Considerando a reação de Folin-Ciocalteu, a presença de grupamentos hidroxila nos compostos polifenólicos são determinantes para as reações de oxirredução e a formação do produto reacional responsável pela coloração proporcional à concentração do metabólito, a reação não apresenta estequiometria nem tão pouco é capaz de diferenciar monômeros de compostos poliméricos (AGOSTINI-COSTA et al., 1999).

Segundo a lei de Lambert-Beer a absorvância é diretamente proporcional ao coeficiente de absorção molar; moléculas que apresentam alta absorvidade molar possuem a capacidade de absorver a luz de forma mais precisa devido à alta sensibilidade, pois quando feitas pequenas mudanças na concentração do analito, são percebidas grandes mudanças na resposta obtida. Sendo assim, a avaliação do padrão de referência utilizado em estudos por UV/Vis é de extrema necessidade para a obtenção de resultados representativos do teor do metabólito estudado (BUENO, 2012).

Para a seleção do padrão de referência utilizado neste estudo, foram comparadas as respostas analíticas de diferentes padrões frente à reação de Folin-Ciocalteu e seus respectivos coeficientes de absorção molar (PELILLO, 2004; EVERETTE et al., 2010; BUENO et al., 2012). Nesse caso, foram

avaliados o ácido gálico, a catequina e o pirogalol por apresentarem elevado número de hidroxilas vicinais e pelo fato de serem os principais padrões de referência utilizados na literatura para o doseamento de polifenóis (SÓLON et al., 2004; VERZA, 2006, BUENO et al., 2012)

Assim, curvas de calibração foram construídas para cada um dos padrões e, em seguida, calculados os respectivos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) e coeficiente angular (α) para cada substância de referência. Os resultados apresentados na tabela 4 revelam comportamento semelhante tanto para o ácido gálico ($\epsilon = 1045,0$; $\alpha = 102,52$) quanto para a catequina ($\epsilon = 1113,3$; $\alpha = 101,94$), enquanto o pirogalol apresentou valores mais expressivos para ambos os parâmetros ($\epsilon = 1462,2$; $\alpha = 154,00$).

De acordo com os resultados apresentados, o pirogalol apresentou elevado coeficiente de absorvidade molar, coeficiente angular e teor de taninos totais para as duas drogas avaliadas, características que, proporcionam maior sensibilidade deste composto ao método de Folin-Ciocalteu quando comparado com a catequina e ácido gálico, pois pequenas variações nas concentrações de pirogalol representam grandes variações na resposta espectrofotométrica obtida. Nesse sentido foi estabelecido o uso deste como padrão de referência para o doseamento de taninos totais, conforme preconizado pelas Farmacopeias utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu (FB5, 2010; Ph. Brit., 2014).

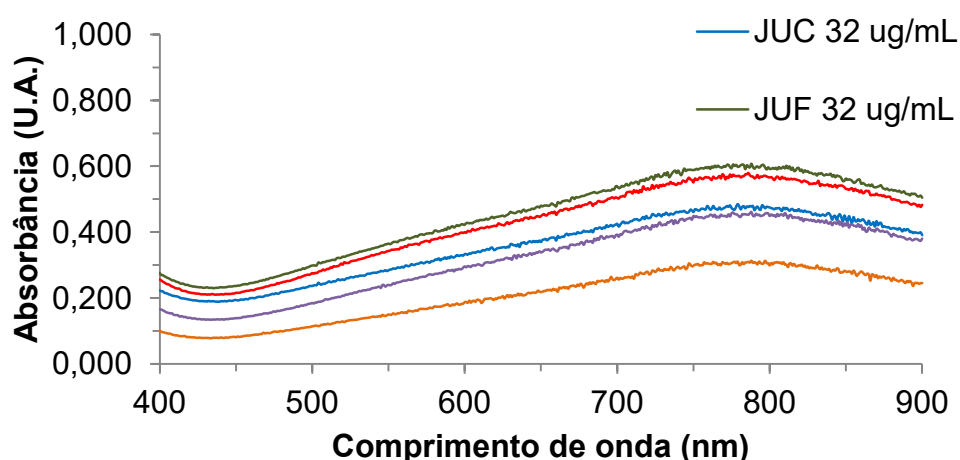
TABELA 4 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE LINEARIDADE, LD, LQ E COMPARAÇÃO ENTRE A ABSORTIVIDADE MOLAR, COEFICIENTE ANGULAR LINEAR E TEOR DE TANINOS TOTAIS CALCULADOS DE ACORDO COM CADA PADRÃO DE REFERÊNCIA PARA CASCA E FRUTO DE JUCÁ.

Parâmetro	Casca	Fruto	Ácido Gálico	Catequina	Pirogalol
Faixa de concentração (µg/mL)	16,0-48,0	8,0-40,0	2,0-8,0	2,0-7,0	1,00-5,00
Coeficientes do modelo	a = 0,0134	a = 0,0204	a = 102,52	a = 101,94	a = 154,0
	b = 0,1115	b = 0,0772	b = 0,0072	b = 0,0401	b = - 0,0060
Coeficiente de correlação (R ²)	0,9994	0,9988	0,9999	0,9994	0,9996
LD (µg/mL)	1,5302	1,0425	0,1624	0,3094	0,0692-
LQ (µg/mL)	5,1007	3,4751	0,5414	1,0313	0,2308
Absortividade Molar (ε)	-	-	1045,0	1113,3	1462,2
Coeficiente angular (α)	-	-	102,517	101,940	154,00
Teor médio de TT g% na Casca	-	-	8,20 ± 0,045	6,99 ± 0,063	12,12 ± 0,110
			(0,55)	(0,90)	(0,91)
Teor médio de TT g% no Fruto	-	-	9,94 ± 0,045	8,45 ± 0,117	13,90 ± 0,108
			(0,45)	(1,38)	(0,78)

Fonte: Próprio Autor.

Antes de dar início a qualquer estudo de validação de um método analítico, uma série de ensaios preliminares é necessária para a verificação da adequabilidade dos passos experimentais entre os quais podem ser destacados: preparação de amostras (solventes, diluições, cleanup e etc); condições reacionais (tempo, concentrações e reagentes); e, conseqüentemente, ajustes instrumentais (tal como o $\lambda_{\max}$). No caso de métodos espectrofotométricos aplicados a matrizes biológicas, a eleição do comprimento de onda de leitura é determinante para maior especificidade e/ou seletividade da técnica instrumental. O deslocamento batocrômico promovido pelo reagente de Folin-Ciocalteu resultante das reações de oxiredução de hidroxilas fenólicas podem apresentar desvio de $\lambda_{\max}$ capazes de comprometer as respostas experimentais levando a subestimação dos dados quantitativos. Tal situação pode ser mais complexa em virtude da típica diversidade de derivados estruturais para esta classe de metabólitos. Neste estudo, a avaliação comparativa dos espectros de varredura (500-900 nm) obtidos tanto para as substâncias candidatas a padrão de referência (ácido gálico, catequina, e pirogallol), quanto para as matrizes vegetais de jucá (cascas do caule e frutos), indicaram máximo de absorvância em mesmo comprimento de onda ($\lambda_{\max} = 760$ nm).

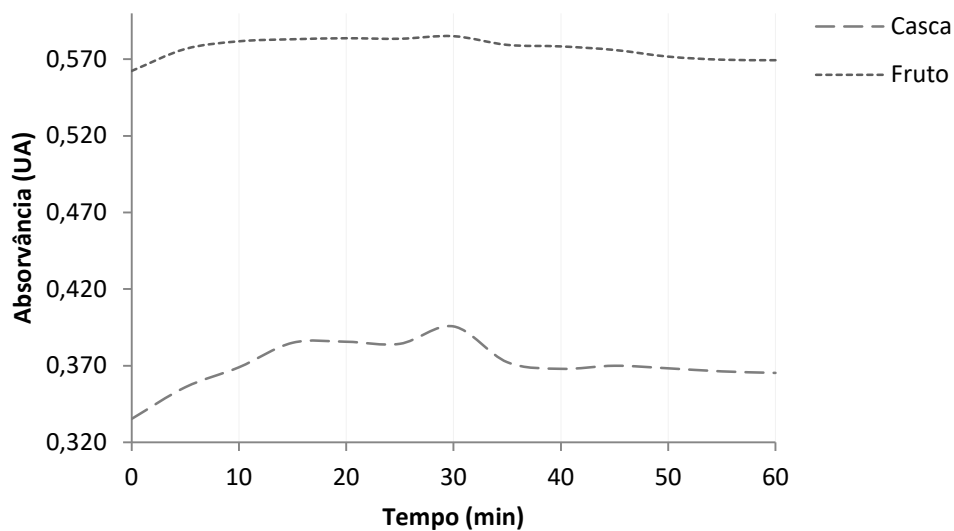
FIGURA 10 - ESPECTROS DE VARREDURA (400-900 NM) DOS PADRÕES DE REFERÊNCIA E DOS EXTRATOS PFT OBTIDOS A PARTIR DOS FARMACÓGENOS DE *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

Neste mesmo comprimento de onda, o estudo de cinética reacional permitiu observar que os dados de absorvância aumentam durante os 30 minutos iniciais, alcançando breve estabilização seguida de diminuição gradual nas leituras espectrofotométricas (Figura 11).

FIGURA 11 - CINÉTICA REACIONAL DO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU PARA DOSEAMENTO DE TANINOS EM FARMACÓGENOS DE *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

Em relação à quantidade de droga, os resultados estatísticos de comparação entre as médias de teores obtidos pelo ensaio *ANOVA One-Way* apresentados na tabela 5 confirmaram a hipótese de diferença significativa entre os teores obtidos para as diferentes quantidades avaliadas, pois os valores de $F_{calculado}$ (Fruto: 163,04; Casca: 7,47) para os teores médios de PFT obtidos foram maiores do que os $F_{tabelado}$ (5,14), sendo escolhida a quantidade de 0,5 g para as duas drogas devido à obtenção da maior quantidade de polifenóis totais obtidos, uma vez que a adoção de 0,50 g de droga vegetal para 250 mL de líquido extrator apresentou as maiores respostas experimentais calculadas como PFT e expressas em g% de cada um dos padrões (Figura 10), independente do farmacógeno avaliado (cascas do caule ou frutos).

TABELA 5 - ANOVA – ONE-WAY PARA A AVALIAÇÃO DE DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS TEORES OBTIDOS PARA AS DIFERENTES QUANTIDADES DE DROGA UTILIZADAS NO PROCESSO EXTRATIVO.

Farmacógeno	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F_{CAL}
Casca	Entre grupos	0,0787	2	0,0394	7,47
	Dentro dos grupos	0,0316	6	0,0053	
	Total	0,1104	8		
Fruto	Entre grupos	4,3649	2	2,1824	163,09
	Dentro dos grupos	0,0803	6	0,0134	
	Total	4,4452	8		

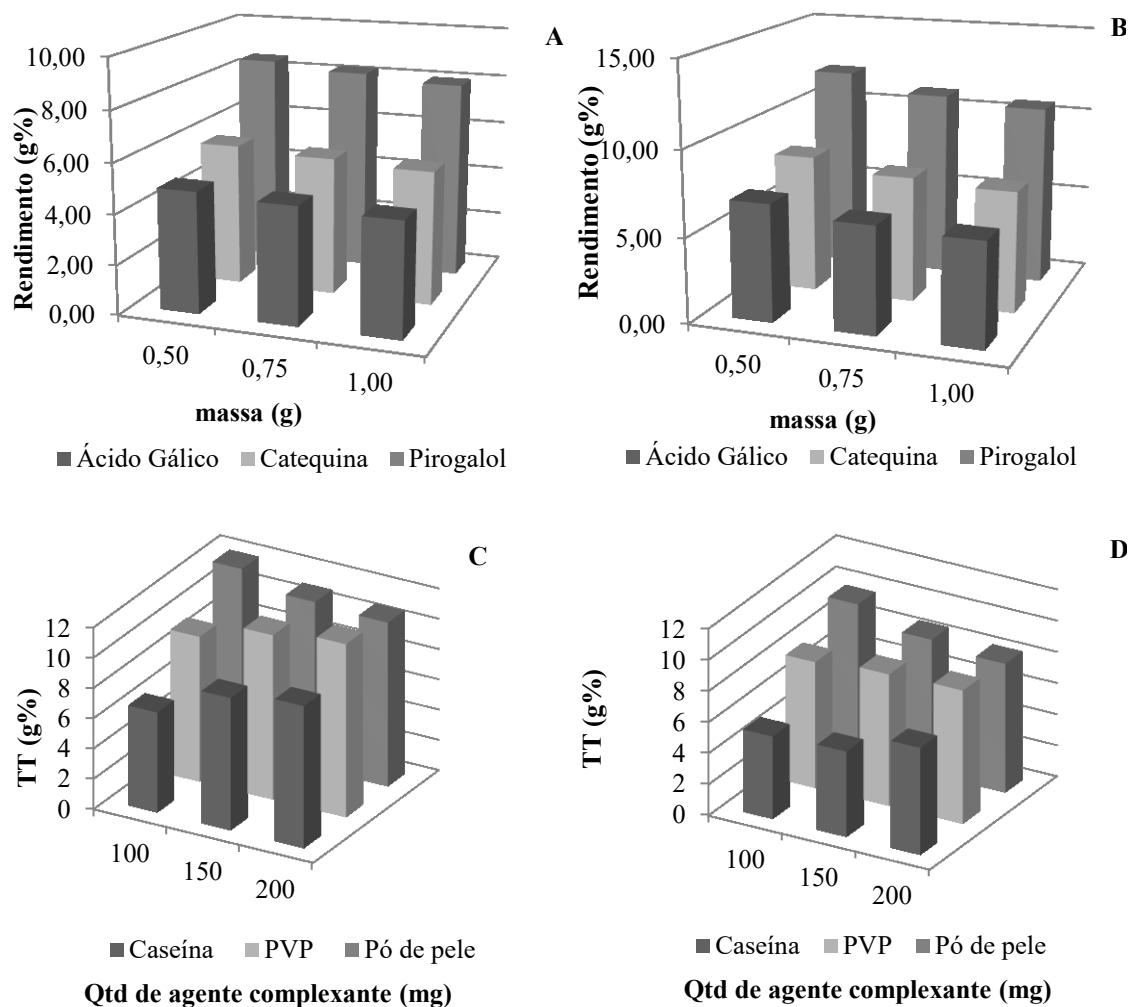
Fonte: Próprio Autor.

$F_{tab}(gl1, gl2, 0,05) = 5,14$

SQ = soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; FCAL = valor de F calculado.

Na etapa de avaliação do agente complexante, a figura 12 mostra que a Caseína e o PVP apresentam desempenho semelhante em relação ao rendimento de taninos totais. Assim, à medida que há aumento na quantidade de agente complexante há um discreto aumento no rendimento. Por outro lado, o pó de pele apresentou comportamento inverso aos demais agentes complexantes proporcionando maior interação com os taninos quando em menor quantidade (100 mg), nesse sentido o pó de pele foi escolhido para ser utilizado na metodologia.

FIGURA 12 - TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS DE ACORDO COM A QUANTIDADE DE DROGA PARA AS CASCAS (A) E FRUTOS (B) E RENDIMENTO COMPARATIVO EM G% DE PIROGALOL EM CASCAS (C) E FRUTOS (D) PARA CADA AGENTE COMPLEXANTE.



Fonte: Próprio Autor.

As influências do reagente de Folin-Ciocalteu e da solução de Na_2CO_3 sobre a resposta do método analítico foram estudadas através de metodologia de superfície de resposta, onde a matriz do planejamento é apresentada na tabela 6. Os modelos matemáticos usados para gerar as superfícies foram avaliados por ANOVA e os dados estão apresentados na Tabela 7.

Quanto ao planejamento fatorial, segundo a análise de variância apresentada na tabela 7, os valores de $F_{\text{calculado}}$ superiores aos F_{tabelado} evidenciaram que há diferença estatística entre os diferentes níveis do reagente de Folin-Ciocalteu (modelos linear e quadrático), solução de carbonato de sódio e para a regressão dos modelos matemáticos utilizados para a construção das superfícies de resposta. Não foram observadas significâncias estatísticas para as interações entre os fatores, replicatas e resíduos. Na análise de falta de ajuste, como os valores de $F_{\text{calculado}}$ não foram maiores do que os valores de F_{tabelado} não há evidência estatística significativa de falta de ajuste para os modelos matemáticos utilizados, indicando que, na região investigada, as superfícies de resposta são descritas satisfatoriamente pelos modelos matemáticos utilizados no estudo e que definem as superfícies de resposta.

De acordo com os resultados, a proporção do reagente Folin-Ciocalteu ocasionou efeito negativo sobre a resposta analítica reduzindo o teor de taninos totais. Enquanto que a concentração de Na_2CO_3 exerceu influência positiva, favorecendo as respostas em todas as condições estudadas. Desta forma, a maximização das respostas pôde ser observada quando empregados menor volume do reagente de Folin-Ciocalteu e maior concentração de Na_2CO_3 (Figura 13), optando-se por utilizar 1 mL de Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio a 29% (m/v).

TABELA 6 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A AVALIAÇÃO DO TEOR DE PFT DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS.

Variáveis Codificadas		Variáveis Naturais	
Folin (mL)	Carbonato (%)	Folin (mL)	Carbonato (%)
-1	-1	1	10,75
1	-1	3	10,75
-1	1	1	29
1	1	3	29
0	0	2	15
0	0	2	15
0	0	2	15

Fonte: Próprio Autor.

TABELA 7 - ANOVA DA MATRIZ DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2² APLICADO PARA AVALIAR A INFLUÊNCIA DO FOLIN-CIOCALTEAU E Na₂CO₃ NA CONCENTRAÇÃO DE TANINOS TOTAIS DAS CASCAS DO CAULE E FRUTOS DE JUCÁ.

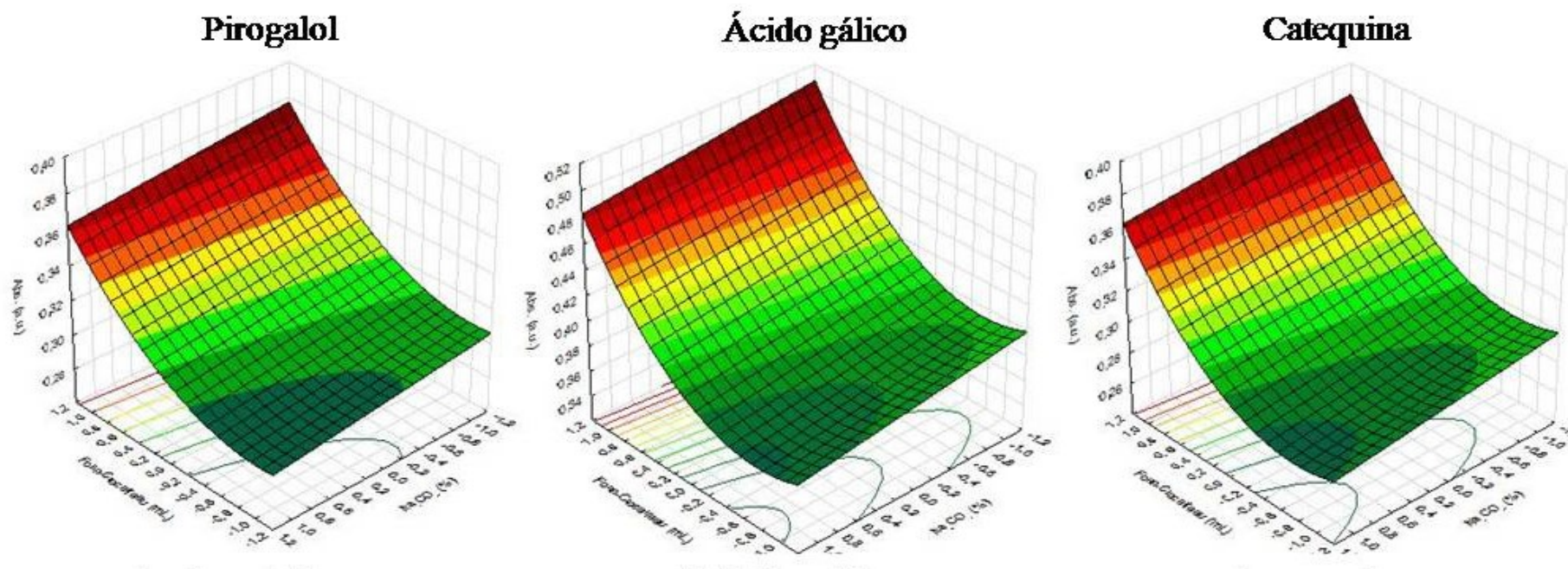
Fatores	Casca do Caule			Frutos			<i>F_{crítico}</i>
	<i>F</i> (CAT)	<i>F</i> (AG)	<i>F</i> (PI)	<i>F</i> (CAT)	<i>F</i> (AG)	<i>F</i> (PI)	
Folin (Linear)	15,30*	23,82*	29,23*	27,15*	21,69*	27,17*	5,32
Folin (Quadrático)	24,63*	3,71	19,41*	9,62*	0,15	0,07	
Na ₂ CO ₃ (Linear)	3,14	57,37*	61,01*	22,69*	52,85*	57,91*	
Interação (Folin x Na ₂ CO ₃)	0,21	0,27	0,27	3,01	0,21	0,33	
Regressão	14,59*	21,29*	27,48*	15,62*	18,73*	21,37*	4,53
Resíduo	0,18	0,20	0,41	0,17	0,18	0,38	5,14
Falta de ajuste	0,21	0,22	1,67	0,20	0,21	1,61	4,15

Fonte: Próprio Autor.

*Significante para $\alpha = 0,05$.

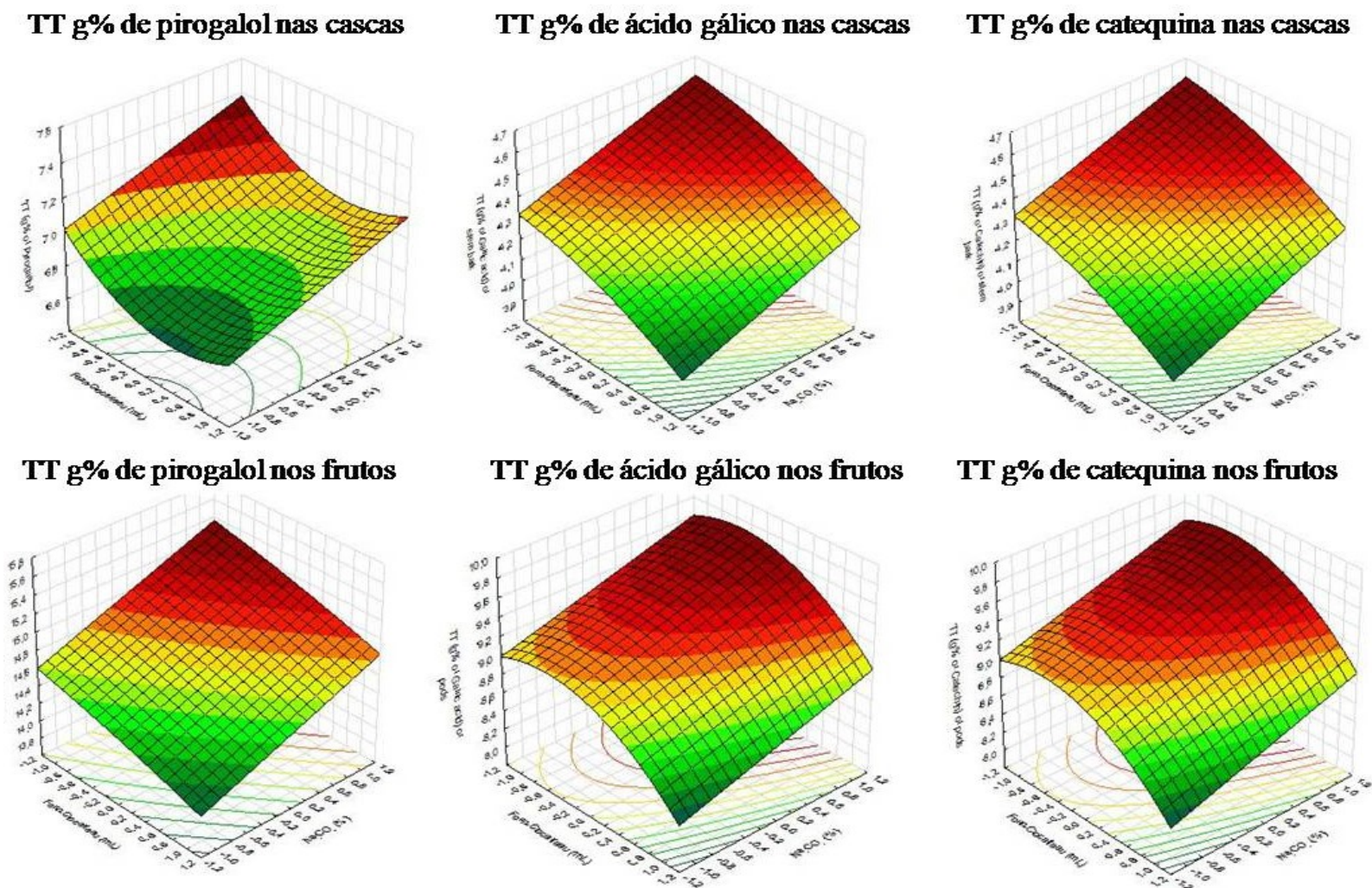
AG: Ácido Gálico; CAT: Catequina; PI: Pirogalol

FIGURA 13 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS PADRÕES PARA AVALIAÇÃO DOS REAGENTES FOLIN-CIOCALTEAU E CARBONATO DE SÓDIO SOBRE OS TEORES DE TANINOS TOTAIS.



Fonte: Próprio Autor.

FIGURA 14 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS TT DAS CASCA DO CAULE (A.) E FRUTO (B.) UTILIZANDO DIFERENTES PADRÕES PARA A AVALIAÇÃO DOS REAGENTES FOLIN-CIOCALTEAU E CARBONATO DE SÓDIO SOBRE OS TEORES DE TANINOS TOTAIS.



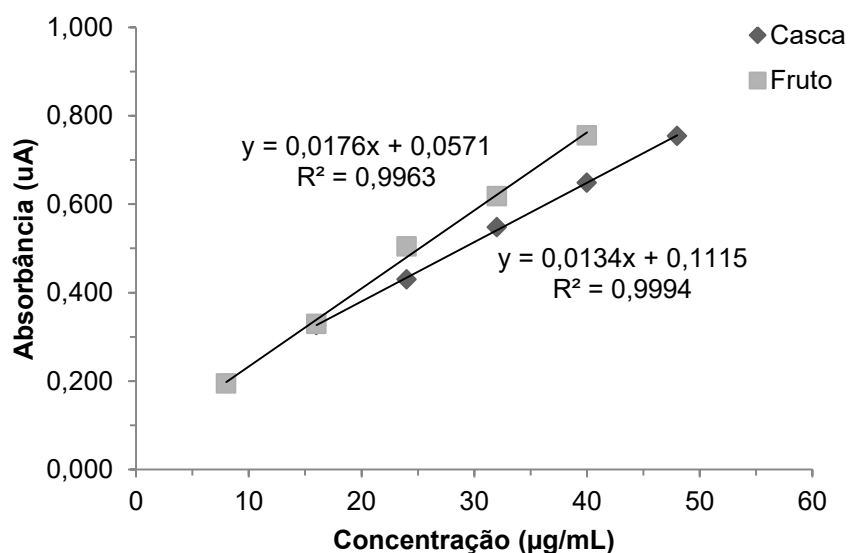
Fonte: Próprio Autor.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.4.1 Curvas de Linearidade, Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Para avaliação das linearidades das curvas obtidas para as amostras foram adotados os dados de absorvância resultantes da diferença entre polifenóis totais (PFT) e fração não-tanante (FNT). Os farmacógenos foram avaliados nas faixas de concentração 16-48 $\mu\text{g/mL}$ e 8,0-40 $\mu\text{g/mL}$ para casca e fruto; as curvas proporcionaram coeficientes de determinação de $R^2 = 0,9994$ ($y = 0,0134x + 0,1115$) e de $R^2 = 0,9988$ ($y = 0,0204 + 0,0772$) para as cascas do caule e os frutos, respectivamente, sendo o método avaliado considerado linear dentro das faixas de concentração utilizadas com as curvas médias de calibração apresentando $R^2 > 0,99$ como preconizado pela RE 899 (2003) e ICH (2005).

FIGURA 15 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO REFERENTE AO ENSAIO DE LINEARIDADE DO TEOR DE TANINOS TOTAIS PARA AS AMOSTRAS DE CASCA E FRUTOS DE JUCÁ.



Fonte: Próprio Autor.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados através da curva de calibração obtida para a solução padrão. Para estes parâmetros, os dados encontrados para as cascas do caule e para os frutos

foram: de 1,53 e 1,04 $\mu\text{g/mL}$ para o LD; e de 5,10 e 3,47 $\mu\text{g/mL}$ para LQ; respectivamente (tabela 4).

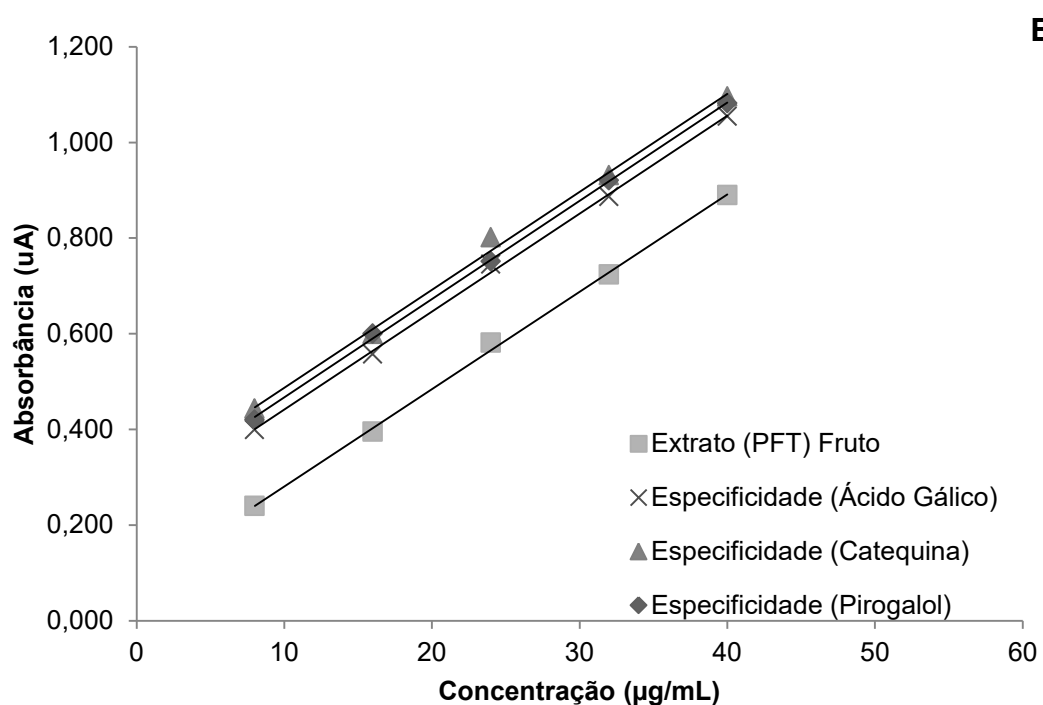
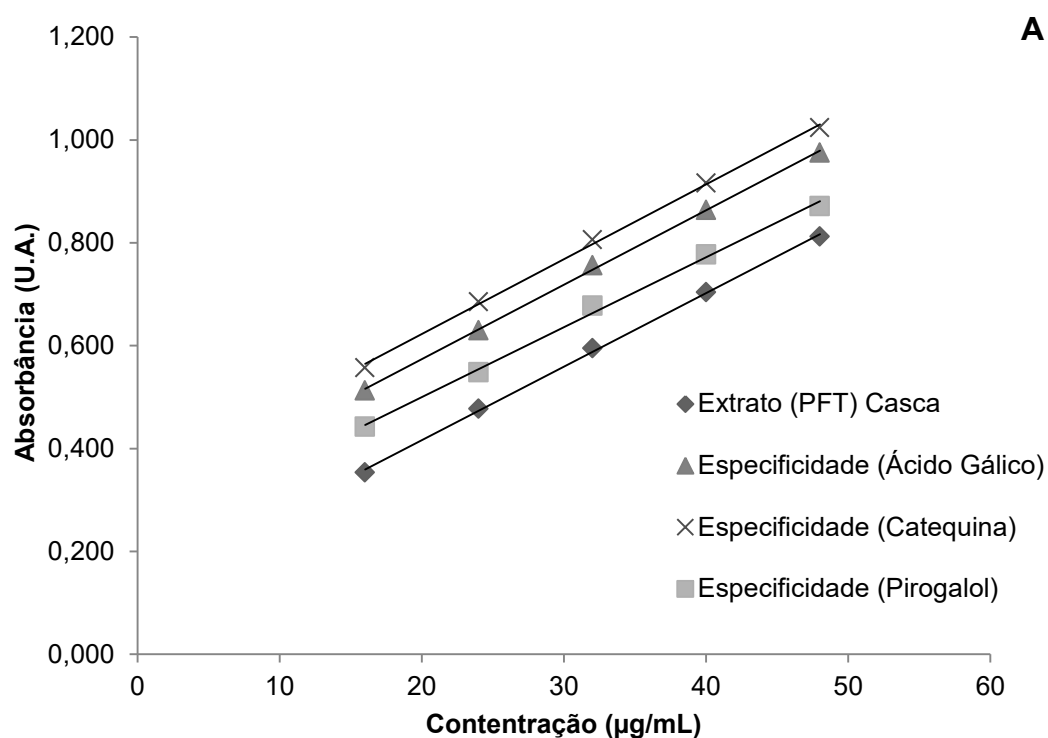
5.4.2 Especificidade

Devido à inviabilidade da obtenção das matrizes vegetais isentas de substâncias interferentes aos reagentes analíticos, se fez necessário a avaliação da especificidade através do método de adição do padrão. No ensaio foi realizada a contaminação das amostras de PFT com alíquota conhecida dos padrões de referência e foram elaboradas curvas de calibração.

As curvas de especificidade foram elaboradas em triplicata para o ácido gálico, catequina e pirogalol. A figura 16 apresenta as curvas médias de linearidade (Extratos) e as curvas médias da especificidade para cada uma das substâncias de referência. A análise estatística dos modelos matemáticos obtidos por regressão linear indica não haver diferença significativa entre os coeficientes angulares das curvas (Tabela 8). Desta forma, a resposta comportamento da curva de calibração das amostras de casca e fruto podem ser explicadas satisfatoriamente por qualquer um dos três padrões de referência avaliados.

Através da comprovação do paralelismo entre as retas, realizando a comparação estatística e comprovando que não há diferença entre os coeficientes angulares obtidos nas curvas de calibração da amostra normal e fortificada foi possível afirmar que o método é específico para a finalidade a que se propõe (RIBANI et al., 2004; ICH, 2005; BUENO et al., 2012).

FIGURA 16 - CURVAS DE LINEARIDADE E ESPECIFICIDADE POR ESPECTROSCOPIA DOS MÉTODOS PROPOSTOS PARA DOSEAMENTO DE TANINOS TOTAIS EM CASCA (A.) E FRUTO (B.) DE JUCÁ.



Fonte: Próprio Autor.

TABELA 8 - RESULTADOS DO ENSAIO DE ESPECIFICIDADE APRESENTANDO A COMPARAÇÃO ENTRE OS COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS PARA AS CURVAS DE PFT DAS AMOSTRAS E AS CURVAS DE ESPECIFICIDADE ELABORADAS PARA CADA PADRÃO.

Farmacógeno	Curvas PFT	Coeficiente angular (α) média $\pm$ DP (DRP%)	F _{calculado}
Casca	Extrato PFT	14,30 $\pm$ 0,2144 (1,50)	-
	Cont. Ácido gálico	14,48 $\pm$ 0,0641 (0,44)	2,11
	Cont. Catequina	14,54 $\pm$ 0,0625 (0,43)	3,51
	Cont. Pirogalol	14,58 $\pm$ 0,0816 (0,56)	4,72
Fruto	Extrato PFT	20,36 $\pm$ 0,1003 (0,49)	-
	Cont. Ácido gálico	20,48 $\pm$ 0,1316 (0,64)	1,71
	Cont. Catequina	20,46 $\pm$ 0,2373 (1,16)	0,49
	Cont. Pirogalol	20,44 $\pm$ 0,0282 (1,02)	0,35

Fonte: Próprio Autor.

$F_{tab(gl1, gl2, 0,05)} = 7,71$

5.4.3 Precisão, exatidão e robustez

Muitas vezes durante a execução de procedimentos analíticos podem ocorrer pequenas variações aleatórias oriundas dos equipamentos utilizados, analistas ou associados ao dia em que o experimento foi realizado. Neste sentido, o ensaio de precisão pretende avaliar e quantificar tais variações nos dados obtidos e expressar através do CV% a proximidade entre os resultados de uma série de medidas. Os dados de precisão e exatidão dos métodos estão resumidos na tabela 9 e os dados referentes à robustez na tabela 10. Considerado os ensaios de precisão, os resultados revelaram desvio-padrão relativo máximo de 1,28 % para o ensaio intra-corrida e de 4,9 % para o ensaio inter-corrida. Neste estudo não foram observados valores de desvio padrão relativo maiores que 5% (BRASIL, 2003), tanto na precisão intra-corrida quanto inter-corrida, do método em ambas as amostras estudadas (cascas do caule ou frutos). Nesse sentido, o método de Folin-Ciocalteu foi considerado como preciso para o doseamento de taninos totais nos dois farmacógenos de jucá avaliados no estudo.

TABELA 9 - RESULTADOS DA PRECISÃO (INTRA-CORRIDA E INTER-CORRIDA).

Farmacógeno	Teste	TT (g%) Média ± DP (DPR%)		F _{calc}
Casca	Precisão intra-corrída	12,12 ± 0,110 (0,91)		-
	Precisão inter-corrída	Dia 1	Dia 2	-
	Analista 1	12,45 ± 0,071 (0,57)	11,31 ± 0,243 (2,15)	0,38
	Analista 2	12,49 ± 0,082 (0,66)	11,38 ± 0,094(0,83)	0,38
Fruto	Precisão intra-corrída	13,90 ± 0,178(1,28)		-
	Precisão inter-corrída	Dia 1	Dia 2	-
	Analista 1	13,81 ± 0,136 (0,98)	14,16 ± 0,081 (0,58)	0,51
	Analista 2	13,91 ± 0,080 (0,58)	14,23 ± 0,081 (0,57)	0,02

Fonte: Próprio Autor.

C = concentração média em (µg/mL); DP = Desvio Padrão; DPR (%) = desvio padrão relativo (Precisão); E (%) = Exatidão.

$F_{tab(g11, g12, 0,05)} = 5,32$

Para o ensaio de exatidão, as cascas apresentaram taxas de recuperação na faixa de 96,84% a 103,13%, com média de 100,73% (2,14%); enquanto que para os frutos a recuperação ficou entre 104,12% e 109,13%, com média igual a 106,07% (2,53%). De acordo com as taxas de recuperação do padrão observadas nos ensaios, o método aplicado às cascas do caule ou aos frutos de *L. ferrea* apresenta desempenho dentro dos limites preconizados pela literatura, indicando que as respostas analíticas são decorrentes principalmente do analito (BRASIL, 2003; ARAÚJO et al., 2013).

A robustez de um método avalia a capacidade deste de resistir a pequenas e deliberadas modificações que possam interferir diretamente na resposta analítica. De acordo com a legislação vigente para validação de métodos analíticos, para considerar um método robusto, o mesmo não pode apresentar variação da resposta analítica maior do que 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Com base nesta evidência foram realizadas modificações em parâmetros considerados críticos para o processo: presença ou ausência de luz, devido à estabilidade dos complexos formados pela oxido-redução dos polifenóis com o reagente de Folin-Ciocalteu; estabilidade das soluções extrativas em 0 e 6 horas após o processo de extração, uma vez que o líquido extrator utilizado é água; e, leitura das amostras em equipamentos de marcas diferentes. Os resultados obtidos apresentaram valores de DPR < 1,65% em relação à casca do caule e DPR < 1,26% quanto ao fruto, podendo considerar o método robusto nestas condições uma vez que os valores de DPR foram menores do que 5% em todos os casos conforme exigido pela legislação (Tabela 10).

TABELA 10 - RESULTADOS OBTIDOS PARA ANÁLISE DE ROBUSTEZ DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU PARA O DOSEAMENTO DE TANINOS TOTAIS EM FARMACÓGENOS DE *L. ferrea*.

Farmacógeno	Parâmetros	Variáveis	TT (g%) Média ± DP (DPR%)
Casca	Luminosidade	Ausência de Luz	12,18 ± 0,200 (1,64)
		Presença de Luz	12,67 ± 0,070 (0,55)
	Estabilidade das soluções extrativas	0 h	12,39 ± 0,095 (0,77)
		6 h	12,07 ± 0,199 (1,65)
	Equipamento	Equip. 1	12,39 ± 0,094 (0,76)
		Equip. 2	12,67 ± 0,070 (0,55)
Fruto	Luminosidade	Ausência de Luz	14,06 ± 0,178 (1,26)
		Presença de Luz	14,55 ± 0,156 (1,08)
	Estabilidade das soluções extrativas	0 h	14,59 ± 0,148 (1,02)
		6 h	13,95 ± 0,027 (0,19)
	Equipamento	Equip. 1	13,55 ± 0,047 (0,34)
		Equip. 2	13,64 ± 0,134 (0,98)

Fonte: Próprio Autor.

DP = Desvio padrão; DPR% = Desvio padrão relativo; TT (µg/mL) = Taninos Totais em µg/mL de pirogalol.

Após avaliar, padronizar e validar o método de Folin-Ciocalteu para os farmacógenos de casca e fruto de jucá foi possível realizar o doseamento e comparação do teor de taninos totais nos diferentes lotes utilizados no estudo. Os resultados são apresentados na tabela 11 e foi calculada uma média geral de 11,43% (7,98%) e 13,77% (8,28%) para o teor de taninos totais nos três lotes das cascas e frutos respectivamente. Os $F_{\text{calculados}}$ mostram que há diferença estatística nos teores obtidos para os diferentes lotes de cada droga e os baixos CV% obtidos demonstram uma baixa variação no teor de taninos totais nos diferentes lotes avaliados para cada farmacógeno. Por fim, foi possível verificar que a quantidade de taninos na droga constituída dos frutos é ligeiramente maior que a constituída das cascas.

TABELA 11 - RESULTADOS OBTIDOS PARA ANÁLISE DO TEOR DE TANINOS TOTAIS EM DIFERENTES LOTES DAS CASCAS DO CAULE E FRUTOS DE *L. ferrea*.

Farmacógeno	Lote	Teor (%)	Teor Médio	$F_{calculado}$
Casca	JUC1	12,12 ± 0,110 (0,91)		
	JUC2	12,39 ± 0,120 (0,97)	11,43 ± 0,912 (7,97)	387,99
	JUC3	10,31 ± 0,013 (0,13)		
Fruto	JUF1	13,86 ± 0,136 (0,98)		
	JUF2	12,58 ± 0,042 (0,33)	13,76 ± 1,135 (8,25)	398,73
	JUF3	14,84 ± 0,095 (0,64)		

Fonte: Próprio Autor.

$F_{tab (gl1, gl2, 0,05)} = 5,14$

6 CONCLUSÕES

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

O estudo de otimização e padronização do método analítico espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu aplicado às cascas do caule e frutos de *L. ferrea*, proporcionou a avaliação de parâmetros operacionais que poderiam afetar diretamente o teor de taninos totais nos farmacógenos da espécie vegetal, permitindo assim a padronização dos procedimentos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e representativos. De acordo com a análise dos parâmetros de validação foi possível garantir que o método proposto possui a especificidade necessária a 760 nm, também apresentando linearidade, precisão e exatidão adequadas, além de ser robusto nas condições estabelecidas de análise.

Por fim, o método de Folin-Ciocalteu pode ser aplicado com êxito ao controle de qualidade das cascas do caule e frutos desta espécie, devido à facilidade de execução dos procedimentos analíticos e a acessibilidade dos equipamentos/reagentes necessários, o que torna o método uma importante ferramenta no controle de qualidade destas drogas alcançadas a partir de *L. ferrea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZYK, B.; ADAMCZYK, S.; SMOLANDER, A.; KITUNEN, V. Tannic acid and norway spruce condensed tannins can precipitate various organic nitrogen compounds. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 628-637, 2011.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M., YAMAGUTI, E., UEMURA, L. M., MELLO, J. C. P. Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 383-386, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução-RE No 899. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**. Brasília, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução-RDC No 14: Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**. Brasília, 2010.

ARAPISTAS P. Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1708-1717, 2012.

ARAÚJO, A. A., SOARES, L. A., ASSUNÇÃO FERREIRA, M.R., DE SOUZA NETO, M.A., DA SILVA, G.R. DE ARAÚJO, R.F. JR., GUERRA, G. C., DE MELO, M. C. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, n. 28, p. 88–96, 2014.

ARAÚJO, L. B. D. C., SILVA, S. L., GALVÃO, M. A. M., FERREIRA, M. R. A., ARAÚJO, E. L., RANDAU, K. P., SOARES, L. A. L. Total phytosterol content in drug materials and extracts from roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-VIS spectrophotometry. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 736-742, 2013.

AUDI, E. A., TOLEDO, C. E. M., SANTOS, F. S., BELLANDA, P. R., ALVES-DO-PRADO, W., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V., SAKURAGUI, C. M., BERSANI-AMADO, C. A., MELLO, J. C. P. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 328-333, 2004.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer Action and Toxicity of *Styrax Camporum* and *Caesalpinia Ferrea*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, n. 3, p. 204-207, 1995.

BACCHI, E.; SERTIÉ, J. A. Identificação Cromatográfica e Ação Farmacológica de Extratos de *Styrax camporum* Pohl e *Caesalpinia ferrea* Martius. **Revista Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 27, n. 2, p. 137-49, 1991.

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**, v. 19, n. 4, p. 865-70, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria**. Campinas: UNICAMP, 2010.

BORGES, L. A.; SOUZA, L. G. R.; GUERRA, M.; MACHADO, I. C.; LEWIS, G. P.; LOPES, A. V. Reproductive isolation between diploid and tetraploid cytotypes of *Libidibia ferrea* (= *Caesalpinia ferrea*) (Leguminosae): ecological and taxonomic implications. **Plant System and Evolution**, v. 298, p. 1371-1381, 2012.

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

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 408-420, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.960, de 09 de dezembro de 2008**. Aprova o Programa Nacional de Plantas medicinais e fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, nº 240, p. 56. 10 de dezembro de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **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, 2003.

BRAZ, R. et al. Quality control and TLC profile data on selected species commonly found in the Brazilian market. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n. 5, p. 1111-1118, 2012.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: **The Stationary Office**, 2001.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: **The Stationary Office**, 2014.

BRUNETON, J. **Farmacognosia – Fitoquímica Plantas Medicinales**. 2 ed. España: Editorial Acríbia S. A., p. 365-400, 2001.

BRUYNE, T. de.; PIETERS, L.; WIEVROUW, M.; CLERO, E. de.; BERGHE, D.V.; VLIETINCK, A. J. Biological evaluation of proanthocyanidin dimmers and related polyphenols. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 954-958, 1999.

BUENDÍA, B.; GIL, M. I.; TUDELA, J. A.; GADY, A. L.; MEDINA, J. J.; SORIA, C. HPLC-MS Analysis of Proanthocyanidin Oligomers and Other Phenolics in 15 Strawberry Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3916–3926, 2010.

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

CARVALHO, J.C.T., TEIXEIRA, J.R.M., SOUZA, P.J.C., BASTOS, J.K., DOS SANTOS FILHO, D., SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.

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

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

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

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

DA COSTA, L. M., DOS SANTOS, V. A., OHANA, D. T., LIMA, E. S., PEREIRA, M. M., DE SOUZA, T. P. Technological development of aqueous extracts from *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum., Rubiaceae, (mulateiro) using factorial design. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 181-186, 2011.

DA SILVA, P.P., CHISTÉ, R. C., GODOY, H. T., PRADO, M. A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 875-881, 2013.

DHANANI, T. et al. A Validated High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Tannin-Related Marker Constituents Gallic Acid, Corilagin, Chebulagic Acid, Ellagic Acid and Chebulinic Acid in Four *Terminalia* Species from India. **Journal of Chromatographic Science**, 2014.

DI STASI, L.C., HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata Atlântica**. Unesp, São Paulo, 2002.

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. **An Introduction to the Bootstrap**, Chapman and Hall, 1993.

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

EUROPEAN Pharmacopoeia. 4. Ed. France: **EDQM**, p. 187, 2002.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed., Brasília: **ANVISA**, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed., Brasília: **ANVISA**, 2010.

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

FRASSON, A. P. Z. **Caracterização físico-química e biológica e avaliação antimicrobiana do extrato do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

FRASSON, A. P. Z.; BITTEM COURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 35-39, 2003.

GAEDCKE, F.; STEINHOFF, B. wissenschaftliche und rechtliche Grundlagen für Entwicklung, Standardisierung und Zulassung in Deutschland und Europa. Stuttgart:WVG, **Phytopharmaka**, 2000.

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

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256 p. 4494-4497, 1981.

HAGERMAN, A. E.; RICE, M. E.; RITCHARD, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin 16 – (4 – 8) catechin (procyanidin). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 2590-2595, 1998.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481–504, 2000.

HASHIMOTO, G. **Illustrated Encyclopedia of Brazilian Medicinal Plants**. Kamakura: Abokk Press, p. 171—7, 1996.

HASLAM, E. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2713-2721, 2007.

HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; CAI, Y.; MARTIR, R.; MAGNOLATO, D. Traditional herbal medicines-the role of polyphenols. **Planta Medica**, v. 55, p. 8, 1989. <http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=05/04/2010&jornal=1&pagina=85&totalArquivos=160>, accessed in May 2010.

HE, Y., WU, Q., HANSEN, S. H., CORNETT, C., MOLLER, C., LAI, P. Differentiation of tannin-containing herbal drugs by HPLC fingerprints. **Pharmazie**, v. 68, n. 3, p. 155-9, 2013.

ICH. International Conference on Harmonisation Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. Available from: <http://www.ich.org>, 2005.

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

KROMIDAS, S. Validierung in der Analytik. Weinheim: **Wiley-VCH**, 1999.

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

LIAO, X. P.; LU, Z. B.; SHI, B. Selective adsorption of vegetable tannins onto collagen fibers. **Industrial and Engineering Chemical Research**, v. 42, p. 3397-3402, 2003.

LIMA, J. D., ALMEIDA, C. C., DANTAS, V. A. V., SILVA, B. M. S., MORAES, W. S. Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (Leguminosae, Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, vol. 30, n.4, p.513-518, 2006.

LIMA, S. M. A., ARAÚJO, L. C. C., SITÔNIO, M. M., FREITAS, A. C. C., MOURA, S. L., CORREIA, M. T. S., MALTA, D. J. N., GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 169-175, 2012.

LOPES, C. L.; BLAINSKI, A.; DOS SANTOS, P. V. P.; DICIAULA, M. C.; DE MELLO, J. C. P. Development and validation of na HPLC method for the determination of epicathechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 789-795, 2010.

LOPES, G. C., SANCHES, A. C. C., TOLEDO, C. E. M., ISLER, A. C., MELLO, J. C. P. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 135-143, 2009.

LOPES, N.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; ESPADA, S. F.; PACHECO, A. C.; RICARDO, N. M. P. S.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex vírus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 93-99, 2013.

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

MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminants animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 49, p. 241-256, 2003.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica, Leitura & Arte, 2004.

MAKKAR, H. P. S.; DAWRA, R. K.; SINGH, B. Protein Precipitation Assay for Quantitation of Tannins: Determination of Protein in Tannin-Protein Complex. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 435-439, 1987.

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

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

MARQUES, L. C.; PETROVICK, P.R. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/EDUFSC, Cap. 14, p. 327-370, 2010.

MARTINS, A. G. **Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

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

MICHELIN, D. C.; FINATI, S. C. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 18-22, 2010.

MOK DKW, CHAU FT. Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist. *Chemometry*. **Intell Lab**; V. 82, n. 1-2, p. 210-217, 2005.

MOLLER, C., HANSEN, S. H., CORNETT, C. Characterisation of tannin-containing herbal drugs by HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n.3, p. 231-9, 2009.

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

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

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1–2, p. 3–20, 2001.

NACZK, M.; AMAROWICZ, R.; ZADERNOWSLI, R.; SCHAHIDI, F. Protein precipitating capacity of condensed tannins of beach pea, canola hulls, evening primrose and faba bean. **Food Chemistry**, v. 73, p. 467-471, 2001.

NAKAMURA, E. S. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 135-137, 2002.

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

NASCIMENTO, M. P. S. C. B. et al. **Potencial Forrageiro do Pau-Ferro**. In: Boletim de Pesquisa e desenvolvimento, 41. Teresina : EMBRAPA MEIO NORTE, 2002.

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

NUNES, K. M.; BARBOSA, W. L. R.; OZELA, E. F.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-Sólidas Fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 344-50, 2009.

OLIVEIRA, A. F., BATISTA, J. S., PAIVA, E. S., SILVA, A. E., FARIAS, Y. J. M. D., DAMASCENO, C. A. R., BRITO, P. D., QUIROZ, S. A. C., RODRIGUES, C. M. F., FREITAS, C. I. A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde, **Regulamentação dos medicamentos: um esboço mundial**. Washington: OPAS; 62. 2000.

OWEN, R. W.; HAUBNER, R.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 12, p. 1727–173, 2003.

PELILLO, M., CUVELLIER, M. E., BIGUZZI, B., TOSCHI, T. G., BERSET, C., LERCKER, G. Calculation of the molar absorptivity of polyphenols by using liquid chromatography with diode array detection: the case of carnosic acid. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, n. 2, p. 225-229, 2004.

PEREIRA, L. P., DA SILVA, R. O., BRINGEL, P. H., DA SILVA, K. E., ASSREUY, A. M., PEREIRA, M. G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 642-648, 2012.

PEREIRA, M.S.V., RODRIGUES, O.G., FEIJÓ, F.M.C., LIMA, E.Q., SOUSA, M.R.Q. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no semi-árido paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, patos, v.2, n.1, 2006.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 687, 1984.

PUEYO, I. U.; CALVO, M. I. Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content. **Fitoterapia**, v. 80, p. 465-467, 2009.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Editora da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

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

SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Fitoterapia**, v. 72, p. 807–809, 2001.

SAMPAIO, F. C., PEREIRA, M. S., DIAS, C. S., COSTA, V. C., CONDE, N. C., BUZALAF, M. A. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits

against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 289-294, 2009.

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

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.

SHOJI, T.; MASUMOTO, S.; MORIICHI, N.; KANDA, T.; OHTAKE, Y. Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, p. 206-213, 2006.

SILANIKOVE, N.; PEREVOLOTSKY, A.; PROVENZA, F. D. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannin and their negative postingestive effects in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 69-81, 2001.

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

SOARES, L. A. L.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmacy and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 787-790, 2004.

SOARES, L. A. L. ; GONZÁLEZ ORTEGA, G. ; BASSANI, V. L. ; PETROVICK, P.R. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (Quebra-Pedra) empregando planejamento fatorial. **Caderno de Farmácia**, v. 14, n.1/2, p. 19-24, 1998.

SOLÓN LGS, COSTA LJL, WANDERLEY AG, SOARES LAL, SOUZA TP. Avaliação de agentes complexantes na quantificação de taninos totais em soluções extrativas de *Schinus terebinthifolius* R. e *Psidium guajava* L. **Biofarma**, v. 2, p. 275-281, 2007.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/EDUFSC, Cap. 13, p. 289-226, 2010.

SUDHAKAR, M.; RAO, C. H. V.; RAO, P. M.; RAJU, D. B.; VENKATESWARLU, Y. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangetica*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 378–380, 2006.

SUN, B., RICARDO-DA-SILVA, J. M.; SPRANGER, I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 46, p. 4267-4274, 1998.

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

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

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

VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO, H. M. L.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E. M., FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L.A.L.; SÁ, M. D. C., SOUZA, T.P.; WANDERLEY, A. G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1533-1541, 2011.

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

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

VOIGT, R. Pharmazeutische Technologie. 10. überarb. Aufl., Berlin: **Ullstein Mosby**, 2006.

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

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2^a. ed. Berlim: Springer – Verlag, 2001.

WORLD. World Health Organization. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. WHO/EDM/TRM/2000.1. **WHO**. 2000.

WORLD. World Health Organization. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. WHO/TRM/21.4. **WHO**. 1991.

YUNES, R.A., FILHO, V.C. Química de produtos naturais. Novos fármacos e a moderna farmacognosia. 3. ED. Itajaí: ED. **Universidade do Vale do Itajaí**, p. 163 – 192, 2012.

ZENG Z, CHAU FT, CHAN HY, CHEUNG CY, LAU TY, 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, n. 9, 2008.