



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

JULIA APARECIDA LOURENÇO DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CROMATOGRÁFICA DE DROGAS
VEGETAIS DE USO TRADICIONAL NO NORDESTE BRASILEIRO

Tese de Doutorado

Recife - PE

2017



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

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CROMATOGRÁFICA DE DROGAS
VEGETAIS DE USO TRADICIONAL NO NORDESTE BRASILEIRO

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Recife - PE

2017

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

- S719c Souza, Júlia Aparecida Lourenço de.
Caracterização físico-química e cromatográfica de drogas vegetais de uso tradicional no Nordeste brasileiro / Júlia Aparecida Lourenço. – Recife: o autor, 2017.
111 f.; il; 30 cm.
- Orientador: Luiz Alberto Lira Soares.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas.
Inclui referências, apêndices, quadros, figuras e tabelas.
1. Impressões digitais. 2. Plantas medicinais. 3. Cromatografia em camada delgada. 4. HPLC. 5. Antimicrobianos. I. Soares, Luiz Alberto Lira. (orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 072)

JULIA APARECIDA LOURENÇO DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CROMATOGRÁFICA DE DROGAS
VEGETAIS DE USO TRADICIONAL NO NORDESTE BRASILEIRO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 29/08/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Presidente da Banca)

Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza (Membro Interno)

Profa. Dra. Rosali Maria Ferreira da Silva (Membro Interno)

Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque (Membro Externo)

Prof. Dr. Severino Granjeiro Júnior (Membro Externo)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer

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

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

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

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

*Com amor dedico este trabalho aos
meus pais Benedito e Adelaide,
a minha filha Daniele e aos
meus irmãos Haroldo, Fernando e João.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Benedito e Adelaide, que me apoiaram desde o início da idealização desse doutorado, mesmo sabendo das dificuldades que enfrentaríamos e enfrentamos juntos.

À minha linda e amável filha Daniele, pela alegria que traz em minha vida, por me ensinar tanto sobre o amor, paciência e gratidão e por fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus irmãos, Haroldo, Fernando e João por todo apoio, amor e a presença de vocês sempre que possível.

À minha cunhada Liduina e sobrinha Rachel, pelo tempo disponibilizado a me ajudar quando foi necessário.

Às minhas cunhadas e sobrinhos, por todo carinho e palavras de apoio nos momentos oportunos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares, por ter me acolhido em seu laboratório, por toda oportunidade de aprendizado que me foi concedida e por todos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia, os antigos e atuais, Janaina, Jéssica, Laysa, Maria Alice e Paulo, que me ajudaram com a coleta de amostras para a elaboração desse trabalho.

Às alunas de iniciação científica Bruna, Carolina, Janaina, Laysa e Renata pela ajuda na preparação de extratos.

À doutoranda Isabelle, pelo apoio em parte deste trabalho.

À amiga e Dra. Magda Rhayanny Assunção Ferreira, por todo apoio e ajuda em diversos momentos deste trabalho, pelas conversas descontraídas e incentivos.

À aluna de iniciação científica e amiga Wliana Viturino por toda ajuda, seja na coleta de amostras, preparação de extratos, apoio na bancada e por todas as vezes que me ajudou com minha filha para que eu pudesse trabalhar tranquila. A você e sua família, Dona Marinete e Sr. Arlindo minha gratidão por tudo que fizeram por nós.

À toda equipe do Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos (NUDATEF), pelo companheirismo, conhecimentos e alegrias compartilhadas.

À minha amiga e “mãe” pernambucana Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque, por sua amizade, carinho, cuidado e palavras de incentivo nos momentos necessários.

À Maria Olívia de Oliveira Cano, botânica do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), por sua gentileza e ajuda com a aquisição e identificação das amostras vegetais.

Ao Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto, pela disponibilização do granulômetro.

À Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, pela disponibilização do moinho.

À Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva e sua equipe, pela colaboração com as análises de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão e sua equipe, pela colaboração com as análises de atividade antimicrobiana.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa.

Aos amigos de Fortaleza: Aracélia, Carol, Cesar, Chaenne, Dayse, Eunice, Said e Val, que mesmo distantes estão me apoiando e torcendo por mim.

Para chegar à conclusão desse trabalho não estive sozinha, contei com a ajuda de algumas pessoas e das mais diversas formas, direta ou indiretamente, na bancada, nas discussões e em casa. Então aqui, tem a participação de pessoas importantes em minha vida, de amigos que

conquistei ao longo desses anos. E a todos que contribuíram o meu mais sincero agradecimento.

E por fim e sobretudo à Deus, por me permitir vivenciar tudo isso, por colocar em minha vida tantas pessoas especiais, e por me permitir aprender com cada uma delas. E o mais importante, por ter me dado forças para chegar até aqui, pois Ele tudo sabe e tudo vê.

*Viver é aquecer sonhos e esperanças, fazendo da
fé a nossa inspiração maior.
É buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz!*

Mario Quintana

RESUMO

A crescente utilização de produtos de origem vegetal, tem sido motivo de preocupação das autoridades sanitárias no que diz respeito ao seu uso racional e às especificações de qualidade. Sob o aspecto da qualidade farmacêutica destes produtos, os métodos cromatográficos têm sido amplamente empregados para as avaliações qualitativa e quantitativa destas matrizes complexas e seus derivados. Isto se deve a capacidade que possuem estas técnicas para separação da mistura de compostos do metabolismo secundários, especialmente para o estabelecimento de perfis químicos qualitativos (*fingerprints*). Portanto, o objetivo deste trabalho foi a avaliação de perfis químicos de espécies vegetais tradicionais através das cromatografias em camada delgada (CCD) e líquida de alta eficiência (CLAE). Para tanto, sete espécies vegetais com relevância para a terapêutica regional foram selecionadas (*Anacardium occidentale* L.; *Annona muricata* L.; *Guazuma ulmifolia* Lam.; *Phyllanthus niruri* L.; *Psidium guajava* L.; *Punica granatum* L. e *Spondias mombin* Jacq.); submetidas a triagem fitoquímica (derivados antracênicos e cinâmicos, flavonoides e taninos que são classificados como polifenóis); e, em seguida, desenvolvidos os perfis fitoquímicos por CCD e CLAE. As amostras de cada um dos materiais vegetais foram identificadas e caracterizadas de acordo com os métodos gerais da Farmacopeia Brasileira e, após padronização química, submetidos à avaliação dos potenciais citotóxico e antimicrobiano. A triagem fitoquímica revelou que as espécies vegetais estudadas apresentaram derivados cinâmicos, flavonoides e taninos (hidrolisados e condensados). Todas as amostras atenderam as especificações preconizadas pela Farmacopeia Brasileira para matéria-estranha, umidade, cinzas, teor de extrativo e granulometria. Os perfis químicos por CCD e CLAE revelaram bandas/picos típicos para algumas espécies e poderão ser empregados como referência para predição da qualidade química do insumo. Considerando as propriedades biológicas das espécies vegetais, apenas duas espécies apresentaram moderada citotoxicidade (*A. occidentale* e *G. ulmifolia*), enquanto as espécies *A. muricata*; *G. ulmifolia*; *P. niruri*; *P. guajava*; *P. granatum* e *S. mombin* apresentaram propriedades antifúngicas e antibacterianas e a espécie *A. occidentale* apresentou atividade antifúngica. Dessa forma, os resultados deste estudo permitiram relatar pela primeira vez perfis químicos que poderão ser usados como preditores da qualidade química e biológica para a padronização de matérias-primas vegetais e produtos derivados.

Palavras-chaves: Impressões digitais. Plantas medicinais. Cromatografia em camada delgada. HPLC. Antimicrobianos. Citotoxicidade.

ABSTRACT

In general, the access to medicinal plants is facilitated by the possibility of own cultivation or by the wide commercialization in markets and free markets. Therefore, the increasing use of plant products has been a matter of concern to the health authorities as regards their rational use and quality specifications. As to the pharmaceutical quality of these products, chromatographic methods have been widely used for the qualitative and quantitative evaluations of these complex matrices and their derivatives. This is due to the ability of these techniques to separate the mixture of compounds from secondary metabolism, especially for the establishment of qualitative chemical profiles (fingerprints). Therefore, the objective of this work was the evaluation of chemical profiles of traditional plants species through thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Therefore, seven plant species with relevance to the regional therapy were selected (*Anacardium occidentale* L., *Annona muricata* L., *Guazuma ulmifolia* Lam., *Phyllanthus niruri* L., *Psidium guajava* L., *Punica granatum* L. and *Spondias mombin* Jacq.; submitted to phytochemical screening (anthracene and cinnamic derivatives, flavonoids and tannins that are classified as polyphenols); and then, developed the phytochemical profiles by TLC and HPLC. Samples of each of the plant materials were identified and characterized according to the general methods of the Brazilian Pharmacopoeia and, after chemical standardization, submitted to the evaluation of cytotoxic and antimicrobial activity. Phytochemical screening revealed that the studied plant species presented cinnamic, flavonoid and tannin derivatives (hydrolysable and condensed). All samples comply with the specifications recommended by the Brazilian Pharmacopoeia for foreign matter, moisture, ash, extractive content and particle size. The chemical profiles by TLC and HPLC revealed typical bands/peaks for some species and could be used as reference for predicting the chemical quality of the material. Considering the biological properties of the plant species, only two species showed moderate cytotoxicity (*A. occidentale* and *G. ulmifolia*), while the species *A. muricata*; *G. ulmifolia*; *P. niruri*; *P. guajava*; *P. granatum* and *S. mombin* presented antifungal and antibacterial properties and *A. occidentale* had antifungal activity. Thus, the results of this study allowed us to report for the first time chemical profiles that could be used as predictors of chemical and biological quality for the standardization of herbal materials and derived products.

Keywords: *Fingerprints*. Medicinal plants. Thin layer chromatography. HPLC. Antimicrobials. Cytotoxic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das análises realizadas com as drogas vegetais.....	52
Figura 2 - Cromatoplasmas obtidas para as amostras das folhas de <i>A. occidentale</i>	58
Figura 3 - Cromatoplasma obtida para as amostras das folhas de <i>A. muricata</i>	59
Figura 4 - Cromatoplasma obtida para as amostras das folhas de <i>G. ulmifolia</i>	60
Figura 5 - Cromatoplasma obtida para as amostras das folhas de <i>P. niruri</i>	61
Figura 6 - Cromatoplasma obtida para as amostras das folhas de <i>P. guajava</i>	62
Figura 7 - Cromatoplasma obtida para as amostras das cascas do fruto de <i>P. granatum</i>	63
Figura 8 - Cromatoplasma obtida para as amostras das cascas do fruto de <i>S. mombin</i>	64
Figura 9 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de <i>A. occidentale</i>	65
Figura 10 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de <i>A. muricata</i>	66
Figura 11 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de <i>G. ulmifolia</i>	67
Figura 12 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de <i>P. niruri</i>	67
Figura 13 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de <i>P. guajava</i>	68
Figura 14 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de <i>P. granatum</i>	69
Figura 15 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de <i>S. mombin</i>	69
Figura 16 - Cromatoplasmas dos Extratos Brutos Aquosos obtidos por Refluxo de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.....	77
Figura 17 - Cromatoplasmas dos Extratos Brutos Aquosos obtidos por Turbólise de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.....	78
Figura 18 - Cromatoplasmas dos Extratos Brutos 1:1 obtidos por Refluxo de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.	78
Figura 19 - Cromatoplasmas dos Extratos Brutos 1:1 obtidos por Turbólise de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.....	79

Figura 20 - Cromatogramas dos Extratos Brutos 7:3 obtidos por Refluxo de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.	79
Figura 21 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos 7:3 obtidos por Turbólise de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos.	80
Figura 22 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos Aquosos obtidos por Refluxo de todas as amostras, para taninos condensados.	81
Figura 23 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos Aquosos obtidos por Turbólise de todas as amostras, para taninos condensados.	81
Figura 24 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos 1:1 obtidos por Refluxo de todas as amostras, para taninos condensados.	82
Figura 25 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos 1:1 obtidos por Turbólise de todas as amostras, para taninos condensados.	82
Figura 26 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos 7:3 obtidos por Refluxo de todas as amostras, para taninos condensados.	83
Figura 27 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos 7:3 obtidos por Turbólise de todas as amostras, para taninos condensados.	83
Figura 28 - Cromatograma obtido para extrato bruto CJ2 obtido por refluxo e turbólise.....	84
Figura 29 - Cromatograma obtido para extrato bruto GR1 obtido por refluxo e turbólise.	84
Figura 30 - Cromatograma obtido para extrato bruto MT1 obtido por refluxo e turbólise.....	85
Figura 31 - Cromatograma obtido para extrato bruto QP1 obtido por refluxo e turbólise.....	85
Figura 32 - Cromatograma obtido para extrato bruto GB1 obtido por refluxo e turbólise.	85
Figura 33 - Cromatograma obtido para extrato bruto RM3 obtido por refluxo e turbólise.....	86
Figura 34 - Cromatograma obtido para extrato bruto CZ1 obtido por refluxo e turbólise.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Coleta das amostras e suas respectivas localizações.....	38
Quadro 2 - Sistema de eluentes utilizados.	41
Quadro 3 - Substâncias padrões de referência.	41
Quadro 4 - Reagentes reveladores utilizados para cada metabólito.....	42
Quadro 5 - Extratos obtidos por refluxo e turbólise.....	46
Quadro 6 - Sistema de eluentes utilizados.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação de matéria estranha em drogas vegetais.....	53
Tabela 2 - Determinação de água nas drogas vegetais.	54
Tabela 3 - Determinação de cinzas totais nas drogas vegetais.	54
Tabela 4 - Determinação do teor de extrativos nas drogas vegetais.....	55
Tabela 5 - Determinação da granulometria dos pós nas drogas vegetais.	56
Tabela 6 - Teor de Flavonoides Totais por Espectrofotometria UV-Vis nas amostras de matéria prima vegetal.	71
Tabela 7 - Teor de Taninos Totais por Espectrofotometria UV-Vis nas amostras de matéria prima vegetal	72
Tabela 8 - Teor de marcadores polifenólicos (%m/m) obtidos por CLAE nos farmacógenos das espécies vegetais.	73
Tabela 9 - Rendimento dos extratos brutos obtidos por refluxo.....	75
Tabela 10 - Rendimento dos extratos brutos obtidos por turbólise.	76
Tabela 11 - Teor de marcadores (%m/m) obtidos por CLAE nos extratos brutos.	87
Tabela 12 – Percentual (%) de inibição frente ao ensaio de citotoxicidade dos EB.	88
Tabela 13 - Citotoxicidade das amostras CJ273T e MT111T.....	91
Tabela 14 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima (mg/mL) dos extratos brutos contra bactérias.....	93
Tabela 15 - Concentração Inibidora Mínima e Concentração Fungicida Mínima (mg/mL) de extratos brutos contra leveduras de <i>Candida</i> spp.	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
AE	Ácido Elágico
AG	Ácido Gálico
CAT	Catequina
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDAE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CE	Ceará
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CJ	Cajueiro
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com detector de arranjo de fotodiodos
CZ	Cajazeira
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EB	Extrato Bruto
EMEA	<i>The European Agency for the Evaluation of Medical Products</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDA	Food and Drug Administration
g	Grama
GB	Goiabeira
GR	Graviola
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
IV	Infravermelho
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	mililitro

mm	Milímetro
MT	Mutamba
NEU	Ácido etilborilamino éster
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PE	Pernambuco
PEG	Polietilenoglicol
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
PVP	Povidona
QP	Quebra-Pedra
RENISUS	Relatório Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
Rf	Fator de Retenção
RM	Romã
seg	Segundos
SUS	Sistema Único de Saúde
TFT	Teor de Flavonoides Totais
TTT	Teor de Taninos Totais
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
Vis	Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 REFERENCIAL TEÓRICO	28
3.1 ESPÉCIES VEGETAIS INVESTIGADAS	28
3.1.1 <i>Anacardium occidentale</i> L.	28
3.1.2 <i>Annona muricata</i> L.....	29
3.1.3 <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.	29
3.1.4 <i>Phyllanthus niruri</i> L.	30
3.1.5 <i>Psidium guajava</i> L.....	30
3.1.6 <i>Punica granatum</i> L.....	31
3.1.7 <i>Spondias mombin</i> Jacq.	31
3.2 POLIFENOIS	32
3.3 <i>FINGERPRINTS</i> , CCD e CLAE	33
3.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS VEGETAIS	34
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL VEGETAL	37
4.1.1 Caracterização físico-química do material vegetal.....	37
4.2 DESENVOLVIMENTO DOS PERFIS QUÍMICOS DAS AMOSTRAS VEGETAIS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	40
4.2.1 Otimização das condições cromatográficas utilizadas para a CCD	40
4.2.2 Condições cromatográficas utilizadas para análise por CLAE	42
4.3 DOSEAMENTO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis)	43
4.3.1 Flavonoides totais.....	43
4.3.2 Taninos totais.....	44
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	46
4.4.1 Extração por refluxo	46
4.4.2 Extração por turbólise.....	46

4.5 DESENVOLVIMENTO DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS POR CCD E CLAE-DAD	47
4.5.1 Condições cromatográficas utilizadas para a CCD	47
4.5.2 Condições cromatográficas utilizadas para a CLAE-DAD	48
4.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS POR TURBÓLISE (EBT) - MÉTODO DO MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)).....	48
4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS POR TURBÓLISE	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 MATERIAL VEGETAL	52
5.1.1 Caracterização físico-química	53
5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DE POLIFENÓIS NOS FARMACÓGENOS DAS ESPÉCIES VEGETAIS.....	56
5.2.1 Perfis cromatográficos por CCD	56
5.2.2 Perfis cromatográficos por CLAE-DAD	64
5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE TANINOS E FLAVONOIDES NOS FARMACÓGENOS DAS ESPÉCIES VEGETAIS	70
5.3.1 Quantificação por espectrofotometria	70
5.3.1.1 Flavonoides Totais.....	70
5.3.1.2 Taninos Totais	71
5.3.2 Quantificação por CLAE-DAD	73
5.4 ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES CITOTOXICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DOS FARMACÓGENOS DAS ESPÉCIES VEGETAIS.....	74
5.4.1 Preparação dos extratos brutos	74
5.4.1.1 Extração por refluxo	74
5.4.1.2 Extração por turbólise.....	75
5.4.2 Análise Qualitativa dos extratos brutos por CCD E CLAE-DAD	77
5.4.2.1 Perfis Cromatográficos por CCD	77
5.4.2.2 Perfis Cromatográficos por CLAE-DAD	84
5.4.3 Análise Quantitativa de Polifenóis nos Extratos Brutos por CLAE-DAD.....	86

5.4.4 Atividade Citotóxica dos extratos brutos obtidos por turbólise (EBT): pelo método do MTT.....	87
5.4.5 Atividade Antimicrobiana dos extratos brutos obtidos por turbólise	91
6 CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE - ARTIGO.....	110

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, vem crescendo a utilização de plantas medicinais e fitoterápicos, principalmente nos países em desenvolvimento. Em alguns casos o emprego de plantas medicinais figura como o principal recurso disponível ou, até mesmo, como o único para o tratamento primário de saúde. De forma geral, plantas medicinais são de fácil acesso, em função da possibilidade de cultivo pelo próprio usuário ou da comercialização em mercados e feiras livres (MACIEL et al., 2002; GANGADEVI et al., 2008; AROKIYARAJ et al., 2008; GIL, 2010).

Devido ao interesse cada vez maior pelas plantas medicinais, os estudos acerca do tema têm avançado sistematicamente. Houve um aumento no número de pesquisas que foram motivadas pelas perspectivas de emprego terapêutico de diversas destas espécies vegetais utilizadas tradicionalmente. As informações muitas vezes são obtidas pelas utilizações que a população faz das plantas medicinais e com uso constante para determinada doença, tornando assim relevante a sua aplicação na medicina popular (MACIEL et al., 2002; OLIVEIRA et al. 2010).

O Brasil tem uma rica história de uso das plantas medicinais no tratamento dos problemas de saúde da população, que foi construído com base na experiência e transmitido de forma oral, através da medicina popular (BRUNING, MOSEGUI, VIANA, 2012). E, na tentativa de resgatar esses conhecimentos e torná-los mais acessíveis à população, o governo federal criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) para a implantação e implementação no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006; FIGUEREDO, GURGEL, GURGEL JUNIOR, 2014). Nesse contexto, uma lista denominada de Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus) contendo 71 espécies de plantas de interesse para o SUS foi divulgada pela PNPMF com a finalidade de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença, (RENISUS, 2009).

Com o crescimento mundial do emprego de plantas medicinais e seus produtos derivados, aumentou a preocupação das autoridades sanitárias no que diz respeito ao controle de qualidade, segurança e eficácia desses produtos (FAN et al., 2006; GOMATHI et al., 2012).

Sob esse aspecto, a cromatografia em camada delgada (CCD) é bastante utilizada para o controle de qualidade de drogas vegetais, em virtude de sua simplicidade de execução, baixo custo operacional e de rápida reposta para análise (MARSTON, 2007).

Outra técnica muito utilizada para análises de drogas vegetais e que tem se destacado pela sensibilidade e eficiência de separação dos componentes (LIU et al., 2011) é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Tem como uma grande vantagem a possibilidade de acoplar diferentes detectores, como UV e arranjo de diodos (DAD), que são bastantes utilizados para impressões digitais de drogas vegetais (JI et al., 2005; FAN et al., 2006).

Nesse contexto, o perfil fitoquímico da planta ou do seu produto derivado é fundamental para assegurar a qualidade e reprodutibilidade da eficácia terapêutica. Sendo assim, a impressão digital cromatográfica (*fingerprint*) é uma ferramenta analítica alternativa para identificação, autenticação e controle de qualidade de plantas medicinais (HARIPRASAD; RAMAKRISHNAN, 2012).

Para realização deste estudo, foram selecionadas algumas espécies vegetais reconhecidamente medicinais de uso tradicional no nordeste brasileiro, e que são citadas com frequência em programas públicos de saúde, tais como, Farmácias Vivas (MATOS, 2002; MATOS, 2007) e ou centros comunitários (TEIXEIRA; MELO, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007a; ALBUQUERQUE et al., 2007b; OLIVEIRA et al., 2010). Em diversas pesquisas etnobotânica realizadas em algumas comunidades na região nordeste do país, são citadas centenas de plantas por tais comunidades, bem como a forma de uso e a parte da planta que é utilizada, mostrando assim a importância das plantas medicinais no tratamento primário para a saúde (NETO et al., 2014; BAPTISTEL et al., 2014). Desta forma, tais espécies desempenham papel importante para as comunidades, muitas das quais na maioria das vezes não possuem outra forma de acesso para o tratamento de diversas doenças.

Foram selecionadas as seguintes espécies: *Anacardium occidentale* L.; *Annona muricata* L.; *Guazuma ulmifolia* Lam.; *Psidium guajava* L.; *Phyllanthus niruri* L.; *Punica granatum* L. e *Spondias mombin* Jacq., as quais foram submetidas à pesquisa de impressões digitais para detectar principalmente a presença de polifenóis do tipo taninos, flavonoides e derivados cinâmicos. Estas plantas são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas enfermidades e destacam-se em virtude da associação de sua composição química com diversas propriedades farmacológicas, entre as quais, antioxidante, anti-inflamatória, antiulcerogênica, antimicrobiana, antiviral, anti-hipertensiva, problemas circulatórios entre

outros (GALINA et al., 2005; MATOS, 2007; SILVA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007a; ALBUQUERQUE et al., 2007b)

Neste contexto, o emprego da CCD como ferramenta de identificação e de determinação qualitativa da composição química, tem recebido atenção especial para o controle de qualidade de drogas vegetais de interesse medicinal. Sendo assim o propósito principal do presente trabalho é o estabelecimento do perfil cromatográfico padrão para polifenóis das espécies vegetais selecionadas e cujo uso medicinal é amplamente difundido no nordeste brasileiro.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Desenvolver perfis químicos, que possam ser empregados como ferramenta de identificação e de avaliação da qualidade de drogas vegetais amplamente empregadas na medicina tradicional da região Nordeste do Brasil, e avaliar a citotoxicidade a atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar as espécies vegetais objetos do estudo;
- Caracterizar o material vegetal através de ensaios físico-químicos;
- Desenvolver e otimizar métodos extrativos que valorizem os compostos fenólicos de cada espécie;
- Avaliar, otimizar e/ou desenvolver sistemas cromatográficos por CCD capazes de separar satisfatoriamente os metabólitos de interesse das espécies em estudo.
- Avaliar a influência de fontes de variabilidade como local de coleta sobre a reprodutibilidade dos perfis químicos típicos obtidos por CCD para cada espécie.
- Traçar o perfil químico comparativo entre amostras da mesma espécie por CLAE-DAD.
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos.

REFERENCIAL TEÓRICO

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ESPÉCIES VEGETAIS INVESTIGADAS

3.1.1 *Anacardium occidentale* L.

Anacardium occidentale pertence à família Anacardiaceae, é uma das espécies usada na medicina tradicional como antidiarreico e anti-inflamatório, além de possuir alto valor alimentar e importância econômica (VIANA, LEAL, VASCONCELOS, 2013). *A. occidentale* é uma planta nativa do Brasil conhecida popularmente como cajueiro, e encontrada em todo território nacional. A espécie possui relevante papel econômico para região nordeste, principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí (CORRÊA, 1984).

Considerando sua composição química, estudos fitoquímicos das folhas reportaram a presença de flavonoide, galatos de metila e etila, os ácidos gálico e procatequico. (MATOS, 2007). Segundo Konan e Bacchi (2007), um estudo com extrato etanólico das folhas, analisado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectro de massa, indicou a presença de compostos fenólicos, tais como: quercetina, miricetina, catequina, epicatequina, amentoflavona, tetrâmero de proantocianidina e glicosídeos de quercetina não identificado. Além dos óleos essenciais obtidos das folhas que apresentaram (*E*)- β -ocimene, α -copaeno, δ -cadieno, (*E*)-cariofileno e D-germacreno (MAIA, ANDRADE, ZOGHBI, 2000; MONTANARI et al., 2012).

As folhas do cajueiro são utilizadas na medicina popular para tratar distúrbios do trato gastrointestinal (diarreia e gastrite) e hipertensão (AGRA et al., 2007; MATOS, 2007; SILVA et al., 2007, VIANA, LEAL, VASCONCELOS, 2013). Por esta razão, muitas das propriedades biológicas da espécie foram estudadas, algumas das quais foram comprovadas experimentalmente, tais como, anti-inflamatória (OLAJIDE et al., 2004; FALCÃO et al., 2005); antidiabética (OLIVEIRA; SALTO, 1987/1989; KAMTCHOUING et al., 1998; BARBOSA-FILHO et al., 2005) e inibidora da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA-FILHO et al., 2006).

No Brasil, *A. occidentale* está inserida na lista de espécies vegetais selecionadas para estudo pelo Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais e no Relatório Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS, 2009).

3.1.2 *Annona muricata* L.

Annona muricata é conhecida popularmente por graviola e pertence à família da Annonaceae. É nativa das áreas tropicais desde a América Central até a América do Sul, principalmente da Amazônia (CORRÊA, 1984; ITF, 2008). Além dos usos medicinais da espécie, o fruto, possui um grande valor como alimento, sendo amplamente consumido nas regiões norte e nordeste do Brasil, especialmente na produção de sucos, sorvetes e geleias (CORRÊA, 1984).

É uma planta utilizada com propriedades nutricionais pelo seu fruto de sabor exótico e na medicina popular para problemas renais, emagrecedor e hipoglicemiante (SOUSA et al. 2004; CARTAXO et al., 2010), e também como antibacteriano, antiviral e antifúngico. Estudos recentes mostraram que *A. muricata* possui uma potencial atividade anticancerígena (CONSOLACION et al., 2012).

A fitoquímica de extratos aquosos e etanólicos das folhas de *A. muricata* mostraram a presença de alcaloides, taninos, flavonoides, cumarinas, terpenos, saponinas, antraquinonas, lactonas, glicosídeos cardioativos, fenóis e fitoesteróis (GAVAMUKULYA et al., 2014).

3.1.3 *Guazuma ulmifolia* Lam.

Guazuma ulmifolia é uma planta lenhosa, atualmente enquadra-se na família Malvaceae, é conhecida popularmente como mutamba. É encontrada desde o México até o sul do Brasil. Suas folhas e raízes possuem atividade antidiarreica e cicatrizante, já as atividades gastrointestinais e respiratórias são atribuídas às cascas e caule (DUARTE, DRANKA, YANO, 2011). É também utilizada pela população para distúrbios renais, alopecia, tosse e febre (GALINA et al., 2005; LOPES et al., 2009; PATIL, BIRADOR, 2013).

Estudos fitoquímicos da infusão das cascas indicaram a presença de taninos e flavonoides. (ANDRADE-CETTO, HEINRICH, 2005; GALINA et al., 2005). Lopes e colaboradores. (2009) isolaram e identificaram nove taninos condensados de frações solúveis em acetato de etila obtidas de um extrato acetona:água.

3.1.4 *Phyllanthus niruri* L.

Phyllanthus niruri é uma erva conhecida como quebra-pedra e pertencentes à família Euphorbiaceae. Esta espécie têm o uso popular associado ao tratamento de distúrbios renais, marcadamente no tratamento da litíase urinária através da promoção do relaxamento dos ureteres e a analgesia do sistema renal, facilitando a eliminação dos cálculos renais. Além disto, existem relatos de seu uso como anti-inflamatório de uma forma geral e leve atividade diurética (MATOS, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007a; ALBUQUERQUE et al., 2007b).

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de compostos como alcaloides, flavonoides, lignanas e triterpenos. Os triterpenos inibem a citotoxicidade induzida por oxalato de cálcio (MALINI, LENIN, VARALAKSHMI, 2000), bem como reduzem a formação de pedra que podem causar o cálculo renal (VIDYA, LENIN, VARALAKSHMI, 2002) e os marcadores de deposição de cristais nos rins (VIDYA, MALINI, VARALAKSHMI, 2000)

P. niruri é uma das 71 espécies que está contida na lista do Rensis (RENISUS, 2012).

3.1.5 *Psidium guajava* L.

Da família Myrtaceae, *Psidium guajava* L., conhecida popularmente como goiabeira, é uma planta utilizada tradicionalmente por seu valor alimentar e nutricional. É encontrada em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo América Latina, Europa, Ásia e África (GUTIERREZ et al., 2008; RISHIKA, SHARMA, 2011).

Todas as partes da planta possuem atributos medicinais usados por gerações, portanto, compõem muitas listas de estudos etnobotânicos, mostrando grande versatilidade e valor em uso, sendo indicada para o tratamento de diarreia, inflamações da garganta e da boca (MATOS, 2007; GUTIERREZ et al., 2008; DAKAPPA-SHRUTHI et al., 2013).

P. guajava está inserida na lista de espécies vegetais selecionadas do Rensis (RENISUS, 2012)

No nordeste do Brasil, as folhas da goiabeira são usadas tradicionalmente para tratar doenças do trato digestivo, inflamação, gengivite e inflamações na garganta (ALBUQUERQUE et al., 2007a). No leste da Ásia e em outros países, o extrato das folhas é utilizado pela população para tratamento da diabetes (GUTIERREZ et al., 2008).

É uma espécie bastante estudada quanto ao efeito antidiarrêico de suas folhas e cascas (SMITH, NIGEL, 1992; GONÇALVES, et al, 2005). Na avaliação de preparações

tradicionais da planta com cascas e folhas, foram encontrados taninos, flavonoides, saponinas e alcaloides e as atividades biológicas antiespasmódica e antidiarreica estão concentradas na fração polifenólica (TONA et al., 2000).

3.1.6 *Punica granatum* L.

Punica granatum atualmente enquadra-se na família Lythraceae é conhecida popularmente como romã. É um arbusto nativo da região que abrange desde o Irã até o Himalaia, a noroeste da Índia. É encontrada na mitologia, na arte egípcia, no antigo testamento e no Talmude da Babilônia (LANGLEY, 2000, NEURATH et al., 2004; LORENZI & SOUZA, 2001; VIANA, LEAL, VASCONCELOS, 2013)

. Pode chegar até 28% de taninos nas cascas do seu fruto, e provavelmente sejam eles os responsáveis pela ação terapêutica de suas cascas, nos casos de estomatite, amigdalite, faringite, anemia, gastrite, indigestão, laringite e vaginite (MATOS, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007a; ALBUQUERQUE et al., 2007b).

Na lista do Renisus também está inserida *P. granatum* como uma das espécies de interesse no SUS (RENISUS, 2012)

3.1.7 *Spondias mombin* Jacq.

Spondias mombin pertence à família Anacardiaceae, é uma árvore frutífera e conhecida popularmente por cajazeira. Na medicina tradicional, o cozimento das folhas é utilizado como gargarejo para tratar inflamações da boca e garganta (MATOS, 2007). O chá das folhas também é utilizado no tratamento de alguns sintomas tais como pressão alta, tosse, gonorreia, cáries, vermes intestinais e transtornos gastrointestinais (BOUQUET; DEBRAY, 1974; AYOKA et al., 2008).

Pesquisa realizada com extrato metanólico das folhas da cajazeira relatou atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosae*, *Shigella dysenteriae*, enquanto extratos da casca do caule inibiram o crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Também há relato de atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (OLUGBUYIRO; MOODY; HAMANN, 2009). A atividade antiviral contra os vírus *Coxsaki B* e *Herpes Simplex I* têm sido atribuída à presença de quatro substâncias, sendo duas do grupo dos

elagitaninos, geraniina e galoilgeraniina (CORTHOUT et al., 1991; MATOS, 2002; NJOKU; AKUMEFALA, 2007).

A análise fitoquímica do extrato bruto metanólico das folhas de *S. mombin* revelou a presença de taninos hidrolisáveis e saponinas (ACCIOLY et al., 2012). Suas folhas apresentaram em estudos fitoquímicos a presença de taninos, saponinas, resinas, esteróis e triterpenos, flavonoides e alcaloides (ABO et al., 1999; CARABALLO; CARABALLO; RODRÍGUEZ-ACOSTA, 2004; ASUQUO et al., 2013).

3.2 POLIFENOIS

Antes de receberem a denominação de polifenóis, esse grupo derivado de plantas medicinais era chamado por “tanino vegetal”, porque os extratos de plantas ricos nesse grupo era utilizado na curtição de couro de animais.

Os compostos fenólicos ou polifenóis pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal (SIMÕES et al., 2010). São metabólitos secundários de plantas com importância quando se trata da qualidade nutricional e funcional (LAPORNIK; PROSEK; GOLC, 2005). Estes são conhecidos por ser o grupo de compostos mais abundante na natureza, apresentando considerável importância fisiológica e morfológica para as plantas, além de apresentarem diversas funções biológicas (PINELO et al., 2005).

Eles podem ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal, e são constituídos por fenóis simples, ácidos fenólicos (ácido benzoico e derivados cinâmicos), antraquinonas, cumarinas, flavonoides, lignanas e ligninas, e taninos hidrolisáveis e condensados (SIMÕES et al., 2010).

Os derivados cinâmicos são classificados como fenóis simples. No reino vegetal, são distribuídos amplamente ao menos quatro desses derivados, são eles: ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico. Praticamente todos os vegetais possuem ao menos um desses ácidos (SIMÕES et al., 2010). O derivado cinâmico cafeato de metila, possui atividade antitumoral e antimicrobiana, e outros compostos desse mesmo grupo estão envolvidos no controle de alguns processos inflamatórios (SHARMA, 2011).

As antraquinonas são compostos orgânicos derivados do antraceno, formado a partir da oxidação dos fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos

que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas. A principal atividade biológica atribuída às quinonas é a atividade laxante (SIMÕES et al., 2010).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural e amplamente distribuído no reino vegetal. Uma grande variedade de propriedades farmacológicas é encontrada nesse grupo, tais como: antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, permeabilidade capilar e também atividade hormonal (SIMÕES et al., 2010).

Os taninos correspondem a um grupo de metabólitos secundários amplamente distribuído no reino vegetal, ao qual é atribuído um número significativo de atividades farmacológicas tais como adstringente e antioxidante (HASLAM et al., 1989). São substâncias complexas de natureza polifenólica, com peso molecular variando de 500 a 3000 Dalton (MELLO; SANTOS, 2017).

3.3 *FINGERPRINTS*, CCD e CLAE

O controle de qualidade de fitoterápico tem atualmente como aliado uma poderosa ferramenta, as impressões digitais cromatográficas (FAN et al., 2006).

As impressões digitais, *fingerprints*, fornecem perfis cromatográficos que servem de referência para drogas vegetais compostas por diversos constituintes químicos, e assim podem apresentar-se como um guia de referência para padronizações futuras (ALAJMI, ALAM, 2013). Elas são aceitas e recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WORLD, 2000), *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA), para realizar o controle de qualidade de matéria-prima vegetal, extratos e produtos acabados, enfatizando a utilização de um perfil cromatográfico de compostos farmacologicamente ou quimicamente ativos presentes. Este perfil pode ser fundamental para representar a integridade de tais produtos, representando as similaridades e diferenças encontradas nas espécies investigadas (FDA, 2004; EMEA, 2006; GIRI et al., 2010).

As impressões digitais podem ser empregadas através da utilização de diversos métodos, entre eles, os cromatográficos como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) e Cromatografia Gasosa (CG) além da técnica espectroscópica de Infravermelho (IV) (LIANG, XIE, CHAN, 2004; TISTAERT, DEJAEGHER, HEYDEN, 2011).

Um dos métodos cromatográficos mais eficientes e utilizados é a CLAE, pois consegue separar uma mistura de compostos, tornando-se muito utilizada para análises de produtos naturais, por se tratar de uma matriz complexa na qual essa técnica consegue separar, quantificar e identificar os principais compostos.

É uma técnica de fácil operação, totalmente automatizado, com alta resolução, seletividade e sensibilidade. (HARRIS, 2003; SNYDER, KIRKLAND, DOLAN, 2010). Tem como uma grande vantagem a possibilidade de acoplar diferentes detectores, como UV e arranjo de diodos (DAD), que são bastantes utilizados para impressões digitais de drogas vegetais (JI et al., 2005; FAN et al., 2006).

A CLAE tem se tornado o método de escolha quando se trata da obtenção de *fingerprints* de matérias-primas vegetais, em virtude de que a técnica também tem se destacado pela sensibilidade e eficiência de separação dos componentes (LIU et al., 2011).

No entanto, essa é uma técnica que requer um alto investimento financeiro e utiliza grandes volumes de solventes nocivos ao homem e meio ambiente. (JI et al., 2005; FAN et al., 2006).

Apesar de ser uma técnica simples e antiga, a CCD, ainda hoje é bastante utilizada em diversas partes do mundo e desempenha um importante papel na análise química de plantas medicinais (SHERMA, 2008). A CCD além de simples, é rápida e econômica quando tratamos de análises qualitativas. Mas, nos últimos anos, foram desenvolvidos novos tipos de adsorventes e com qualidade diferenciada, como tamanho de partículas desses adsorventes e a espessura de sua camada na placa cromatográfica (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

3.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS VEGETAIS

As plantas medicinais são compostas por diversos grupos químicos que formam uma matriz complexa, que lhes conferem algumas atividades biológicas, mas também podem possuir substâncias nocivas aos humanos e animais, onde essas substâncias podem ser produzidas por elas como defesa natural (BRAGA, RATES, SIMÕES, 2017)

A citotoxicidade de plantas medicinais pode ser considerada como um problema de saúde pública, pois efeitos adversos e interações com outras drogas ocorrem com frequência (VEIGA JUNIOR, PINTO, MACIEL, 2005)

Alguns compostos isolados de plantas medicinais possuem atividade citotóxica e apresentam relação com a incidência de tumores, como as saponinas e terpenos que possuem efeito tóxico renal (VOLPATO, 2005)

Perante essas informações, é de extrema importância que as drogas vegetais sejam submetidas à ensaios de citotoxicidade para garantir sua eficácia e segurança.

3. 5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS

O uso tradicional de plantas medicinais desperta o interesse de pesquisadores pela busca de informações das espécies vegetais mais utilizadas que tem como embasamento o uso empírico para buscar a comprovação da sua eficácia como profilática e curativa de diversas infecções (MICHELIN et al., 2005).

Elas se destacam como alternativa e ganharam popularidade devido aos baixos efeitos colaterais quando comparados aos medicamentos antibióticos e que são resistentes algumas cepas (ANAND et al., 2015)

As plantas são cada vez mais estudadas por serem possíveis fontes de substâncias com atividade antimicrobianas (MENDES et. al., 2011). Dentre elas, destacam-se os polifenóis que tiveram sua atividade antibacteriana estudada por Rhodes e colaboradores (2006).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As amostras dos materiais vegetais foram coletadas em diferentes municípios da Região Nordeste (Quadro 1). Após coleta, os materiais foram submetidos à secagem em estufa de ar circulante sob temperatura de 40 °C (Modelo Luca 82/480, Lucadema®) durante 3 dias. Em seguida, as amostras foram trituradas em moinho de facas tipo Willye (Modelo 340 série 100/08, Adamo®) com malha de 10 mesh.

A parte utilizada da amostra de *Punica granatum* foram as cascas dos frutos, e de todas as outras foram utilizadas as folhas.

As amostras foram encaminhadas para o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) para identificação botânica.

4.1.1 Caracterização físico-química do material vegetal

As amostras foram caracterizadas empregando métodos gerais em Farmacognosia de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010), conforme descrito nos itens a seguir.

Determinação de material estranho

Cerca de 25 g da amostra foram colocadas sobre uma folha de papel numa superfície plana e espalhadas cuidadosamente em uma fina camada e separadas por quarteamento. De forma manual, os materiais estranhos foram separados, inicialmente a olho nu, e posteriormente, com o auxílio de uma lente de aumento. O material separado foi pesado e anotado o valor para determinação da percentagem em relação à massa inicial da droga vegetal pesada para o ensaio.

Quadro 1 - Coleta das amostras e suas respectivas localizações.

Espécie	Local da coleta								
	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3		
	Local	Data	Tomb.	Local	Data	Tomb.	Local	Data	Tomb.
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Fortaleza-CE	06/14	90152	Recife- PE	07/14	89991	Limoeiro-PE	09/14	89990
<i>Annona muricata</i> L.	Fortaleza-CE	06/14	90153	Caruaru-PE	08/14	89992	Bezerros-PE	09/14	90450
<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam	Pau D'algo-PE	03/15	90096	Lagoa do Itaenga-PE	04/16	91097	Fortaleza-CE	06/16	91418
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Fortaleza-CE	06/14	90149	Recife-PE	03/15	89760	Paulista-PE	05/16	91098
<i>Psidium guajava</i> L.	Fortaleza-CE	05/14	90151	Caruaru-PE	08/14	89761	Bezerros-PE	09/14	90449
<i>Punica granatum</i> L.	Fortaleza-CE	01/15	90148	Recife-PE	04/15	90095	Paulista-PE	05/15	90170
<i>Spondias mombin</i> Jacq.	Caruaru-PE	08/14	89762	Limoeiro-PE	09/14	*	Paulista-PE	05/14	90169

*Não foi possível identificação.

Fonte: Dados do próprio autor.

Perda por dessecação

A determinação de água nas amostras foi realizada pelo método gravimétrico em estufa, onde cerca de 2 g da amostra foi colocada em pesa-filtro tarado que foi preparado previamente dessecado nas mesmas condições da análise durante 30 minutos. A amostra foi dessecada a 100 – 105 °C em estufa (Modelo CO 18, Precision Scientific Thelco®) por 5 horas até peso constante. A quantidade de água na amostra foi calculada em relação à droga seca.

Determinação de cinzas (totais e insolúveis em ácido)

Cerca de 3 g da amostra pulverizada, foram transferidas para cadinho previamente tarado. A amostra foi incinerada aumentando, gradativamente, à temperatura até, no máximo, 600 °C. Um gradiente de temperatura (30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C) foi utilizado. Em seguida, a amostra foi resfriada em dessecador e pesada, sendo colocada novamente no forno mufla a 600 °C por mais uma hora, e o procedimento foi repetido até peso constante.

Para as amostras que apresentaram um percentual acima de 7% de cinzas totais, foi dado prosseguimento ao ensaio com a determinação de cinzas insolúveis em ácido. O resíduo obtido nas cinzas totais foi submetido à fervura por 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. O vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido sob papel filtro isento de cinza e lavado com água quente até que o filtrado apresentasse pH neutro. O papel filtro foi transferido para o cadinho de origem, seco em chapa aquecedora e incinerado à 500 °C até peso constante. O cálculo percentual de cinzas insolúveis em ácido foi realizado em relação à droga seca ao ar.

Teor de extrativos

Cerca de 2 g da droga vegetal foram colocadas em balão volumétrico de fundo redondo e adicionados 100 mL de água e deixado sob refluxo em banho-maria (LUCA-150/24/D, Lucadema®) à 85 °C por 1 hora. Após, a amostra foi resfriada, filtrada e 25 mL do filtrado foram colocados em pesa-filtro previamente tarado. A amostra foi seca em banho-maria e levada para estufa a 100 – 105 °C por 6 horas. A amostra foi retirada, resfriada em dessecador e o peso do teor de extrativo calculado em mg/g de material vegetal seco.

Análise granulométrica

Cerca de 25 g de amostra foram pesadas e colocadas sobre um conjunto de tamises previamente tarados e distribuídos na seguinte sequência de tamanho da abertura da malha dispostos de cima para baixo, 850, 600, 425, 250, 150 e 75 μm e base coletora. O tamises foram submetidos à vibração no granulômetro (Bertel[®]) por 15 minutos. Após esse tempo, foi retirado e pesado cuidadosamente cada tãmis contendo a amostra retida. O cálculo foi realizado através do gráfico de retenção e passagem da amostra no ponto de intersecção dos mesmos.

Análise dos dados

Todas as análises descritas foram realizadas em triplicata e os dados apresentados utilizando média e desvio padrão.

4.2 DESENVOLVIMENTO DOS PERFIS QUÍMICOS DAS AMOSTRAS VEGETAIS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

4.2.1 Otimização das condições cromatográficas utilizadas para a CCD

Preparação das soluções extrativas

Cerca de 1,0 g do material vegetal seco e triturado foi submetido à extração por refluxo em banho-maria, durante 15 minutos com 10 mL de metanol sob temperatura de 70 °C. Após filtração em papel filtro, cerca de 25 μL foram usados para análise cromatográfica.

Sistemas cromatográficos

Os principais sistemas utilizados como fase móvel estão os descritos no quadro 2.

Quadro 2 - Sistema de eluentes utilizados.

Grupos químicos de interesse	Sistema eluente	Concentração (v/v)
Derivados cinâmicos	Tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico	75:25:25:6
Flavonoides	Tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico	75:25:25:6
Taninos	Tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico	75:25:25:6
		75:25:10:6
		75:25:20:6
	Acetato de etila: ácido fórmico: água	90:5:5
	Acetato de etila: tolueno: ácido fórmico: água	80:10:5:5

Fonte: Dados do próprio autor.

As substâncias padrões utilizadas como referência para cada grupo químico estão descritas no quadro 3.

Quadro 3 - Substâncias padrões de referência.

Grupos químicos de interesse	Substâncias padrões
Derivados cinâmicos	Ácido cafeico
Flavonoides	Quercetina
Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico
Taninos condensados	Catequina

Fonte: Dados do próprio autor.

Os sistemas foram submetidos à ajustes de polaridade até definir aquele que apresentasse uma melhor separação e resolução das bandas.

As amostras foram aplicadas de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas (Camag®, 20 x 10) após saturação com a fase móvel, específica para cada metabólito. A cuba foi saturada durante 30 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente.

O volume de aplicação das amostras foi de 25 µL e 15 µL para as substâncias padrões. Cada eluição durou aproximadamente 30 minutos. As bandas foram aplicadas com largura de 10 mm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 5 mm. A largura da placa cromatográfica variou de acordo com a quantidade de amostras aplicadas, o comprimento foi de 10 cm; e, as amostras foram aplicadas a 10 mm da origem e com término de 5 mm do final da placa.

Após a eluição das placas, as mesmas foram secas à temperatura ambiente em capela, e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível. Em seguida foram digitalizadas com auxílio de fotodocumentador (UVP® Doc-It® LS Image Analysis Software) com câmera (Canon® Rebel T3 EOS 1100) acoplada. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Quadro 4). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

Quadro 4 - Reagentes reveladores utilizados para cada metabólito.

Metabólito de interesse	Reagente
Derivados cinâmicos	Reagente natural (NEU) + PEG 5% etanólico
Flavonoides	Reagente natural (NEU) + PEG 5% etanólico
Taninos	Cloreto férrico 1% em etanol

Fonte: Wagner (1996).

4.2.2 Condições cromatográficas utilizadas para análise por CLAE

Foram pesados, em balança analítica (Modelo AUY, Shimadzu®) cerca de 500 mg de cada amostra vegetal. Em seguida, foram transferidas para balão de fundo redondo de 250 mL e adicionados 100 mL de uma solução etanólica 50% (v/v). A amostra foi submetida à refluxo em banho-maria em uma temperatura de 85 °C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas e filtradas em papel de filtro. Uma alíquota de 10 mL foi retirada e diluída em balão volumétrico de 25 mL e o volume aferido com água ultra pura obtida pelo sistema Purelab Classic UV (Elga®). Por fim, a solução foi filtrada em membrana de PVDF 25 mm com tamanho de poro de 0,45 µm (Chromafil®) e submetido à análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência nas condições descritas abaixo.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD), degaseificador e sistema de injetor automático (Ultimate 3000, ThermoScientific®). O sistema foi controlado pelo software Chromeleon® versão 6.8, que

também gerencia o sistema de aquisição e tratamento dos dados referentes as amostras. Foi utilizada uma coluna analítica de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno (Dionex[®], C₁₈; 5 µm), protegida por pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada (Phenomenex[®], C₁₈, 3,9 µm). As análises foram realizadas em temperatura ambiente (23 °C ± 2°C), controlada por ar condicionado. A fase móvel utilizada foi constituída por água (A) e metanol grau HPLC (Tedia[®]) (B), acidificadas com 0,05% de ácido trifluoracético (Vetec[®]), fluxo da fase móvel de 0,8 mL/minuto em modo gradiente, previamente degaseificadas em banho de ultrassom (Ultracleaner[®] 1600A, Unique), nas seguintes condições: de 10-25% (B) em 10 minutos, 25-40% (B) em 5 minutos, 40-75% (B) em 20 minutos, 75-15% (B) em 1 minuto.

Foram injetados 20 µL das soluções amostras e as análises realizadas em triplicata. A leitura do detector de diodo foi realizada na faixa de 190 a 400 nm e a aquisição cromatográfica observada em 270 nm.

4.3 DOSEAMENTO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis)

4.3.1 Flavonoides totais

Solução Estoque

A extração foi realizada sob refluxo em banho-maria (LUCA-150/24/D, Lucadema[®]) num balão de fundo redondo contendo 0,5 g do material vegetal e 30 mL de solução hidroalcoólica (50%, v/v), durante 30 minutos. O extrato foi resfriado à temperatura ambiente e filtrado em algodão; o resíduo (algodão e material vegetal) foi submetido à extração por mais duas vezes, durante 15 minutos. As frações filtradas foram reunidas em balão volumétrico e o volume ajustado para 100,0 mL, com a solução hidroalcoólica 50%, constituindo a Solução Estoque. Essa metodologia foi adaptada aos métodos desenvolvidos e validados anteriormente por Petry e colaboradores (1998) e Marques e colaboradores (2012).

Determinação da alíquota

Alíquotas da solução estoque (que variaram de 1 a 5 mL de acordo com a espécie) foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL, onde se adicionou 2,0 mL de solução

etanólica de cloreto de alumínio 5% (m/v), ajustando-se o volume, em seguida, com a solução hidroalcoólica 50%. Após adição da solução de cloreto de alumínio, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro, utilizando como branco uma solução de compensação (amostra sem a presença da solução de cloreto de alumínio). As amostras foram submetidas à varredura em espectrofotômetro (Evolution 60S, Thermo Scientific®) na faixa de comprimento de onda de 200 a 900 nm, após 5 minutos da adição de solução reagente de cloreto de alumínio.

Cálculo para determinação do teor de flavonoides totais (TFT)

O teor de flavonoides totais, expresso em gramas de rutina por 0,5 g de droga seca, foi calculado pela equação:

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

Onde: TFT = teor de flavonoides totais; A = absorvância lida; FD = fator de diluição; m = massa de droga seca (g); $E_{1cm}^{1\%}$ = absorção específica do complexo rutina =cloreto de alumínio.

4.3.2 Taninos totais

Solução Estoque

Foi pesado cerca de 0,50 g de droga vegetal moída e adicionados 150 mL de água destilada em um balão de fundo redondo. A preparação foi mantida sob refluxo durante 30 minutos, em banho-maria (LUCA-150/24/D, Lucadema®) a temperatura de 80-90 °C, em seguida, resfriada até a temperatura ambiente. O conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 250 mL e o volume completado com água destilada. A solução foi deixada em repouso para decantar, em seguida filtrou-se em papel de filtro, desprezando os primeiros 50 mL e o restante do filtrado constituiu a Solução Estoque (SE - 0,002 g/mL). Baseando-se no método farmacopeico para *Mayten ilicifolia* Mart. Ex Reissek (BRASIL, 2010).

Solução amostra para polifenóis totais

Foram diluídos 5 mL da SE para balão volumétrico de 25 mL com água destilada. Em seguida, foram transferidos volumetricamente alíquotas de 1 a 4 mL desta solução (que variou

de acordo com a espécie em estudo), 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada para balão volumétrico de 25 mL e o volume aferido com solução de carbonato de sódio anidro a 29% (p/v). A absorvância foi mensurada em 785 nm (A_1) no espectrofotômetro UV-Vis (Evolution 60S, Thermo Scientific®) após 30 minutos, utilizando água destilada para ajuste do zero.

Solução amostra para polifenóis não adsorvidos por povidona (PVP)

Para 10 mL do filtrado, foi adicionado 0,1 g de PVP em erlenmeyer de 125 mL e agitados mecanicamente no agitador magnético múltiplo (RO-15 POWER, IKA-WERKE®) durante 60 minutos. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro. Foram diluídos 5 mL desse filtrado em balão volumétrico de 25 mL com água destilada e transferidos volumetricamente 2 mL desta solução, 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 10 mL de água destilada para balão volumétrico de 25 mL e o volume aferido com solução de carbonato de sódio anidro a 29% (p/v). A absorvância foi mensurada em 785 nm (A_2) após 30 minutos, utilizando água destilada para ajuste do zero.

Solução padrão

Foram dissolvidos 50 mg de pirogalol em balão volumétrico de 100 mL com água destilada. Em seguida, transferidos volumetricamente 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água destilada. Após, 2 mL dessa solução, 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 10 mL de água destilada foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume aferido com solução de carbonato de sódio anidro a 29% (p/v). A absorvância foi mensurada em 785 nm (A_3) após 30 minutos, utilizando água destilada para ajuste do zero.

O teor de TT foi calculado em porcentagem de taninos (droga seca), expressos em g% de pirogalol, segundo a expressão:

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

Onde: FD = fator de diluição da amostra; A_1 = absorvância da Solução amostra para polifenóis totais; A_2 = absorvância da Solução amostra para polifenóis não adsorvidos em PVP; A_3 = absorvância da Solução padrão;

m_1 = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água; m_2 = massa de pirogalol (98%), em gramas.

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

4.4.1 Extração por refluxo

As amostras vegetais secas e trituradas foram submetidas ao processo de decocção sob refluxo em banho-maria, durante 30 minutos, com temperatura igual a 70 °C. Os extratos foram preparados na proporção de 10 % (m/v) empregando como solventes água e a mistura de acetona e água nas proporções de 1:1 e 7:3 (v/v), respectivamente, conforme descrito no quadro 5.

Quadro 5 - Extratos obtidos por refluxo e turbólise.

Extrato	Solvente
Aquoso	Água
1:1	Acetona:água
7:3	Acetona:água

Fonte: Dados do próprio autor.

Ao final da extração, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e em seguida, filtrada à vácuo, concentrada para eliminação do solvente orgânico em evaporador rotatório (RV10 Basic, IKA®) sob pressão reduzida (40 – 50 °C). Ao final os extratos foram congelados em freezer -80 °C, após 3 dias foram liofilizados em Liofilizador de Bancada (Modelo L101, Liotop®), obtendo-se assim o extrato bruto por refluxo (EBR). Após a liofilização, os extratos após foram triturados e armazenados em frascos hermeticamente fechados e tiveram seus rendimentos calculados.

4.4.2 Extração por turbólise

As amostras vegetais secas e trituradas foram adicionadas a liquidificador industrial (Metvisa®) e agitadas com o solvente por 30 segundos com um intervalo de 4 minutos entre as agitações. Cada ciclo teve duração de 4 minutos e 30 segundos, e um total de 18 min para o processo completo. Semelhante ao processo de refluxo, os extratos foram preparados na

proporção de 10 % (m/v) empregando como solventes água e a mistura de acetona e água nas proporções de 1:1 e 7:3. Após os ciclos extrativos, a solução foi filtrada sob pressão reduzida e concentrada para eliminação do solvente orgânico em evaporador rotatório (RV10 Basic, IKA®) sob pressão reduzida (40 – 50 °C). Ao final os extratos foram congelados em freezer - 80 °C, após 3 dias foram liofilizados em Liofilizador de Bancada (Modelo L101, Liotop®), obtendo-se assim o extrato bruto (EBT). Após a liofilização, os extratos foram triturados e armazenados em frascos hermeticamente fechados e tiveram seus rendimentos calculados.

4.5 DESENVOLVIMENTO DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS POR CCD E CLAE-DAD

Preparação das amostras

Dos extratos brutos obtidos por refluxo e turbólise foram pesados cerca de 0,3 g e adicionado 1 mL de metanol e agitados mecanicamente em vórtex (LabDancer, IKA®).

4.5.1 Condições cromatográficas utilizadas para a CCD

Sistemas cromatográficos

As amostras foram aplicadas com o auxílio do sistema semiautomático Linomat 5 da CAMAG®, e o software WinCats® em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas (Camag®, 20 x 10 cm) após saturação com a fase móvel, específica para cada metabólito (descritas no Quadro 2). A cuba foi saturada durante 30 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente.

O volume de aplicação das amostras foi de 15 µL e 7 µL para as substâncias padrões. Cada eluição demorou aproximadamente 30 minutos. As bandas foram aplicadas com largura de 10 mm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 5 mm. O tamanho da largura da placa cromatográfica variou de acordo com a quantidade de amostras aplicadas, mas o tamanho do comprimento foi de 10 cm, na qual a amostra foi aplicada com a 10 mm da origem e com termino 5 mm do final da placa.

Após a eluição das placas as mesmas foram secas à temperatura ambiente em capela, e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível em seguida foram digitalizadas utilizando um fotodocumentador (UVP® Doc-It® LS Image Analysis Software) com câmara

(Canon® Rebel T3 EOS 1100) acoplada. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito que está apresentado em resultados, no quadro 4. As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

4.5.2 Condições cromatográficas utilizadas para a CLAE-DAD

Foram pesados, em balança analítica (Modelo AUY, Shimadzu®) cerca de 25 mg de cada EBR e EBT. Em seguida, foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL e completado com água ultra pura obtida pelo sistema Purelab Classic UV (Elga®). As soluções foram submetidas a agitação em banho de ultrassom (Ultracleaner 1600A, Unique) por 30 minutos até completa dissolução. Após as soluções foram filtradas em membrana de PVDF 25 mm com tamanho de poro de 0,45 µm Chromafil® e submetido à análise no cromatógrafo líquido de alta eficiência nas condições descritas abaixo.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD), degaseificador e sistema de injetor automático (Ultimate 3000, ThermoScientific®). O sistema foi controlado pelo programa Chromeleon® 6.8, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento dos dados referentes as amostras. Foi utilizada uma coluna analítica de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno (Dionex®, C₁₈; 5 µm), protegida por pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada (Phenomenex®, C₁₈, 3,9 µm). A análise foi realizada em temperatura ambiente (23°C ± 2°C), controlada por ar condicionado. A fase móvel utilizada foi constituída por água (A) e metanol (B), acidificadas com 0,05% de ácido trifluoracético, fluxo da fase móvel de 0,8 mL/minuto em modo gradiente, previamente degaseificadas em banho de ultrassom (Ultracleaner1600A, Unique®), nas seguintes condições: de 10-25% (B) em 10 minutos, 25-40% (B) em 5 minutos, 40-75% (B) em 20 minutos, 75-15% (B) em 1 minuto.

Foram injetados 20 µL das soluções amostras e as análises realizadas em triplicata. A leitura do detector de diodo foi realizada na faixa de 190 a 400 nm e a aquisição cromatográfica observada em 270 nm.

4.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS POR TURBÓLISE (EBT) - MÉTODO DO MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina))

Os extratos brutos obtidos por turbólise foram avaliados quanto à atividade citotóxica, no Laboratório de Cultura de Células situado no Departamento de Antibióticos da UFPE, sob coordenação da Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva. As análises foram realizadas através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983; ALLEY et al., 1988).

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram HEp-2 (carcinoma de laringe humana) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano) mantidas em meio de cultura DMEM; MCF-7 (câncer de mama humano) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) mantidas em meio de cultura RPMI 1640. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As células MCF-7, HEp-2, NCI-H292 (10⁵ células/mL) e HL-60 (3 x 10⁵ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida, as amostras de EBT 7:3 dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (1%, m/v) foram adicionadas aos poços em concentração final de 50 µg/mL. O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como padrão. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT dissolvido (5 mg/mL) em tampão salino fosfato (PBS) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism 7.0*.

4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS POR TURBÓLISE

Os extratos brutos obtidos por turbólise foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana, utilizando bactérias patogênicas e fungos. As bactérias testadas foram *Serratia marcescens* UFPEDA 352, *Staphylococcus saprophyticus* UFPEDA 833, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e *Escherichia coli* UFPEDA 224, obtidas da Coleção de Cultura (WDCM114) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os fungos testados foram *Candida albicans* (URM 5901), *Candida glabrata* (URM 4246), *Candida krusei* (URM 6391) e *Candida parapsilosis* (URM 6345) obtidos da Coleção de Micologia do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco.

Os ensaios foram realizados no Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências da UFPE, sob coordenação do Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, os micro-organismos foram cultivados em caldo Mueller Hinton (MHB) a 37 °C para bactérias ou caldo Sabouraud Dextrose (SDB) a 28 °C para fungos durante a noite sob agitação suave. Para os experimentos, as densidades de cultura dos micro-organismos foram ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm a 3×10^6 UFC/mL. Em cada linha de uma microplaca de 96 poços, 100 µL dos extratos brutos (2,0 mg/mL em 5% de DMSO) foram diluídos em série em meio de cultura para a proporção final de 1:1024. Em seguida, 20 µL da cultura de micro-organismos foram aderidos a cada poço. Os poços contendo apenas meio de cultura ou apenas os micro-organismos em meio de cultura foram utilizados como controle de esterilidade e 100% de crescimento de cultura, respectivamente, a densidade óptica (DO_{600}) foi medida no tempo zero a 600 nm e as amostras foram incubadas a 37 °C para bactérias ou 28 °C para fungos durante 24 h. Após este período, o DO_{600} foi novamente medida. O aumento da DO_{600} em relação ao tempo zero foi considerado como crescimento microbiano. A Concentração Inibidora Mínima (CIM) foi determinada na menor concentração de extratos brutos capazes de promover a redução de DO_{600} maior ou igual a 50% em comparação com o controle de crescimento de 100%. A tetraciclina (8 µg/mL) foi utilizada como controle positivo.

Cada ensaio foi realizado em triplicata e foram realizados três experimentos independentes. Para determinar a concentração bactericida (CBM) ou fungicida mínima (CFM), o sobrenadante (10 µL) de cada poço onde a inibição de crescimento foi maior ou igual a 50% foi transferido para o caldo ágar Mueller Hinton para bactérias ou ágar Sabouraud-Dextrose para fungos, e as placas foram incubadas durante 24 h. A CBM ou CFM corresponderam à menor concentração de extrato bruto capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

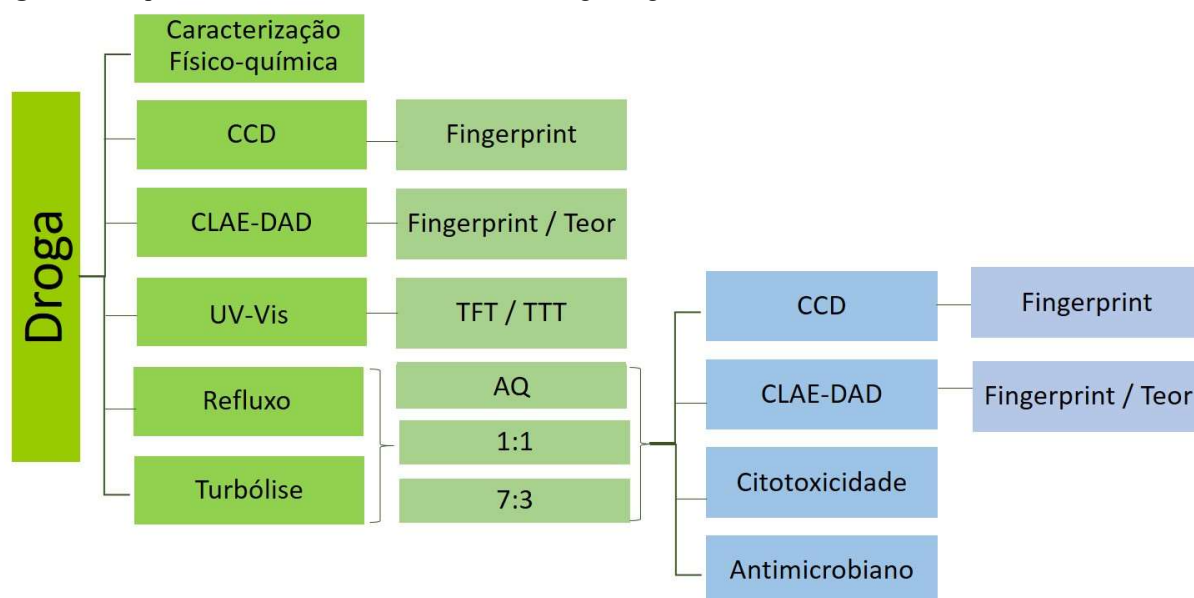
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATERIAL VEGETAL

Antes de iniciar algum tipo de trabalho com uma droga vegetal, seja como matéria-prima ou como ativo na preparação de algum produto, a sua qualidade deve ser assegurada, para que sua segurança e eficácia não sejam comprometidas. Para tanto, diversos ensaios para a análise de qualidade de drogas vegetais são preconizados pelas farmacopeias ou por outros códigos oficiais reconhecidos. Estes ensaios se dividem em três principais grupos: ensaios de identificação, ensaios de pureza e ensaios quantitativos (SOARES; FARIAS, 2017).

A abordagem adotada para avaliação das amostras das espécies vegetais empregadas neste estudo, incluiu a realização de ensaios de identificação, através do desenvolvimento do perfil cromatográfico; e, a realização dos ensaios de pureza, tal como pesquisa de matéria estranha, teor de água, determinação de cinzas e teor de extrativos, além da determinação da distribuição granulométrica, constituindo a caracterização físico-química. A partir da droga vegetal foram realizadas além da caracterização, outras análises conforme descritas adiante e que estão esquematizadas na figura 1.

Figura 1 - Esquema das análises realizadas com as drogas vegetais.



Fonte: Dados do próprio autor.

5.1.1 Caracterização físico-química

Determinação de material estranho

A análise de determinação de matéria estranha vegetal visa a busca de insetos, fungos ou outros contaminantes que devem estar ausentes das drogas vegetais. Para as espécies em estudo, a análise resultou nos valores descritos na tabela 1, e que segundo a Farmacopeia Brasileira estão de acordo, pois não ultrapassam o limite superior de 2% m/m.

Tabela 1 - Determinação de matéria estranha em drogas vegetais.

Espécies	Média% \pm DP		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
<i>A. occidentale</i> L.	0,0012% \pm 0,0003	0,0077% \pm 0,0006	0,0080% \pm 0,0005
<i>A. muricata</i> L.	0,0018% \pm 0,0003	0,0033% \pm 0,0008	0,0023% \pm 0,0003
<i>G. ulmifolia</i> Lam	0,0070% \pm 0,0005	0,0030% \pm 0,0005	0,0060% \pm 0,0005
<i>P. niruri</i> L.	0,0033% \pm 0,0003	0,0035% \pm 0,0005	0,0027% \pm 0,0008
<i>P. guajava</i> L.	0,0025% \pm 0,0005	0,0068% \pm 0,0008	0,0045% \pm 0,0005
<i>P. granatum</i> L.	0,0013% \pm 0,0003	0,0075% \pm 0,0009	0,0038% \pm 0,0008
<i>S. mombin</i> Jacq.	0,0060% \pm 0,0005	0,0017% \pm 0,0006	0,0028% \pm 0,0003

Fonte: Dados do próprio autor.

Perda por dessecação

A determinação de água em drogas vegetais foi realizada pelo método gravimétrico, e o resultado da análise encontra-se na tabela 2, o qual encontra-se de acordo com a Farmacopeia Brasileira, pois não ultrapassou o limite de 14%.

Tabela 2 - Determinação de água nas drogas vegetais.

Espécie	Média% (DPR)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
<i>A. occidentale</i> L.	8,52% (3,21)	10,31% (1,60)	9,44% (1,79)
<i>A. muricata</i> L.	7,86% (2,81)	11,50% (2,64)	10,42% (3,29)
<i>G. ulmifolia</i> Lam	11,43% (1,22)	9,70% (3,61)	9,14% (0,44)
<i>P. niruri</i> L.	7,14% (2,96)	12,27% (2,54)	11,22% (4,57)
<i>P. guajava</i> L.	10,57% (3,58)	11,59% (3,88)	10,51% (2,63)
<i>P. granatum</i> L.	13,87% (3,02)	13,38% (0,67)	13,83% (1,92)
<i>S. mombin</i> Jacq.	8,49% (2,78)	12,77% (2,15)	13,05% (2,65)

Fonte: Dados do próprio autor.

Determinação de cinzas (totais e insolúveis em ácido)

As quantidades de impurezas inorgânicas das amostras foram analisadas pelo teste de determinação de cinzas totais que se encontram na tabela 3. As amostras de *Phyllanthus niruri* por terem apresentado um valor de cinzas totais acima de 7% foram submetidas ao teste de determinação de cinzas insolúveis em ácido, e apresentaram o valor de 0,56 (1,39) para a amostra 1, 0,65 (3,22) para a amostra 2 e 0,63 (2,47) para a amostra 3.

Tabela 3 - Determinação de cinzas totais nas drogas vegetais.

Espécie	Média% (DPR)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
<i>A. occidentale</i> L.	3,69% (4,03)	2,79% (3,86)	4,79 % (3,03)
<i>A. muricata</i> L.	6,43% (2,19)	6,62% (2,06)	6,42% (3,98)
<i>G. ulmifolia</i> Lam	3,92% (1,59)	5,04% (3,97)	8,51% (2,88)
<i>P. niruri</i> L.	7,89% (2,34)	8,60% (2,65)	13,68% (3,12)
<i>P. guajava</i> L.	5,71% (2,98)	4,91% (1,61)	6,11% (2,72)
<i>P. granatum</i> L.	2,86% (3,95)	2,49% (3,77)	2,46% (1,41)
<i>S. mombin</i> Jacq.	3,71% (0,17)	4,61% (2,42)	5,88% (0,44)

Fonte: Dados do próprio autor.

Teor de extrativos

O teor de extrativos indica a presença de compostos hidrossolúveis no material vegetal, como aminoácidos, açúcares, heterosídeos flavonoídicos e mucilagens. Os valores obtidos estão descritos na tabela 4, que mostrou a pequena variação que ocorre na mesma espécie que foi coletada em regiões diferentes, com exceção do caju, onde a amostra 2 apresentou um valor maior que as amostras 1 e 3 coletadas em regiões diferentes.

Tabela 4 - Determinação do teor de extrativos nas drogas vegetais.

Espécie	Média% (DPR)		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
<i>A. occidentale</i> L.	3,50% (1,51)	5,71% (2,07)	3,68% (1,46)
<i>A. muricata</i> L.	6,15% (1,66)	6,75% (2,38)	6,34% (1,85)
<i>G. ulmifolia</i> Lam.	3,97% (1,08)	3,90% (4,35)	4,20% (4,55)
<i>P. niruri</i> L.	5,44% (1,44)	5,77% (4,81)	5,50% (0,46)
<i>P. guajava</i> L.	4,71% (3,20)	5,02% (0,72)	4,93% (1,39)
<i>P. granatum</i> L.	12,05% (1,94)	11,05% (0,31)	11,56% (0,61)
<i>S. mombin</i> Jacq.	7,39% (0,84)	7,11% (2,15)	7,45% (0,97)

Fonte: Dados do próprio autor.

Análise granulométrica

A análise de granulometria dos pós foi determinada pela intersecção das curvas de retenção e passagem obtidas na análise. Os resultados encontram-se na tabela 5, bem como a sua classificação segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição.

O processo extrativo ocorre através da difusão do solvente pela parede celular da droga vegetal, e vários fatores podem influenciar esse processo, e um deles é o tamanho das partículas da droga vegetal. Uma droga vegetal com tamanho de partículas classificadas como pó, favorecerá a extração por permitir um melhor contato com o líquido extrator, devido ao aumento da superfície de contato; mas, uma diminuição excessiva do tamanho dessa partícula pode dificultar a passagem desse líquido, e influenciou negativamente o processo extrativo. Esse pode ser um dos motivos nas diferenças obtidas do teor de extrativos contidos na tabela 4, a diferença dos tamanhos de partículas de uma amostra para outra, quando se trata da mesma espécie vegetal.

Tabela 5 - Determinação da granulometria dos pós nas drogas vegetais.

Espécie	Tamanho médio (µm)			Classificação do Pó
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	
<i>A. occidentale</i> L.	642,0	668,0	666,0	Moderadamente grosso
<i>A. muricata</i> L.	72,0	137,0	193,0	Pó semifino
<i>G. ulmifolia</i> Lam	177,0	371,0	563,0	Pó semifino à moderadamente grosso
<i>P. niruri</i> L.	425,0	602,0	468,5	Pó semifino
<i>P. guajava</i> L.	407,0	548,0	571,0	Moderadamente grosso
<i>P. granatum</i> L	453,0	420,0	444,0	Moderadamente grosso
<i>S. mombin</i> Jacq.	642,0	668,0	666,0	Moderadamente grosso

Fonte: Dados do próprio autor.

5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DE POLIFENÓIS NOS FARMACÓGENOS DAS ESPÉCIES VEGETAIS

5.2.1 Perfis cromatográficos por CCD

Sistemas cromatográficos

A otimização dos sistemas foi realizada conforme pesquisa na literatura, e dos testes realizados a que apresentou melhor condição de eluição para as amostras e padrões são as descritas abaixo no Quadro 6.

Quadro 6 - Sistema de eluentes utilizados.

Grupo químico de interesse	Sistema eluente	Reagente Revelador
Derivados cinâmicos Flavonoides Taninos condensados Taninos hidrolisáveis	Tolueno: acetato de etila: metanol: ácido fórmico (75:25:25:6)	Reagente natural (NEU) + PEG 5% etanólico Vanilina clorídrica Cloreto férrico 1% em etanol

Fonte: Dados do próprio autor.

Por se tratar de materiais de origem vegetal os cuidados em seu manuseio devem ser criteriosos, pois vários fatores influenciam na qualidade das espécies e consequentemente

seus efeitos terapêuticos. Além da abordagem botânica, a avaliação química, qualitativa ou quantitativa, desempenha um papel fundamental como informação complementar para a identificação de medicamentos à base de plantas (principalmente para materiais em pó), porém também está intimamente ligada à eficácia, segurança e qualidade farmacêutica desses produtos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; BRAZ et al., 2012; GOVINDARAGHAVAN, HENNEL, SUCHER, 2012).

Os perfis por CCD refletem a integridade fitoquímica de medicamentos e produtos à base de plantas e podem ser facilmente utilizados para fornecer um maior número de dados sobre a composição complexa dessas matrizes biológicas (PATRA et al., 2010; NICOLETTI, 2011; BRAZ et al., 2012). Assim, o desenvolvimento e avaliação por CCD com a reprodutibilidade desejada não é uma tarefa simples e necessita de um trabalho prolongado. Além disso, a variabilidade química dentro e entre os lotes de medicamentos é um desafio complexo e extensivo (JOSHI, 2012). Fazer a determinação do perfil químico das espécies medicinais brasileiras não é uma tarefa fácil, pois a maioria de seus compostos ativos não são conhecidos. Por outro lado, o desenvolvimento de perfil por CCD é o primeiro passo para padronização da qualidade química, e pode ser usado como parâmetro ou referência para identificar suas atividades biológicas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

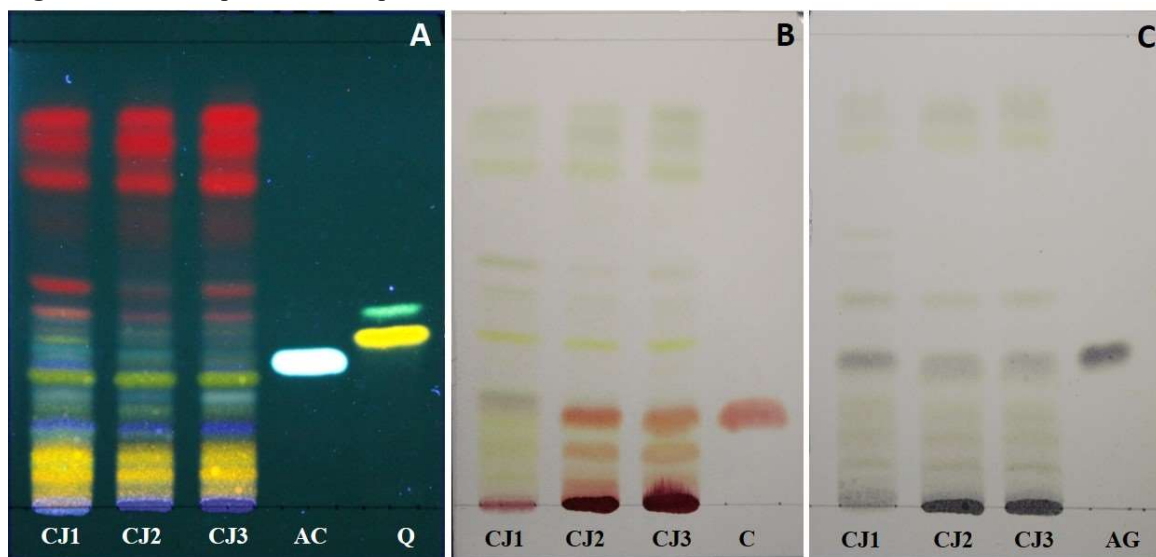
Nesse estudo, os sistemas cromatográficos obtidos por CCD foram aplicados na análise de diferentes amostras de várias espécies de plantas de reconhecida importância na terapêutica brasileira tradicional, a fim de identificar bandas ou conjuntos de bandas típicas que poderiam funcionar como passo inicial para maior compreensão de suas relações químicas e farmacológicas.

Anacardium occidentale

Considerando os dados obtidos pela cromatografia em camada delgada para as amostras das folhas de *A. occidentale* (cajueiro), as placas reveladas com NEU+PEG e observadas sob UV 365 nm apresentaram bandas indicativas de derivados cinâmicos e flavonoides devido as colorações das bandas observadas nas amostras serem semelhantes às colorações das bandas dos padrões utilizados (Figura 2A). As três amostras apresentaram perfis semelhantes, indicando a adequação das condições experimentais para esta análise. A literatura relata a presença de heterosídeos derivados da quercetina (quercetina 3-*O*-rutinosídeo e quercetina 3-*O*-ramnosídeo), além da respectiva aglicona observada neste estudo (AJILEYE et al., 2015). As bandas para o ácido cafeico ($R_f = 0,30$) e quercetina ($R_f = 0,42$)

foram observadas em todas as amostras e podem ser utilizadas como referências para o controle dessa espécie. A análise de taninos condensados permitiu a detecção de catequina ($R_f = 0,21$) apenas em duas amostras (Figura 2B: CJ2 e CJ3). O ácido gálico utilizado como substância de referência para taninos hidrolisáveis foi detectado ($R_f = 0,33$) em todas as amostras (Figura 2C).

Figura 2 - Cromatoplasmas obtidas para as amostras das folhas de *A. occidentale*.



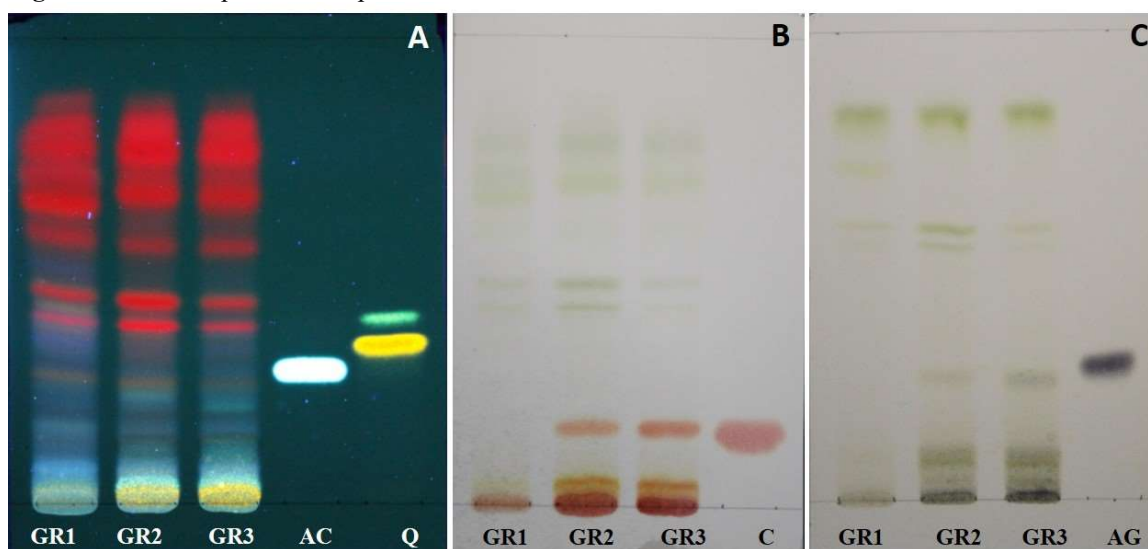
(A) Derivados Cinâmicos e Flavonoides; (B) Taninos condensados; (C) Taninos hidrolisáveis; Padrões: ácido cafeico (AC); quercetina (Q); catequina (C) e ácido gálico (AG).

Fonte: Dados do próprio autor.

Annona muricata

A análise por cromatografia em camada delgada das folhas de *A. muricata* mostrou ausência de ácido cafeico ou quercetina (Figura 3A: GR1-GR3), mas o cromatograma apresentou bandas claras de cor laranja que são indicativas da presença de flavonoides. A presença de catequina ($R_f = 0,16$) e ácido gálico foi observada apenas em duas amostras (Figura 3B: GR2 e GR3). As amostras dessas espécies foram autenticadas e, como são de localizações geográficas distintas pode ser esse o fator que diferenciou a amostra GR1 das demais. George e colaboradores realizaram uma triagem por cromatografia em camada delgada com extratos butanólicos, metanólicos e aquosos de *A. muricata* e identificaram a presença de flavonoides e taninos, corroborando os resultados encontrados neste estudo (GEORGE et al., 2012; GEORGE et al., 2014).

Figura 3 - Cromatoplaça obtida para as amostras das folhas de *A. muricata*.



(A) Derivados Cinâmicos e Flavonoides; (B) Taninos condensados; (C) Taninos hidrolisáveis; Padrões: ácido cafeico (AC); quercetina (Q); catequina (C) e ácido gálico (AG).

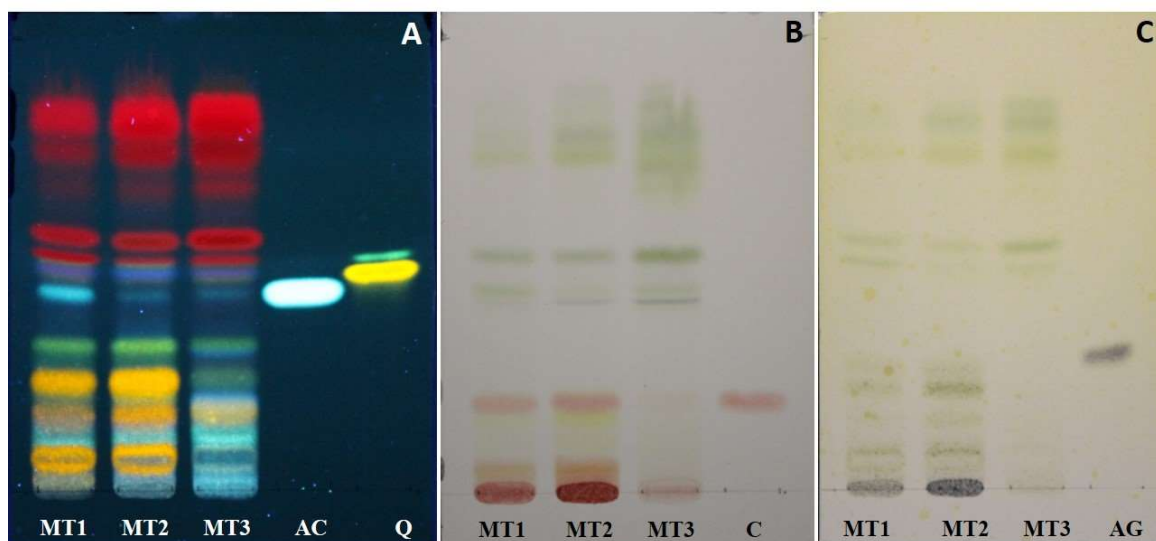
Fonte: Dados do próprio autor.

Guazuma ulmifolia

O perfil químico observado para as amostras de *G. ulmifolia* mostrou a presença de ácido cafeico ($R_f = 0,44$) e algumas bandas típicas para flavonoides (Figura 4A: MT1-MT3). A presença de catequina ($R_f = 0,20$) e algumas bandas derivadas de catequina foram observadas (Figura 4B: MT1-MT3). A presença de ácido gálico não pôde ser observada nas amostras (Figura 4C: MT1-MT3). A amostra MT3 apresentou intensidade diferente nas colorações de suas bandas, quando comparadas às outras duas amostras, isso pode estar relacionados com alguns fatores tais como por exemplo: sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, idade da planta, fatores endógenos entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; WOSCH et al., 2015, SOARES, FARIAS; 2017).

Apesar dos poucos estudos na literatura com a espécie *G. ulmifolia*, Subbalakshmi e Meerabai (2016), analisaram por cromatografia em camada delgada extratos etanólico, hexânico, acetato de etila e aquoso das folhas da espécie e verificaram a presença de flavonoides, taninos e outros polifenóis, corroborando com esse estudo.

Figura 4 - Cromatoplaça obtida para as amostras das folhas de *G. ulmifolia*.



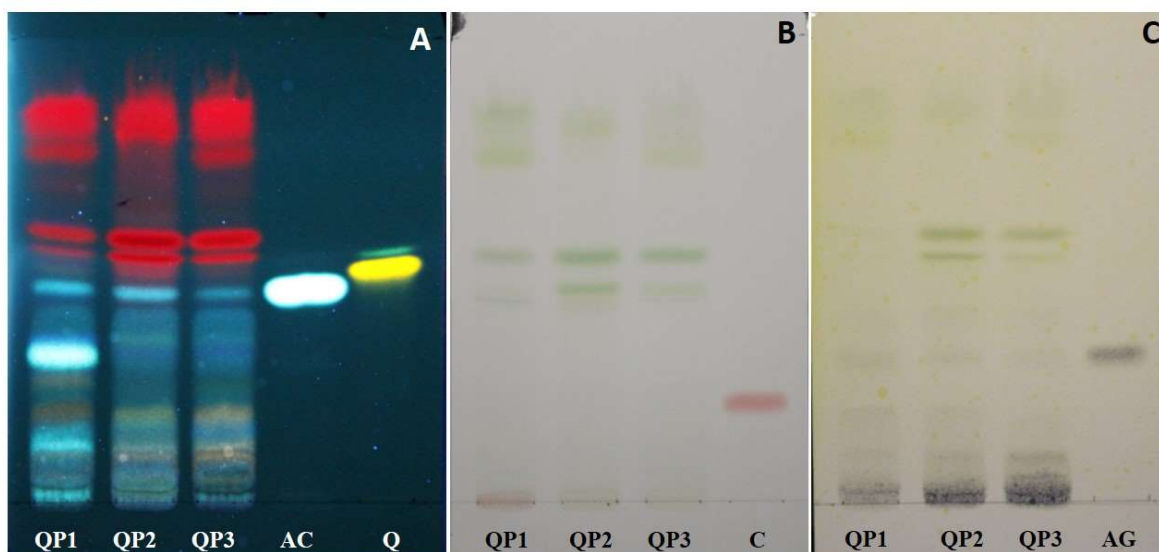
(A) Derivados Cinâmicos e Flavonoides; (B) Taninos condensados; (C) Taninos hidrolisáveis; Padrões: ácido cafeico (AC); quercetina (Q); catequina (C) e ácido gálico (AG).

Fonte: Dados do próprio autor.

Phyllanthus niruri

A presença de ácido cafeico e outros derivados cinâmicos (Figura 5A: QP1-QP2), bem como a detecção de ácido gálico (Figura 5B: QP1-QP2), desempenham um papel fundamental na caracterização química das partes aéreas de *P. niruri*. A ausência completa de taninos condensados (Figura 5C: QP1-QP2) corrobora com os resultados da prospecção fitoquímica realizada por Nascimento e colaboradores (2008). As três amostras apresentaram perfis bem semelhantes, embora a MT1 tenha mostrado um pouco mais de intensidade em suas bandas (Figura 5C). No entanto, nossos dados sugerem que a catequina e quercetina não podem ser usados como substâncias de referência para esta amostra.

Figura 5 - Cromatoplaça obtida para as amostras das folhas de *P. niruri*.



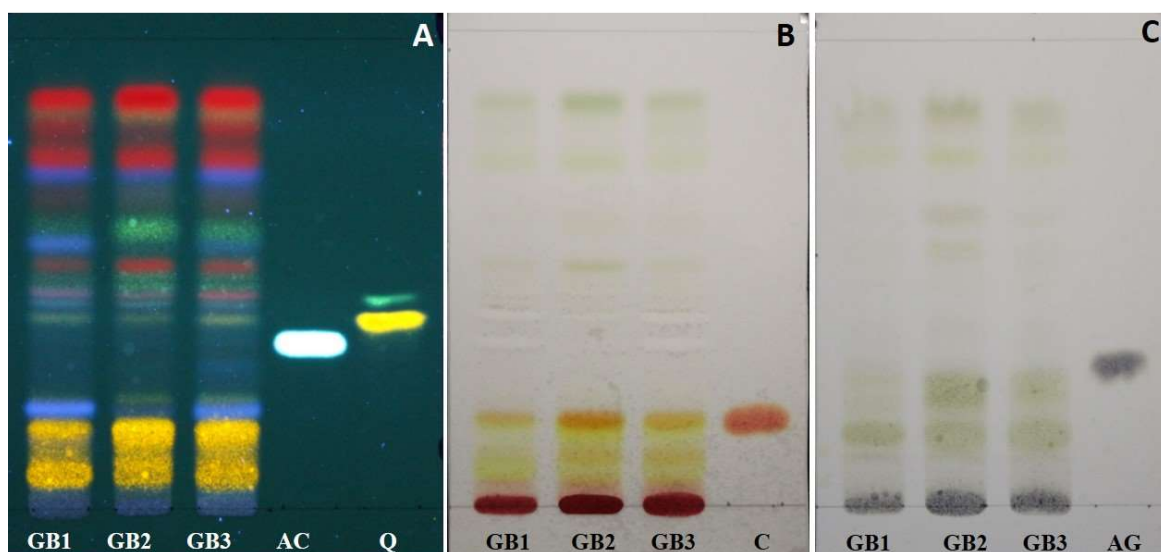
(A) Derivados Cinâmicos e Flavonoides; (B) Taninos condensados; (C) Taninos hidrolisáveis; Padrões: ácido cafeico (AC); quercetina (Q); catequina (C) e ácido gálico (AG).

Fonte: Dados do próprio autor.

Psidium guajava

Os perfis de cromatografia em camada delgada observados para as folhas de *P. guajava* mostraram várias bandas intensas para substâncias tipo flavonoides, incluindo a presença de quercetina (Figura 6A: GB1-GB3). Também foram observadas bandas suaves de ácido cafeico ($R_f = 0,34$) em todas as amostras. A presença de catequina ($R_f = 0,18$) foi confirmada nas três amostras com bandas bem intensas (Figura 6B: GB1-GB3), no entanto a literatura apresenta estudos que relatam a presença de ácido gálico nas folhas de *P. guajava* (Figura 6C: GB1-GB3) (CHANG et al., 2013; MORAIS-BRAGA et al., 2017). Nesse trabalho as amostras não apresentaram bandas características ao padrão ácido gálico, o que pode talvez ser justificados pelos fatores climáticos entre outros citados por Gobbo-Neto e Lopes (2007).

Figura 6 - Cromatoplaça obtida para as amostras das folhas de *P. guajava*.



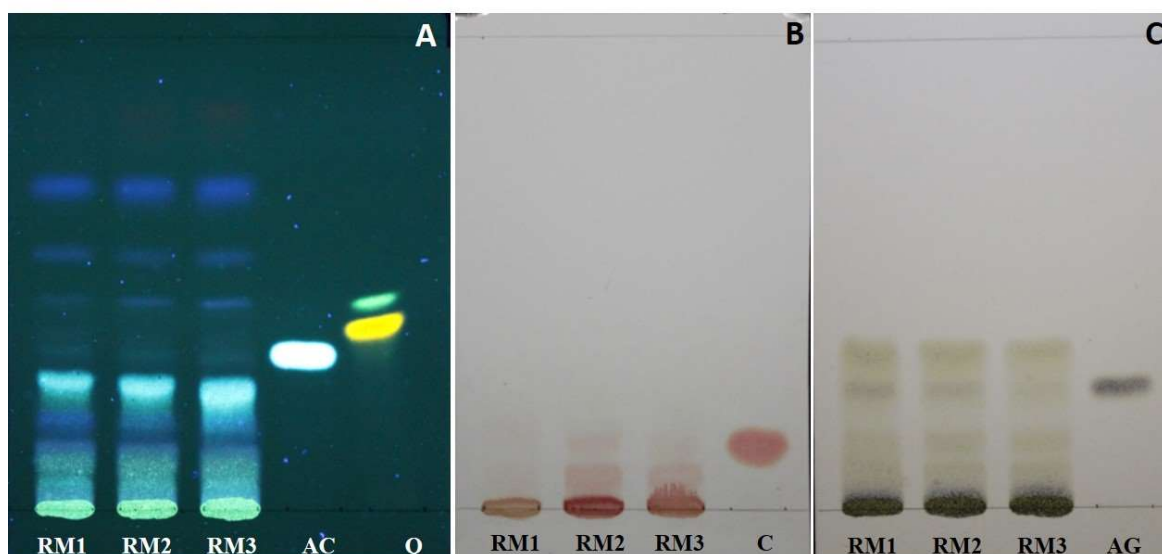
(A) Derivados Cinâmicos e Flavonoides; (B) Taninos condensados; (C) Taninos hidrolisáveis; Padrões: ácido cafeico (AC); quercetina (Q); catequina (C) e ácido gálico (AG).

Fonte: Dados do próprio autor.

Punica granatum

As análises das cascas dos frutos de *P. granatum* apresentaram semelhanças nos perfis de cromatografia em camada delgada para os derivados cinâmicos e flavonoide (Figura 7A: RM1-RM3) com bandas intensas para os derivados cinâmicos, mas não apresentaram bandas características para flavonoides. Alper e colaboradores (2011) relataram a presença de compostos fenolicos do tipo ácido cafeico e ácido clorogênico no suco do fruto de *P. granatum* que corroboram com os resultados encontrados nesse estudo. Os derivados cinâmicos são compostos que apresentam atividades biológicas importantes tais como antioxidante, antifúngica, antimicrobiana e antiinflamatória, entre outras (SHARMA, 2011). As amostras apresentaram bandas características para o padrão ácido cafeico ($R_f = 0,33$) pois apresentaram o mesmo valor de R_f e mesma coloração das bandas. A cromatografia em camada delgada para taninos indicou a presença de catequina ($R_f = 0,15$) (Figura 7B: RM1-RM3) e ácido gálico ($R_f = 0,26$) (Figura 7C: RM1-RM3).

Figura 7 - Cromatoplaça obtida para as amostras das cascas do fruto de *P. granatum*.



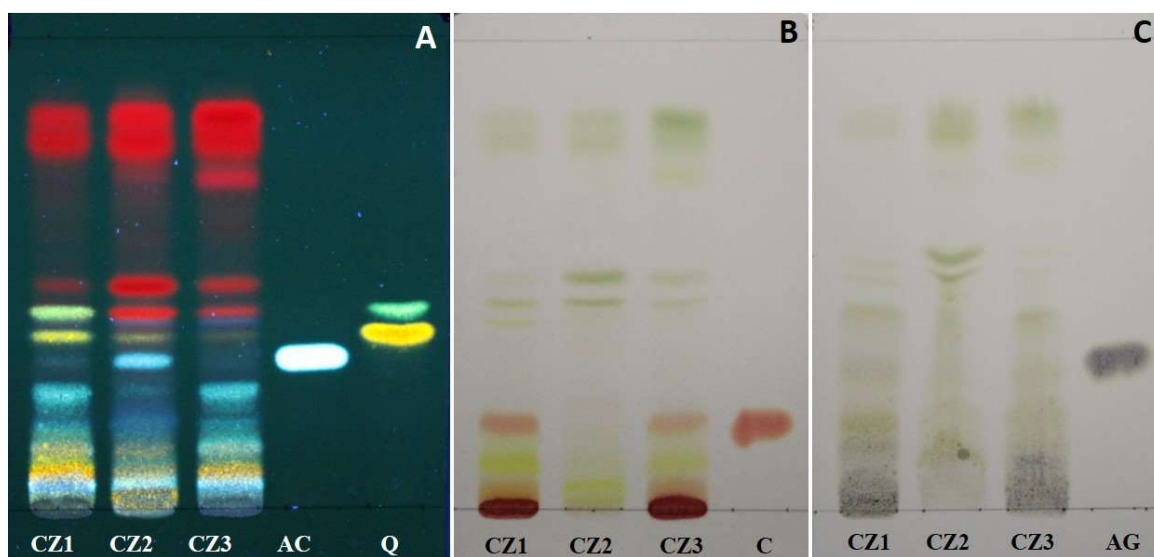
(A) Derivados Cinâmicos e Flavonoides; (B) Taninos condensados; (C) Taninos hidrolisáveis; Padrões: ácido cafeico (AC); quercetina (Q); catequina (C) e ácido gálico (AG).

Fonte: Dados do próprio autor.

Spondias mombin

O perfil cromatográfico das amostras das folhas de *S. mombin* mostrou bandas equivalentes ao padrão ácido cafeico ($R_f = 0,31$), quercetina ($R_f = 0,43$) (Figura 8A: CZ1-CZ3), catequina ($R_f = 0,17$) (Figura 8B: CZ1-CZ3) e, ácido gálico ($R_f = 0,31$) (Figura 8C: CZ1-CZ3), com exceção da amostra CZ2 da Figura 7B que não apresentou banda referente ao padrão catequina. Esse resultado corrobora com a pesquisa de Silva e colaboradores (2012) que identificaram além da quercetina, ácido elágico no extrato hidrometanólico das folhas de *S. mombin*.

Figura 8 - Cromatoplaça obtida para as amostras das cascas do fruto de *S. mombin*.



(A) Derivados Cinâmicos e Flavonoides; (B) Taninos condensados; (C) Taninos hidrolisáveis; Padrões: ácido cafeico (AC); quercetina (Q); catequina (C) e ácido gálico (AG).

Fonte: Dados do próprio autor.

5.2.2 Perfis cromatográficos por CLAE-DAD

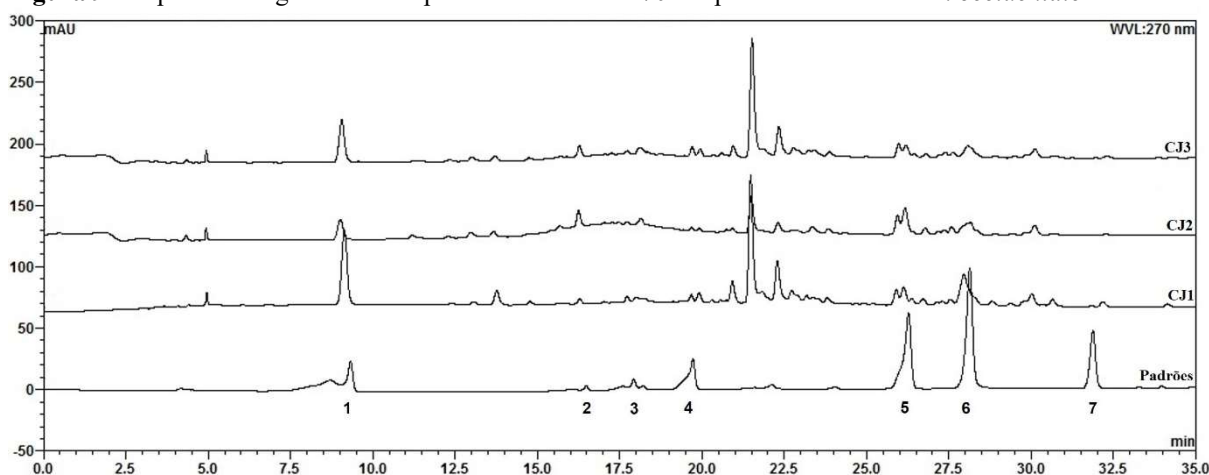
A cromatografia líquida de alta eficiência é o procedimento mais utilizado para a análise química de materiais e produtos à base de plantas. Os dados obtidos por essa técnica podem fornecer informações qualitativas e quantitativas, que podem ser melhoradas de acordo com o detector acoplado. No entanto, mesmo usando o detector mais comum (UV-Vis), os perfis cromatográficos desempenharam um papel importante nos ensaios de identificação ou quantificação de plantas e produtos derivados (TISTAERT, DEJAEGHER, HEYDEN, 2011; WOLFENDER et al., 2015).

A sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade são algumas das vantagens da análise por CLAE quando comparada com a CCD; embora muitas vezes pode superar seus elevados custos operacionais (PRATHAP et al., 2013). Portanto, nesse estudo, as amostras também foram submetidas à análise por cromatografia líquida de fase reversa para obter suas impressões digitais. Os perfis qualitativos foram adquiridos utilizando as mesmas condições cromatográficas e depois comparados com os dados obtidos da cromatografia líquida das substâncias padrões. As condições analíticas permitem a separação e identificação das substâncias padrões, bem como seus respectivos picos nas amostras. Os cromatogramas para cada espécie vegetal e substâncias padrão são apresentados nas figuras 9 a 15. Além dos padrões, vários picos ou regiões cromatográficas foram designados como "picos típicos".

Anacardium occidentale

A análise das folhas de *A. occidentale* por cromatografia líquida de fase reversa confirmou a presença de taninos em todas as amostras (ácido gálico e catequina), como foi observado nas placas de CCD (incluindo a catequina na amostra CJ1). Na análise por CCD várias bandas de compostos semelhantes a flavonoides foram observadas (Figura 2A). Já na análise por CLAE alguns picos reproduzíveis (Figura 9) foram observados em todas as amostras nos tempos de retenção entre 21 e 27 minutos que apresentaram o espectro típico de flavonoides como por exemplo o espectro com máximos em 201,7; 267,5 e 349,0 nm.

Figura 9 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de *A. occidentale*.



A. occidentale (CJ1-CJ3) e padrões: ácido gálico (1), catequina (2), ácido clorogênico (3), ácido cafeico (4), rutina (5), ácido elágico (6) e quercetina (7).

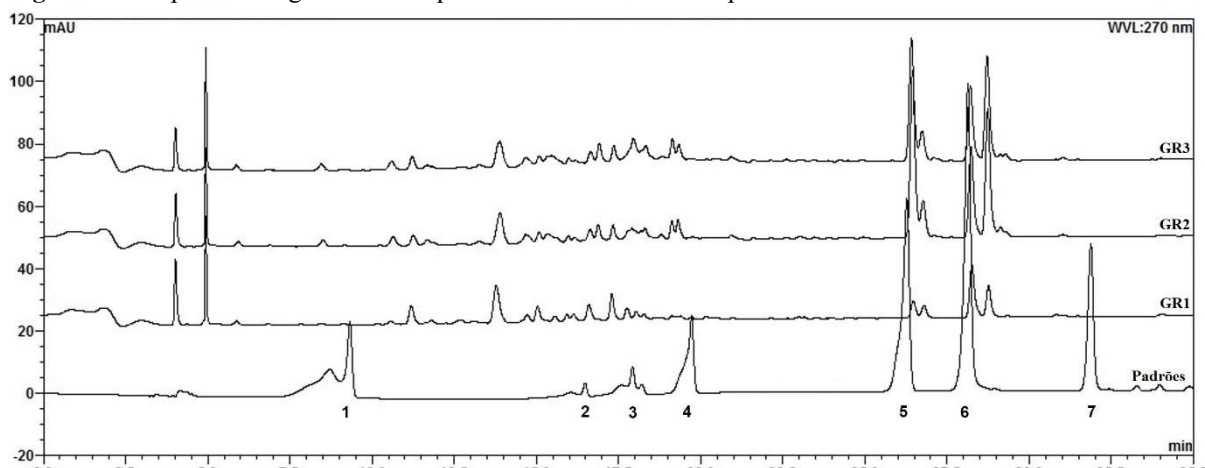
Fonte: Dados do próprio autor.

Annona muricata

Os dados cromatográficos das amostras de *A. muricata* permitiram a separação e identificação da catequina (Figura 10). Esses resultados corroboram com estudos anteriores onde foi observado a presença de catequina no extrato aquoso (GEORGE et al., 2014) e seu isolamento de um extrato etanol-água (3:1, v/v). Por outro lado, a presença de quercetina ou ácido gálico não foi detectada (NAWWAR et al., 2012). Além disso, os perfis apresentaram várias zonas de semelhanças. Um deles (entre 25 e 30 min) possui picos com espectros UV correspondentes a classe de flavonoides (26,3 e 28,15 min, e máximos de 203,0, 257,0 e 356,3 nm e 197,2; 265,7 e 348,6 nm, respectivamente). Apesar da ausência de marcadores conhecidos, as impressões digitais obtidas para *A. muricata* apresentaram semelhança e,

juntamente com os dados da CCD, são plataformas importantes para a avaliação da qualidade química das espécies.

Figura 10 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de *A. muricata*.



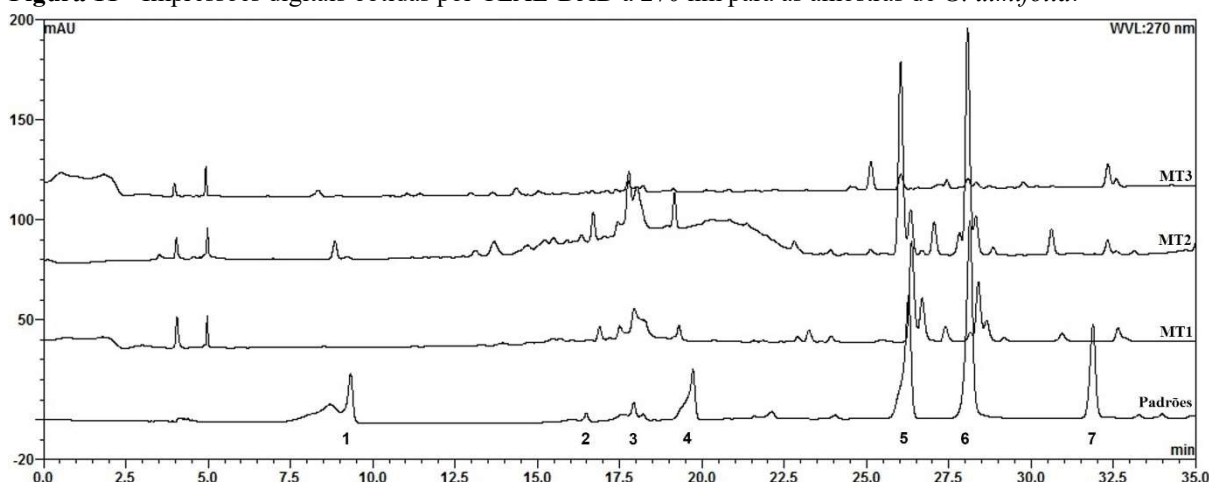
A. muricata (GR1-GR3) e padrões: ácido gálico (1), catequina (2), ácido clorogênico (3), ácido cafeico (4), rutina (5), ácido elágico (6) e quercetina (7).

Fonte: Dados do próprio autor.

Guazuma ulmifolia

Em relação à impressão digital das folhas de *G. ulmifolia*, as condições experimentais confirmaram a presença de rutina por apresentar semelhança no tempo de retenção (26 minutos) e espectro com máximos de absorção em 204,0; 256,8 e 356,4 nm (Figura 11). Além disso, foi observada outra zona de similaridade entre 3-5 minutos em todas as amostras. A presença de rutina também foi relatada anteriormente por Moraes e colaboradores (2017) reforçando sua relevância como marcador químico para folhas de *G. ulmifolia*.

Figura 11 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de *G. ulmifolia*.



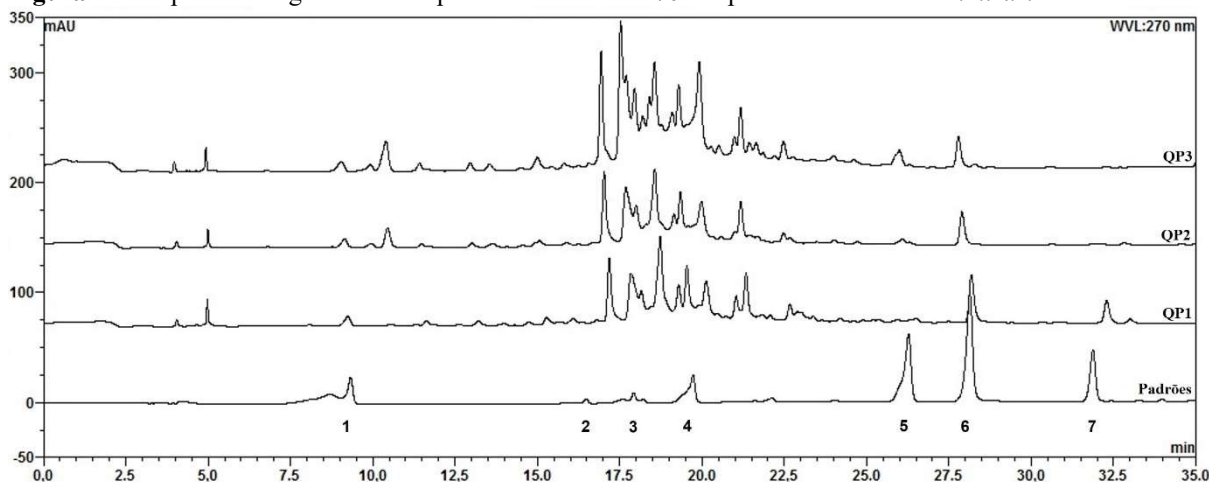
G. ulmifolia (MT1-MT3) e padrões: ácido gálico (1), catequina (2), ácido clorogênico (3), ácido cafeico (4), rutina (5), ácido elágico (6) e quercetina (7).

Fonte: Dados do próprio autor.

Phyllanthus niruri

A presença de taninos hidrolisáveis foi previamente relatada para partes aéreas de *P. niruri* (DE SOUZA et al., 2002) e as amostras analisadas neste estudo apresentaram ácidos gálico, no tempo de retenção de 9 minutos e elágico 28 minutos, com máximos em 215,3 e 271,8 nm; 201,6; 245,2 e 366,3 nm respectivamente (Figura 12). As zonas de similaridade entre os cromatogramas ocorrem a 3-5 min e novamente a 15-23 min. A presença de flavonoides não pode ser confirmada nas condições cromatográficas usadas em nosso estudo.

Figura 12 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de *P. niruri*



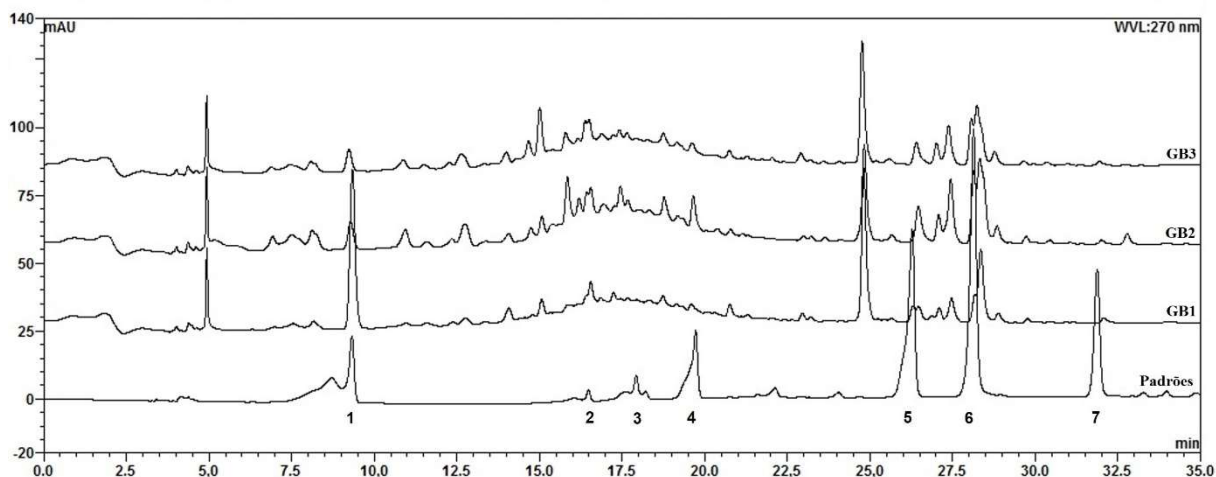
P. niruri (QP1-QP3) e padrões: ácido gálico (1), catequina (2), ácido clorogênico (3), ácido cafeico (4), rutina (5), ácido elágico (6) e quercetina (7).

Fonte: Dados do próprio autor.

Psidium guajava

Os cromatogramas obtidos por CCD das folhas de *P. guajava* apresentaram banda com colorações características para taninos e os picos de ácido gálico, ácido elágico e catequina foram identificados em todas as amostras no cromatograma por CLAE (Figura 13). Apesar da detecção de pelo menos duas bandas para flavonoides por CCD, apenas um pico importante a 25 min pode ser separado de forma satisfatória e mostrou um espectro representativo para flavonoides (máximo a 204,4; 256,4 e 352,2 nm).

Figura 13 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de *P. guajava*.



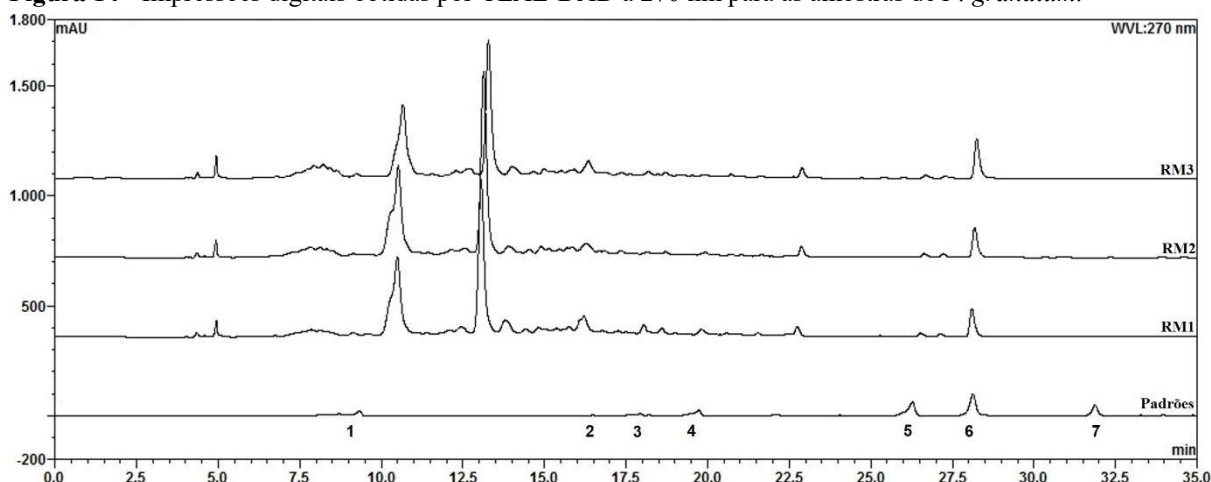
P. guajava. (GB1-GB3) e padrões: ácido gálico (1), catequina (2), ácido clorogênico (3), ácido cafeico (4), rutina (5), ácido elágico (6) e quercetina (7).

Fonte: Dados do próprio autor.

Punnicia granatum

A análise de cascas dos frutos de *P. granatum* por CLAE forneceu perfis químicos muito semelhantes para as amostras, sugerindo que a abordagem de impressão digital pode ser uma ferramenta de robustez para análise de material vegetal (Figura 14). As cascas dos frutos de *P. granatum* pico para o ácido elágico em 28 minutos com máximos de 201,6; 245,2 e 366,3 nm. A presença dele está intimamente relacionada às punicalaginas e elafaganinas previamente relatadas nas romãs (JAIN et al., 2011; AMYRGIALAKI et al.; 2014) e no seu suco (SENTANDREU, CERDÁN-CALERO, SENDRA, 2013).

Figura 14 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de *P. granatum*.



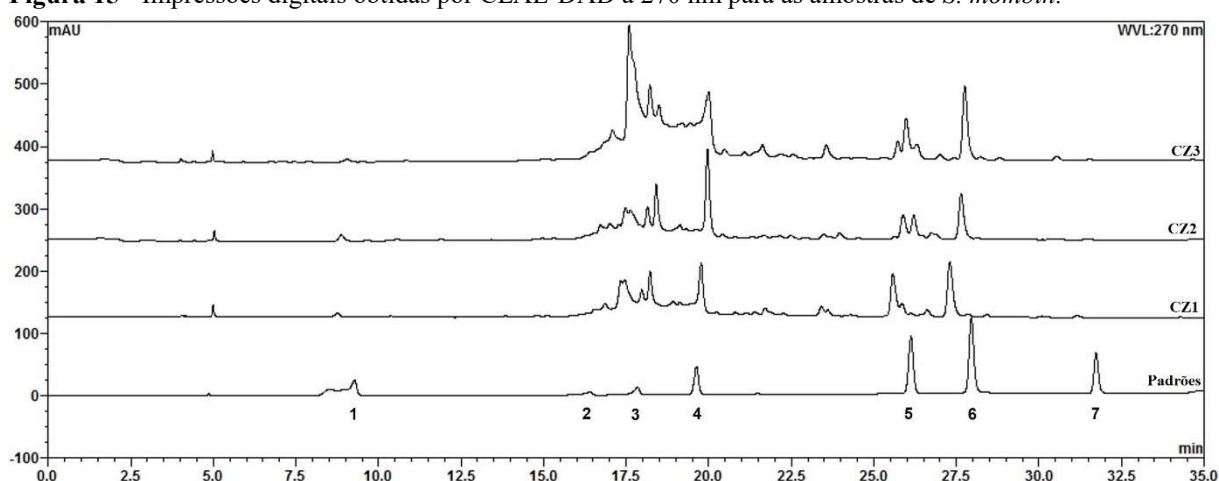
P. granatum (RM1-RM3) e padrões: ácido gálico (1), catequina (2), ácido clorogênico (3), ácido cafeico (4), rutina (5), ácido elágico (6) e quercetina (7).

Fonte: Dados do próprio autor.

Spondias mombin

Na literatura, há relatos da presença de ácido elágico em extratos hidroetanólicos (CABRAL et al., 2016) e metanólicos (SILVA et al., 2012) das folhas de *S. mombin*, corroborando com os resultados deste estudo. Além da presença de ácido elágico, foi possível separar e identificar por CLAE, o ácido gálico e a rutina. Os compostos foram observados em todas as amostras de folhas de *S. mombin*. Além disso, a comparação entre os perfis químicos mostrou um alto grau de similaridade de perfis entre as amostras (Figura 15).

Figura 15 - Impressões digitais obtidas por CLAE-DAD a 270 nm para as amostras de *S. mombin*.



S. mombin (CZ1-CZ3) e padrões: ácido gálico (1), catequina (2), ácido clorogênico (3), ácido cafeico (4), rutina (5), ácido elágico (6) e quercetina (7).

Fonte: Dados do próprio autor.

5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE TANINOS E FLAVONOIDES NOS FARMACÓGENOS DAS ESPÉCIES VEGETAIS

5.3.1 Quantificação por espectrofotometria

5.3.1.1 Flavonoides Totais

Os flavonoides compõem uma importante classe de polifenóis presentes como metabólitos secundários em grande parte dos vegetais. Eles podem ser utilizados como marcadores taxonômicos especialmente por sua abundância relativa em quase todo reino vegetal, sua especificidade em algumas espécies, facilidade de identificação e relativa estabilidade (ZUANAZZI, MONTANHA, ZUCOLOTTO, 2017).

A espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) é um dos métodos mais utilizados para o doseamento dos flavonoides, por ser de simples operação e um custo não muito elevado. Mas para isso há necessidade de uma reação colorimétrica com cloreto de alumínio (AlCl_3) para evitar a sobreposição dos compostos fenólicos que absorvem na mesma região, minimizando assim a baixa seletividade do método (PEKAMPUS, 1992; ROCHA, TEIXEIRA, 2004; KOMAROVA et al., 2009; ALVES et al., 2010; MARQUES et al., 2012).

Na análise por CCD observou-se a presença de flavonoides em algumas amostras, devido as bandas de colorações características e o mesmo R_f do padrão, corroborando com a análise de quantificação realizada (Tabela 6). As amostras de GR2, MT1, GB2, RM2 e CZ3 foram as que apresentaram maior teor de flavonoide totais, 10,10; 9,92; 10,09; 11,85 e 11,39 respectivamente, expressos em g % de rutina. Observa-se através desses dados que há diferenças nos teores encontrados de uma mesma espécie quando essas foram obtidas de locais diferentes, mostrando mais uma vez a influência de diversos fatores na produção dos metabólitos secundários.

Tabela 6 - Teor de Flavonoides Totais por Espectrofotometria UV-Vis nas amostras de matéria prima vegetal.

Espécie	Amostra	TFT (g % rutina)
<i>A. occidentale</i> L.	CJ1	7,55 (1,04)
	CJ2	5,71 (1,82)
	CJ3	5,38 (0,91)
<i>A. muricata</i> L.	GR1	5,55 (1,57)
	GR2	10,10 (1,32)
	GR3	8,63 (1,53))
<i>G. ulmifolia</i> Lam	MT1	9,92 (1,60)
	MT2	4,47 (0,30)
	MT3	3,45 (3,14)
<i>P. niruri</i> L.	QP1	5,11 (0,12)
	QP2	6,48 (1,10)
	QP3	1,31 (1,43)
<i>P. guajava</i> L.	GB1	7,84 (1,60)
	GB2	10,09 (0,80)
	GB3	7,71 (0,47)
<i>P. granatum</i> L.	RM1	10,03 (1,13)
	RM2	11,85 (1,53)
	RM3	9,63 (1,33)
<i>S. mombin</i> Jacq.	CZ1	6,21 (2,21)
	CZ2	9,25 (1,44)
	CZ3	11,39 (1,13)

Os dados foram expressos como média (desvio padrão relativo percentual).

Fonte: Dados do próprio autor.

5.3.1.2 Taninos Totais

Muitas plantas apresentam taninos em sua constituição, e eles são responsáveis por diversas atividades biológicas e farmacológicas, tais como o alívio das inflamações, diarreias, hipertensão arterial, queimaduras, problemas estomacais, renais e do sistema urinário, entre outras. Essas atividades podem ser relacionadas às suas propriedades de quelação de metais, e às suas atividades antioxidantes e de complexação com proteínas e enzimas (HASLAM, 1996; MELLO, SANTOS, 2017).

Neste contexto, podemos justificar que a utilização das drogas vegetais em estudo, estão ligadas também à presença dos taninos, e ratificar os resultados encontrados nas análises por CCD, pois estes estão confirmados no ensaio de doseamento dos taninos totais apresentados na tabela 7. As amostras de romã foram as que apresentaram maior teor de taninos totais com 25,04 para RM1, seguida das amostras de cajazeira com 14,52 para CZ3, expressos em g% de pirogalol. Observa-se que as mesmas amostras apresentaram bandas positivas para os taninos na análise por CCD corroborando com esta análise.

Tabela 7 - Teor de Taninos Totais por Espectrofotometria UV-Vis nas amostras de matéria prima vegetal

Espécie	Amostra	TTT (g% pirogalol)
<i>A. occidentale</i> L.	CJ1	2,78 (2,14)
	CJ2	1,89 (2,83)
	CJ3	2,62 (1,22)
<i>A. muricata</i> L.	GR1	4,08 (1,48)
	GR2	3,93 (2,22)
	GR3	4,19 (1,48)
<i>G. ulmifolia</i> Lam.	MT1	2,53 (0,66)
	MT2	3,12 (1,33)
	MT3	0,14 (1,32)
<i>P. niruri</i> L.	QP1	4,75 (2,23)
	QP2	5,43 (1,34)
	QP3	5,54 (1,04)
<i>P. guajava</i> L.	GB1	5,04 (3,15)
	GB2	8,16 (0,94)
	GB3	3,61 (2,91)
<i>P. granatum</i> L.	RM1	25,03 (1,59)
	RM2	23,69 (2,83)
	RM3	24,89 (2,81)
<i>S. mombin</i> Jacq.	CZ1	7,18 (3,70)
	CZ2	6,31 (3,45)
	CZ3	14,52 (1,35)

Os dados foram expressos como média (desvio padrão relativo percentual).

Fonte: Dados do próprio autor.

5.3.2 Quantificação por CLAE-DAD

Os resultados obtidos por CLAE-DAD apresentam maior seletividade e sensibilidade quando comparado ao método espectrofotométrico. Eles estão demonstrados na tabela 8 através dos seus principais marcadores, as variações existentes entre amostras de uma mesma espécie são decorrentes de diversos fatores que podem influenciar na produção dos metabolitos secundários já discutidos anteriormente.

Tabela 8 - Teor de marcadores polifenólicos (%m/m) obtidos por CLAE nos farmacógenos das espécies vegetais.

Espécie	Amostras	CAT	AG	AE	FT*	DCT**
<i>A. occidentale</i>	CJ1	0,48 (0,73)	0,51 (0,43)	-	0,38 (0,41)	-
	CJ2	0,59 (0,84)	0,16 (1,43)	-	0,30 (0,91)	-
	CJ3	0,53 (0,76)	0,30 (1,89)	-	0,15 (1,87)	-
<i>A. muricata</i>	GR1	-	-	-	0,50 (2,50)	0,53 (0,81)
	GR2	-	-	-	1,60 (0,18)	0,47 (0,16)
	GR3	-	-	-	1,24 (0,57)	0,41 (0,88)
<i>G. ulmifolia</i>	MT1	0,14 (0,98)	-	-	1,10 (0,10)	-
	MT2	-	-	-	2,46 (0,78)	-
	MT3	-	-	-	0,35 (1,61)	-
<i>P. niruri</i>	QP1	-	0,12 (0,97)	-	-	1,83 (0,54)
	QP2	-	0,10 (1,46)	-	-	2,86 (0,52)
	QP3	-	0,08 (2,98)	-	-	4,84 (0,98)
<i>P. guajava</i>	GB1	-	0,24 (1,98)	0,14 (1,96)	0,80 (2,01)	-
	GB2	-	0,11 (0,89)	0,12 (1,54)	0,73 (1,01)	-
	GB3	-	0,10 (1,34)	0,12 (1,94)	0,71 (0,62)	-
<i>P. granatum</i>	RM1	-	-	0,36	-	-
	RM2	-	-	0,36	-	-
	RM3	-	-	0,46	-	-
<i>S. mombin</i>	CZ1	-	0,08 (2,97)	0,26 (0,62)	0,53 (0,82)	0,28 (0,21)
	CZ2	-	0,08 (2,88)	0,22 (0,51)	0,39 (0,59)	0,31 (0,57)
	CZ3	-	0,09 (2,61)	0,30 (0,92)	0,20 (1,04)	0,36 (0,44)

CAT: Catequina; AG: Ácido gálico; AE: Ácido elágico; FT: Flavonoides Totais, calculados como rutina; DCT: Derivados Cinâmicos Totais, calculados como ácido clorogênico.

Os dados foram expressos como média (desvio padrão relativo percentual).

Fonte: Dados do próprio autor.

5.4 ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DOS FARMACÓGENOS DAS ESPÉCIES VEGETAIS

5.4.1 Preparação dos extratos brutos

Os extratos brutos líquidos ou secos são obtidos quando um solvente líquido ou mistura deles for utilizado para remover um ou mais constituintes químicos presentes numa droga vegetal, ou seja, selecionar e concentrar substâncias que sejam de interesse (BASSANI; PETROVICK, 2017). Assim um extrato concentra as substâncias, conseqüentemente reduzirá as posologias e aumentará o prazo de validade, pois em sua preparação podem retirar ou minimizar a presença de compostos indesejáveis (MARQUES, 2005).

São diversos os fatores que influenciam no rendimento de uma extração, como o método de extração utilizado e o solvente utilizado, que irão afetar diretamente o rendimento do extrato obtido.

5.4.1.1 Extração por refluxo

A extração por refluxo foi realizada com as amostras submetidas ao calor de 70 °C por 30 minutos em banho-maria para evitar algum processo degradativo de substâncias termolábeis presentes em alguma das amostras.

Observa-se na tabela 8, que houve diferenças no rendimento entre as amostras de uma mesma espécie. A amostra que apresentou melhor rendimento foi romã, 48,39% para RM3 aquoso; 46,50% para RM11:1 e 44,94% para RM2 7:3.

Tabela 9 - Rendimento dos extratos brutos obtidos por refluxo.

Espécie	Amostra	Rendimento (%; m/m)		
		Refluxo		
		Aquoso	1:1	7:3
<i>A. occidentale</i>	CJ1	16,02	16,99	12,05
	CJ2	18,02	26,74	26,86
	CJ3	8,22	15,05	11,48
<i>A. muricata</i>	GR1	18,88	10,06	15,52
	GR2	21,72	11,82	11,80
	GR3	20,27	15,54	9,26
<i>G. ulmifolia</i>	MT1	12,61	18,81	16,51
	MT2	12,51	6,32	20,46
	MT3	7,93	8,30	7,14
<i>P. niruri</i>	QP1	14,22	17,05	17,08
	QP2	21,96	16,44	14,68
	QP3	14,45	15,82	14,51
<i>P. guajava</i>	GB1	12,97	20,28	19,33
	GB2	17,03	21,55	22,43
	GB3	19,27	22,69	18,80
<i>P. granatum</i>	RM1	27,17	46,50	43,77
	RM2	39,26	42,21	44,94
	RM3	48,39	45,24	39,63
<i>S. mombin</i>	CZ1	31,11	36,16	28,60
	CZ2	28,77	26,53	21,34
	CZ3	22,52	26,41	18,57

Fonte: Dados do próprio autor.

5.4.1.2 Extração por turbólise

A extração por turbólise utilizada, não submete a amostra ao aquecimento, mas à elevada agitação por curto tempo alternado por um descanso da droga em contato com o solvente extrator, mostrou diferença no rendimento obtido quando comparado com o processo extrativo por refluxo.

Essa diferença de rendimento está demonstrada na tabela 9, onde é possível notar que nesse caso a amostra com melhor produção foi QP11:1 com 51,53% de rendimento. É possível observar também que o solvente extrator que apresentou um melhor resultado foi acetona:água 1:1, pois a maioria das amostras apresentou melhor rendimento que esse foi o solvente extrator utilizado.

Tabela 10 - Rendimento dos extratos brutos obtidos por turbólise.

		Rendimento (%; m/m)		
Espécie	Amostra	Turbólise		
		Aquoso	1:1	7:3
<i>A. occidentale</i>	CJ1	11,33	15,32	11,11
	CJ2	20,17	28,54	23,53
	CJ3	7,31	14,73	17,22
<i>A. muricata</i>	GR1	13,86	17,42	14,43
	GR2	15,80	23,44	14,92
	GR3	10,82	24,01	15,53
<i>G. ulmifolia</i>	MT1	8,23	24,03	18,11
	MT2	13,75	17,04	12,35
	MT3	15,21	11,32	7,77
<i>P. niruri</i>	QP1	24,40	51,53	41,96
	QP2	5,76	15,80	12,98
	QP3	15,22	20,16	17,10
<i>P. guajava</i>	GB1	12,48	22,90	16,64
	GB2	13,96	26,34	19,88
	GB3	16,68	27,14	22,59
<i>P. granatum</i>	RM1	32,23	47,95	43,82
	RM2	29,53	42,53	38,55
	RM3	30,28	38,46	42,13
<i>S. mombin</i>	CZ1	24,88	34,93	38,92
	CZ2	26,63	28,16	20,06
	CZ3	23,81	30,24	23,88

Fonte: Dados do próprio autor.

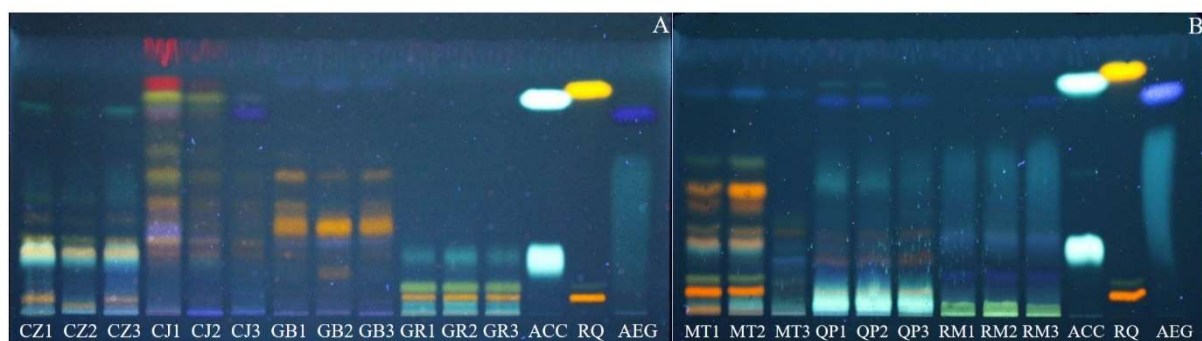
5.4.2 Análise Qualitativa dos extratos brutos por CCD E CLAE-DAD

5.4.2.1 Perfis Cromatográficos por CCD

Com a obtenção dos extratos brutos propõe-se concentrar e selecionar as substâncias polifenólicas, que são de interesse nesse estudo. Sendo assim, os extratos brutos obtidos por refluxo e turbólise tiveram além da influência dos métodos empregados, a mistura de solventes utilizados, que variaram entre água; acetona:água (1:1) e acetona:água (7:3). Dessa forma os perfis obtidos para essas amostras apresentam diferenças em suas bandas quando comparadas com a droga vegetal de origem. As cromatoplasmas para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis encontram-se nas figuras 16 a 21. As mesmas foram eluídas com o sistema acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5), derivatizadas com o reagente NEU+PEG e visualizadas sob luz UV 365 nm.

Nas cromatoplasmas dos extratos brutos aquosos obtidos por refluxo e turbólise para os metabólitos derivados cinâmicos, flavonoide e taninos hidrolisáveis (Figuras 16 e 17) é possível observar que algumas bandas são um pouco mais intensas e/ou nítidas quando obtidas por refluxo.

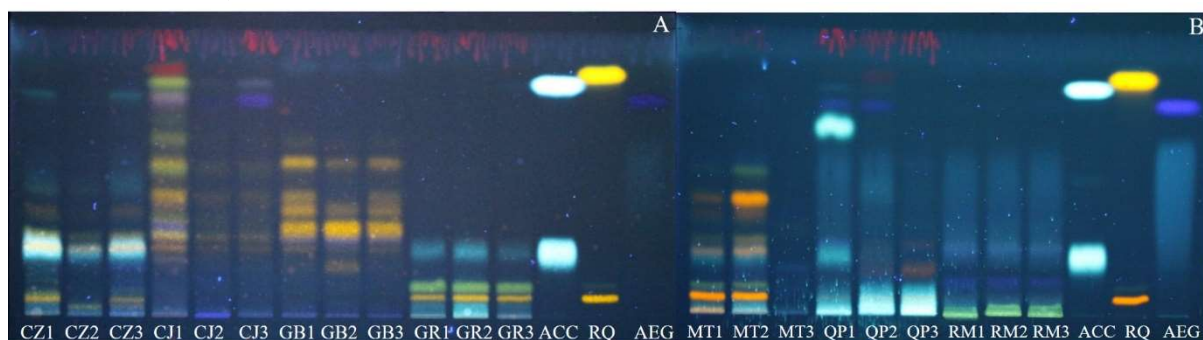
Figura 16 - Cromatoplasmas dos Extratos Brutos Aquosos obtidos por Refluxo de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.



(A): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (B): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrões: Mistura de ácido cafeico e ácido clorogênico (ACC); Mistura de rutina e quercetina (RQ); Mistura de ácido elágico e ácido gálico (AEG).

Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 17 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos Aquosos obtidos por Turbólise de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.

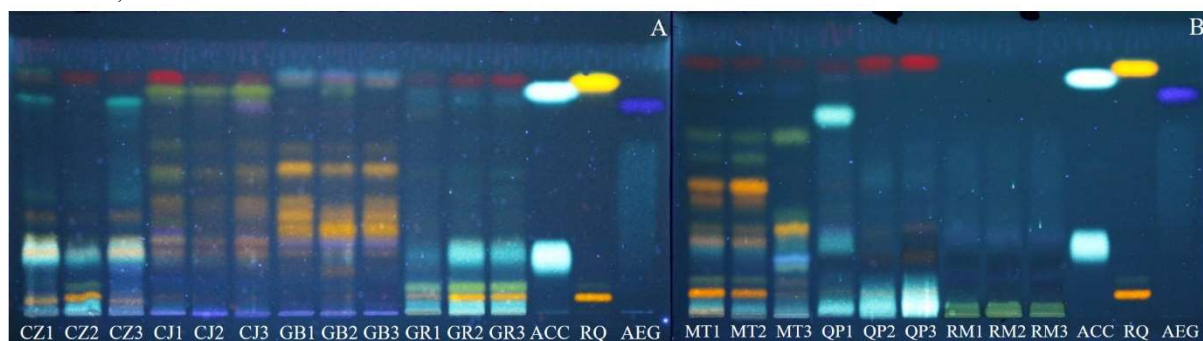


(**A**): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (**B**): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrões: Mistura de ácido cafeico e ácido clorogênico (ACC); Mistura de rutina e quercetina (RQ); Mistura de ácido elágico e ácido gálico (AEG).

Fonte: Dados do próprio autor.

Para os extratos brutos acetona:água (1:1) observa-se que a intensidade das colorações das bandas são mais intensas nos extrato obtidos por turbólise, mostrando que aqui há a influência maior do método quando também muda-se o solvente de água para a mistura de acetona:água (1:1). É notório que a extração é mais eficiente quando a presença de alguma substância torna-se mais evidente, com é o caso do ácido elágico ($R_f = 0,41$) que se mostrou mais nítido nos extratos brutos obtidos por turbólise de *A. muricata*, *P. niruri* e *P. granatum* (Figuras 18 e 19).

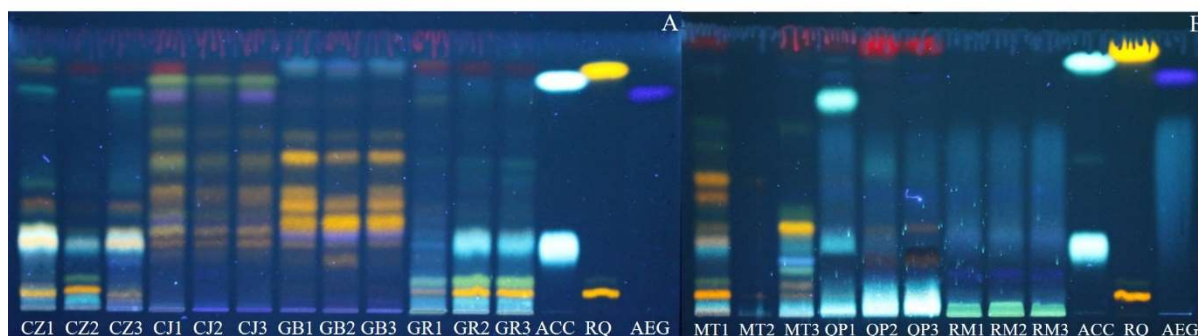
Figura 18 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos 1:1 obtidos por Refluxo de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.



(**A**): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (**B**): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrões: Mistura de ácido cafeico e ácido clorogênico (ACC); Mistura de rutina e quercetina (RQ); Mistura de ácido elágico e ácido gálico (AEG)

Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 19 - Cromatoplasmas dos Extratos Brutos 1:1 obtidos por Turbólise de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.



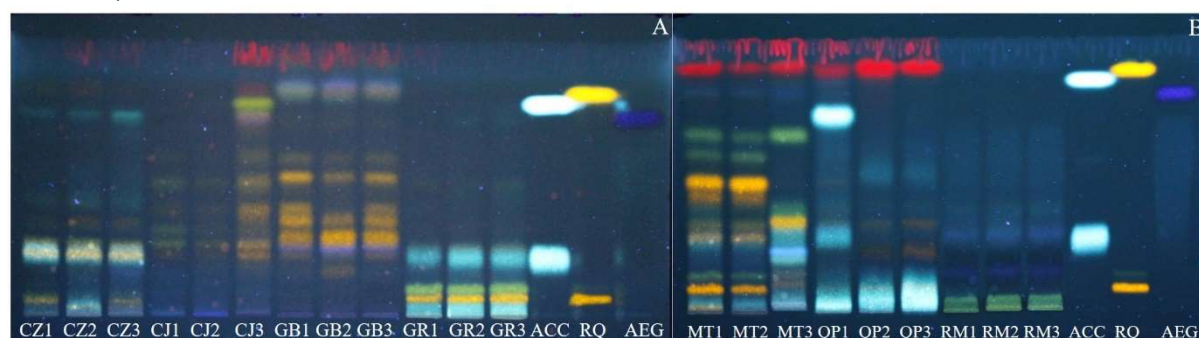
(A): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); **(B):** Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrões: Mistura de ácido cafeico e ácido clorogênico (ACC); Mistura de rutina e quercetina (RQ); Mistura de ácido elágico e ácido gálico (AEG)

Fonte: Dados do próprio autor.

Quando a mistura do solvente extrator foi mudada novamente, agora na proporção de 7:3 de acetona:água, observa-se que a extração evidenciou com mais nitidez alguns outros grupos de metabolitos como os derivados cinâmicos, aqui representados pelo ácido cafeico ($R_f = 0,24$) e ácido clorogênico ($R_f = 0,92$), pois as bandas referentes a esse grupo apresentou mais luminosidade. O mesmo ocorreu com as bandas característica para o grupo dos flavonoides, onde as colorações amarelo/alaranjado também foram mais intensas.

Além do solvente nota-se também que o método teve sua influência quando comparados os cromatogramas obtidos por refluxo e turbólise, o segundo apresentou as bandas com um pouco mais intensidade (Figuras 20 e 21).

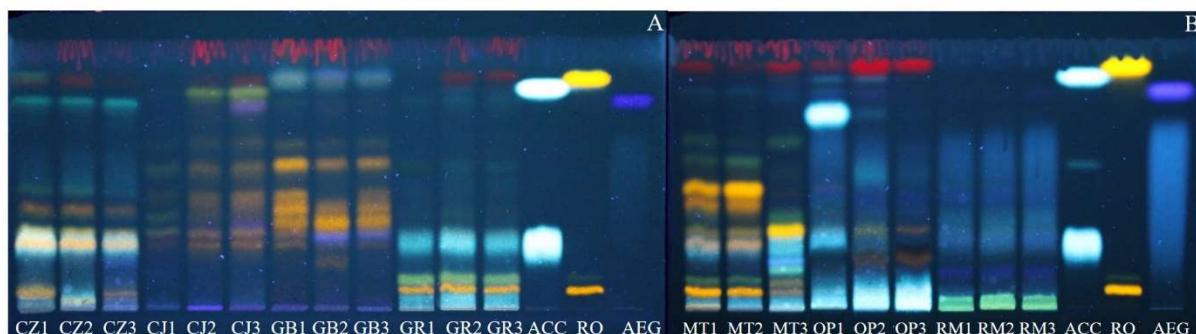
Figura 20 - Cromatogramas dos Extratos Brutos 7:3 obtidos por Refluxo de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos hidrolisáveis.



(A): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); **(B):** Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrões: Mistura de ácido cafeico e ácido clorogênico (ACC); Mistura de rutina e quercetina (RQ); Mistura de ácido elágico e ácido gálico (AEG)

Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 21 - Cromatoplacas dos Extratos Brutos 7:3 obtidos por Turbólise de todas as amostras, para derivados cinâmicos, flavonoides e taninos.



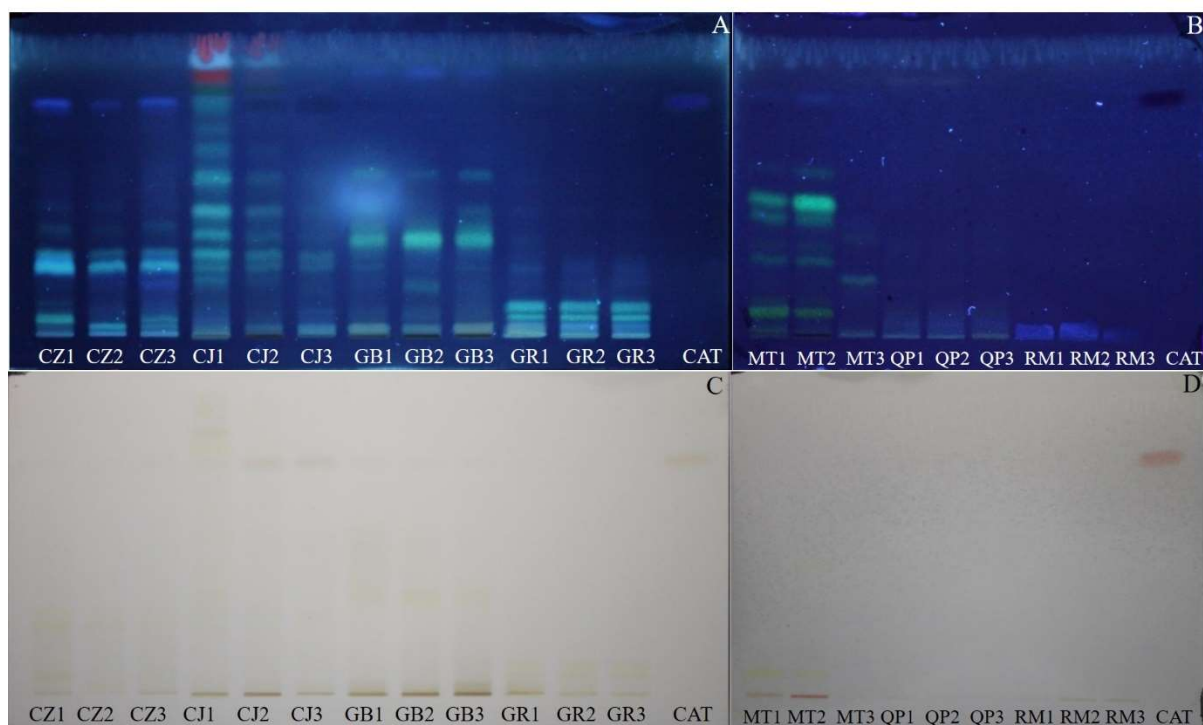
(**A**): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (**B**): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrões: Mistura de ácido cafeico e ácido clorogênico (ACC); Mistura de rutina e quercetina (RQ); Mistura de ácido elágico e ácido gálico (AEG)

Fonte: Dados do próprio autor.

Na CCD dos extratos brutos para taninos condensados (Figuras 22 a 27), após a derivatização com vanilina clorídrica, rapidamente é revelada a presença de grupo que é representado pelo padrão catequina, mas assim como é rápida sua manifestação, também é o seu desaparecimento. Diante disso, as cromatoplacas foram fotodocumentadas sob luz Vis, onde é nitidamente observada a presença dos taninos condensados através da catequina ($R_f = 0,86$) e também sob luz UV em 365 nm, onde é possível observar o padrão e a banda semelhante nos extratos quando esta faz parte da constituição da amostra.

Nesse contexto, pode-se observar a presença da catequina com bandas de pouco intensidade nos extratos brutos de *A. occidentale*, *A. muricata*, *G. ulmifolia*, *P. guajava*, *P. granatum* e *S. mombin*, onde estão a visualização está um pouco mais nítida nos cromatogramas dos extratos aquosos obtidos por refluxo (Figura 22).

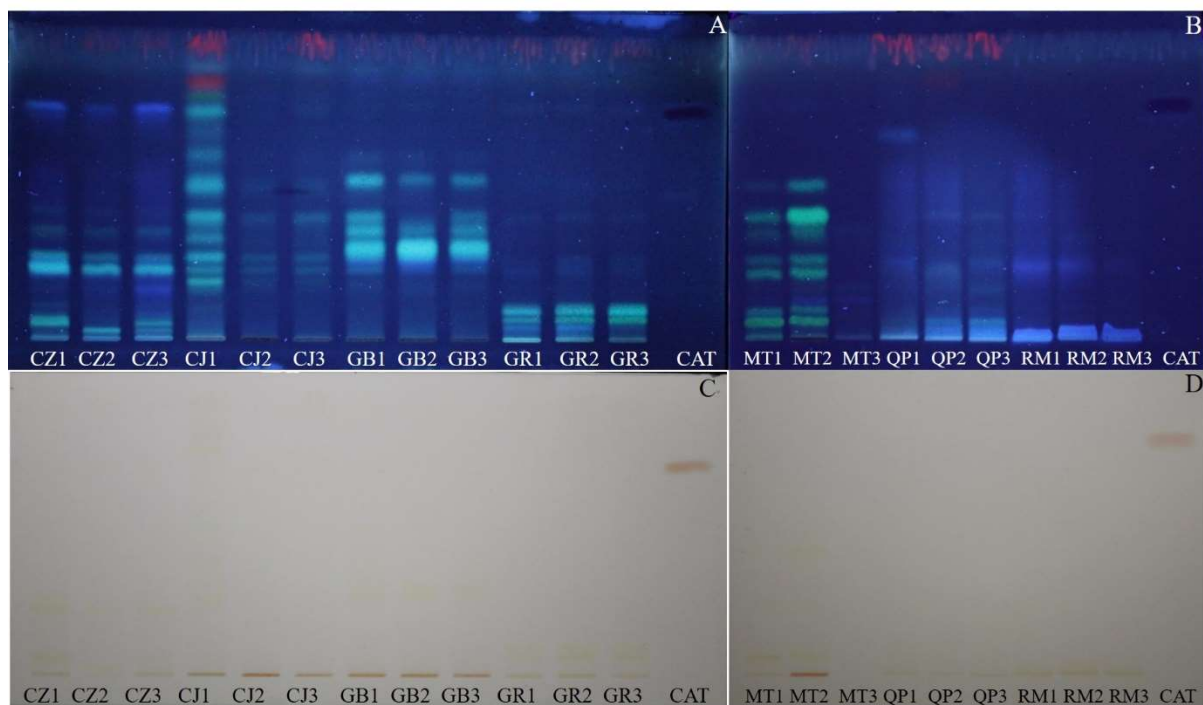
Figura 22 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos Aquosos obtidos por Refluxo de todas as amostras, para taninos condensados.



(A e C): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (B e D): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrão catequina (CAT). (A e C): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz UV 365 nm. (C e D): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz Visível.

Fonte: Dados do próprio autor.

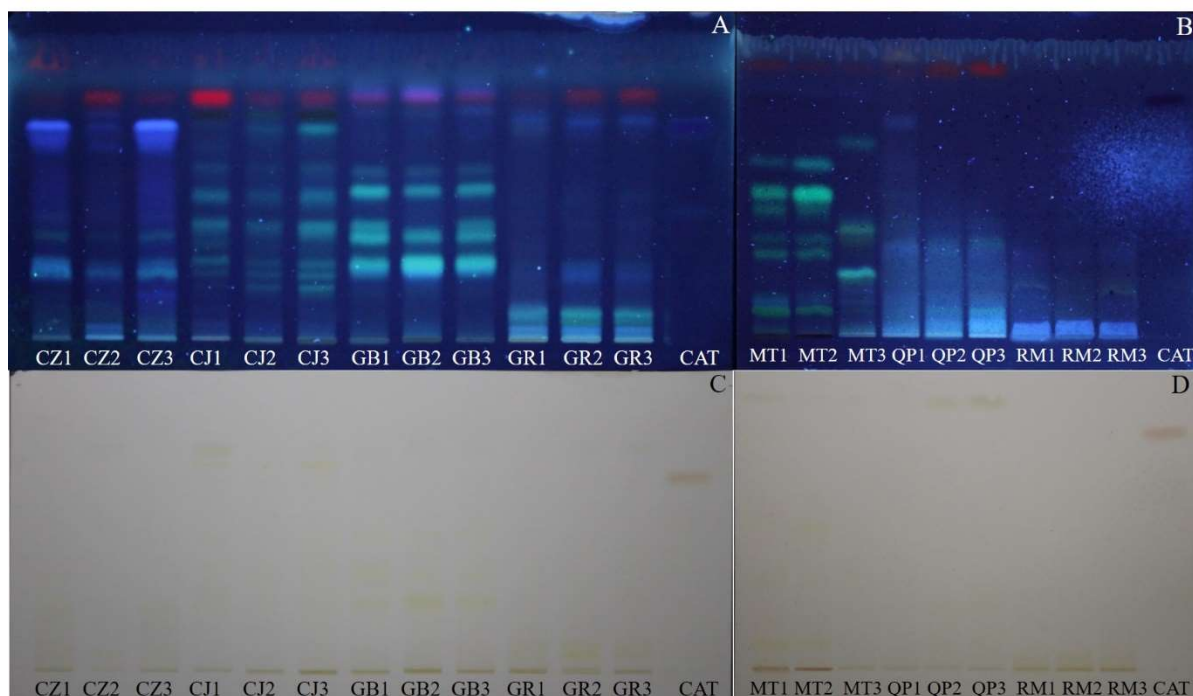
Figura 23 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos Aquosos obtidos por Turbólise de todas as amostras, para taninos condensados.



(A e C): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (B e D): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrão catequina (CAT). (A e C): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz UV 365 nm. (C e D): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz Visível.

Fonte: Dados do próprio autor.

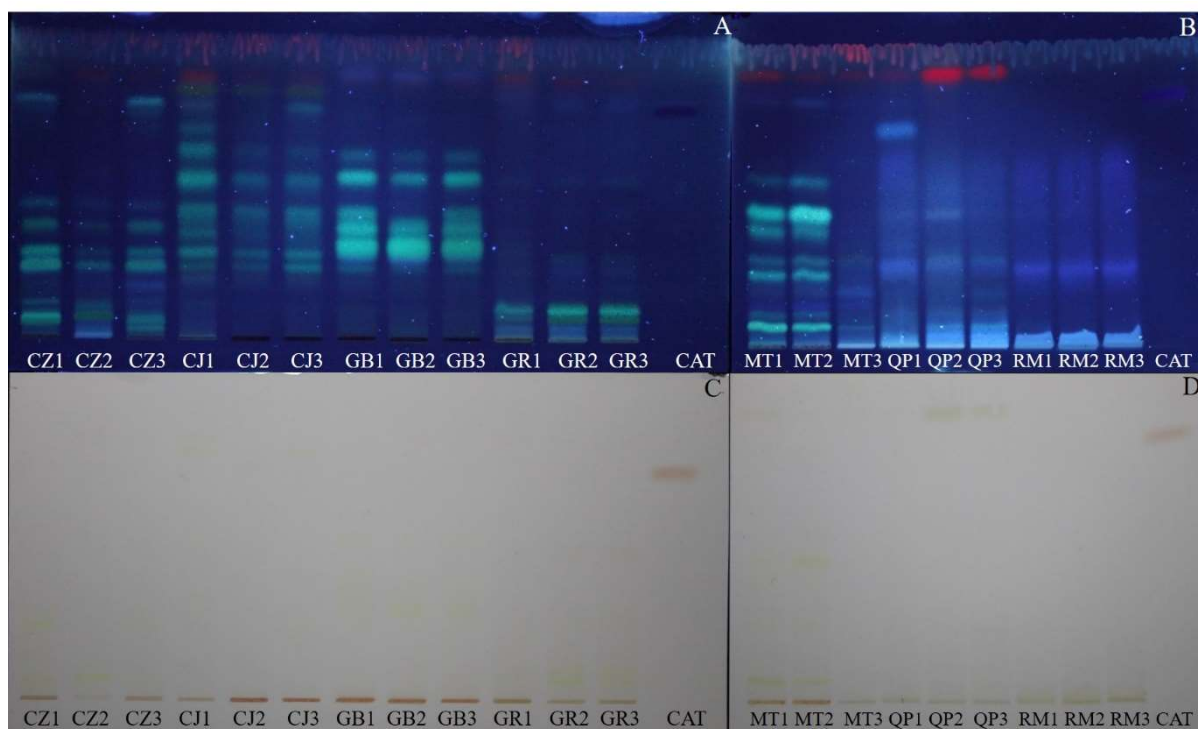
Figura 24 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos 1:1 obtidos por Refluxo de todas as amostras, para taninos condensados.



(A e C): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (B e D): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrão catequina (CAT). (A e C): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz UV 365 nm. (C e D): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz Visível.

Fonte: Dados do próprio autor.

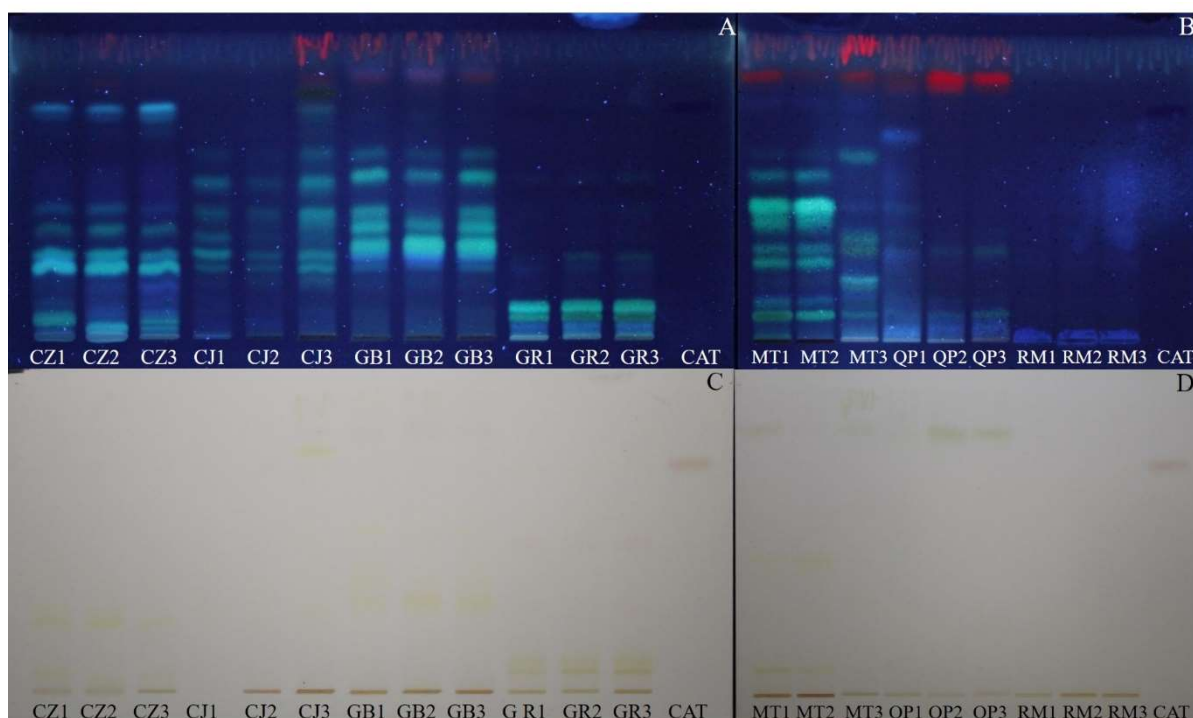
Figura 25 - Cromatoplasas dos Extratos Brutos 1:1 obtidos por Turbólise de todas as amostras, para taninos condensados.



(A e C): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (B e D): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrão catequina (CAT). (A e C): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz UV 365 nm. (C e D): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz Visível.

Fonte: Dados do próprio autor.

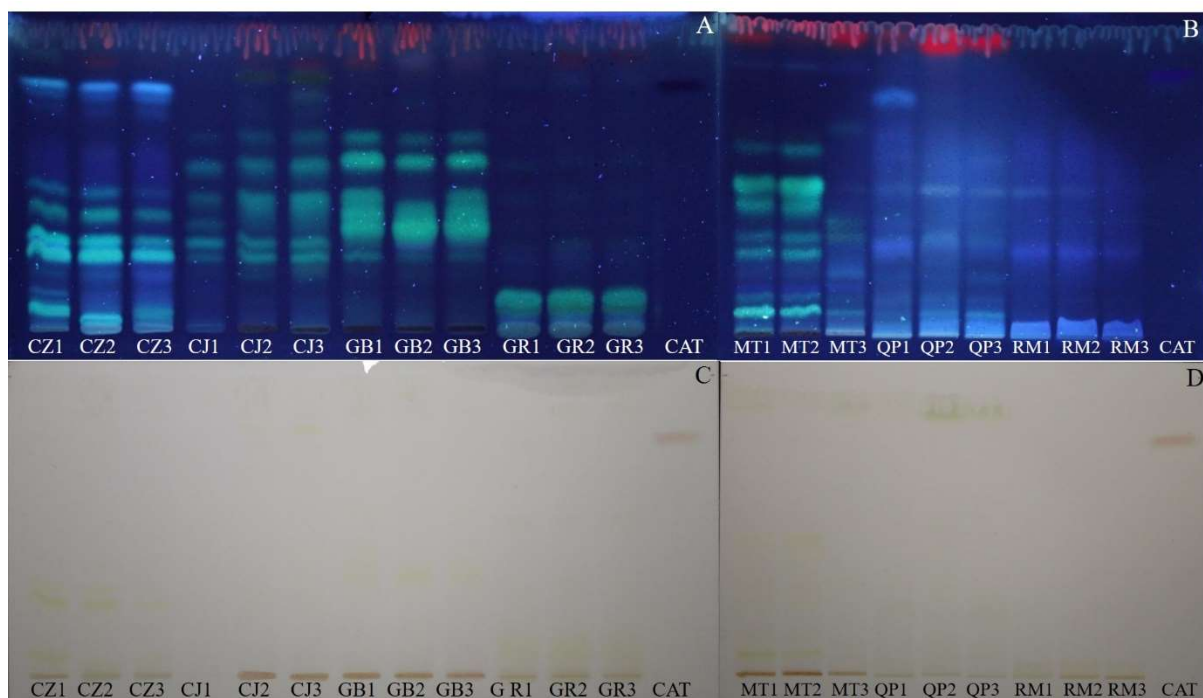
Figura 26 - Cromatoplasmas dos Extratos Brutos 7:3 obtidos por Refluxo de todas as amostras, para taninos condensados.



(A e C): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (B e D): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrão catequina (CAT). (A e C): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz UV 365 nm. (C e D): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz Visível.

Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 27 - Cromatoplasmas dos Extratos Brutos 7:3 obtidos por Turbólise de todas as amostras, para taninos condensados.



(A e C): Cajazeira (CZ); Caju (CJ); Goiaba (GB); Graviola (GR); (B e D): Mutamba (MT); Quebra-Pedra (QP) e Romã (RM); Padrão catequina (CAT). (A e C): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz UV 365 nm. (C e D): Após derivatização com vanilina clorídrica e visualizadas sob luz Visível.

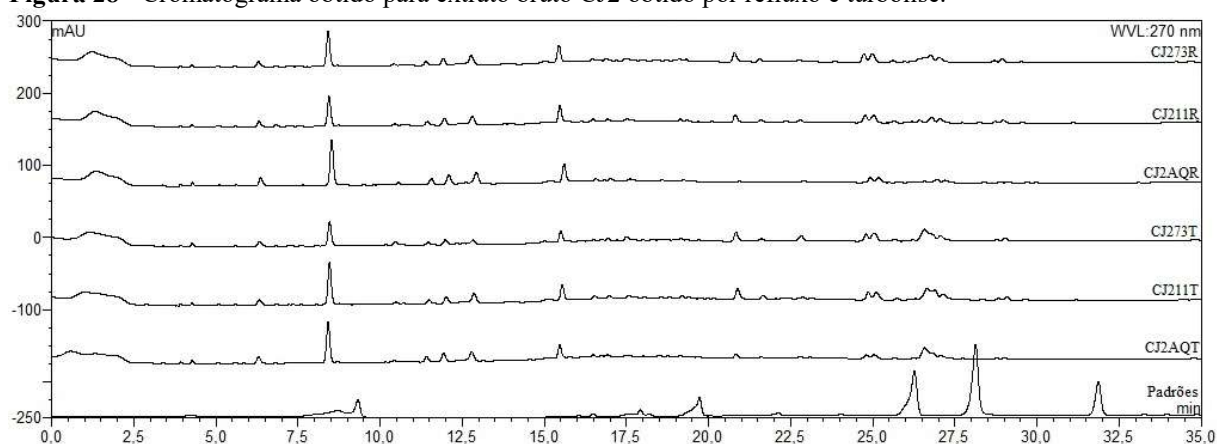
Fonte: Dados do próprio autor.

5.4.2.2 Perfis Cromatográficos por CLAE-DAD

Os perfis digitais obtidos por CLAE-DAD para os extratos brutos, confirmam a semelhança entre as amostras de uma mesma espécie e que são de localidades diferentes. Não há entre elas uma grande divergência entre seus perfis, confirmando que se tratam da mesma espécie que foram confirmadas pela identificação botânica.

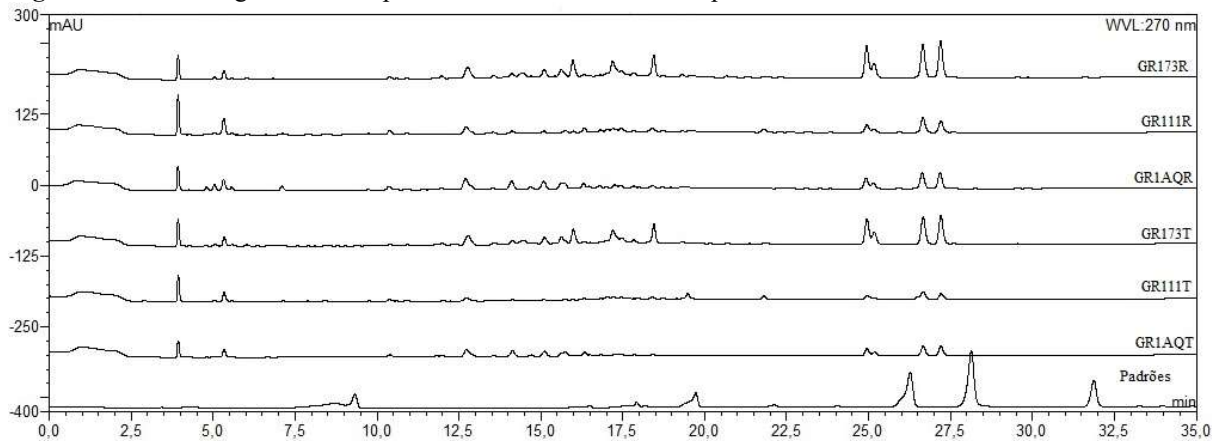
A seguir estão demonstrados (Figuras 28 a 34) os cromatogramas dos extratos brutos obtidos por refluxo e turbólise com os três solventes extratores, água; acetona:água (1:1); e acetona:água (7:3). Apenas uma amostra de cada espécie foi selecionada, por apresentar um melhor perfil na CCD e um melhor teor dos marcadores quando avaliados pela CLAE. Os cromatogramas apresentam o comparativo dos seus perfis de cada amostra quando obtidas por métodos extrativos e solventes diferentes.

Figura 28 - Cromatograma obtido para extrato bruto CJ2 obtido por refluxo e turbólise.



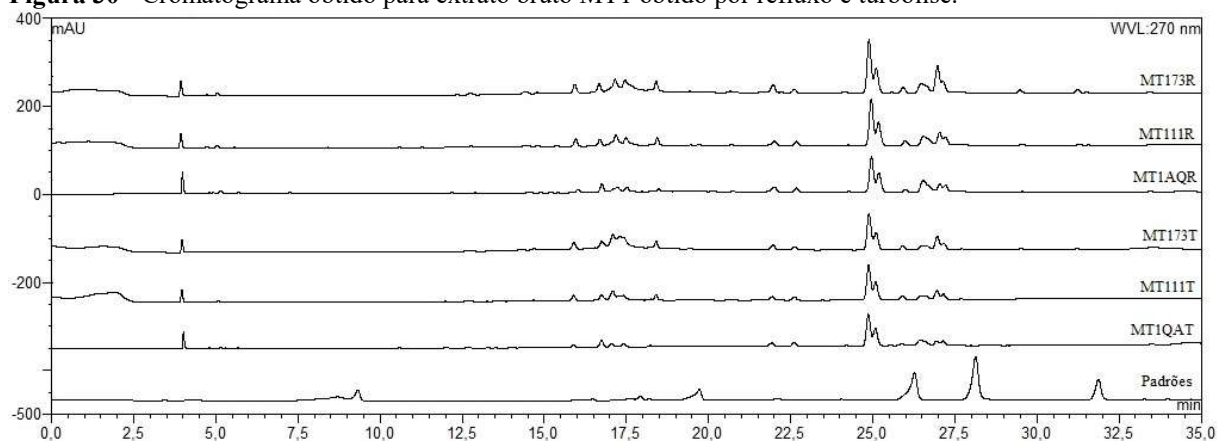
CJ2: Cajueiro amostra 2; AQ: Aquoso; 11: acetona:água (1:1); 73: acetona:água (7:3); T: Turbólise; R: Refluxo.
Fonte: Dados do próprio autor

Figura 29 - Cromatograma obtido para extrato bruto GR1 obtido por refluxo e turbólise.



GR1: Graviola amostra 1; AQ: Aquoso; 11: acetona:água (1:1); 73: acetona:água (7:3); T: Turbólise; R: Refluxo.
Fonte: Dados do próprio autor

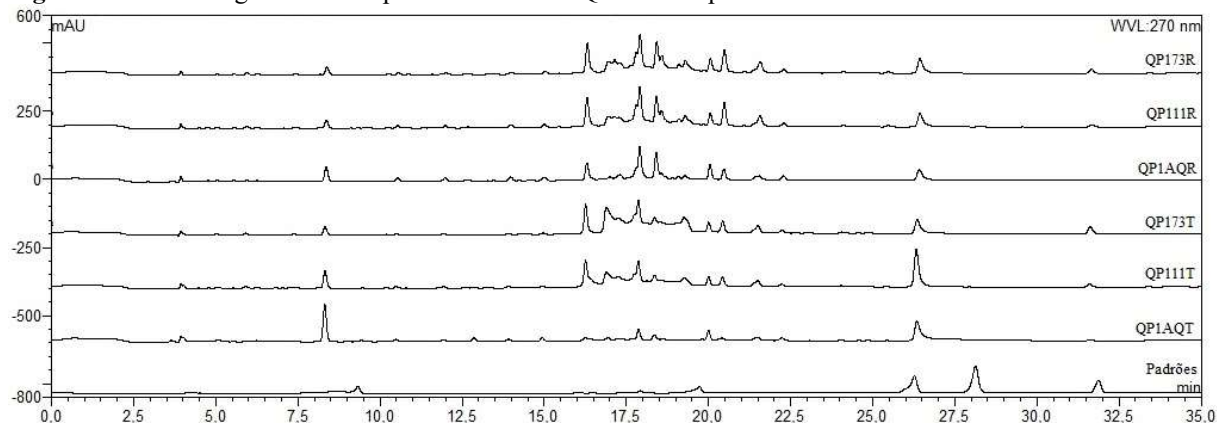
Figura 30 - Cromatograma obtido para extrato bruto MT1 obtido por refluxo e turbólise.



MT1: Mutamba amostra 1; AQ: Aquoso; 11: acetona:água (1:1); 73: acetona:água (7:3); T: Turbólise; R: Refluxo.

Fonte: Dados do próprio autor

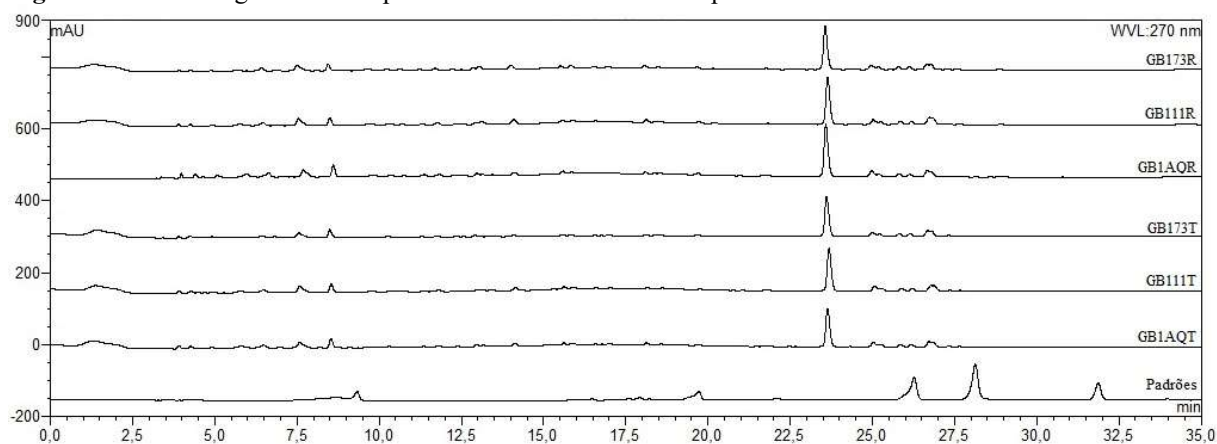
Figura 31 - Cromatograma obtido para extrato bruto QP1 obtido por refluxo e turbólise.



QP1: Quebra-Pedra amostra 1 AQ: Aquoso; 11: acetona:água (1:1); 73: acetona:água (7:3); T: Turbólise; R: Refluxo.

Fonte: Dados do próprio autor

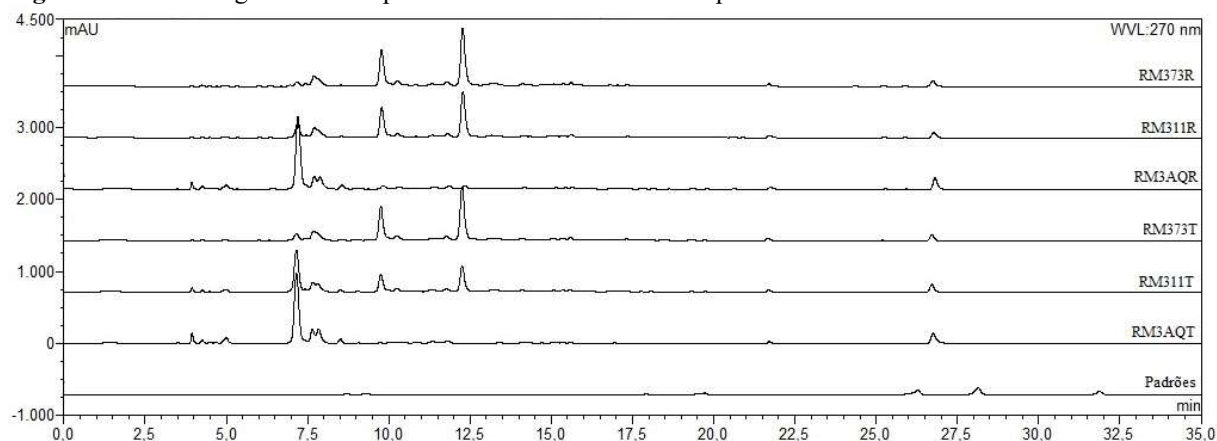
Figura 32 - Cromatograma obtido para extrato bruto GB1 obtido por refluxo e turbólise.



GB1: Goiaba amostra 1; AQ: Aquoso; 11: acetona:água (1:1); 73: acetona:água (7:3); T: Turbólise; R: Refluxo.

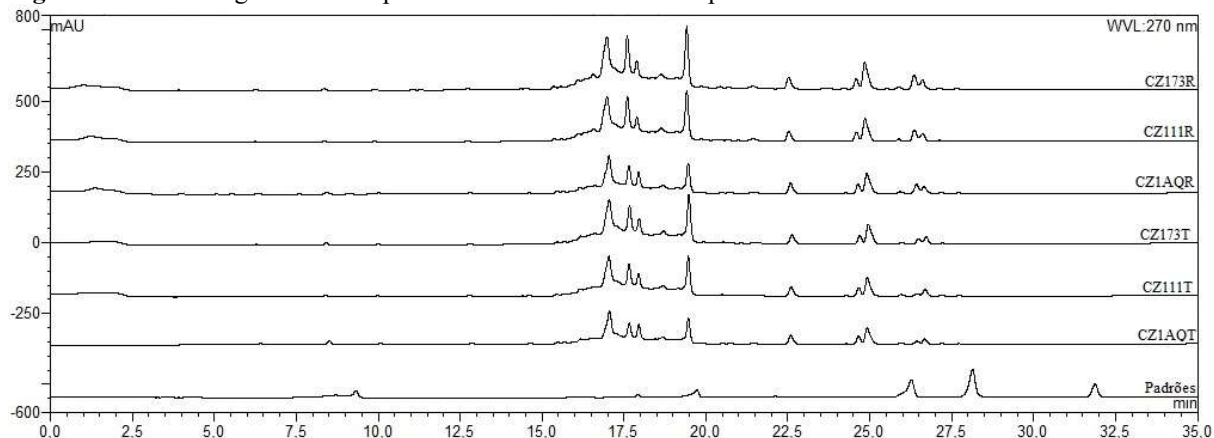
Fonte: Dados do próprio autor

Figura 33 - Cromatograma obtido para extrato bruto RM3 obtido por refluxo e turbólise.



RM3: Romã amostra 3; AQ: Aquoso; 11: acetona:água (1:1); 73: acetona:água (7:3); T: Turbólise; R: Refluxo.
Fonte: Dados do próprio autor

Figura 34 - Cromatograma obtido para extrato bruto CZ1 obtido por refluxo e turbólise.



CZ1: Cajá amostra 1; AQ: Aquoso; 11: acetona:água (1:1); 73: acetona:água (7:3); T: Turbólise; R: Refluxo.
Fonte: Dados do próprio autor

5.4.3 Análise Quantitativa de Polifenóis nos Extratos Brutos por CLAE-DAD

A CLAE é uma das principais alternativas analítica para avaliação de metabólitos secundários em materiais vegetais. Para a análise de polifenóis, as condições mais utilizadas incluem fase reversa empregando colunas C_{18} e como fases móveis combinações de metanol/acetonitrila e água, frequentemente acidificados. Os ácidos mais utilizados para acidificar as fases são: ácidos fórmico, ácido acético, ácido fosfórico e tetrahydrofurano em concentrações de no máximo 3% (v/v). Dentre eles os mais utilizados são os ácidos fosfórico e trifluoracético (ARAPITSAS, 2012; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Os resultados obtidos pela análise por CLAE-DAD (Tabela 11) corroboram com os já encontrados por CCD e pelo doseamento por espectrofotometria UV-Vis, confirmando a presença dos marcadores de forma qualitativa e quantitativa.

Tabela 11 - Teor de marcadores (%m/m) obtidos por CLAE nos extratos brutos.

Espécie	EB	CAT	AG	AE	FT	DCT
<i>A. occidentale</i>	CJ2AQT	1,18 (0,21)	0,64 (0,14)	-	1,39 (0,22)	-
	CJ211T	1,31 (0,78)	0,66 (0,23)	-	2,92 (0,84)	-
	CJ273T	1,25 (0,99)	0,41(0,29)	-	3,35 (0,82)	-
<i>A. muricata</i>	GR1AQT	-	3,08 (0,29)	0,52 (0,96)	1,09 (0,31)	0,23 (0,15)
	GR111T	-	-	-	1,78 (0,79)	-
	GR173T	-	-	-	1,71 (0,12)	-
<i>G. ulmifolia</i>	MT1AQT	-	-	-	2,87 (0,29)	-
	MT111T	-	-	-	2,95 (0,18)	-
	MT173T	-	-	-	3,05 (0,83)	-
<i>P. niruri</i>	QP1AQT	-	1,44 (0,17)	0,81 (0,12)	-	0,69 (0,10)
	QP111T	-	0,71 (0,56)	1,24 (0,31)	-	0,62 (0,26)
	QP173T	-	0,38 (0,86)	0,63 (0,30)	-	0,60 (0,36)
<i>P. guajava</i>	GB1AQT	-	0,33 (0,52)	-	2,29 (0,48)	-
	GB111T	-	0,31 (0,15)	-	2,56 (0,35)	-
	GB173T	-	0,30 (0,23)	-	2,39 (0,66)	-
<i>P. granatum</i>	RM3AQT	-	-	0,37 (0,53)	-	-
	RM311T	-	-	0,30 (0,10)	-	-
	RM373T	-	-	0,26 (0,63)	-	-
<i>S. mombin</i>	CZ1AQT	-	0,16 (0,65)	-	1,87 (0,29)	0,16 (0,65)
	CZ111T	-	0,12 (0,60)	-	1,75 (0,18)	0,18 (0,73)
	CZ173T	-	0,12 (0,45)	-	1,53 (0,83)	0,12 (0,45)

EB: Extrato Bruto; CAT: Catequina; AG: Ácido gálico; AE: Ácido elágico; FT: Flavonoides Totais, calculados como rutina; DCT: Derivados Cinâmicos Totais, calculados como ácido clorogênico.

Os dados foram expressos como média (desvio padrão relativo percentual).

Fonte: Dados do próprio autor

5.4.4 Atividade Citotóxica dos extratos brutos obtidos por turbólise (EBT): pelo método do MTT

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com atividade (95 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50 %) (RODRIGUES et al., 2014).

As amostras na concentração de 50 µg/mL apresentaram citotoxicidade frente às linhagens testadas conforme tabela 12.

Tabela 12 – Percentual (%) de inibição frente ao ensaio de citotoxicidade dos EB.

Amostras	% Inibição							
	Hep-2	EPM	NCI-H292	EPM	MCF-7	EPM	HL-60	EPM
CJ1AQT	5,53	0,13	9,15	0,18	18,25	0,15	22,75	0,18
CJ111T	7,73	0,19	6,98	0,32	6,83	0,51	11,18	0,68
CJ173T	29,75	1,00	20,50	0,13	21,25	0,18	33,00	1,10
CJ2AQT	25,75	0,63	23,25	1,08	22,75	1,70	37,25	2,28
CJ211T	4,15	0,03	2,23	0,03	5,75	0,08	9,00	0,03
CJ273T	70,25	2,85	78,25	2,48	36,75	1,78	75,25	1,90
CJ3AQT	11,3	0,9	6,7	0,8	10,3	1,3	13,7	1,1
CJ311T	53,1	1,9	58,3	2,1	49,2	1,9	51,4	1,35
CJ373T	5,5	0,6	7,9	0,6	7,6	0,8	18,5	0,9
GR1AQT	10,9	0,7	12,8	0,6	13,9	0,8	9,8	0,5
GR111T	13,5	1,4	9,6	1,1	5,2	0,6	29,0	0,7
GR173T	31,1	2,0	15,7	1,7	26,5	1,7	66,1	2,2
GR2AQT	48,8	5,8	22,1	2,0	16,5	1,4	71,5	1,6
GR211T	0,3	0,1	0,2	0,1	1,2	0,2	3,2	0,9
GR273T	22,3	2,9	17,1	2,3	23,6	1,5	50,0	2,3
GR3AQT	17,1	2,0	7,7	0,7	5,8	0,5	25,0	0,6
GR311T	14,2	2,0	11,2	1,4	5,0	0,3	26,0	0,5
GR373T	16,3	1,1	20,5	1,3	28,2	0,7	37,0	1,2

Continuação Tabela 12 – Percentual (%) de inibição frente ao ensaio de citotoxicidade dos EB.

MT1AQT	10,45	0,90	7,45	0,44	5,65	0,50	19,85	0,45
MT111T	46,62	3,06	72,68	3,78	80,64	1,98	85,66	3,42
MT173T	22,32	2,88	17,10	2,34	23,58	1,48	50,04	2,34
MT2AQT	13,55	1,60	6,15	0,55	4,59	0,38	19,85	0,45
MT211T	15,84	1,78	22,50	1,75	21,78	2,34	52,92	2,70
MT273T	10,75	1,15	7,60	0,85	4,10	0,48	23,05	0,55
MT3AQT	32,22	2,52	19,26	2,34	29,34	3,78	39,24	3,24
MT311T	31,14	1,98	15,66	1,69	26,46	1,67	66,06	2,16
MT373T	11,30	1,55	8,90	1,15	3,95	0,21	20,60	0,40
QP1AQT	15,8	1,8	22,5	1,7	21,8	2,3	52,9	2,7
QP111T	32,2	2,5	19,3	2,3	29,3	3,8	39,2	3,2
QP173T	17,33	1,49	12,35	0,72	9,37	0,83	32,91	0,75
QP2AQT	18,74	2,57	14,76	1,91	6,55	0,35	34,15	0,66
QP211T	17,82	1,91	12,60	1,41	6,79	0,80	38,22	0,91
QP273T	0,20	0,07	0,26	0,07	0,18	0,07	2,84	0,33
QP3AQT	0,14	0,05	0,09	0,06	0,56	0,10	1,48	0,41
QP311T	22,47	2,65	10,20	0,91	7,60	0,62	32,91	0,75
QP373T	14,34	0,91	7,21	0,78	12,19	0,77	30,42	0,99
GB1AQT	7,30	0,82	10,36	0,80	10,03	1,08	24,37	1,24
GB111T	14,84	1,16	8,87	1,08	13,51	1,74	18,07	1,49
GB173T	10,28	1,33	7,88	1,08	10,86	0,68	23,05	1,08
GB2AQT	4,39	0,07	6,55	0,05	5,06	0,07	9,45	0,17
GB211T	21,47	1,41	27,03	1,74	37,14	0,91	48,66	1,58
GB273T	14,34	0,91	16,83	0,80	18,24	0,99	12,93	0,62
GB3AQT	64,16	0,79	67,31	1,08	59,52	1,99	66,82	2,40
GB311T	48,78	5,76	22,14	1,98	16,51	1,35	71,46	1,62
GB373T	0,31	0,11	0,20	0,13	1,22	0,22	3,20	0,90

Continuação Tabela 12 –Percentual (%) de inibição frente ao ensaio de citotoxicidade dos EB.

RM1AQT	12,95	0,85	16,30	1,05	22,40	0,55	29,35	0,95
RM111T	2,65	0,04	3,95	0,03	3,05	0,05	5,70	0,10
RM173T	38,70	0,48	40,60	0,65	35,90	1,20	40,30	1,45
RM2AQT	8,65	0,55	4,35	0,47	7,35	0,47	18,35	0,60
RM211T	0,09	0,03	0,06	0,04	0,34	0,06	0,89	0,25
RM273T	8,95	0,70	5,35	0,65	8,15	1,05	10,90	0,90
RM3AQT	6,20	0,80	4,75	0,65	6,55	0,41	13,90	0,65
RM311T	4,40	0,50	6,25	0,49	6,05	0,65	14,70	0,75
RM373T	8,65	0,55	10,15	0,48	11,00	0,60	7,80	0,38
CZ1AQT	3,65	0,02	1,96	0,02	5,06	0,07	7,92	0,02
CZ111T	4,86	0,11	8,05	0,15	16,06	0,13	20,02	0,15
CZ173T	22,66	0,55	20,46	0,95	20,02	1,50	32,78	2,00
CZ2AQT	21,08	0,86	17,48	0,74	11,03	0,53	22,58	0,57
CZ211T	26,18	0,88	18,04	0,11	18,70	0,15	29,04	0,97
CZ273T	61,82	2,51	51,26	2,18	32,34	1,56	66,22	1,67
CZ3AQT	1,66	0,04	2,75	0,05	5,48	0,05	6,83	0,05
CZ311T	1,25	0,01	0,67	0,01	1,73	0,02	2,70	0,01
CZ373T	8,93	0,30	6,15	0,04	6,38	0,05	9,90	0,33
Doxorrubicina	52,6	1,2	70,1	0,5	73,2	0,6	81,3	0,9

HEp-2 (carcinoma de laringe humana); NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano); MCF-7 (câncer de mama humano) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda).

Fonte: Dados do próprio autor.

Para as amostras relacionadas na tabela 12 que apresentaram atividade moderada (> 70% de inibição), foi determinada a concentração que inibe 50 % do crescimento em relação ao controle negativo (CI₅₀) empregando concentrações dentro da faixa de 0.098 e 50 µg/mL. A doxorrubicina (0.009 - 1.25 µg/mL) foi utilizada como padrão. A CI₅₀ e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear em programa computacional e estão apresentados na tabela 13.

Dessa forma, as amostras de extrato bruto que apresentaram uma melhor atividade citotóxica foram as amostras CJ273T (extrato bruto das folhas de caju amostra 2 extraída com acetona:água 7:3 por turbólise) e MT111T (extrato bruto das folhas de mutamba amostra 1 extraída com acetona:água 1:1 por turbólise).

Tabela 13 - Citotoxicidade das amostras CJ273T e MT111T.

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL) Intervalo de confiança			
	NCI-H292	HEp-2	MCF-7	HL-60
CJ273T	22,3	15,3	8,2	12,5
	17,2 -26,4	10,8 – 19,2	3,9 -11,8	9,6 – 15,2
MT111T	8,2	18,6	6,3	9,4
	7,4 -13,7	14,9 – 22,1	3,3 -9,2	5,8 - 14,1
	4,4 -10,1	8,3 – 15,6	8,2 – 14,7	5,4 – 8,9
Doxorrubicina	0,08	0,31	0,11	0,06
	0,06 – 0,12	0,26 – 0,36	0,08 - 0,15	0,05 – 0,07

HEp-2 (carcinoma de laringe humana); NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano); MCF-7 (câncer de mama humano) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda).

Fonte: Dados do próprio autor.

5.4.5 Atividade Antimicrobiana dos extratos brutos obtidos por turbólise

Todas as espécies incluídas neste estudo apresentam diversos relatos de uso tradicional muito difundido na população da região Nordeste. De uma forma geral, as principais propriedades descritas para estas plantas são: antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antidiabético, antitérmica entre outras. A literatura ainda relata que uma boa parte destas espécies encontra aplicação no tratamento de distúrbios gastrointestinais (AGRA et al., 2007; MATOS, 2007; SILVA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007a; BOUQUET; DEBRAY, 1974; AYOKA et al., 2008; DUARTE, DRANKA, YANO, 2011; CONSOLACION et al., 2012; VIANA, LEAL, VASCONCELOS, 2013).

Considerando a relevância destas espécies, os extratos obtidos por turbólise foram submetidos aos ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica

As tabelas 14 e 15 resumem os resultados obtidos para o potencial antibacteriano e antifúngico, respectivamente, dos extratos avaliados.

Os dados obtidos para as amostras de *A. occidentale* revelaram que não foi detectada atividade para qualquer uma das cepas de bactérias utilizadas. Por outro lado, todas as leveduras testadas (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) apresentaram alguma sensibilidade à *A. occidentale*.

As amostras de *A. muricata* apresentaram atividade antibacteriana para quase todas as cepas testadas, com exceção da *S. marcescens*. A atividade antifúngica para os extratos de *A. muricata* só foi detectada para *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Os extratos de *G. ulmifolia* apresentaram propriedade antibacteriana frente às cepas utilizadas, com exceção da cepa de *S. marcescens*, que não foi sensível aos extratos da espécie. Comportamento oposto foi observado para a avaliação da atividade antifúngica, para

o qual todas as amostras de *G. ulmifolia* apresentaram atividade para todas as cepas de leveduras testadas.

Em relação as amostras de *P. niruri*, os extratos apresentaram atividade antibacteriana para *S. aprophyticus* e *S. aureus* e antifúngicas para *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Os extratos das amostras de *P. guajava* apresentaram atividade contra as cepas de *S. saprophyticus* e *S. aureus*. A atividade do quebra-pedra nos ensaio antifúngico revelou que a espécie foi ativa contra as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Exceto pela cepa de *S. marcescens*, todas as cepas de bactérias foram sensíveis às amostras de *P. granatum*. Já diante das cepas de leveduras, a espécie apresentou importante atividade antifúngica. Entretanto, apenas o extrato RM373T foi eficaz frente as cepas de *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Neste caso, ao lado da origem geográfica das amostras, a composição química do extrato resultante da combinação do solvente extrator pode ter sido o principal responsável pela resposta biológica

Por fim, a *S. mombin* também apresentou amplo espectro de atividade antibacteriana. Para esta espécie, as exceções ficaram por conta da ausência de atividade para a cepa *S. marcescens*, e a atividade contra a cepa de *E. coli* foi restrita ao extrato CZ1AQT. Considerando a propriedade antifúngica, a espécie foi ativa para as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Em síntese, os dados encontrados reforçam a hipótese acerca das indicações populares sobre o uso tradicional de espécies vegetais na terapêutica. O potencial das espécies vegetais, mesmo aquelas já estudadas, pode ser atribuído à variabilidade das condições de crescimento (distribuição geográfica, solo, clima, estágio de desenvolvimento, entre outros); que permite perfis de metabólitos secundários distintos, ou suficientemente diferentes, para a manifestação de uma ou outra propriedade terapêutica. Ademais, os processos de transformação e extração a partir das matérias primas são responsáveis pela importante orientação do perfil químico final e que também podem levar à produtos com atividades específicas ou mais pronunciadas.

Tabela 14 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima (mg/mL) dos extratos brutos contra bactérias.

Espécie	Amostra	<i>E. coli</i>		<i>S. saprophyticus</i>		<i>S. marcescens</i>		<i>S. aureus</i>	
		CIM ₅₀	CBM	CIM ₅₀	CBM	CIM ₅₀	CBM	CIM ₅₀	CBM
<i>A. occidentale</i> L.	CJ2AQT	X	NA	X	NA	X	NA	X	NA
	CJ211T	X	NA	X	NA	X	NA	X	NA
	CJ273T	X	NA	X	NA	X	NA	X	NA
<i>A. muricata</i> L.	GR1AQT	X	NA	0,4	X	X	NA	0,025	X
	GR111T	X	NA	0,025	X	X	NA	0,025	X
	GR173T	0,4	0,8	0,05	X	X	NA	0,025	X
<i>G. ulmifolia</i> Lam	MT1AQT	0,8	X	0,05	X	X	NA	0,4	X
	MT111T	0,1	0,4	0,0125	0,8	X	NA	0,025	X
	MT173T	0,05	0,4	0,0125	0,8	X	NA	0,025	X
<i>P. niruri</i> L.	QP1AQT	X	NA	X	NA	X	NA	0,1	X
	QP111T	X	NA	0,025	X	X	NA	0,025	X
	QP173T	X	NA	0,0125	X	X	NA	0,025	X
<i>P. guajava</i> L.	GB1AQT	0,2	X	0,0125	X	X	NA	0,025	0,8
	GB111T	0,1	0,8	0,0125	0,8	0,8	X	0,025	X
	GB173T	X	NA	0,0125	X	0,8	X	0,025	0,8
<i>P. granatum</i> L.	RM3AQT	0,8	X	0,0125	X	X	NA	0,0125	0,8
	RM311T	0,2	X	0,0125	0,4	X	NA	0,0125	0,8
	RM373T	0,2	0,8	0,0125	0,8	X	NA	0,0125	0,8
<i>S. mombin</i> Jacq.	CZ1AQT	0,4	0,8	0,0125	X	X	NA	0,025	0,8
	CZ111T	X	NA	0,0125	0,8	X	NA	0,025	0,4
	CZ173T	X	NA	0,0125	X	X	NA	0,025	0,4

CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; X = Não apresentou inibição; NA = Não Analisado.

Fonte: Dados do próprio autor.

Tabela 15 - Concentração Inibidora Mínima e Concentração Fungicida Mínima (mg/mL) de extratos brutos contra leveduras de *Candida* spp.

Espécie	Amostra	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. parapsilosis</i>	
		CIM ₅₀	CFM	CIM ₅₀	CFM	CIM ₅₀	CFM	CIM ₅₀	CFM
<i>A. occidentale</i> L.	CJ2AQT	0,3125	0,625	0,625	X	0,3125	0,625	0,625	X
	CJ211T	0,625	X	0,625	X	0,625	X	0,625	X
	CJ273T	0,3125	X	0,3125	0,5	0,3125	X	0,3125	0,5
<i>A. muricata</i> L.	GR1AQT	0,8	X	X	NA	0,8	X	X	NA
	GR111T	0,8	X	X	NA	0,8	X	X	NA
	GR173T	0,8	X	X	NA	0,8	X	X	NA
<i>G. ulmifolia</i> Lam	MT1AQT	0,125	X	0,25	X	0,125	X	0,25	X
	MT111T	0,5		0,25	X	0,5		0,25	X
	MT173T	0,25	X	0,125	X	0,25	X	0,125	X
<i>P. niruri</i> L.	QP1AQT	0,8	X	X	NA	0,8	X	X	NA
	QP111T	0,8	X	X	NA	0,8	X	X	NA
	QP173T	0,8	X	X	NA	0,8	X	X	NA
<i>P. guajava</i> L.	GB1AQT	0,1	X	X	NA	0,1	X	X	NA
	GB111T	0,1	X	X	NA	0,1	X	X	NA
	GB173T	0,2	X	X	X	0,2	X	X	X
<i>P. granatum</i> L.	RM3AQT	0,1	X	X	X	0,1	X	X	X
	RM311T	0,0125	X	X	X	0,0125	X	X	X
	RM373T	0,0125	X	0,025	X	0,0125	X	0,025	X
<i>S. mombin</i> Jacq.	CZ1AQT	0,8	X	X	NA	0,8	X	X	NA
	CZ111T	0,8	X	X	X	0,8	X	X	X
	CZ173T	0,8	X	X	X	0,8	X	x	X

CIM = Concentração Inibitória Mínima; CFM = Concentração Fungicida Mínima; NA = Não Analisado.

Fonte: Dados do próprio autor.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A análise qualitativa química de drogas vegetais de espécies medicinais brasileiras indicaram similiaridades que podem servir como referência para que sejam utilizadas com o objetivo de controle de qualidade. Além disso, os perfis químicos obtidos podem fornecer referências confiáveis para a avaliação da composição complexa das matrizes. Uma vez que os materiais à base de plantas foram autenticados e identificados botanicamente, as impressões digitais (CCD e/ou CLAE) permitiram a detecção de pequenas diferenças devido à sua variabilidade intrínseca a partir de matrizes biológicas e/ou condições de crescimento. Por outro lado, a maioria das impressões digitais mostrou semelhanças importantes devido a vários sinais comuns (bandas/picos), que podem ser utilizados como referências para padronizar os produtos à base de plantas. Assim, este estudo cromatográfico contribui para o desenvolvimento de parâmetros de qualidade adicionais para a padronização química de tais materiais fitoterápicos, a fim de assegurar a reprodutibilidade da atividade durante os ensaios biológicos.

A análise quantitativa das espécies estudadas e de seus respectivos extratos apresentaram pequenas variações em amostras da mesma espécie quando adquiridas de locais diferentes, mostrando mais uma vez que um conjunto de fatores podem influenciar na produção desses metabólitos secundários. E quando associados aos perfis químicos irão auxiliar a identificação dessas espécies permitindo assegurar a complexidade química da matriz que está diretamente relacionada à padronização dos teores, e que podem servir como parâmetro durante um controle de processo produtivo.

Os ensaios de citotoxicidade e o de atividade antimicrobiana são indicativos e preliminares para a busca de um uso seguro e eficaz das espécies associado com o uso tradicional às quais já são empregadas.

Como possibilidades futuras propõem-se utilizar essas informações obtidas nesse estudo como um banco de dados de impressões digitais que servirão como guia para estudos dessas espécies, e assim serão como um modelo para dar prosseguimento de estudos semelhantes com outras espécies utilizadas tradicionalmente, e aumentar o acervo dessas informações obtidas através das impressões digitais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial Potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. **Phytotherapy Research**, v.13, p.494–7, 1999.
- ACCIOLY, M. P.; et al. Leishmanicidal activity *in vitro* of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions. **Veterinary parasitology**, v. 187, p. 79-84, 2012.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AJILEYE, O. O.; OBUOTOR, E.M.; AKINKUNMI, E. O.; ADEROGBA, M. A. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University: Science**, v. 27, n. 3, p. 244–252, 2015.
- ALAJMI, M. F., ALAM, P. HPTLC fingerprint and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of different *Maytenus* species grown in Kingdom of Saudi Arabia. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3(5), p. 341-347, 2013.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M. LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007a.
- ALBURQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; RAMOSA, M. A.; AMORIM, E. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 76–91, 2007b.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; DZERWUINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.
- ALPER, N.; ONSEKIZOGLU, P.; ACAR, J. Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and organic acid compositions of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 35, p. 313–319, 2011.
- ALVES, L. D. S.; ROLIM, L. A.; FONTES, D. A. F.; ROLIM-NETO, P. J.; LA ROCA, M. F.; SOARES SOBRINHO, J. L. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.
- AMYRGIALAKI, E.; MAKRIS, D. P.; MAUROMOUSTAKOS, A.; KEFALAS, P. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 216–222, 2014.

ANAND, G.; RAVINANTHAN, M.; BASAVIAH, R. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 7, n. 1, 2015.

ANDRADE-CETTO A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 99, p. 325-348, 2005.

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

AROKIYARAJ S., RADHA, R., MARTIN S., et al. Phytochemical analysis and anti-diabetic activity of *Cadaba fruticosa* R. Br. **Indian Journal of Science Technology**, v.1, n.6, p.1-4, 2008.

ASUQUO, O. R. et al. Comparative Study of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Spondias mombim* on neuro behaviour in male rats. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 5, p. 29-35, 2013.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; AKINSOMISOYE, O. S.; UKPONMWAN, O. E. Medicinal and economic value of *Spondias mombim*. **African Journal of Biomedical Research**, v.11, p. 129–36, 2008.

BAPTISTEL, A. C.; COUTINHO, J. M. C. P.; LINS NETO, E. M. F.; MONTEIRO, J. M. Plantas medicinais utilizadas na Comunidade Santo Antônio, Currais, Sul do Piauí: um enfoque etnobotânico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.406-425, 2014.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 258-285, 2006.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 392-413, 2005.

BASSANI, V. L.; PEETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de produtos farmacêuticos a partir de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed. p. 129-145, 2017.

BOUQUET, A.; DEBRAY, M. Plantes médicinales de la Côte-d'Ivoire. **Orstom Paris**, v.32, p. 15–6, 1974.

BRAGA, F. C.; RATES, S. M. K.; SIMÕES, C. M. O. Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed. p. 53-68, 2017.

BRASIL, Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRAZ, R.; WOLF, L. G.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1111–1118, 2012.

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685, 2012.

CABRAL, B.; SIQUEIRA, E. M. S.; BITENCOURT, M. A. O.; LIMA, M. C. J. S.; LIMA, A. K.; ORTMANN, C. F.; CHAVES, V. C.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; ROCHA, H. A. O.; SCORTECCI, K. C.; REGINATTO, F. H.; GIORDANI, R. B.; ZUCOLOTO, S. M. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 304–311, 2016.

CARABALLO, A.; CARABALLO, B.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n.2, p. 186-8, 2004.

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

CHANG, C.; HSIEH, C.; WANG, H.; PENG, C.; CHYAU, C.; PENG, R. Y. Unique bioactive polyphenolic profile of guava (*Psidium guajava*) budding leaf tea is related to plant biochemistry of budding leaves in early dawn. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 944-954, 2013.

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

CONSOLACION, R.; GENEVEVE, S.; TORRES, O. B.; MING-JAW, D.; CHIEN-CHANG, S. Acetogenins from *Annona muricata*. **Pharmacognosy Journal**, v. 4, p. 32-37, 2012.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional, v. I a IV, 1984

CORTHOUT, J. et al. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1129-30, 1991.

DAKAPPA-SHRUTHI, S., ADHIKARI, R., TIMILSINA, S.S., SAJJEKHAN, S. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 3, 162–168, 2013.

DE SOUZA, T. P.; HOLZSCHUH, M. H.; LIONÇO, M. I.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.;

PETROVICK, P. R. Validation of a LC method for the analysis of phenolic compounds from aqueous extract of *Phyllanthus niruri* aerial parts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 2, p. 351–356, 2002.

DUARTE, M. R.; DRANKA, E. R. K. YANO, M. Análise microscópica foliar de mutamba (*Guazuma ulmifolia* LAM., Malvaceae). **Visão Acadêmica.**, v.12, p. 7-17, 2011.

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

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 381-391, 2005.

FAN, X. H., CHENG, Y. Y., YE, Z. L., LIN, R. C., QIAN, Z. Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 217–224, 2006.

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.

FIGUEREDO, C. V., GURGEL, I. G. D., GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

GALINA, K. J.; SAKURAGUI, K. M.; BORGUEZAM ROCHA, J. C.; LORENZETTI, E. R.; PALAZZO DE MELLO, J. C. Contribuição ao estudo farmacognóstico da mutamba (*Guazuma ulmifolia* - Sterculiaceae), **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 225-233, 2005.

GANGADEVI, V.; YOGESWARI, S.; KAMALRAJ, S.; RANI, G.; MUTHUMARI, J. The antibacterial activity of *Acalpha indica* L. **Indian Journal of Science Technology**, v.1, n.6, p.1-5, 2008.

GAVAMUKULYA, Y.; ABOU-ELELLA, F.; WAMUNYOKOLI, F. AEL-SHEMY, H. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**, v. 7, p. S355-S363, 2014.

GEORGE, V. C.; KUMAR D. R.; RAJKUMAR, V.; SURESH P. K.; ASHOK, K. Quantitative assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic leaf extract of *Annona muricata* Linn. in normal and immortalized human cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 699–704, 2012.

GEORGE, V. C.; KUMAR D. R.; SURESH, P. K.; KUMAR, R. A. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2328–2335, 2014.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3ª edição, São Paulo: Pharmabooks, 2010.

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

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOMATHI, D., VIKUMAR, G., KALAISELVI, M., VIDYA, B., UMA, C., HPTLC fingerprinting analysis of *Evolvulus alsinoides* (L.) L., **Journal of Acute Medicine**, v. 2, p. 77-82, 2012.

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

GOVINDARAGHAVAN, S.; HENNEL, J. R.; SUCHER, N. J. From classical taxonomy to genome and metabolome: Towards comprehensive quality standards for medicinal herb raw materials and extracts. **Fitoterapia**, v. 83, n. 60, p. 978-988, 2012.

GUTIERREZ, R.M., MITCHELL, S., SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 117, p. 1–27, 2008.

HARIPRASAD, P.; RAMKRISHNAN, N. Chromatographic finger print analysis of *Rumex vesicarius* L. by HPTLC technique. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S57-S63, 2012.

HARRIS, D. C., **Quantitative Chemical Analysis**, 6 ed., W.H. Freeman Media, Bedford, New York, USA, 2003.

HASLAM, E. LILLEY, T. H., CAI, Y., MARTIN, R., MAGNOLATO, D. Traditional herbal medicines – The role polyphenols. **Planta Médica**, v. 55, p. 1-8, 1989.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

ITF. **Índice Terapêutico Fitoterápico**. 1. Ed. Petropolis, EPUB, 2008.

JAIN, V.; MURUGANANTHAN, G.; DEEPAK, M.; VISWANATHA, G. L.; MANOHAR, D. Isolation and Standardization of Various Phytochemical Constituents from Methanolic Extracts of Fruit Rinds of *Punica granatum*. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v. 9, n. 6, p. 414-420, 2011.

Jl, Y .B., XU, Q. S., HU, Y. Z., HEYDEN, Y. V., **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 97–104, 2005.

JOSHI, D. D. **Herbal Drugs and Fingerprints: Evidence Based Herbal Drugs**. Springer: India, 2012.

KAMTCHOUING, P.; SOKENG, D.S.; MOUNDIPA, F. P.; WATCHO, P.; JATSA, B.H.; LONTSI, D. Protective role of *Anacardium occidentale* extract against streptozotocin-induced in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 95-99, 1998.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KOMAROVA, N. I.; ROGACHEV, A. D.; CHERNYAK, E. I.; MOROZOV, S. V.; FOMENKO, V. V.; SALAKHUTDINOV, N. F. Quantitative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamsii* leaves and stems. *Chemistry Natural Compounds*, v.45, n. 1, p. 27-31, 2009.

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

LANGLEY, P. Why a pomegranate? **British of Medicine Journal**, v.321, n.4, p.1153-4, 2000.

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

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

LIU Y.; SUN, X. M.; DI, D. L.; QUAN, J. X.; ZHANG, J.; YANG, X. F. A metabolic profiling analysis of symptomatic gout in human serum and urine using high performance liquid chromatography-diode array detector technique. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 2132-2140, 2011.

LOPES, G. C.; ROCHA, J. C. B.; ALMEIDA, G. C.; MELLO, J. C. P. Condensed Tannins from the Bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1103-1109, 2009.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil** – arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, p.1088, 2001.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-38, 2002.

MAIA, J. G. S., ANDRADE, E. H., ZOBHBI, M. G. B. Volatile Constituents of the Leaves, Fruits and Flowers of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) **Journal of Food Composition And Analysis**, v. 13,227-232, 2000.

MALINI, M. M., LENIN, M., VARALAKSHMI, P. Protective effect of triterpenes on calcium oxalate crystal-induced peroxidative changes in experimental urolithiasis. **Pharmacological Research** v. 41: p. 413-418, 2000.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos

para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2, p. 74-76, 2005.

MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2785-2797, 2007.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 4. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2002.

MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 3ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 2007.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed. p. 236-248, 2017.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDONÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; ROLIM NETO, P. J.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pelucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.32, n.1, p. 121-125, 2011.

MICHELIN; D.C.; MORESCHI; P. E.; LIMA; A. C.; NASCIMENTO; G. G. G.; PAGANELLI; M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MONTANARI, R. M., BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., SILVA, C. J. ANDRADE, N. J., ISMAIL, F. M. D. BARBOSA, M. C. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. **Molecules**, v. 17, p. 9728-9740, 2012.

MORAIS, S. M.; CALIXTO-JÚNIOR, J. T.; RIBEIRO, L. M.; SOUSA, H. A.; SILVA, A. A. S.; FIGUEIREDO, F. G.; MATIAS, E. F. F.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MORIAS-BRAGA, M. F. B.; COUTINHO, H. D. M. Phenolic composition and antioxidant, anticholinesterase and antibiotic-modulating antifungal activities of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) ethanol extract. **South African Journal of Botany**, v. 110, p. 251–257, 2017

MORAIS-BRAGA, M.F.B.; CARNEIRO, J.N.P.; MACHADO, A.J.T.; SALES, L.; ANTONIA, T.L.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; MENEZES, I.R.A.; SOUZA, D.S.L. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 302-313, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA E SILVA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências. Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.2, p. 145-150, 2008.

- NAWWAR, M.; AYOUB, N.; HUSSEIN, S.; HASHIM, A.; EL-SHARAWY, R.; WENDE, K.; HARMS, M.; LINDEQUIST, U. A flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 5, p. 761–767, 2012.
- NETO, F. R. G.; ALMEIDA, G. S. S. A.; JESUS, N. G.; FONSECA, M. R. Estudo Etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Sisal no município de Catu, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.16, n.4, p.856-865, 2014.
- NEURATH, A.R. et al. *Punica granatum* (pomegranate) juice provides an HIV-I entry inhibitor and candidate topical microbicide. **BMC Infectious Diseases**, v.4, n.41, p.1-12, 2004.
- NICOLETTI, M. HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of Botanicals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 818-823, 2011.
- NJOKU, P.C., AKUMEFALA, M.I. Phytochemical and nutrient evaluation of *Spondias mombin* leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.6, p.613–615, 2007.
- OLAJIDE, O. A.; ADEROGBA, M.A.; ADEDAPO, A.D.; MAKINDE, J.M. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on in vivo inflammatory models. **J Ethnopharmacol**, v.95, p.139-142, 2004.
- OLIVEIRA, F., SALTO, M. L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2/4, p. 170-196, 1987/1989.
- OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, nordeste do Brasil, **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n.2, p. 571-577, 2010.
- OLUGBUYIRO, J. A. O.; MOODY, J. O.; HAMANN, M. T. AntiMtb activity of triterpenoid-rich fractions from *Spondias mombin* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1807-1809, 2009.
- PATIL, J. U.; BIRADAR, S. D. Pharmacognostic Study of *Guazuma ulmifolia*. **International Research Journal Pharmacy**, v. 4, n. 4, p. 130-131, 2013.
- PATRA, K. C.; PARETA, S. K.; HARWANSH, R. K.; KUMAR, K. J. Traditional approaches towards standardization of herbal medicines - A review. **Journal of Pharmaceutial Science and Technology**, v. 2, n. 11, p. 372-379, 2010.
- PERKAMPUS, H. H.; **UV-VIS spectroscopy and its applications**, SpringerVerlag: Berlin, 1992.
- PETRY, R. D.; DE SOUZA, K. C.B, BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonoides totais em extratos em extratos hidroalcóolicos de *Passiflora alata* ryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 79, p. 7-10, 1998.

PINELO, M.; DEL FABBRO, P.; MANZOCCO, L.; NUNEZ, M. J.; NICOLI, M. C. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by products. **Food Chemistry**, v. 92, p. 109–117, 2005.

PRATHAP, B.; AKALANKA, D.; SRINIVASA RAO, G. H.; JOHNSON, P.; ARTHANARISWARAN, P. A Review - Importance of RP-HPLC in Analytical Method Development. **International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 15-23, 2013.

RENISUS. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>, Acessado em oct/2015.

RHODES, P. L.; MITCHELL, J. W.; WILSON, M. W.; MELTON, L. D. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p. 281-286, 2006.

RISHIKA D, SHARMA R. An update of pharmacological activity of *Psidium guajava* in the management of various disorders. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. v. 3, n. 10, p. 3577-3584, 2012.

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

RODRIGUES, F. A. R. et al. Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 83, p. 126-131, 2014.

SENTANDREU, E.; CERDÁN-CALERO, M.; SENDRA, J M. Phenolic profile characterization of pomegranate (*Punica granatum*) juice by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to an electrospray ion trap mass analyzer. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 30, p. 32–40, 2013

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 403-423, 2011.

SHERMA, J. Planar chromatography, review: planar chromatography, **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 4243–4267, 2008.

SILVA, F. V. G.; SILVA, S. M.; SILVA, G. C.; MENDONÇA, R. M. N.; ALVES, R. E.; DANTAS, A. L. Bioactive compounds and antioxidant activity in fruits of clone and ungrafted genotypes of yellow mombin tree. **Food Science and Technology**, v. 32, p. 685–691, 2012.

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

SIMÕES, C. M. O et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6^a ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SMITH J.; NIGEL, H.: **Tropical Forests and their Crops**. Cornell University Press, London 1992.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., DOLAN, J.W., **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, 3 ed., Wiley–Interscience, Hoboken, NJ, USA, 2010.

SOARES, L. A. L.; FARIAS, M. R. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed. p. 83-105, 2017.

SOUSA, M. P.; MATOS, F. J. A; MATOS, M. E. O.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 2004.

SUBBALAKSHMI, C.; MEERABAI, G. Phytochemical diversity and antimicrobial activity of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). **World Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 7, p. 1336-1341, 2016.

TEIXEIRA, S. A.; MELO, J. I. M. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi, Pernambuco, Brasil, **IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre**, v. 61, n. 1-2, p. 5-11, 2006.

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

TONA, L., KAMBU, K., NGIMBI, N., MESIA, K., PENGE, O., LUSAKIBANZA, M., CIMANGA, K., DE BRUYNE, T., APERS, S., TOTTE, J., PIETERS, L., VLIETINCK, A J., Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine**, v.7, p.31–38, 2000.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIANA, G. S. B., LEAL, L. K. A. M., VASCONCELOS, S. M. M. **Plantas medicinais da caatinga: atividades biológicas e potencial terapêutico**. Fortaleza. Expressão Gráfica e Editora, 2013.

VIDYA, L., LENIN, M, VARALAKSHMI, P. Evaluation of the effect of triterpenes on urinary risk factors of stone formation in pyridoxine deficient hyperoxaluric rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 514-518, 2002.

VIDYA, L., MALINI, M.M., VARALAKSHMI, P. Effect of pen-tacyclic triterpenes on oxalate-induced changes in rat erythrocytes. **Pharmacological Research**, v. p. 42: 313-316, 2000.

VOLPATO, A. M. M. **Investigação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**. 2005. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

WAGNER, H.M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. New York: Springer-Verlag, 1996.

WOLFENDER, J. C.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**. v. 1382, p. 136–164, 2015.

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

WOSCH, L.; IMIG, D. C.; CERVI, A. C.; MOURA, B. B.; BUDEL, J. M.; SANTOS, C. A. de M. Comparative study of *Passiflora taxa* leaves: I. A morpho-anatomic profile. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 328–343, 2015.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTI, S. M. Flavonoidesl. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed. p. 209-233, 2017.

APÊNDICE

APÊNDICE - ARTIGO**Chemical Profiles By TLC And HPLC Of Plant Species From Northeast Brazil**

Julia Aparecida Lourenço de Souza^{1,2}, Wliana Alves Viturino da Silva², Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra^{2,3}, Magda Rhayanny Assunção Ferreira^{2,3}, Luiz Alberto Lira Soares^{1,2,3}

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco,

²Department of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Pharmacognosy, Federal University of Pernambuco,

³Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Revista: Pharmacognosy Magazine

JCR: 1.069

Qualis CAPES: B3

Status: Aceito

Chemical Profiles by Thin-layer Chromatography and High-performance Liquid Chromatography of Plant Species from Northeast Brazil

Julia Aparecida Lourenço de Souza^{1,2}, Wiliana Alves Vitorino da Silva², Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra^{1,2}, Magda Rhaiany Assunção Ferreira^{1,2}, Luiz Alberto Lira Soares^{1,2,3}

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, ²Department of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Pharmacognosy, Federal University of Pernambuco, ³Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil
Submitted: 12-06-2017 Revised: 14-07-2017 Published: 177

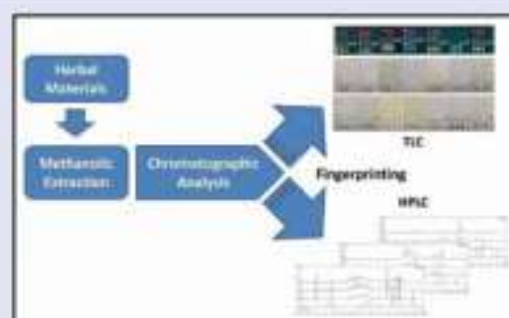
ABSTRACT

Background: Fingerprint analysis plays a key role in quality control of herbal medicines due to its technical capacity to represent the chemical diversity of these complex matrices. Several traditional Brazilian species showed very little data in their chemical profiles. **Objective:** Thus, the purpose of this study was to evaluate the chemical profiles of Brazilian herbal species by thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). **Materials and Methods:** The herbal materials of 7 species (*Anacardium occidentale*, *Annona muricata*, *Guanuma ulmifolia*, *Phyllanthus niruri*, *Passiflora guajava*, *Punica granatum*, and *Spondias mombin*) were collected from three different locations in Northeast Brazil, botanically authenticated and their chemical profile analyzed by TLC (cinnaic acid, flavonoids, and tannins) and by HPLC (polyphenols). **Results:** The chromatographic data showed the similarities between chemical profiles of the sample fingerprints, confirming the presence of several classes of secondary metabolites, as well as the identification of different chemical standards (catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid, gallic acid, quercetin, or rutin). **Conclusion:** The chromatographic profiling of the herbal drugs by TLC and HPLC were successfully characterized and allowed for the identification of promising chemical markers, improving the state of art in the quality control of the herbal species investigated in this study.

Key words: Brazilian medicinal plants, chromatography, fingerprint, quality control

SUMMARY

- Qualitative fingerprints from 7 traditional Brazilian species
- Three collection of each species from different locations in Northeast Brazil
- Development and evaluation of chemical fingerprints by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography



Abbreviations used: HPLC: High-performance liquid chromatography; PVDF: Polyvinylidene fluoride; RP-HPLC: Reverse-phase liquid chromatography; TLC: Thin-layer chromatography; UV-spectrum: Ultraviolet spectrum

Correspondence:

Dr. Luiz Alberto Lira Soares,
Department of Pharmaceutical Sciences,
Laboratory of Pharmacognosy, Federal University
of Pernambuco - UFPE, Prof. Arthur de Sá, 5th,
Cidade Universitária, 50740-521 Recife-PE, Brazil.
E-mail: lals.ufpe@gmail.com
DOI: 10.4103/pm.225_17

Access this article online

Website: www.pharmacogn.azjournals.com

Quick Response Code:



INTRODUCTION

The use of medicinal plants in the prevention and treatment of several diseases has increased worldwide in the last decades. Phytotherapeutic products are the first choice of treatment for most of the population due to easy access either by self-cultivation and/or by purchasing from popular markets.^[1]

Although the phytotherapy is among one of the oldest therapeutic strategies in humanity, there are several problems relating to its safe use, and these are closely linked to the quality of herbal raw materials. The acquisition of high-quality herbal materials is an important challenge and can depend directly on many factors such as cultivation/collocation conditions and procedures, as well as the raw material processing (drying, milling, extraction, etc.).^[2-4]

Therefore, any significant variation in the execution of any of these procedures may propagate throughout the manufacturing chain resulting in deviations in quality of the finished herbal product. Regarding the chemical control of such products and their manufacturing processes, the concept of chemical markers has been widely used until today.^[5]

Although the use of chemical markers is a concept of low complexity, such an approach does not ensure the therapeutic quality of herbal products since the clinical activity of many plants is related to their complex chemical composition. In addition, the active compounds of several medicinal species are still unknown, and the use of one or more markers as an indicator of efficacy or safety can be controversial.^[6] Thus, the detailed chemical profile of the plant or its derived products is

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprints@medknow.com

Cite this article as: Souza JA, Silva WA, Bezerra IC, Ferreira MR, Soares LA. Chemical profiles by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography of plant species from Northeast Brazil. *Pharmacogn. Mag.* 2018;XX(X):XXX-XXX.