



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

MAGDA RHAYANNY ASSUNÇÃO FERREIRA

METODOLOGIAS ANALÍTICAS E QUIMIOMÉTRICAS PARA A AVALIAÇÃO DE IMPRESSÕES DIGITAIS DA DROGA VEGETAL E PRODUTOS DERIVADOS DOS FRUTOS DE *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz

Tese de Doutorado

Recife - PE

2016



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

METODOLOGIAS ANALÍTICAS E QUIMIOMÉTRICAS PARA A AVALIAÇÃO DE IMPRESSÕES DIGITAIS DA DROGA VEGETAL E PRODUTOS DERIVADOS DOS FRUTOS DE *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz

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

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Fernanda Pimentel

Recife - PE

2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Susyleide Brito, CRB4-1141

F383m Ferreira, Magda Rhayanny Assunção.
Metodologias analíticas e quimiométricas para a avaliação de impressões digitais da droga vegetal e produtos derivados dos frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz / Magda Rhayanny Assunção Ferreira. – 2016.
271 f.: il.; tab.; graf; 30 cm.

Orientador: Luiz Alberto Lira Soares.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências e apêndices.

1. Análise espectral. 2. Análise estatística. 3. Cromatografia. 4. Emulsões. 5. Fabaceae I. Soares, Luiz Alberto Lira (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (22.ed.) UFPE (CCS 2017-016)

MAGDA RHAYANNY ASSUNÇÃO FERREIRA

METODOLOGIAS ANALÍTICAS E QUIMIOMÉTRICAS PARA A AVALIAÇÃO DE IMPRESSÕES DIGITAIS DA DROGA VEGETAL E PRODUTOS DERIVADOS DOS FRUTOS DE *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz

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: 20/05/2016.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Claudete Fernandes Pereira (Membro externo)

Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Junior (Membro externo)

Prof. Dr. Severino Grangeiro 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. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

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

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

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

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Dedico este trabalho aos meus avós maternos Raimundo e Francisca (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao alcançar um objetivo, se conquistar algo tão almejado durante sua vida, uma das coisas mais importantes é reconhecer as pessoas que lhe ajudaram a alcançar suas metas. Durante a elaboração, realização e concretização deste trabalho, muitas mãos ajudaram, pessoas presentes nos experimentos, nas discussões, participando diretamente para a conclusão dele e também aqueles, que de uma forma indireta ajudaram, a construí-lo. Deixo aqui meu agradecimento especial:

A minha família, base de tudo para mim, minha mãe (Maria Rosinete), meu primo e afilhado (Lucas), minha irmã (Rhayza) e meu cunhado (Ronaildo), pelo apoio e por suportarem a distância, as ausências, os estresses. Por vocês e para vocês todo o meu agradecimento com essa conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares, que me acolheu desde a iniciação científica e com muita paciência foi, além de orientador, professor, educador, também conselheiro e amigo. Ensinou-me a trilhar os primeiros passos na pesquisa e como criar um ambiente de grupo de pesquisa que é capaz de crescer, aprender, ensinar e apoiar uns aos outros quando necessário. Você é meu maior exemplo de caráter, dedicação, humildade e respeito. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio, incentivo, puxões de orelha e obviamente todas as conquistas profissionais que alcancei até hoje. Tudo foi possível, pois você confiou em mim.

A minha co-orientadora, Prof. Dra. Maria Fernanda Pimentel, por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação, entusiasmo e levantamento de questões que sempre foram muito construtivas no desenvolvimento do trabalho. Meu enorme agradecimento por ter contribuído para minha formação profissional e pessoal.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacognosia (UFPE), especialmente aos que fizeram e fazem parte do Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos (NUDATEF). A minha chegada e estadia na UFPE não foram fáceis, foram quatro anos e meio de muito trabalho, cansaço, muito aprendizado, algumas perdas e muitas conquistas. Meu agradecimento aos membros antigos (Camila, Larissa, Layanne e Vanessa) pela acolhida

inicial e amizade que dura até hoje. Meu enorme agradecimento a Mônica e Wliana, as alunas de Iniciação Científica que deram grande suporte nesse trabalho. Isabelle, Julia e Rhyanne pela amizade construída e pelo apoio quando eu estava longe. Aos demais alunos de Iniciação e TCC (especialmente Alana e Suellen) e Mestrado (Paulo em especial, pelas fotos e coleta dos frutos) que passaram e que estão no laboratório diariamente contribuindo para meu crescimento.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Combustíveis (LAC) da UFPE, Carol, Vanessa, João e Eduardo, muito obrigada pela ajuda com a disponibilidade dos equipamentos e nos programas de quimiometria.

Aos amigos que contribuíram para a aquisição das amostras utilizadas nesse estudo, em especial Caroline, amiga desde 2009 e para toda a vida.

A meu orientador de Doutorado Sanduíche, Prof. Dr. Rolf Daniels, por ter me recebido no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade de Tübingen. A equipe do Laboratório sempre gentil: Ingrid, Irina, Klaus, Martina e, a Dra. Dominique Lunter pela ajuda com as análises “*in vitro*”. Aos colegas de Laboratório, em especial Ziwei e Dorothea.

To my Supervisor on Sandwich Doctorate, Prof. Dr. Rolf Daniels, for received me in Pharmaceutical Technology Laboratory of the University of Tübingen. The team Lab always very kind: Ingrid, Irina, Klaus, Martina and Dra. Dominique Lunter for the help with the “*in vitro*” analysis. All colleagues of the Lab, especially Ziwei and Dorothea.

Aos amigos de turma de faculdade, que torceram por essa conquista e que se fazem presentes até hoje, mesmo com a distância: Daliana, Luanda, Carol, Suellen e Rosilene.

Aos amigos brasileiros que ganhei durante o período de Doutorado Sanduíche: Ricardo e sua família, Fernando e Daniel. Muito obrigada pelas viagens, cervejas, aulas e almoços juntos. Vocês tornaram a minha estadia na Alemanha mais agradável. As amigas que Tübingen me presenteou, Fernanda e Patrícia.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia em Pernambuco (FACEPE), pela bolsa concedida. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao

Deustcher Akademischer Austauschdienst (DAAD) pela bolsa e suporte concedidos durante o período de Doutorado Sanduíche.

A todos aqueles que participaram de alguma forma para minha formação acadêmica e pessoal, os Laboratórios dos quais tive a honra de participar e que neles surgiram amizades que contribuíram muito para todo meu crescimento, agradeço imensamente.

“Uma andorinha só não faz verão”.

“Facts are the air of scientists. Without them you can never fly.”
Linus Carl Pauling

“Não ande apenas pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os outros já foram.”
Alexander Graham Bell

RESUMO

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Fabaceae) é uma árvore conhecida como “Jucá” com frutos usados na medicina popular. Entre os constituintes descritos estão os monômeros de taninos hidrolisáveis (ácidos elágico - AE e gálico - AG). Considerando técnicas cromatográficas e espectroscópicas utilizadas na avaliação da composição química qualitativa e/ou quantitativa de polifenóis em produtos naturais, o objetivo deste trabalho foi avaliar metodologias nas regiões espectrais de ultravioleta (UV) e infravermelho (próximo-NIR e médio-MIR), para o controle de qualidade da matéria prima e derivados de *L. ferrea*, aliado ao uso de ferramentas quimiométricas; além de obter e avaliar sistemas contendo o Extrato Bruto (EB)/Frações (FR). As amostras foram submetidas a quantificação por UV e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), além da obtenção de perfis por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) e CLAE. O método por CLAE foi desenvolvido e validado, e empregado como referência para análises quimiométricas. Em seguida, os EBs foram obtidos por diferentes métodos e proporções de solvente, e, também suas respectivas frações; avaliados por CCD-AE, CLAE, UV, NIR e MIR. A regressão por mínimos quadrados parciais foi empregada para quantificação de AE e AG. Por fim foi investigada a viabilidade de sistemas dispersos com e sem tensoativo para veiculação de EB/FR. O teor de polifenóis totais permaneceu entre 10,7537,86 g% e, dos marcadores por CLAE, entre 0,57-2,68 e 0,54-3,23 g%, expressos como AE e AG, respectivamente. Os perfis cromatográficos permitiram separar e identificar os principais marcadores analíticos (AE e AG), e detectar semelhanças em número de manchas/picos e a variabilidade na intensidade/área dos marcadores nas amostras. O método de referência foi validado com êxito, conforme legislação vigente: linearidade ($R^2 > 0,99$), seletividade, precisão intermediária (DPR < 5%), recuperação (99,86%-108,08%), e robustez adequada às variações submetidas. Tal método também foi validado para o EB aquoso e aplicado aos demais EBs/FRs para obtenção dos teores dos marcadores e perfis. A análise revelou a presença dos marcadores em todas as amostras. Ademais, os dados indicaram dependência do teor de marcadores, dos parâmetros extração (método e solvente) e da variabilidade interamostras. Considerando os métodos espectroscópicos, pré-processamentos foram utilizados para diminuir efeitos indesejáveis. Os valores da raiz quadrada dos erros médios de validação cruzada (RMSECVs) para a determinar o teor de AG foram: 0,39% m/m (UV), 0,47% m/m (NIR) e 0,56% m/m (MIR). Para AE, os valores de RMSECV foram: 0,28% m/m (UV), 0,24% m/m (NIR) e 0,37% m/m (MIR). Na validação externa os valores da raiz do erro médio quadrático de previsão (RMSEPs) obtidos para o AE foram de 0,20% m/m (UV), 0,71% m/m (NIR) e 0,36% m/m (MIR); quanto ao AG foram obtidos valores iguais a: 0,36% m/m (UV), 0,35% m/m (NIR) e 0,44% m/m (MIR). Por fim, os sistemas contendo EB/FR de *L. ferrea* foram estáveis e apresentaram liberação de ordem zero *in vitro*. Os resultados indicam que os métodos estudados neste trabalho permitiram alcançar os objetivos propostos de caracterização quali-quantitativa da matéria prima e produtos derivados de *L. ferrea*, indicando perspectiva promissora para a análise química e padronização de matrizes complexas de origem natural.

Palavras chave: Análise Espectral. Análise Estatística. Cromatografia. Emulsões. Fabaceae.

ABSTRACT

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Fabaceae) is a tree known as "Jucá" and its fruit are used in folk medicine. Among the components described are the monomers of hydrolysable tannins (ellagic acid - EA and gallic - GA). Whereas chromatographic and spectroscopic techniques for use in the assessment of the chemical quality and/or quantity of polyphenols in natural products, the objective of this study was to evaluate qualitative/quantitative methodologies, the spectral regions of ultraviolet (UV) and infrared (near-NIR and medium-MIR), for the quality control of raw materials and derivatives from fruits of *L. ferrea*, coupled with to the use of chemometric tools; and obtain and evaluate emulsions containing the crude extract (CE)/fractions (FR). The samples were submitted to UV quantification and high performance liquid chromatography (HPLC), as well as profiling by high performance thin layer chromatography (HPTLC) and HPLC. The method by HPLC was developed and validated, and used as reference for chemometric analysis. Then the CEs were obtained by different methods and proportions of solvent, and also their respective fractions; evaluated by HPTLC, HPLC, UV, NIR and MIR. Partial least squares regression was used to quantify EA and GA. Finally, the feasibility of dispersed systems with and without surfactant for CE/FR delivery was investigated. The total polyphenols content remained between 10.75-37.86 g% and, from the markers by HPLC, between 0.57-2.68 and 0.54-3.23 g%, expressed as EA and GA, respectively. The chromatographic profiles allowed to separate and identify the main analytical markers (EA and GA), and to detect similarities in number of spots/peaks and the variability in the intensity/area of the markers in the samples. The reference method was validated successfully, according to current legislation: linearity ($R^2 > 0.99$), selectivity, intermediate precision (RSD <5%), recovery (99.86% -108.08%), and robustness appropriate to the variations submitted. This method was also validated for the aqueous CE and applied to the other CEs/FRs to obtain the content of the markers and profiles. The analysis revealed the presence of markers in all samples. In addition, the data indicated dependence on the content of markers, extraction parameters (method and solvent) and sample inter-variability. Considering the spectroscopic methods, pre-processing was used to decrease undesirable effects. The root mean square cross-validation errors (RMSECVs) to determine the GA content were: 0.39% m/m (UV), 0.47% m/m (NIR) and 0.56% m/m (MIR). For EA, RMSECV values were: 0.28% m/m (UV), 0.24% m/m (NIR) and 0.37% m/m (MIR). In the external validation, the mean root mean square error root (RMSEPs) obtained for the EA were 0.20% m/m (UV), 0.35% m/m (NIR) and 0.36% m/m (MIR); As for GA, values equal to 0.36% m/m (UV), 0.71% m/m (NIR) and 0.44% m/m (MIR) were obtained. Finally, the systems containing CE/FR of *L. ferrea* were stable and showed zero order release *in vitro*. The results indicate that the methods studied in this work allowed to reach the proposed objectives of qualitative and quantitative characterization of the raw material and products derived from *L. ferrea*, indicating a promising perspective for the chemical analysis and standardization of complex matrices of natural origin.

Keywords: Spectral Analysis. Statistical Analysis. Chromatography. Emulsions. Fabaceae.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - *Libidibia ferrea* Mart. ex. Tul. L. P. Queiroz (1. Casca; 2. Árvore; 3. Árvore com partes aéreas; 4. Partes aéreas; 5. Frutos; 6A. Frutos e 6B. Sementes).....37

CAPÍTULO II

Figura 1 - Estruturas dos monômeros de taninos hidrolisáveis. A – Ácido gálico; B – Ácido elágico.....67

Figura 2 – Reação de oxi-redução das hidroxilas fenólicas utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico.....68

Figura 3 - *Fingerprints* obtidos por CCD para as 14 amostras dos frutos de *L. ferrea*.....84

Figura 4 - Cromatograma obtidos para os padrões (ácido gálico e ácido elágico) e para o material vegetal dos frutos de *L. ferrea*.....87

Figura 5 - Espectros de varredura dos padrões de ácido gálico (a) e de ácido elágico (b).....89

Figura 6 - Especificidade para o método analítico por CLAE-DAD para a matéria prima (frutos) de *L. ferrea*, em relação ao ácido gálico (a) e ácido elágico (b).....90

Figura 7 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD (em 254 e 270 nm) para as quatorze amostras dos frutos de *L. ferrea*.....97

Figura 8 - Cromatograma obtido para os padrões (ácido gálico e ácido elágico) e para o extrato bruto dos frutos de *L. ferrea*.....99

Figura 9 - Espectros de varredura dos picos correspondentes aos padrões de ácido gálico (a) e ácido elágico (b).....100

Figura 10 - Especificidade do método para o extrato bruto aquoso (turbólise) dos frutos de *L. ferrea*.....100

Figura 11 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 1 de *L. ferrea*.....106

Figura 12 - Cromatogramas representativos para a para os extratos/frações dos frutos de *L. ferrea*. Dados referentes à amostra 1. Os cromatogramas referentes às demais amostras estão resumidos no apêndice B.....117

Figura 13 - Cromatogramas obtidos por CCD-AE *versus* CLAE-DAD (extratos e frações da amostra 1 – A e amostra 6 - B).....118

Figura 14 - Cromatogramas obtidos por CCD-AE <i>versus</i> CLAE-DAD (extratos e frações da amostra 4 – A e amostra 11 - B).....	118
--	-----

CAPÍTULO III

Figura 1 - Princípios de transmitância, transfectância e reflectância difusa.....	134
Figura 2 - Organização dos dados durante as etapas de calibração multivariada.....	141
Figura 3 - Fluxograma representativo dos métodos de calibração.....	142
Figura 4 - Espectros de Ultravioleta das amostras e do padrão de ácido elágico sem pré-processamento.....	153
Figura 5 - Espectros de Ultravioleta-Visível das amostras e do padrão de ácido gálico sem pré-processamento.....	154
Figura 6 - Espectros de todas as amostras após pré-processamento primeira derivada com filtro Savitzky-Golay e janela de 3 pontos.....	158
Figura 7 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), para o ácido gálico.....	159
Figura 8 - Valores previstos <i>versus</i> os valores de referência (CLAE-DAD) para determinação do teor de ácido elágico em extratos brutos de <i>L. ferrea</i> utilizando espectros de UV-Vis.....	160
Figura 9 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido gálico em extratos brutos de <i>L. ferrea</i> <i>versus</i> os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de UV-Vis.....	160
Figura 10 - Valores previstos <i>versus</i> observados para determinação do teor de ácido elágico em amostras de validação externa dos extratos de <i>L. ferrea</i> utilizando espectros de UV-Vis.....	161
Figura 11 - Valores previstos <i>versus</i> observados para determinação do teor de ácido gálico em amostras de validação externa dos extratos de <i>L. ferrea</i> utilizando espectros de UV-Vis.....	162
Figura 12 - Espectro de MIR correspondente ao ácido elágico.....	164
Figura 13 - Espectro de MIR correspondente ao ácido gálico.....	164
Figura 14 - Espectros de MIR sem pré-tratamento para as amostras e para o padrão de ácido elágico, com a área destacada excluída da faixa espectral de trabalho.....	165
Figura 15 - Espectros de MIR sem pré-tratamento para as amostras e para o padrão ácido gálico, com a área destacada excluída da faixa espectral de trabalho.....	166

Figura 16 - Espectros de todas as amostras e do ácido elágico após pré-processamento (primeira derivada de Savitzky Golay com janela de 3 pontos, seguido de SNV).....	172
Figura 17 - Espectros de todas as amostras e ácido gálico após pré-processamento (primeira derivada de Savitzky Golay com janela de 5 pontos, seguido de SNV).....	173
Figura 18 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), parao ácido elágico.....	173
Figura 19 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), parao ácido gálico.....	174
Figura 20 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido elágico em extratos brutos de <i>L. ferrea</i> versus os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de MIR.....	174
Figura 21 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido gálico em extratos brutos de <i>L. ferrea</i> versus os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de MIR.....	175
Figura 22 - Valores previstos versus observados para determinação do teor de ácido elágico em amostras de validação externa dos extratos de <i>L. ferrea</i> utilizando espectros de MIR.....	175
Figura 23 - Valores previstos versus observados para determinação do teor de ácido gálico em amostras de validação externa dos extratos de <i>L. ferrea</i> utilizando espectros de MIR.....	176
Figura 24 - Espectro de NIR correspondente ao ácido elágico.....	178
Figura 25 – Espectro de NIR correspondente ao ácido gálico.....	178
Figura 26 - Espectros de NIR sem pré-tratamento para as amostras e para o padrão de ácido elágico, com a área destacada excluída da faixa espectral de trabalho.....	179
Figura 27 - Espectros de NIR sem pré-tratamento para as amostras e para o padrão de ácido gálico, com a área destacada excluída da faixa espectral de trabalho.....	179
Figura 28 - Espectros de todas as amostras e do ácido elágico após pré-processamento (primeira derivada de Savitzky Golay com janela de 7 pontos, seguido de SNV).....	185
Figura 29 - Espectros de todas as amostras e do ácido gálico após pré-processamento (primeira derivada de Savitzky Golay e janela de 3 pontos, seguido de MSC).....	185
Figura 30 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), parao ácido elágico.....	186
Figura 31 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), parao ácido gálico.....	186

Figura 32 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido elágico em extratos brutos de <i>L. ferrea</i> versus os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de NIR.....	187
Figura 33 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido gálico em extratos brutos de <i>L. ferrea</i> versus os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de NIR.....	187
Figura 34 – Valores previstos versus observados para determinação do teor de ácido elágico em amostras de validação externa dos extratos de <i>L. ferrea</i> utilizando espectros de NIR.....	188
Figura 35 – Valores previstos versus observados para determinação do teor de ácido gálico em amostras de validação externa dos extratos de <i>L. ferrea</i> utilizando espectros de NIR.....	189

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Esquema representativo dos processos de instabilidade em sistemas emulsionados.....	204
Figura 2 - Célula de Difusão de Franz modificada.....	207
Figura 3 - Perfil cromatográfico por CCD-AE (A) e CLAE-DAD (B) das amostras.....	218
Figura 4 - Avaliação da solubilidade do extrato bruto (EB) e frações (aquosa-FAq e orgânica - FOr) nos componentes da formulação. A - fase aquosa, B - fase oleosa.....	220
Figura 5 - Diagramas de fase pseudoternários.....	221
Figura 6 - Análise microscópica das emulsões preliminares.....	224
Figura 7 - Diagramas de fase pseudoternários para sistemas contendo o extrato bruto dos frutos de <i>L. ferrea</i>	224
Figura 8 - Tamanho médio de gotículas de emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de <i>L. ferrea</i>	226
Figura 9 - Análise microscópica de emulsões preparadas com o extrato bruto e frações dos frutos de <i>L. ferrea</i>	227
Figura 10 - Determinação do potencial Zeta de emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de <i>L. ferrea</i>	228
Figura 11 - Ciclo gelo/degelo para avaliação de emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de <i>L. ferrea</i>	229
Figura 12 - Índice de cremagem em diferentes condições de armazenagem para emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de <i>L. ferrea</i>	230

Figura 13 - Resultados para as determinações de turbidez (barras) e pH (linhas) durante estudo de estabilidade (1 a 90 dias) de emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de <i>L. ferrea</i>	232
Figura 14 - Avaliação do diâmetro médio de gotícula para emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de <i>L. ferrea</i> , submetidas a estudo de estabilidade.....	233
Figura 15 - Teor de polifenóis totais por UV-Vis para emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de <i>L. ferrea</i> , submetidas a estudo de estabilidade (dias 1 e 90).....	234
Figura 16 - Teor de ácido gálico e ácido elágico por CLAE-DAD para emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de <i>L. ferrea</i> , submetidas a estudo de estabilidade (dias 1 e 90).....	235
Figura 17 - Tensão de cisalhamento <i>versus</i> taxa de cisalhamento. Sistemas com tensoativo (A) e com HPMC (B).....	237
Figura 18 - Liberação <i>in vitro</i> dos sistemas contendo extrato bruto de <i>L. ferrea</i> obtidos com tensoativo (T20S80) e com HPMC 3,0%.....	239

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II

Quadro 1 - Localidade de coleta das amostras dos frutos de *L. ferrea*.....73

CAPÍTULO III

Quadro 1 – Resumo das principais bandas características de ácido gálico e ácido elágico por MIR.....163

Quadro 2 – Resumo das principais bandas características de ácido gálico e ácido elágico por NIR.....177

CAPÍTULO IV

Quadro 1 – Avaliação das condições de preparação de emulsões estabilizadas por tensoativos ou HPMC.....212

Quadro 2 - Estabilidade sob centrifugação para emulsões contendo extrato/frações de *L. ferrea*.....225

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Principais constituintes de algumas partes de <i>Libidibia ferrea</i>	8
---	---

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Teor de Polifenóis Totais por UV-Vis nas amostras de matéria prima vegetal dos frutos de <i>L. ferrea</i>	86
Tabela 2 - Áreas obtidas os picos da curva analítica do ácido gálico na avaliação da linearidade.....	91
Tabela 3 - Áreas obtidas para os picos da curva analítica do ácido elágico na avaliação da linearidade.....	91
Tabela 4 - Áreas obtidas para os picos correspondentes ao ácido gálico e ao ácido elágico na curva analítica na avaliação de linearidade nos frutos de <i>L. ferrea</i>	92
Tabela 5 - Dados da análise estatística das curvas de calibração para os padrões (ácido gálico, ácido elágico) e matéria prima dos frutos de <i>L. ferrea</i>	93
Tabela 6 - Ensaio de repetitividade e de precisão intermediária para a matéria prima dos frutos de <i>L. ferrea</i>	94
Tabela 7 – Ensaio de exatidão: resultados obtidos para a área dos picos dos marcadores da matéria prima de <i>L. ferrea</i>	95
Tabela 8 - Ensaio de exatidão: resultados obtidos para as áreas dos padrões.....	95
Tabela 9 - Ensaio de exatidão: resultados obtidos (média) para concentrações teóricas e experimentais, a partir da equação da reta dos padrões.....	95
Tabela 10 - Ensaio de exatidão: resultados de recuperação para os marcadores na matriz dos frutos de <i>L. ferrea</i>	95
Tabela 11 - Ensaio de robustez: ter dos marcadores na em matéria prima dos frutos de <i>L. ferrea</i>	96
Tabela 12 – Teor médio de ácido gálico e ácido elágico obtido por CLAE-DAD em diferentes amostras dos frutos de <i>L. ferrea</i>	98
Tabela 13 - Dados de calibração para os padrões de ácido gálico, ácido elágico e extrato bruto dos frutos de <i>L. ferrea</i>	101
Tabela 14 - Repetitividade e precisão intermediária para o extrato bruto aquoso (turbólise) dos frutos de <i>L. ferrea</i>	102

Tabela 15 – Exatidão: resultados de recuperação para o extrato bruto aquoso (turbólise) dos frutos de <i>L. ferrea</i>	103
Tabela 16 - Robustez: teor de ácido gálico e ácido elágico (%m/m) em extrato bruto aquoso dos frutos de <i>L. ferrea</i>	103
Tabela 17 – Teores de ácido gálico (%m/m) obtidos por CLAE-DAD para os extratos brutos e frações dos frutos de <i>L. ferrea</i>	109
Tabela 18 – Teores de ácido elágico (%m/m) obtidos por CLAE-DAD para os extratos brutos e frações dos frutos de <i>L. ferrea</i>	113

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Regiões espectrais no Infravermelho.....	133
Tabela 2 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico na calibração por UV-VIS.....	155
Tabela 3 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico na calibração por UV-VIS.....	155
Tabela 4 - Valores de R^2 , RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico, com todas as amostras e após retirada dos <i>outliers</i>	156
Tabela 5 - Valores de R^2 , RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico, com todas as amostras e após retirada dos <i>outliers</i>	156
Tabela 6 - Valores de R^2 , RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico e ácido gálico nas etapas de calibração e validação.....	157
Tabela 7 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico na calibração por MIR.....	167
Tabela 8 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico na calibração por MIR.....	168
Tabela 9 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico, com todas as amostras e após retirada dos <i>outliers</i> , para MIR.....	169
Tabela 10 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico, com todas as amostras e após retirada dos <i>outliers</i> , para MIR.....	169
Tabela 11 - Valores de R^2 , RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico e ácido gálico nas etapas de calibração e validação.....	171
Tabela 12 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico na calibração por NIR.....	180

Tabela 13 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico na calibração por NIR.....	181
Tabela 14 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico, com todas as amostras e após retirada dos <i>outliers</i> , para NIR.....	182
Tabela 15 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico, com todas as amostras e após retirada dos <i>outliers</i> , para NIR.....	182
Tabela 16 - Valores de R^2 , RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico e ácido gálico nas etapas de calibração e validação.....	184

CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Componentes da emulsão final.....	213
Tabela 2 - Teor de polifenóis totais (TPT – UV-Vis) e teor de ácido gálico e ácido elágico (CLAE) no extrato bruto e frações aquosa e orgânica.....	219
Tabela 3 - Avaliação das condições de preparação de emulsões estabilizadas por tensoativos ou HPMC.....	222

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Alagoas
AM	Amazonas
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing and Material
ATR	Reflectância Total Atenuada
CCD-AE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CE	Ceará
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com detector de arranjo de fotodiodos
CLS	<i>Classical Least Squares</i>
CG	Cromatografia Gasosa
DPR	Desvio Padrão Relativo
EB	Extrato Bruto
EMEA	<i>The European Agency for the Evaluation of Medical Products</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIR	<i>Far Infrared</i>
GO	Goiás
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
JK	Jack-knifing (Algoritmo)
MIR	Infravermelho médio
MLR	Regressão linear múltipla (<i>Multiple Linear Regression</i>)
MS	Mato Grosso do Sul
MSC	Correção do Sinal Multiplicativo (<i>Multiplicative Signal Correction</i>)
mUA	mili Unidade de Absorbância
NIR	Infravermelho Próximo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Regressão por Componentes Principais (<i>Principal Component Regression</i>)
PE	Pernambuco
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Squares</i>)
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno

SG	Savitzky-Golay (Algoritmo)
SNV	Varição Normal Padrão (<i>Standard Normal Variate</i>)
SPXY	<i>Sample set Partitioning based on joint x-y distances</i> (Partição do conjunto de amostras baseado nas distâncias conjuntas x-y)
RE	Resolução Específica
RMSEC	Raiz do Erro Médio Quadrático de Calibração (<i>Root Mean Square Error of Calibration</i>)
RMSECV	Raiz do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada (<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i>)
RMSEP	Raiz do Erro Médio Quadrático de Previsão (<i>Root Mean Square Error of Prediction</i>)
RN	Rio Grande do Norte
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
VL	Variáveis Latentes
PRESS	Soma dos Quadrados do Erro de Previsão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 CAPÍTULO I - LIBIDIBIA FERREA MART EX TUL L. P. QUEIROZ: ASPECTOS GERAIS, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA	35
3.1 REVISÃO DA LITERATURA	35
3.1.1 Aspectos Gerais	36
3.1.2 Atividades Biológicas	37
3.1.3 Composição Química	47
3.2 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
4 CAPÍTULO II - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA E CROMATOGRÁFICA DE POLIFENOIS DOS FRUTOS DE LIBIDIBIA FERREA (JUCÁ)	63
4.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	64
4.1.1 Espécies vegetais e <i>fingerprint</i>	64
4.1.2 Análise polifenóis em espécies vegetais	66
4.1.2.1 Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	68
4.1.2.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE)	69
4.1.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	70
4.1.3 Validação de Métodos Analíticos	71
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.2.1 Material Vegetal	73
4.2.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	73
4.2.3 Obtenção da Solução Extrativa	74
4.2.4 Doseamento de Polifenóis Totais	75
4.2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Método Referência)	75
4.2.5.1 Preparo das soluções para análise por CLAE-DAD	75
4.2.5.2 Condições Cromatográficas.....	76
4.2.5.3 Desenvolvimento e validação do método por CLAE-DAD para quantificação de ácido gálico e ácido elágico nos frutos de <i>L. ferrea</i>	76
4.2.5.3.1 Seleção do comprimento de onda, especificidade e identificação dos picos	77

4.2.5.3.2 Linearidade.....	77
4.2.5.3.3 Especificidade e pureza do pico	77
4.2.5.3.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	78
4.2.5.3.5 Precisão - Repetitividade (intracorrida)	78
4.2.5.3.6 Precisão - Precisão intermediária (intercorrida)	78
4.2.5.3.7 Exatidão	79
4.2.5.3.8 Robustez.....	79
4.2.6 Obtenção dos extratos brutos.....	79
4.2.6.1 Métodos de Obtenção	79
4.2.6.2 Validação do método analítico por CLAE-DAD para o doseamento de ácido gálico e ácido elágico em extrato bruto aquoso dos frutos de <i>L. ferrea</i>	80
4.2.7 Obtenção das frações	81
4.2.8 Caracterização dos extratos brutos e frações	81
4.2.8.1 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência.....	81
4.2.8.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	81
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada	83
4.3.2 Doseamento de Polifenóis Totais	85
4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	86
4.3.3.1 Procedimento de validação para análise quantitativa	88
4.3.3.1.1 Seleção do comprimento de onda, especificidade e identificação dos picos	88
4.3.3.1.2 Curvas analíticas, Limite de Detecção e Limite de Quantificação	91
4.3.3.1.3 Repetitividade e Precisão Intermediária	93
4.3.3.1.4 Exatidão	94
4.3.3.1.5 Robustez.....	96
4.3.3.2 Obtenção do perfil cromatográfico de diferentes amostras por CLAE	96
4.3.4 Obtenção e Caracterização dos Extratos Brutos e Frações.....	98
4.3.4.1 Validação do método analítico por CLAE-DAD para o doseamento de ácido gálico e ácido elágico em extrato bruto aquoso dos frutos de <i>L. ferrea</i>	99
4.3.4.1.1 Seleção do comprimento de onda, especificidade e identificação dos picos	99
4.3.4.1.2 Curvas analíticas, Limite de Detecção e Limite de Quantificação	100
4.3.4.1.3 Repetitividade e Precisão Intermediária	101
4.3.4.1.4 Exatidão	102

4.3.4.1.5 Robustez.....	103
4.3.4.2 Preparação e caracterização cromatográfica de extratos brutos e frações obtidos dos frutos de <i>L. ferrea</i>.....	103
4.3.4.2.1 Perfil químico típico obtido por CCD-AE.....	105
4.3.4.2.2 Perfil químico típico obtido por CLAE-DAD e quantificação de ácido gálico e ácido elágico nos extratos brutos e frações	107
4.4 CONCLUSÃO.....	119
REFERÊNCIAS	120
5 CAPÍTULO III - ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS E QUIMIOMÉTRICAS ...	130
5.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	131
5.1.1 Métodos Espectroscópicos	131
5.1.1.1 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível.....	131
5.1.1.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho	132
5.1.1.2.1 Infravermelho Médio	134
5.1.1.2.2 Infravermelho Próximo.....	136
5.1.2 Quimiometria.....	137
5.1.2.1 Pré-processamento dos dados.....	138
5.1.2.2 Métodos de Calibração Multivariada	140
5.1.2.2.1 Regressão Linear Múltipla (MLR)	142
5.1.2.2.2 Regressão por Componentes Principais (PCR)	143
5.1.2.2.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	144
5.1.2.3 Seleção de Variáveis.....	145
5.1.2.4 Seleção de amostras.....	146
5.1.2.5 Número de variáveis.....	147
5.1.2.6 Parâmetros relacionados com a qualidade do modelo.....	147
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	150
5.2.1 Espectroscopia de Absorção na região Ultravioleta (UV)	150
5.2.1.1 Preparo das soluções.....	150
5.2.1.2 Registro dos espectros	150
5.2.2 Espectroscopia nas regiões do Infravermelho Médio e Próximo	151
5.2.2.1 Amostras e Padrão	151
5.2.2.2 Aquisição dos espectros NIR e MIR	151
5.2.3 Análise Estatística.....	151

5.2.3.1 Detecção de <i>outliers</i>	151
5.2.3.2 Pré-processamento de dados.....	151
5.2.3.3 Construção dos modelos de calibração e validação externa.....	152
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	153
5.3.1 Espectroscopia no UV	153
5.3.1.1 Pré-processamento espectral e avaliação de <i>outliers</i>	154
5.3.1.2 Determinação dos conjuntos de calibração e validação externa.....	156
5.3.1.3 Construção do modelo PLS	157
5.3.2 Infravermelho Médio	163
5.3.2.1 Espectros de MIR de ácido elágico e ácido gálico	163
5.3.2.2 Pré-processamento espectral e avaliação de <i>outliers</i>	165
5.3.2.3 Determinação dos conjuntos de calibração e validação externa.....	170
5.3.2.4 Construção do modelo PLS	170
5.3.3 Infravermelho Próximo.....	177
5.3.3.1 Espectros de NIR de ácido elágico e ácido gálico.....	177
5.3.3.2 Pré-processamento espectral e avaliação de <i>outliers</i>	178
5.3.3.3 Determinação dos conjuntos de calibração e validação externa.....	182
5.3.3.4 Construção do modelo PLS	182
5.4 CONCLUSÕES	190
REFERÊNCIAS	191
6 CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DISPERSOS CONTENDO EXTRATO E FRAÇÕES DOS FRUTOS DE <i>L. ferrea</i>	201
6.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	201
6.1.1 Emulsões	202
6.1.2 Perfil de liberação <i>in vitro</i>	206
6.1.3 Sinergismo	207
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	210
6.2.1 Obtenção e Caracterização das Emulsões	210
6.2.1.1 Otimização dos parâmetros	210
6.2.1.1.1 Ensaio eficiência de incorporação para extrato bruto e frações.....	210
6.2.1.1.2 Construção de Diagramas Pseudoternários	210
6.2.1.1.3 Método de obtenção das emulsões	211

6.2.1.1.4 Avaliação preliminar das condições de preparação e da composição da formulação	211
6.2.1.1.5 Emulsões contendo o extrato/frações	212
6.2.1.2 Caracterização das Emulsões.....	213
6.2.2 Estudos de Estabilidade	216
6.2.2.1 Estabilidade Intrínseca.....	216
6.2.2.2 Ciclo gelo/degelo	216
6.2.2.3 Estabilidade Acelerada	216
6.2.3 Ensaio de Liberação <i>in vitro</i>	216
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	218
6.3.1 Obtenção e Caracterização das Emulsões	218
6.3.2 Estudo de Estabilidade.....	225
6.3.3 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	238
6.4 CONCLUSÕES	239
REFERÊNCIAS	240
7 CONCLUSÃO.....	247
REFERÊNCIAS	249
APÊNDICE A – CROMATOPLACAS DE CCD-AE PARA EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES	254
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES OBTIDOS POR CLAE-DAD.....	261
APÊNDICE C – ARTIGO 1.....	268
APÊNDICE D – ARTIGO 2	270

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Inúmeras são as razões para a investigação de plantas medicinais e seus derivados, dentre as quais podem ser destacadas: aprofundar conhecimento sobre o potencial medicinal da diversidade de plantas nativas; estabelecer uma base racional para o uso medicinal de determinadas espécies vegetais; desenvolver medicamentos à base de plantas que apresentam atividade relevante (fitoterápicos); descobrir novos protótipos de medicamentos; ou, ainda, levantar informações sobre o uso de medicamentos tradicionais. Além disso, as plantas medicinais são fontes potenciais de moléculas bioativas que possuem novas estruturas e/ou mecanismos de ação. Essas características inovadoras têm motivado o setor produtivo farmacêutico para direcionar a pesquisa para o desenvolvimento de novos produtos a partir de plantas medicinais (ZANIN et al., 2012).

Atualmente, o controle de qualidade de drogas vegetais e produtos derivados é fundamentado no uso tradicional ou na análise quantitativa de marcadores. Para identificar e determinar quantitativamente os marcadores, normalmente são eleitas uma ou mais substâncias farmacologicamente importantes presentes na amostra. Embora esta abordagem seja amplamente preconizada por códigos oficiais para estabelecer especificações de qualidade para a maioria das espécies vegetais usadas na medicina tradicional, essa concepção não permite assegurar a qualidade terapêutica desses produtos, uma vez que em boa parte dos casos a atividade biológica está relacionada à complexa composição química presente (ZENG et al., 2008; GAD et al., 2013; GOVINDARAGHAVAN; SUCHER, 2015).

A falta de consenso acerca do controle de qualidade focado exclusivamente na quantificação de alguns marcadores tem fortalecido a concepção da “Fitoequivalência”, que foi desenvolvida pelos Alemães para garantir a consistência e qualidade das plantas/produtos disponíveis no mercado (TYLER, 1999; GAD et al., 2013). Deste modo, um perfil químico detalhado da planta ou produto derivado, tem papel importante para permitir a avaliação da diversidade química do material e assim assegurar a reprodutibilidade da eficácia terapêutica e, conseqüentemente, a sua “Fitoequivalência” (GAEDCKE; STEINHOFF, 2000; MOK; CHAU, 2005; WAGNER, 2011).

Considerando esses aspectos, a técnica de impressão digital (*fingerprint*) cromatográfica foi reconhecida e é aceita pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como estratégia para avaliação de produtos naturais (WORLD, 2000). A abordagem também é preconizada por importantes agências de regulação sanitária tal como *China Food and Drug Administration* (CFDA), *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Agency for the*

Evaluation of Medicinal Products (EMA); que enfatizam o uso de análises comparativas qualitativa e quantitativa da impressão digital espectroscópica ou cromatográfica de matéria-primas vegetais/extratos/produtos acabados; frente a materiais de referência (drogas vegetais, extratos, ou substâncias químicas certificadas) para assegurar a identidade e qualidade (FDA, 2004; EMA, 2006; 2011; GIRI et al., 2010; ZAHNG et al., 2014). Desse modo, por menores que sejam as variações na diversidade e/ou na concentração dos constituintes químicos do vegetal, estas variações podem comprometer as propriedades terapêuticas e/ou tóxicas, pois as mesmas dependem da ação sinérgica (e muitas vezes ainda desconhecida), de múltiplos metabólitos secundários presentes na espécie vegetal (LI et al., 2004, TIAN; XI; LIU, 2009; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI et al., 2010; GOVINDARAGHAVAN; HENNELL; SUCHER, 2012).

Em face dessas considerações e diante das dificuldades encontradas na padronização e definição de parâmetros de qualidade para uma droga vegetal, a técnica denominada “*metabolic profiling*” vem sendo bastante empregada nos últimos anos. Tal técnica consiste em utilizar o *fingerprint* das espécies, para identificar não só os principais marcadores, mas também os demais compostos a fim de correlacionar suas contribuições sinérgicas para a eficácia esperada (DAOLIO et al., 2008; GAD et al., 2013; WOLFENDER et al., 2013; 2015).

O *fingerprint* de produtos tradicionais tal como um espectro ou um cromatograma, obtidos por um procedimento específico, representa uma característica única e permite tipificar o perfil químico deste tipo de material (WELSH et al., 1996; MOK; CHAU, 2005; GAD et al., 2013; CHOI; VERPOORTE, 2014). Este perfil deve ser caracterizado através da identificação de produtos multicompostos de uso na medicina tradicional, podendo ser feita com precisão (de acordo com as similaridades), mesmo que a diversidade e concentração dos compostos não seja exatamente a mesma para amostras diferentes de uma mesma droga vegetal ou produto derivado (diferenças). No entanto, o maior desafio reside no desenvolvimento de abordagens capazes de obter informações úteis, considerando a abundância de dados brutos produzidos quando são analisados todos os dados gerados por cromatogramas ou espectros (LIANG; LIE; CHAN, 2004; ZENG et al., 2008; CHOI; VERPOORTE, 2014; WOLFENDER et al., 2015).

Nesse contexto, a associação de impressões digitais com métodos quimiométricos tal como modelos de reconhecimento de padrões, incrementa a velocidade e a confiabilidade de processamento e tradução dos dados (espectroscópicos ou cromatográficos), para fornecer o máximo de informações químicas relevantes por meio de índices de similaridade e de

coeficientes de correlação linear (BRERETON, 2007; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI et al., 2010). Diferentes técnicas quimiométricas vêm sendo cada vez mais aplicadas a dados analíticos, especialmente a análise e calibração multivariada de dados espectroscópicos (OTTO, 1999; BARROS NETO; SCARMINO; BRUNS, 2006; 2010; LILAND, 2011).

A padronização de derivados vegetais em formas farmacêuticas não é uma tarefa simples, especialmente para produtos derivados de drogas vegetais oriundas de extrativismo ou de cultivos não controlados. Assim, o desenvolvimento de técnicas capazes de decifrar a complexidade dos dados oriundos da análise de matrizes multicompostos é uma poderosa ferramenta para avaliar a constância da composição química, pré-requisito para o uso seguro e eficaz dos produtos derivados de material vegetal (AHMAD; AQIL; OWAIS, 2006). Portanto, para o desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, algumas estratégias são necessárias para que a constância química possa ser alcançada, tal como a misturas de lotes de matérias-primas diferentes (origem, safras, cultivo/extrativismo), combinação de extratos ou ainda adoção de processos especiais de extração capazes de promover o enriquecimento químico dos extratos obtidos (GAEDCKE; STEIHHOFF, 2000; AHMAD; AQIL; OWAIS, 2006; STICHER et al., 2015).

Além das dificuldades enfrentadas para que a composição química apropriada seja alcançada, a adição ou incorporação de derivados vegetais em formas farmacêuticas continua uma tarefa complexa. Isso porque, em muitos casos, a concentração necessária dos compostos ativos é elevada e pode exceder a capacidade da forma farmacêutica. Ademais, os compostos também podem apresentar diversas incompatibilidades com componentes da formulação, resultando em instabilidades físicas, químicas ou físico-químicas tanto do(s) composto(s) ativo(s) como da forma farmacêutica. Considerando a preparação de sistemas dispersos, a estabilidade, a solubilidade e a distribuição dos compostos químicos nos componentes da formulação é um desafio a mais (SCHULZ; DANIELS, 2000; VIYUCH; KLINGTHONG; SIRIPAISAL, 2003; RAHATE; NAGARKAR, 2007; FERREIRA et al., 2010; FRELICHOWSKA, BOLZINGER, CHEVALIER, 2009; 2010; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012; SONG et al., 2015).

Diante do exposto, este trabalho teve como propósitos a avaliação de métodos cromatográficos (camada delgada e cromatografia líquida) e espectroscópicos (UV-Vis e IV), para investigação qualitativa e quantitativa de drogas vegetais, extratos e frações oriundos dos frutos de *Libidibia ferrea*. Por fim, considerando os diversos relatos das atividades antifúngica e antimicrobiana da espécie, foi avaliada a viabilidade de sistemas dispersos para veiculação dos extratos e frações preparados.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologias analíticas associadas à técnicas quimiométricas, para avaliação qualitativas e quantitativas de impressões digitais, para a droga vegetal e produtos derivados dos frutos de *Libidibia ferrea*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as matérias primas vegetais por UV-Vis (doseamento de polifenóis totais), CCD-AE e CLAE-DAD;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para o doseamento de ácido elágico e ácido gálico em matéria prima (frutos) de *L. ferrea* por CLAE-DAD;
- Obter extratos brutos e frações a partir das amostras dos frutos de *L. ferrea*;
- Analisar o perfil espectroscópico obtido para as matérias primas e extratos brutos dos frutos de *L. ferrea*;
- Validar metodologia analítica por CLAE-DAD para o doseamento de ácido elágico e ácido gálico no extrato bruto aquoso dos frutos de *L. ferrea*;
- Aplicar o método por CLAE-DAD aos demais extratos brutos e frações obtidos;
- Analisar o teor de marcadores nos extratos brutos por UV-Vis, CLAE-DAD, MIR e NIR;
- Desenvolver modelos de calibração multivariada empregando UV-Vis, NIR e MIR, para quantificação de ácido elágico e ácido gálico nos extratos brutos de *L. ferrea*;
- Avaliar a viabilidade de sistemas dispersos para veiculação do extrato bruto e frações de *L. ferrea*.

CAPÍTULO I
***LIBIDIBIA FERREA* MART EX TUL L. P.**
QUEIROZ: ASPECTOS GERAIS,
ATIVIDADES BIOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO
QUÍMICA

3 CAPÍTULO I - *LIBIDIBIA FERREA* MART EX TUL L. P. QUEIROZ: ASPECTOS GERAIS, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

O uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica tem sido relatado há muito tempo por serem fontes potenciais de moléculas bioativas, que possuem novas estruturas e mecanismos de ação ainda não elucidados (CORTES-ROJAS et al., 2015; PFERSCHY-WENZIG; BAUER, 2015). Os materiais à base de plantas têm importância em vários setores, como as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. A relevância de medicamentos à base de plantas torna-se mais importante no desenvolvimento de um país, onde o conhecimento tradicional de tais estratégias terapêuticas é amplamente utilizado pela população (KASSING et al., 2010; 2012).

O Brasil é o país que apresenta maior potencial para pesquisas utilizando espécies vegetais, uma vez que tem a maior biodiversidade do planeta. Nesse contexto, sabe-se que as plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem de modelos para a síntese de certo número de fármacos. Muitos pesquisadores apresentam interesse no estudo dos produtos naturais, uma vez que eles representam uma fonte para inúmeras aplicações, como descoberta de moléculas bioativas, mudança ou incremento das propriedades físico-químicas e biológicas na associação com outros fármacos (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006; JOLY et al., 2011).

Com o interesse em espécies que apresentem propriedades terapêuticas e composição química definida, a busca pela utilização racional desses recursos aliado à biodiversidade relatada acima, proporcionou o surgimento de políticas públicas que incentivam as pesquisas relacionadas aos produtos de origem vegetal (SANT´ANA et al., 2004). Entre essas políticas, merece destaque a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a qual proporcionou a criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, cujos princípios são voltados para a ampliação de opções terapêuticas e consequente melhora da atenção básica aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), valorização do conhecimento popular; utilização sustentável da biodiversidade do país, além do desenvolvimento tecnológico de produtos à base de plantas medicinais (BRASIL, 2006; 2009).

Ainda nesta direção e seguindo as diretrizes da Política e do Programa de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, em 2009 o Ministério da Saúde criou a Relação Nacional de

Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS). Esta relação contempla 71 espécies medicinais e apresenta como objetivo incentivar pesquisas a cerca dessas espécies, para que essas possam ser incluídas na Atenção Primária do Sistema Público de Saúde (BRASIL, 2009). Dentre essas espécies, está a espécie *Libidibia ferrea*, em virtude do emprego popular de suas cascas, frutos e folhas.

No que diz respeito à espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*, o presente capítulo consiste em um levantamento da literatura de várias bases de dados sobre aspectos gerais, bem como produtos químicos e dados farmacológicos sobre esta espécie que tenham sido publicados até 2016. A estratégia de busca para o presente estudo foi procurar em bases de dados virtuais de pesquisa, como PubMed, Science Direct, SciELO, SciFinder, Scopus e Web of Science. Algumas das palavras-chave utilizadas foram *Caesalpinia*, *Caesalpinia ferrea*, *Libidibia ferrea*, Jucá e Pau Ferro.

3.1.1 Aspectos Gerais

O gênero *Caesalpinia* (família Caesalpiniaceae, Caesalpinioideae e Leguminosae) inclui 500 espécies de árvores distribuídas em todo o mundo. É caracterizado por seu teor de polifenóis (flavonoides, taninos), terpenos e esteróides, e polissacarídeos, que são os principais responsáveis pelas suas propriedades biológicas (ZANIN et al., 2012). As principais espécies deste gênero são nativas do Brasil, mas nem todas são endêmicas e estão distribuídas em diferentes regiões de todo o país (ALZUGARAY, 1984; LEWIS, 1988; FLORA DO BRASIL, 2014).

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea* pertence à divisão Magnoliophyta (Angiosperma); classe Magnoliopsida (Dicotiledônea); ordem Fabales; família Fabaceae; subfamília Caesalpinioideae; também chamada por *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*, é popularmente conhecida como "jucá" ou "pau ferro" (CRONQUIST, 1981; PIO CORREA, 1984; LORENZI, 2002; MATOS, 2007; MATOS et al., 2015). No que diz respeito ao sua etimologia, "*Caesalpinia*" foi nomeado após Andrea Caesalpinio (botânico italiano); e "*ferrea*", que significa ferro, é devido à alta densidade desta madeira (EMBRAPA, 2014) (Figura 1).

Figura 1 - *Libidibia ferrea* Mart. ex. Tul. L. P. Queiroz (1. Casca; 2. Árvore; 3. Árvore com partes aéreas; 4. Partes aéreas; 5. Frutos; 6A. Frutos e 6B. Sementes).



Fonte: Paulo Aires (2014).

Esta espécie é considerada uma árvore nativa do Brasil e é endêmica do Norte e Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco), principalmente na área geográfica dominada pela Caatinga (cerrado). Além disso, a espécie é cultivada em outros países para utilização na arborização de ruas e parques, apresentando o nome de pau-ferro do Brasil (LORENZI, 2002; MATOS, 2007). Portanto, a espécie desempenha um papel importante na preservação ambiental e que também pode ter impacto econômico significativo para o país (EMBRAPA, 2014).

L. ferrea é uma árvore que possui entre 10 a 15 m de altura e tem um tronco fino com um diâmetro de 40 a 60 cm. As folhas são do tipo bipinadas compostas que medem de 15 a 19 cm de comprimento. Os frutos são indeiscentes e as sementes são duras e de cor marrom escuro (LORENZI, 2002).

Desde 1960, a espécie *L. ferrea* têm sido estudada tanto em relação às suas atividades biológicas quanto à composição química. Um grande número desses estudos avaliaram os efeitos farmacológicos desta espécie e esses estudos têm correlacionado às atividades de alguns constituintes químicos. A maior parte desses estudos foi baseada em informações populares sobre as indicações, o modo de uso, e parte da planta utilizada na preparação.

3.1.2 Atividades Biológicas

Medicina Tradicional

Os estudos etnofarmacológicos anteriores mostram que *Libidibia ferrea* é utilizada em muitas partes do mundo para o tratamento diversas doenças e seus recursos são parte de um conhecimento tradicional sobre esta espécie (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Neste contexto, Barros (1982) relatou que as sementes e a casca de *L. ferrea* têm sido utilizadas na medicina tradicional sob a forma de chá e poções para perder peso e para realizar a assepsia de ferimentos. Os frutos são usados principalmente contra anemia, doenças pulmonares e diabetes. As raízes são usadas como antipiréticos e anti-diabéticos (BRAGA, 1960).

Balbach (1972) descreveu em seu livro que a infusão da casca do caule de *L. ferrea* tem sido usada para o tratamento de enterocolite e diarreia. Braga (1976), na terceira edição do livro "Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará"; relata várias propriedades terapêuticas, incluindo o tratamento e alívio da asma, contusões, tosse crônica e feridas, e as raízes são utilizadas com ação antipirética e anti-diabética. De acordo com Lewis (1988), as raízes são utilizadas como antipirético e anti-diarreico e a decocção da madeira mostrou um efeito curativo e anti-secretor. Thomas et al. (1998), deu a primeira descrição de que o extrato aquoso apresentou propriedades anti-inflamatória e analgésica.

Alguns experimentos em animais demonstraram a atividade analgésica, anti-inflamatória e anti-úlceras dos frutos e cascas desta espécie (BACCHI; SERTIÉ, 1994; BACCHI et al., 1995; CARVALHO et al., 1996). Também durante os anos 90, foram descritas atividades frente a doenças do trato respiratório, disenteria e diabetes (BRAGANÇA, 1996). Atividade sobre a inflamação hepática e na ocorrência de hepatotoxicidade também foi relatada na literatura (Di STASI et al., 2002). Segundo Maia (2004) os frutos são antidiarreicos e têm efeitos curativos e também foi observado que as raízes são antipiréticas.

Atividade Alelopática

O estudo de Oliveira et al. (2012) foi avaliar o potencial alelopático de folhas, cascas do caule e vagens maduras de Jucá na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de alface (*Lactuca sativa*). Os extratos das folhas e vagens obtidos a 100 °C reduziu a porcentagem de germinação de *L. sativa*. Assim, os autores concluíram que os diferentes extratos apresentaram atividade alelopática afetando o desenvolvimento de mudas de *L. sativa*.

Efeitos antiinflamatório, analgésico e antinoceptivo

Carvalho e Colaboradores (1996) realizaram um estudo preliminar sobre as atividades anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto aquoso dos frutos de *L. ferrea* obtidos por maceração por 2 h (60 °C). Foram utilizados ratos Wistar albinos e camundongos Swiss. O extrato bruto mostrou inibição na formação de edema em 36,3% dentro de 2 horas do experimento e 23,0% em três horas. No ensaio de injeção intraperitoneal de ácido acético quando tratados com 10 mg/kg e 20 mg/kg de extrato bruto, o número de contorções foi reduzido. Além disso, o teste de carragenina do edema da pata posterior de rato induzido mostrou inibição quando administrada uma dose oral de 300 mg/kg de extrato bruto.

Mais recentemente, o extrato hidroalcoólico (95%) das vagens (cascas e sementes) obtido por meio de agitação (razão de 1:5) foi avaliado frente às atividades anti-inflamatória e analgésica. O extrato, na dose de 50 mg/kg (peso corporal) mostrou inibição do edema de orelha, da permeabilidade vascular induzida e redução da migração de células para a cavidade peritoneal. Adicionalmente, o teste de indução por ácido acético, nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg (de peso corporal) reduziu o número de contorções. Além disso, o estudo relata que no teste de formalina, os efeitos apresentados a partir do extrato apareceram apenas na segunda fase. No teste de toxicidade aguda, foram usados ratos fêmeas do tipo albinos Swiss, a dose de 2 g/kg não causou a morte em animais (LIMA et al., 2012).

As vagens foram usadas para o ensaio de polissacarídeo totais por meio de um processo de lavagem (água e metanol), basificação (NaOH 0,1 M), neutralização (HCl 1 M), e precipitação (EtOH). O total de polissacarídeos foi eluído em cromatografia de troca iônica, originando três frações ricas de polissacarídeos (FI, FII, FIII). O polissacarídeo total na dose de 1 mg/kg, inibiu o edema da pata induzido pela carragenina e a fração FIII inibiu os parâmetros inflamatórios no edema da pata induzido pelos seguintes estímulos: bradicinina, carragenina, composto 48/80, dextrana, histamina, óxido nítrico, prostaglandina E2 e serotonina. Além disso, a fração FIII inibiu o edema de carragenina induzida em animais e o modelo de peritonite inibiu a migração de células e de proteínas por carragenina e N-formilfenilalanina-metionilleucil. Finalmente, os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram também observados no tratamento com FIII durante sete dias com 1 mg/kg. De acordo com os resultados obtidos a perda de peso corporal, danos ao coração, baço ou fígado não foram observados. Houve algumas alterações no peso do rim e do número de linfócitos. No entanto, os níveis de marcadores hepáticos, tais como albumina, alanina transaminase, aspartato

transaminase e globulina não mostraram nenhuma alteração. O teor de ureia mostrou valores elevados, enquanto que o conteúdo de creatinina não apresentou nenhum desvio (PEREIRA et al., 2012).

Os frutos foram submetidos à extração com fluido supercrítico com dióxido de carbono e foram utilizados para curativos de feridas. Em seguida, foram realizados ensaios de citocompatibilidade e capacidade antiinflamatória. No teste de citocompatibilidade, observou-se que os curativos carregados não são tóxicos contra macrófagos mas inibem a adesão de fibroblastos, provando a capacidade anti-inflamatória na regulação da expressão de mediadores do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas do tipo IL-1 (DIAS et al., 2013).

O extrato aquoso e a fração lipídica das sementes foram avaliados para efeito antinociceptivo e verificou-se que ambos apresentaram propriedades anti-inflamatórias e analgésicas centrais. O extrato aquoso causou inibição relacionada com a dose e o valor ID₅₀ foi de 5,99 mg/kg, causando um efeito antinociceptivo induzido na dor periférica. Os autores indicaram que os lípideos são responsáveis pela ação relacionada com a dose antinociceptiva em modelos químicos e térmicos de nocicepção em ratos. Além disso, a porção lipídica inibiu opióides e receptores colinérgicos e a ciclooxigenase-2 (SAWADA et al., 2014).

O extrato bruto das cascas, obtido por turbo-extração (10%, p/v) com água ou acetona:água (7:3, v/v) como solvente de extração foram avaliados em relação a atividades analgésica e anti-inflamatória. Na avaliação da atividade antiinflamatória, o modelo de migração de leucócitos foi utilizado e a avaliação da peritonite por carragenina mostrou redução na quantidade de leucócitos que migraram. Entretanto, a atividade analgésica, determinada pelo teste de placa quente e teste de contorção abdominal por ácido acético induzido, não apresentou resultados positivos (ARAÚJO et al., 2014).

Pereira e colaboradores (2016) analisaram o mecanismo de cura de feridas cutâneas, realizadas por incisão em ratos, do extrato rico em polissacarídeos das cascas do caule de jucá. O extrato promoveu redução da área das feridas e hipernocicepção, além de diminuir a infiltração de leucócitos e a permeabilidade vascular, estimular a fibroplasia, angiogênese, bem como a granulação do tecido formado, depósito de colágeno e formação de camada epitelial. Os autores evidenciaram uma redução nos níveis de TNF- α , PGE₂, IL-1 e proteína total e puderam confirmar que o extrato das cascas do caule de jucá, rico em polissacarídeos, promove a cicatrização de feridas, com o controle da fase inflamatória atenuando a hipernocicepção através da modulação dos mediadores inflamatórios.

Atividades Antimicrobiana e Antifúngica

A atividade antimicrobiana do extrato metanólico dos frutos (80%, v/v) obtido por maceração foi avaliada pela concentração inibitória mínima (CIM). Os valores de CIM obtidos foram 25, 40, 66, 66 e 100 $\mu\text{g/mL}$ frente a cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus casei*. Além disso, os autores indicam que além da atividade encontrada para as cepas, foi observada a ausência de crescimento e demonstra a atividade dos extratos sobre a formação de biofilme (SAMPAIO et al., 2009).

Atividades biológicas foram avaliadas para o extrato bruto aquoso obtido das sementes após tratamento com 50 mm de NaCl, pH 7.0 com 0,15 mol.L⁻¹ de tampão fosfato na proporção 1:10 (m/v) após agitação e centrifugação. Neste estudo, a toxicidade aguda não foi observada a 0,3 mg.10g⁻¹ (peso) e as atividades hemolítica, heparinásica e antibacteriana foram observadas frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraensis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*; e, atividade antifúngica frente *Aspergillus niger*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. truncatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. pallidoroseum*, *Mucor* sp., *Neurospora* sp., *Penicillium herguei*, *Phomopsis* sp., *Phytiumoli gandrums*, *Rhizoctonia solani* e *Thricoderma viridae*. Neste mesmo estudo, atividade larvicida contra *Aedes aegypti* foi relatada (com mortalidade de 85%) (CAVALHEIRO et al., 2009).

Na triagem realizada por Ferreira et al. (2013), os extratos brutos da casca obtidos por refluxo com água, etanol: água (1: 1) e acetona: água (1: 1) mostrou eficácia antifúngica ao inibir o crescimento de cepas ATCC de *Candida* spp. A CIM obtida para *Candida albicans* foi mais eficiente em extratos brutos obtidos com etanol:água e acetona:água (62,5 $\mu\text{g/mL}$), 31,25 a 125 $\mu\text{g/mL}$ foi similar para *C. dubliniensis* e *C. glabrata*, e entre 15,62 e 62,50 $\mu\text{g/mL}$ para *C. krusei*. Os autores sugerem a efetividade desta planta contra cepas de *Candida* não-*albicans*. No mesmo estudo, a concentração fungicida mínima (CFM) foi calculada, revelando que o extrato etanólico obteve valores de CFM de 250 $\mu\text{g/mL}$ frente à cepa de *C. dubliniensis*.

Os frutos foram utilizados na obtenção de extrato etanólico (10%, m/v) por maceração (72 h). O extrato foi avaliado para a existência de microorganismos e foi verificada a ausência de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. O ensaio de atividade antimicrobiana para *S. mutans* e *S. oralis* durante 20 dias e 140 dias após preparação

do extrato, revelou resultados entre 100 e 1,5625 μL obtidos para 20 dias e 3,125 μL para 140 dias (MARREIRO et al., 2014).

Estudos mostraram que a ação combinada de eritromicina com extrato dos frutos de *L. ferrea* obtido com etanol:água (7:3) apresentam potencial sinérgico quando em associação, em relação a cepas de *Staphylococcus aureus*. A combinação da eritromicina com o extrato hidroalcoólico também demonstrou danos ao DNA do estafilococo pela análise de eletroforese realizada (SILVA et al., 2013).

A atividade antifúngica e antimicotoxigênica contra *Aspergillus parasiticus* utilizando o método de diluição em agar foi reportado por Martins et al. (2014). Os efeitos antifúngicos do extrato mostraram atividade pronunciada em diferentes graus de crescimento nas concentrações estudadas (1,08, 1,62 e 3,24%) e o extrato de jucá foi efetivo no controle do crescimento e na produção de aflatoxinas por *A. parasiticus*.

Araújo e colaboradores (2014) também avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos da casca (aquoso e acetona:água, 7:3). O ensaio foi realizado pelo método de difusão em ágar e microdiluição frente a cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC, *Staphylococcus epidermidis* INCQS, *Enterococcus faecalis* ATCC e um isolado clínico de *Staphylococcus aureus* metilina resistente), bem como cepas Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC, *Salmonella enteritidis* INCQS, *Shigella flexneri* e *Klebsiella pneumoniae*). Os extratos brutos do tipo acetona: água (7:3) mostraram maior inibição contra a maioria das bactérias, e o extrato bruto aquoso mostrou uma maior atividade contra *S. epidermidis* (16,00 mm), *E. faecalis* (12,67 mm) e *S. flexneri* (13,00). Em relação à concentração inibitória mínima, os resultados indicaram que o extrato bruto acetona:água (7:3, v/v) proporcionou o melhor resultado em comparação com o extrato bruto aquoso, adicionalmente, a maioria das bactérias gram-negativas foram resistentes, especialmente *E. coli*, com valor de CIM maior que 10mg/mL (ARAÚJO et al., 2014).

Nascimento e colaboradores em 2015 demonstraram a capacidade antimicrobiana de extrato etanólico obtido das sementes de jucá frente às bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os valores de CIM encontrados ficaram entre 50 e 125 $\mu\text{g/mL}$.

O extrato seco dos frutos obtido por Spray dryer (7,5 %, p/v) foi utilizado para obter um enxaguatório bucal, o qual foi avaliado quanto a presença de cepas de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os autores indicaram a

ausência de microorganismos (bactérias, fungos, leveduras) no produto obtido (VENÂNCIO et al., 2015).

Paiva e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos obtidos a partir da maceração (3 h) das cascas de jucá (10%, p/v; etanol 70%) frente à *Staphylococcus* spp. isolados do leite de cabras com mastite, sendo evidenciado pelos autores a capacidade do extrato na inibição das cepas de *S. aureus*, principais responsáveis pela contaminação de leite de caprino.

Extratos etanólicos da entrecasca e vagem de *L. ferrea* foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana em relação às cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (ATCC) e cepas multiresistentes, e a modulação da atividade antibiótica. Nesse estudo, foi verificado que os extratos apresentaram valor de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ para todas as cepas. Já em relação a atividade moduladora de antibióticos, os autores relatam que não foi observada modulação significativa da atividade antibiótica sobre clindamicina, exceto quando associada ao extrato etanólico da vagem frente a cepa de *S. aureus*; além disso, quando o extrato etanólico da entrecasca foi associado a aminoglicosídeos, observou-se sinergismo com a amicacina e gentamicina (FERREIRA et al., 2015).

Antidiabética

O extrato hidroalcoólico (80%) dos frutos foi particionado, originando sete novos extratos e frações. O extrato obtido com 1-BuOH, o resíduo e a fração 7 apresentaram melhor atividade inibidora contra aldose redutase (UEDA et al., 2002). Ueda et al., (2004) testaram a aldose redutase *in vitro* de ácido elágico e ácido 2-(2,3,6-tri-hidroxi-4-carboxifenil) ácido elágico, este último isolado a partir dos frutos de *L. ferrea*, e foi verificado que ambos os compostos são dose-dependentes e inibiram o acúmulo de sorbitol nos eritrócitos, cristalino e o nervo ciático sob incubação *in vitro* com glicose.

Por outro lado, estudos de Carvalho et al. (2010) indicaram que os extratos aquosos de *L. ferrea* quando usados em tratamento crônico na reatividade vascular de ratos diabéticos induzidos pela aloxana não foram capazes de modificar as contrações ou relaxamentos.

Vasconcelos et al. (2011), prepararam o extrato bruto aquoso por infusão (7,5:100, m/v) a partir das cascas de *L. ferrea* e avaliaram as propriedades farmacológicas (propriedades hipoglicêmicas) e os mecanismos de redução do nível de glicose no sangue de ratos diabéticos através das proteínas quinase B (PKB/Akt), AMP-proteína ativada (AMPK) e

acetil-CoA carboxilase (ACC), com doses de 300 e 450 mg/kg/dia. Os autores verificaram que o extrato bruto reduziu os níveis de glicose no sangue e melhorou o estado metabólico dos animais. P-Akt apresentou-se aumentado no fígado e no músculo esquelético dos animais tratados, P-AMPK foi reduzida apenas no músculo esquelético destes animais e P-ACC foi reduzida, tanto no fígado e no músculo esquelético. Por fim, os parâmetros bioquímicos em uma dose de 450 mg/kg/dia apresentaram reduções nos níveis de ureia, ácido úrico, AST e ALT.

Antioxidante

Em estudos realizados por Silva et al. (2011), o extrato dos frutos obtido com etanol:água (7:3) por agitação a 300 rpm durante 15 h, exibiu uma forte atividade antioxidante no teste *in vitro* e demonstraram uma correlação significativa e linear entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante realizada por ensaio fosfomolibdênico, bem como a atividade de eliminação de radicais superóxido. A atividade antioxidante total foi de 38,06% e no ensaio de fosfomolibdênio de 21,08%, ambos em relação ao ácido ascórbico. No mesmo estudo, a eliminação de radicais por ensaio de óxido nítrico foi calculada e verificou-se que a IC₅₀ foi igual a 199,2 µg/mL. Por outro lado, o ensaio de degradação do DNA apresentou a capacidade para inibir a degradação do DNA.

Um estudo sobre a capacidade antioxidante pelo radical DPPH foi realizado por Port's et al. (2013), e valores entre 0,5 e 1,0 foram verificadas, os quais representam atividade moderada; e quando analisado com o sistema β-caroteno/ácido linoléico, os resultados mostraram altos valores de 93,29 (BHT µg/mL).

Recentemente, as vagens de jucá foram empregadas na preparação de extrato etanólico na proporção 1:10, obtido por agitação. O extrato obtido foi submetido ao ensaio da atividade antioxidante pelo radical cátion ABTS, atividade sequestradora do radical livre DPPH e branqueamento de β-caroteno. Os autores relataram que o extrato apresentou atividade antioxidante e atividade sequestradora (NASCIMENTO et al., 2015).

Antitumoral

Os efeitos antitumorais promovidos pelos frutos foram testados *in vitro* frente ao vírus Epstein-Barr antígeno precoce (EBV-EA). Os compostos isolados de ácido gálico e galato de

metila diminuíram significativamente o número médio de papilomas, promovendo, assim, os efeitos de 12-O-tetra-decanoilforbol-13-acetato (TPA) na formação de tumores da pele em ratos (NAKAMURA et al., 2002a; 2002b).

Em 2003, a atividade quimiopreventiva de 2-(2,3,6-tri-hidroxi-4-carboxifenil) ácido elágico dos frutos foi avaliada e os dois estágios de papilomas da pele do rato induzidos foram inibidos por este composto (INADA et al., 2003).

Antiviral

A replicação do vírus do herpes simplex (HSV) e poliovírus (PV) foram avaliadas pelo polissacarídeo sulfatado obtido a partir da extração aquosa das sementes seguido de sulfatação. O ensaio citotóxico demonstrou um efeito sobre a replicação de HSV-1 e PV-1 com CC_{50} superior a 3000 $\mu\text{g/mL}$; a atividade antiviral apresentou IC_{50} de 405 $\mu\text{g/mL}$ e 1,73 $\mu\text{g/mL}$, para o HSV-1 e PV-1, respectivamente. Os autores provaram que o polissacarídeo sulfatado obtido a partir de sementes de *L. ferrea* inibiu a absorção do vírus nas fases após a penetração e a síntese de proteína viral (LOPES et al., 2013).

Cardiovascular

O efeito cardiovascular do extrato aquoso bruto da casca do caule (obtido por uma infusão com água destilada a 100 °C) induziu a hipotensão associada à taquicardia em ratos normotensos. A dose de 40 mg/kg induziu bradiarritmias transientes. A ocorrência de vasodilatação na artéria mesentérica de rato mediada por canal de aberturas K^+ sensíveis a ATP também foi relatado (MENEZES et al., 2007).

Clastogenicidade

Diferentes concentrações do extrato bruto aquoso foram testadas contra clastogenicidade aguda *in vivo* em células da medula óssea de ratos Wistar utilizando a análise de aberração cromossômica. O estudo mostrou que o extrato não apresentou potencial clastogênico, o que implica que a mistura de compostos presentes no extrato não induziu um aumento significativo em células com micronúcleos ou aberrações cromossômicas em doses de 500, 1.000 e 1.500 mg/kg de peso corporal (SOUZA et al., 2006).

DNA Topoisomerase

Para investigar o potencial da casca sobre a inibição da DNA topoisomerase II, a casca foi extraída com acetona para obter os compostos paufferol A, B e C. Esses apresentaram atividades inibidoras contra a topoisomerase II humana e a proliferação celular através da indução da apoptose em células de leucemia em humanos HL60. O Paufferol A apresentou um valor de IC₅₀ igual a 2,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ contra topo II humana e de 5,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ contra células HL60 (NOZAKI et al., 2007). Paufferol B e C apresentaram atividades inibidoras contra topo II com um IC₅₀ iguais a 15,3 e 14,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente; e, os efeitos inibidores foram demonstrados na proliferação das células HL 60 com valores de IC₅₀ de 11,6 e 12,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para Paufferol B e C, respectivamente (OHIRA et al., 2013).

Inibidores de proteinase

Bariani et al. (2012) relataram a utilização de inibidores de tripsina em sementes de *L. ferrea* contra os fungos patogênicos *Colletotrichum guaranicola*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*. Os extratos de proteína foram purificados em Sephadex G-100, submetido à detecção de inibidores e análise de SDS-PAGE. Verificou-se um efeito na redução da esporulação e micélio dos fungos.

Outras atividades

A administração do extrato aquoso de *L. ferrea* em ratos Wistar submetidos a um bioensaio de curto prazo mostrou uma redução de peso não significativa da vesícula seminal (REBOREDO et al., 2006). O extrato aquoso do fruto, a uma dose de 300 mg/kg de peso corporal mostrou que não há interferência com o funcionamento do sistema reprodutor de ratos Wistar (LUCINDA et al., 2010). Além disso, a inflamação do fígado e a ocorrência de hepatotoxicidade já foram relatadas na literatura (Di STASI et al., 2002).

Recentemente, um estudo reuniu algumas espécies vegetais, dentre elas *L. ferrea* e avaliou a eficácia da inibição da atividade hemorrágica induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*. O extrato aquoso dos frutos obtido na proporção 1:5 (p/v) a 70 °C durante 2 h sob agitação constante (1250 rpm), seguido de liofilização, foi avaliado frente ao veneno liofilizado da espécie *Bothrops jararaca*. Ratos machos e fêmeas do tipo Swiss (34–41 g)

foram utilizados neste estudo. Os autores verificaram que o extrato bruto de *L. ferrea* não foi capaz de inibir a hemorragia induzida pelo veneno (MOURA et al., 2015).

Kobayashi e colaboradores (2015) estudaram o potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de jucá (12,5%) em ratos Wistar e verificaram boa reepitelização e colagenização discreta a moderada.

Fernandes e colaboradores (2016) testaram a ação repelente dos frutos de jucá para espécies de moscas da família *Calliphoridae* (*Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia eximia*, *Lucilia sericata* e *Sarconesia chlorogaster*), evidenciando que as armadilhas montadas contendo extrato de jucá a 20% e 50% apresentaram repelência, com percentual de 97,5% e 100%, respectivamente.

3.1.3 Composição Química

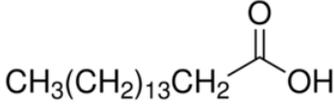
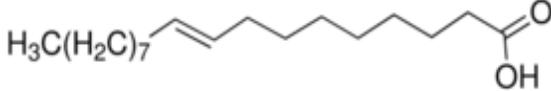
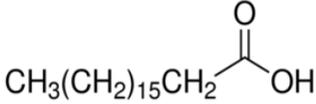
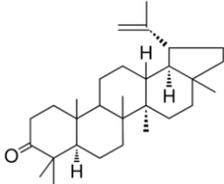
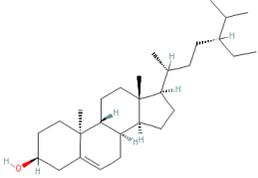
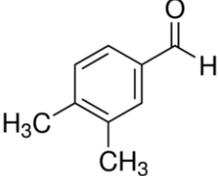
A variedade de atividades biológicas atribuídas à espécie é principalmente devido aos compostos fenólicos e polissacarídeos presentes, principalmente na casca e sementes de *L. ferrea*. Os ácidos graxos, terpenóides, compostos fenólicos (chalcona, taninos) e os polissacarídeos têm sido relacionados, isolados e elucidados a partir de várias partes de *L. ferrea*.

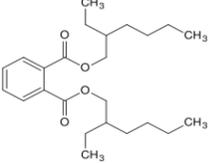
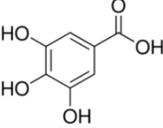
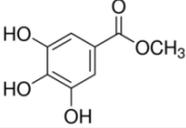
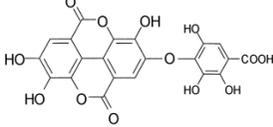
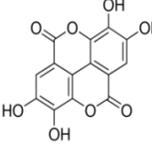
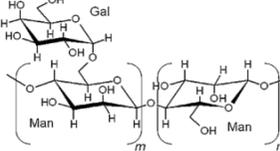
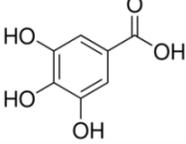
Ácidos Graxos e Terpenoides

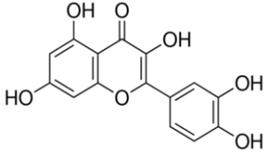
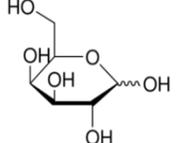
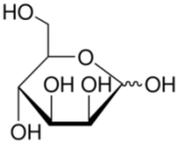
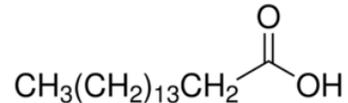
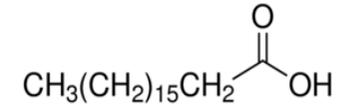
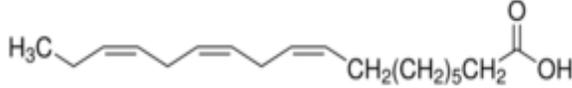
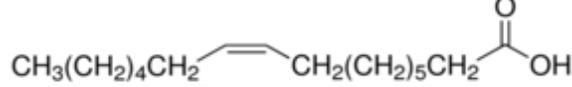
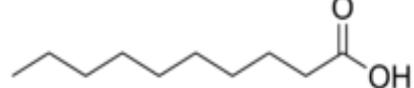
Nos estudos de Dias et al. (2013) foi relatada a presença de ácidos graxos nos frutos após a extração com fluido supercrítico (SFE) utilizando CO₂. A análise por cromatografia gasosa revelou que os frutos apresentam compostos insaturados (52%) e saturados (26%) de ácidos graxos, bem como os terpenóides (13%); há também o ácido linoleico, ácido palmítico, ácido elaidico, gama-sitosterol, ácido esteárico e lupenona. Além disso, 3,4-dimetilbenzaldeído e di-2-etilhexilftalato também foram identificados (Tabela 1). Sawada et al. (2014) também identificaram a presença de ácidos graxos na porção lipídica das sementes, que foi obtida após extração com acetona. Também foram identificados linoleico, palmítico, esteárico e oleico, bem como ácidos palmitolênico e cáprico.

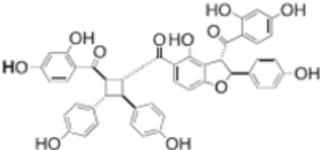
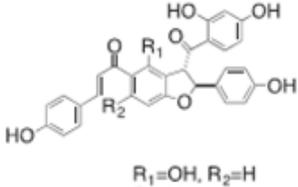
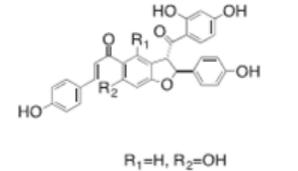
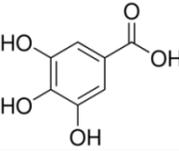
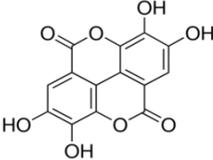
Recentemente, uma análise realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) confirmou a presença de ácidos graxos no extrato bruto aquoso obtido das sementes de *L. ferrea* (DE MOURA et al., 2015).

Tabela 1 - Principais constituintes de algumas partes de *Libidibia ferrea*.

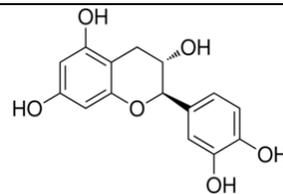
Parte da planta	Composto	Estrutura Química	Referência
	Ácido linoleico		Dias et al., 2013
	Ácido palmítico		Dias et al., 2013
	Ácido eláídico		Dias et al., 2013
	Ácido esteárico		Dias et al., 2013
Frutos	Lupenona		Dias et al., 2013
	Gama-sitosterol		Dias et al., 2013
	3,4-dimetilbenzaldeído		Dias et al., 2013

	di-2-etilhexilftalato		Dias et al., 2013
	Ácido gálico		Nakamura et al., 2002a,b; Silva et al., 2013
	Metil galato		Nakamura et al., 2002a,b; Silva et al., 2013
	2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) ácido elágico		Ueda et al., 2002; 2004
	Ácido elágico		Ueda et al., 2002; 2004
	Galactomanana		Souza et al., 2010
Folhas	Ácido gálico		Port's et al., 2013; Silva et al., 2014

	Quercetina		Port's et al., 2013
	D-galactose		Lopes et al., 2013
	D-manose		Lopes et al., 2013
Sementes	Ácido linoleico		Sawada et al., 2014
	Ácido palmítico		Sawada et al., 2014
	Ácido esteárico		Sawada et al., 2014
	Ácido linolenico		Sawada et al., 2014
	Ácido palmitolenico		Sawada et al., 2014
	Ácido caprico		Sawada et al., 2014

Paufferol A		Nozaki et al., 2007
Paufferol B	 R ₁ =OH, R ₂ =H	Ohira et al., 2013
Cascas e cascas do caule		
Paufferol C	 R ₁ =H, R ₂ =OH	Ohira et al., 2013
Ácido gálico		Vasconcelos et al., 2011; Araújo et al., 2014
Ácido elágico		Vasconcelos et al., 2011

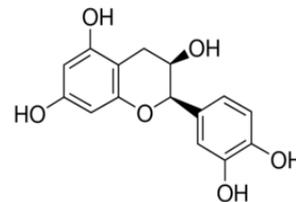
Catequina



Vasconcelos et al., 2011;

Araújo et al., 2014

Epicatequina



Vasconcelos et al., 2011

Fonte: Próprio Autor.

Compostos fenólicos

Entre os compostos fenólicos relacionados com as diferentes partes do *Libidibia ferrea*, os taninos condensados e hidrolisáveis e chalconas merecem especial atenção.

Estudos fitoquímicos por cromatografia em camada delgada (CCD) revelaram a presença de cumarinas, flavonoides, saponinas e os esteróides e taninos (catequinas e ácidos gálico e elágico) (GONZALEZ et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2011; ARAÚJO et al., 2014; DE MOURA et al., 2015).

Em seus estudos, Vasconcelos et al. (2011) e Araújo et al. (2014) realizaram análise por espectrofotometria e cromatografia. Vasconcelos et al. (2011), calcularam o teor de taninos totais em extrato bruto da casca em miligramas por gramas de ácido gálico e encontraram um valor de 266 mg/g. Por outro lado, a análise por CLAE encontrou teores de ácido gálico, catequina, epicatequina e ácido elágico iguais a 112,76, 17,75, 12,00 e 6,13 mg/g, respectivamente. Análise realizada por Araújo et al. (2014) por CCD dos extratos brutos das casca revelou a presença de taninos condensados (catequinas) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico). Na análise por CLAE foram identificados, ácido gálico e catequina nos extratos brutos obtidos com água e acetona aquosa (7:3, v/v).

Ueda et al. (2002), isolaram a partir de frutos o composto ácido elágico por análise espectral e 2-(2,3,6-tri-hidroxi-4-carboxifenil) ácido elágico, em conformidade com a evidência espectral e dados 2D-RMN. De acordo com Nakamura et al. (2002a,b), ácido gálico e galato de metila foram isolados a partir dos frutos jucá depois de terem sido submetidos a refluxo com metanol durante 5 h, e obtendo frações clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (EtOAc), butanólica (n-BuOH) e aquosa (H₂O). A fração EtOAc foi submetida a cromatografia em gel de sílica e Sephadex LH-20, e estes compostos foram identificados por comparações espectrais (IV, ¹H RMN e MS).

Nos frutos, o conteúdo fenólico foi calculado a partir de um extrato obtido com etanol:água (7:3) e foram obtidos valores de 460 mg/g de ácido gálico (SILVA et al., 2011). Sampaio et al. (2009) também calculou o teor de polifenóis no extrato metanólico e a quantificação de compostos fenólicos totais foi estimada pelo método do azul da Prússia e foi estimada em 7,3%. Além disso, a análise espectral (¹H RMN) deste extrato metanólico foi realizada e revelou hidróxi fenóis e compostos metoxilados.

As chalconas são também substâncias que estão presentes nesta espécie, a literatura se refere à presença destes compostos isolados a partir do caule de *L. ferrea*. O extrato bruto foi

obtido com acetona à temperatura ambiente e foi subsequentemente particionado com n-hexano, EtOAc e BuOH. O extrato EtOAc foi submetido a uma cromatografia em coluna contendo gel de sílica, eluição em gradiente de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, obtendo as substâncias Pauferrol A (NOZAKI et al., 2007), B e C, e as suas estruturas foram determinadas por espectroscopia RMN 2D (OHIRA et al., 2013).

Port's et al. (2013) relataram os compostos fenólicos totais (68,13 mg de ácido gálico/g) e flavonoides totais (4,56 mg de catequina/g) em folhas de *L. ferrea*. Também foi identificada a presença do tanino hidrolisável ácido gálico e o flavonóide quercetina no extrato metanólico hidrolisado.

O extrato metanólico (20%) dos frutos, descrito por Silva et al. (2013), apresentou teor de ácido gálico igual a 0,855 mg/g e o derivado galato de metila em concentração igual a 0,866 mg/g. Estes resultados foram determinados por cromatografia líquida ultra rápida.

Na solução extrativa das folhas, obtida por refluxo com água, o teor de polifenóis foi calculado pelo método de Folin-Ciocalteu e a presença de ácido gálico foi identificado e mensurada por CLAE (SILVA et al., 2014).

Polissacarídeos

Os polissacarídeos são a outra classe de compostos com várias atividades biológicas relacionadas com *L. ferrea*. O extrato hidrocolóide purificado a partir das sementes apresentou 75% de hidratos de carbono total e 9% da proteína. Espectros de RMN 1D/2D indicaram a presença de galactomanana ligada a (1→4)- β -D-manopiranosose, parcialmente substituídos em O-6 com uma única unidade de cadeias laterais de α -D-galactopiranosose. A divisão de três sinais de ^{13}C na região das unidades de 4-O-manpiranosose revelou as unidades α -D-Galpiranosose (SOUZA et al., 2010).

Pereira et al. (2012) utilizaram as vagens para obter o total polissacarídeos liofilizado com subsequente cromatografia de troca iônica. O conteúdo de polissacarídeos obtido apresentou rendimento de 2,8%, com 31% de carboidratos (48% de ácido urônico) e 3% de proteína, proporcionando a obtenção de frações de polissacarídeos FI, FII e FIII, entre os quais, FIII apresentou valores elevados de hidratos de carbono.

Outro estudo que demonstrou a presença de polissacarídeos em *L. ferrea*, obteve um extrato aquoso obtido a partir das sementes seguido de sulfatação. O polissacarídeo sulfatado foi caracterizado por Carbono 13, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (1H) e FT-

IR. A análise por FT-IR revelou bandas características de polissacarídeos e as análises de ^{13}C , RMN- ^1H mostrou a presença de monossacarídeos D-galactose e D-manose (LOPES et al., 2013). A presença de galactomanana nas sementes foi também provado por Gallão et al. (2013), que também indicou que a galactomanana está localizada no endosperma.

3.2 CONCLUSÃO

Libidibia ferrea Mart. ex Tul. L. P. Queiroz é uma planta medicinal utilizada na medicina tradicional para combater a anemia, doenças pulmonares e diabetes. A espécie também apresenta propriedades antipiréticas e anti-diabética. Vários estudos confirmaram essas atividades, bem como anti-inflamatória, antimicrobiana e outras propriedades farmacológicas. No entanto, apesar dos numerosos relatos sobre suas propriedades biológicas, há um pequeno número de estudos sobre os compostos químicos da espécie. Considerando este aspecto, mais estudos são necessários para correlacionar a presença destes compostos com tais propriedades.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G. et al. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; NETO, M. A. S.; SILVA, G. R.; ARAÚJO Jr., R. F. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 2014.
- AZULGARAY, D. **Plantas que curam**. São Paulo: Hemus Press. 1984.
- BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**, v. 60, p. 118–120, 1994.
- BACCHI, E.; SERTIÉ, J. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Médica**, v. 61, p. 204-207, 1995.
- BALBACH, A. **As Plantas que Curam**. São Paulo: Três Press. p. 302-303, 1972.
- BARIANI, A.; GONÇALVES, J. F. C.; CHEVREUIL, L. R.; CAVALLAZZI, J. R. P.; SOUZA, L. A. G.; BENTES, J. L. S. et al. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathology**, v. 38, n. 2, p. 131-138, 2012.
- BARROS, M. A. G. **Flora medicinal do Distrito Federal**. Brasília: Brasil Florestal. v. 12, n. 50, p. 35-45, 1982
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas. p. 540, 1960.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará**. 2ª edição. São Paulo: Três Press. p. 45-46, 1976.
- BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas Mediciniais Antidiabéticas**. Niterói: EDUFF Press, p. 172, 1996.
- BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006.
- BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Relação de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. Brasília, 2009.
- CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; FILHO, D. S.; SARTI, S. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of

Caesalpinia ferrea crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175-78, 1996.

CARVALHO, A. A.; MENEZES, I. A. C.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V. Effect of the Chronic Treatment with Aqueous Extract of *Caesalpinia ferrea* and *Chrysobalanus icaco* on the Vascular Reactivity of Diabetic Rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 5, p. 845-848, 2010.

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I. M. et al. Biological and enzymatic activities of aqueous extract of seeds from *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 586-591, 2009.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 93, p. 366-376, 2015.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press. 1981.

DIAS, A. M. A.; REY-RICO, A.; OLIVEIRA, R. A.; MARCENEIRO, S.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. et al. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **The Journal of Supercritical Fluid**, v. 74, p. 34-45. 2013.

DI STASI, L. C.; GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M.; HIRUMA LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. M. **Fabales medicinais**. In: Di Stasi LC AND Hiruma Lima CA (Eds), Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora UNESP, p. 276-320, 2002.

EMBRAPA. http://www.cnpf.embrapa.br/pesquisa/efb/index_especies.htm, Accessed in: 10/10/2014.

FERNANDES, C. P. M.; MACHADO, C.; LOPES, T. V.; CUNHA FILHO, N.; BRETANHA, P. R.; SCHONS, S. et al. Repellent Action of *Carapa guianensis* and *Caesalpinia ferrea* for flies species of Calliphoridae family. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 867-870, 2016.

FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; LANGASSNER, S. M. Z.; MELLO, J. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SOARES, L. A. L. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 40, p. 3008-3013, 2013.

FERREIRA, J. V. A.; LIMA, L. F.; FIGUEREDO, F. G.; MATIAS, E. F. F.; SOUZA, E. S.; ANDRADE, J. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do extrato etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 1, 2015.

FLORA DO BRASIL. Lista de Espécies da Flora do Brasil.
<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em: 20/10/2014.

GONZALEZ, F. G.; BARROS, S. B. M.; BACHI, E. M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* MART. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 40, p. 79, 2004.

GALLÃO, M. M. I.; NORMANDO, L. O.; VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; RICARDO N. M. P. S.; BRITO, E. S. Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea*. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 58–62, 2013.

INADA, A.; NAKANISHI, T.; MURATA, H.; INATOMI, Y.; UEDA, H.; KAWANISHI, K. Cancer Chemopreventive Activity of 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl)ellagic Acid from the fruits of *Caesalpinia ferrea*. **Natural Medicines**, v. 57, n. 5, p. 192-195, 2003.

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n.89, 2011.

KASSING, M.; U. JENELTEN, SCHENK, J.; HÄNSCH, R.; STRUBE, J. Combination of rigorous and statistical modeling for process development of plant-based extractions based on mass balances and biological aspects. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 1, p. 109-132, 2012.

KASSING, M.; JENELTEN, U.; SCHENK, J.; STRUBE, J. A new approach for process development of plant-based extraction Processes. **Chemical Engineering & Technology**, v. 33, n. 3, p. 377–387, 2010.

KOBAYASHI, Y. T. S.; ALMEIDA, V. T.; BANDEIRA, T.; ALCÂNTARA, B. N.; SILVA, A. S. B.; BARBOSA, W. L. R. et al. Phytochemical evaluation and wound healing potential of the fruit extract ethanolic of Jucá (*Libidibia ferrea*) in Wistar rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34-40, 2015.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Garden, Kew, Inglaterra, p. 369. 1987.

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

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. p. 381, 2002.

LUCINDA, L. M. F.; ROCHA, C. B.; REBOREDO, M. M.; FARIA, V. C.; SÁ, R. C. S. Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia ferrea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 907-914, 2010.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica, Leitura & Arte. pp. 413, 2004.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais. Guia de Seleção e Emprego de Plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária. 349p. 2007.

MATOS, A. C. B.; ATAÍDE, G. M.; BORGES, E. E. L. Physiological, physical, and morpho-anatomical changes in *Libidibia ferrea* ((Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz) seeds after overcoming dormancy. **Journal of Seed Science**, v. 37, p. 026-032, 2015.

MARREIRO, R. O.; BANDEIRA, M. F. C. L.; SOUZA, T. P.; ALMEIDA, M. C.; BENDAHAM, K.; VENÂNCIO, G. N. et al. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Journal of Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 6, p. 9-13, 2014.

MARTINS, M.; KLUCZKOVSKI, A. M.; SOUZA, T. P.; PACHECO, C.; SAVI, G. D.; SCUSSEL, V. M. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) and jucá (*Libidibia ferrea* Mart) extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 131-137, 2014.

MENEZES, I. A. C.; MOREIRA, I. J. A.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p. 41-47, 2007.

MOURA, V. M.; SOUSA, L. A. F.; DOS-SANTOS, M. C.; RAPOSO, J. D. A.; LIMA, A. E.; OLIVEIRA, R. B. et al. Plants used to treat snakebites in Santarém, western Pará, Brazil: An assessment of their effectiveness in inhibiting hemorrhagic activity induced by *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 224-232, 2015.

NASCIMENTO, P. L. A.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; GOMES, J. E. G.; SILVA, M. D. S.; SOUZA, S. A.; SILVA, T. M. S. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods. **Revista Fitos**, v. 9, n. 3, p. 161-252, 2015.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M. et al. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81 p. 135-137, 2002a.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M. et al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, p. 119-124, 2002b.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K-I.; KIDO, M.; HAYASHI, K-I.; IKEDA, S.; MATSUURA, N. et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* 2mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 8290-8292, 2007.

OLIVEIRA, A. K.; COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; DIÓGENES, F. E. P. Atividade alelopática de extratos de diferentes órgãos de *Caesalpinia ferrea* na germinação de alface. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1397-1403, 2012.

- OHIRA, S.; TAKAY, K.; MITSUI, T.; KIDO, M.; HAYASHI, K-I.; HAYASHI, K-I et al. New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 5052–5055, 2013.
- PAIVA, W. S.; NETO, F. E. S.; BANDEIRA, M. G. L.; ABRANTES, M. R.; BATISTA, A. C. L.; SILVA, J. B. A. Atividade antibacteriana da casca do jucá (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz), frente a *Staphylococcus* spp. isolados do leite de cabras com mastite. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 2, p.141-146, 2015.
- PEREIRA, L. P.; DA SILVA, R. O.; BRINGEL, P. H.; DA SILVA, K. E.; ASSREUY, A. M.; PEREIRA, M. G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 642–648. 2012.
- PEREIRA, L. P.; MOTA, M. R. L.; BRIZENO, L. A. C.; NOGUEIRA, F. C.; FERREIRA, E. G. M.; PEREIRA, M. G. et al. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: role of TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β . **Journal of Ethnopharmacology**. In Press, Accepted Manuscript. 2016.
- PFERSCHY-WENZIG, E. M.; BAUER, R. The relevance of pharmacognosy in pharmacological research on herbal medicinal products. **Epilepsy & Behavior**, v. 52, Part B, p. 344–362, 2015.
- PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. P. 490-492. 1984.
- PORT'S, P. S.; CHISTÉ, R. C.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Research International**, v. 53, p. 875-881, 2013.
- REBOREDO, M. M.; LUCINDA, L. M. F.; ROCHA, C. B.; QUEIROZ, G. T.; FARIA, V. C.; VIEIRA, V. A. et al.. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 25, p. 17–29, 2006.
- SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, M. R. A. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 289–294, 2009.
- SANT'ANA, P. J. P.; ASSAD, A. L. D. Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da CEME. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 508-512, 2004.
- SAWADA, L. A.; MONTEIRO, V. S. C.; RABELO, G. R.; DIAS, G. B.; CUNHA, M.; NASCIMENTO, J. L. M. et al. *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: possible involvement of Opioid and Cholinergic receptors. **BioMedical Research International**, 508725, 2014.
- SILVA, L. C. N.; JÚNIOR, C. A. S.; SOUZA, R. M.; MACEDO, A. J.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2222-2228, 2011.

SILVA, L. C. N.; MIRANDA, R. C. M.; GOMES, E. B.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. et al. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 32, p. 2358-2364, 2013.

SILVA, F. A.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SILVA, F. S. B.; MAIA, L. C. Arbuscular mycorrhizal fungi increase gallic acid production in leaves of field grown *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 36, p. 1110-1115, 2014.

SOUZA, A. B.; SOUZA, L. M. S.; CARVALHO, J. C. T. et al. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 380-83, 2006.

SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F. A.; SIERAKOWSKI, M. R. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 641–647, 2010.

THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; SOUZA, P. S. Avaliação das atividades anti-inflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaeflorus*. 10th Brazilian Symposium in Medicinal Plants. São Paulo, Brasil. 1998.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 377-381, 2002.

UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. Effects of Ellagic Acid and 2-(2,3,6-Trihydroxy-4-carboxyphenyl)ellagic Acid on Sorbitol Accumulation *in vitro* and *in vivo*. **Biology Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1584-1587, 2004.

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

VENÂNCIO, G. N.; RODRIGUES, I. C.; SOUZA, T. P.; MARREIRO, R. O.; BANDEIRA, M. F. C. L.; CONDE, N. C. O. Herbal mouthwash based on *Libidibia ferrea*: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density. **Revista de Odontologia UNESP**, v. 44, n. 2, p. 118-124, 2015.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

ZANIN, J. L. B.; DE CARVALHO, B. A.; MARTINELLI, P. S.; DOS SANTOS, M. H.; LAGO, J. H.; SARTORELLI, P. et al. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, v. 17, p. 7887-7902, 2012.

CAPÍTULO II
ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA E
CROMATOGRÁFICA DE POLIFENÓIS DOS
FRUTOS DE *LIBIDIBIA FERREA* (JUCÁ)

4 CAPÍTULO II - ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA E CROMATOGRÁFICA DE POLIFENOIS DOS FRUTOS DE *LIBIDIBIA FERREA* (JUCÁ)

Os compostos fenólicos (principalmente, os monômeros de taninos hidrolisáveis, ácido gálico e ácido elágico), relatados na composição química de *Libidibia ferrea*, têm potencial para serem considerados como os principais componentes do fruto da espécie, quer seja pela sua concentração na droga vegetal ou pelas propriedades farmacológicas atribuídas a mesma. Tais compostos podem ser encontrados em frutas e vegetais, além disso, é possível encontrá-los nas diversas partes da planta, entretanto, com distribuição quantitativa que pode variar entre os diferentes tecidos da planta ou entre populações diferentes da mesma espécie vegetal. São considerados parte da mistura complexa e apenas uma pequena quantidade de espécies vegetais possuem avaliação e controle de qualidade a cerca de sua composição química (HASLAM, 1996; LAPORNIK; PROSEK; GOLC, 2005; PINELO et al., 2005).

Devido à variedade de estruturas que os polifenóis apresentam, a determinação dos mesmos em matrizes vegetais apresentam alguns aspectos que são essenciais, tais como o processamento da amostra, tipo de analito e suas propriedades físico-químicas, método de extração e métodos de detecção eficazes.

Um dos métodos utilizados para análise de polifenóis é a espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis). Trata-se de um método fácil, que pode ser utilizado para caracterizar, analisar a estabilidade de amostras e identificar possíveis adulterações. Diversos trabalhos têm demonstrado a aplicabilidade da espectroscopia UV-Vis na análise de extratos vegetais (BUENO et al., 2012; DICIAULA et al., 2014; NIMAL PUNYASIRI et al., 2015). Considerando a análise de polifenóis em matrizes vegetais, o teor geralmente é mensurado através da quantificação de fenólicos totais utilizando o método de Folin-Ciocalteu (1927), que também é adotado pela Farmacopéia Brasileira (2010) e Farmacopeia Europeia (2013).

A fim de aumentar a especificidade e eliminar as interferências da análise de polifenóis totais por UV-Vis, uma técnica bastante utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência. A técnica é considerada sensível e versátil para a separação e caracterização de compostos, especialmente originados de matrizes complexas, como os produtos naturais. Alguns métodos por CLAE têm sido descritos para a determinação de ácido gálico (CARVALHO et al., 2009; SHARMA; SINGLA, 2013; FERNANDES et al., 2015; NIMAL PUNYASIRI et al., 2015) e de ácido elágico (AGUILERA-CARBO et al., 2008; ZHOU et al.,

2008; MØLLER; HANSEN; CORNETT, 2009; DHOOGHE et al., 2011; PATEL; PATEL; PATEL, 2012; BOROS et al., 2014) em matrizes vegetais.

Além disso, as técnicas cromatográficas podem ser usadas para documentar impressões digitais (*fingerprints*) de espécies vegetais e auxiliar na identificação de variações do material vegetal. As impressões digitais cromatográficas podem ser definidas como um padrão dos marcadores biológicos ou analíticos presentes na matéria prima vegetal. Considerando esta definição, diferentes técnicas podem ser utilizadas na obtenção de impressões digitais cromatográficas e podem ser utilizadas para o controle de espécies vegetais e seus derivados, tais como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As análises por cromatografia em camada delgada desempenham um papel importante como ferramentas analíticas para códigos oficiais, como as Farmacopeias Brasileira (2010), Chinesa (2010) e Europeia (2013). A técnica foi aperfeiçoada com o emprego de placas de alta eficiência e o auxílio de automação, surgindo a cromatografia em camada delgada de alta eficiência que tem se expandido, por apresentar melhor separação das bandas (resolução), menor erro operacional, além de elevadas repetibilidade e reprodutibilidade dos cromatogramas (MARSTON, 2011; SPANGENBERG; POOLE; WEINS, 2011).

Neste contexto, este capítulo trata do desenvolvimento e estabelecimento de procedimentos simples e reprodutíveis para as análises qualitativa (CCD-AE e CLAE-DAD) e quantitativa (UV-Vis e CLAE-DAD) de polifenóis na matéria prima e produtos derivados dos frutos de *L. ferrea*.

4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1.1 Espécies vegetais e *fingerprint*

Na maioria das vezes, os produtos farmacêuticos elaborados a partir de plantas medicinais têm estabelecido uma crescente aceitação terapêutica. Portanto, a matéria-prima vegetal deve apresentar qualidade constante, comprovada através de suas eficácia e segurança clínicas e de suas especificações técnicas (GAEDCKE; STEINHOFF, 2000). Assim, o estabelecimento de parâmetros, para a matéria-prima, é fundamental para que a qualidade de um derivado vegetal ou produto acabado seja assegurada (GOVINDARAGHAVAN; HENNELL; SUCHER, 2012).

Quando se trata de matérias primas vegetais, características homogêneas não são simples de serem alcançadas, pois sua qualidade depende de diversos fatores, sejam relacionados à forma de cultivo e coleta, à variabilidade biológica intrínseca, além de fatores relacionados a operações posteriores (secagem, moagem e armazenamento); os quais podem modificar a complexa composição do material vegetal e/ou de seus derivados. Assim, para que haja reprodutibilidade na qualidade de produtos fitoterápicos é necessário que um protocolo de controle seja implementado desde a produção do material vegetal, passando pelas operações de transformação e finalmente na avaliação do produto final (CALIXTO, 2000; GAEDCKE; STEINHOFF, 2000; BART; PILZ; 2011; BOTH et al., 2014; PFERSCHY-WENZIG; BAUER, 2015).

Como resultado de todas essas etapas, torna-se difícil ou impossível em vários casos identificar a maior parte dos componentes por meio de abordagens tradicionais. Assim, o desenvolvimento de procedimentos eficazes para realização do controle de matrizes vegetais, frequentemente esbarra na escassez de informações acerca da substância ou grupo de substâncias responsáveis pela atividade (BART; PILZ; 2011; BOTH et al., 2014; PFERSCHY-WENZIG; BAUER, 2015).

No que pese a aceitação pela comunidade científica, da adoção de marcadores como alternativa para a proposição de especificações de qualidade para tais analitos; nos últimos anos, o conceito de fitoequivalência tem recebido destaque em virtude da ação sinérgica da mistura de compostos presente no vegetal (ou extrato). É nesse contexto que se insere a técnica de impressão digital (*fingerprint*) aceita pela Organização Mundial de Saúde-OMS (WORLD, 2000) e recomendada por diversas agências oficiais. Pois através de um perfil químico detalhado da planta ou produto derivado há maior possibilidade de garantia da reprodutibilidade da eficácia terapêutica (GAEDCKE; STEINHOFF, 2000; MOK; CHAU, 2005).

Portanto, a impressão digital é recomendada para realizar o controle de qualidade de matérias-primas vegetais e produtos derivados (extratos ou produtos acabados), enfatizando a utilização de um perfil cromatográfico ou espectroscópico dos compostos biologicamente ou quimicamente ativos presentes (FDA, 2004; GIRI et al., 2010; EMA, 2011). A identificação de produtos multicompostos de uso na medicina tradicional pode ser feito com precisão (de acordo com as similaridades observadas), mesmo que a diversidade e concentração dos compostos não seja exatamente a mesma para amostras diferentes de uma mesma droga vegetal (diferenças). Logo, o perfil obtido pode ser fundamental para demonstrar a integridade

de tais produtos, demonstrando tanto as “similaridades” quanto “diferenças” encontradas entre várias amostras investigadas (LIANG; XI; CHAN, 2004).

Para a *Food and Drug Administration* (FDA) são necessárias comparações qualitativas e quantitativas da impressão digital espectroscópica ou cromatográfica do material vegetal seja ele material botânico, extrato ou produtos acabados, frente a materiais de referência (droga vegetal, extrato ou substância química certificada) ou padrões para assegurar a identidade e qualidade; assim como a reprodutibilidade lote a lote (FDA, 2004). Enquanto que a *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA) preconiza a impressão digital cromatográfica para avaliação da estabilidade da composição química tanto da droga vegetal quanto de seus produtos derivados (EMA, 2006; 2011).

Entretanto, o sucesso deste tipo de análise depende de instrumentação e/ou métodos químicos que permitam obtenção de cromatogramas e/ou espectros. Como os extratos vegetais podem ter composições complexas, é necessária a obtenção dos perfis de separação cromatográfica de metabólitos com base nas diferenças de suas propriedades físico-químicas (LIANG et al., 2004; ZENG et al., 2008; ARDILLA et al., 2015).

As técnicas usualmente empregadas para obtenção dos *fingerprints* são cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), infravermelho (IV) (NATISHAN, 2005; LIANG; XI; CHAN, 2010; TISTAERT, 2011, JOSHI, 2012; SHERMA, 2012).

Nesse contexto, a padronização de preparações de origem vegetal é um grande desafio quando consideramos a complexa composição química das espécies vegetais e a variabilidade inerente às matrizes biológicas vegetais. Portanto, por menores que sejam as variações qualitativas e/ou quantitativas dos constituintes químicos, a eficácia e/ou segurança podem ser comprometidas em razão da dependência do efeito sinérgico (e muitas vezes ainda desconhecida), de múltiplos metabólitos secundários presente na espécie vegetal (LI et al., 2004, TIAN; XI; LIU, 2009; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI et al., 2010; GOVINDARAGHAVAN; HENNELL; SUCHER, et al., 2012).

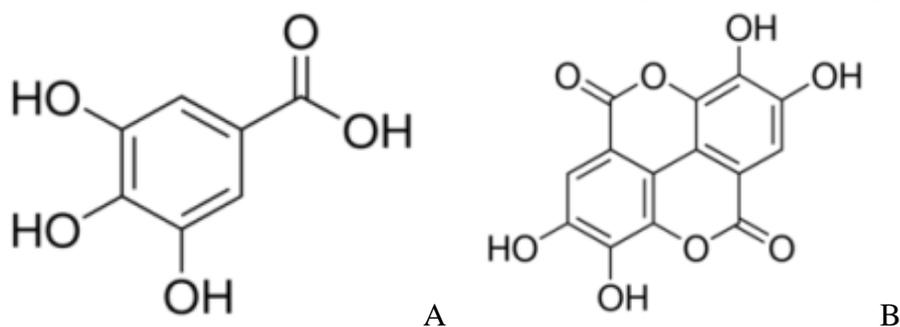
4.1.2 Análise polifenóis em espécies vegetais

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, são conhecidos como metabólitos secundários de plantas, com importância quando se tratam da qualidade nutricional e funcional de frutas, vegetais e outras plantas (LAPORNIK; PROSEK; GOLC, 2005). 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).

Entre os polifenóis encontram-se os taninos (GHARRAS, 2009; SIMÕES et al., 2010), que apresentam alto peso molecular e constituem o terceiro mais importante grupo de polifenóis, podendo se subdividir em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (PORTER, 1989; SIMÕES et al., 2010). Os taninos hidrolisáveis são derivados do ácido gálico e do ácido elágico (Figura 1), compostos de interesse neste estudo. O ácido gálico é esterificado como um poliálcool, e os grupos galóil podem ser esterificados ou oxidados formando os mais complexos taninos hidrolisáveis (HAGERMAN, 2002). O ácido elágico é caracterizado por uma ou mais unidades de hexahidroxidifenol que podem ser esterificadas com açúcar (LANDETE, 2011).

Figura 1 - Estruturas dos monômeros de taninos hidrolisáveis. A – Ácido gálico; B – Ácido elágico.



Fonte: Próprio autor.

Os taninos apresentam diversos efeitos no sistema biológico, desde potencial como quelantes de íons metálicos, agentes precipitadores de proteínas e atividade antioxidante pronunciada. Devido à variedade de atividades biológicas que lhes são atribuídas, eles podem apresentar uma enorme variação estrutural, o que dificulta o desenvolvimento de modelos que possam quantificar precisamente o efeito de tais compostos no sistema (HAGERMAN, 2002).

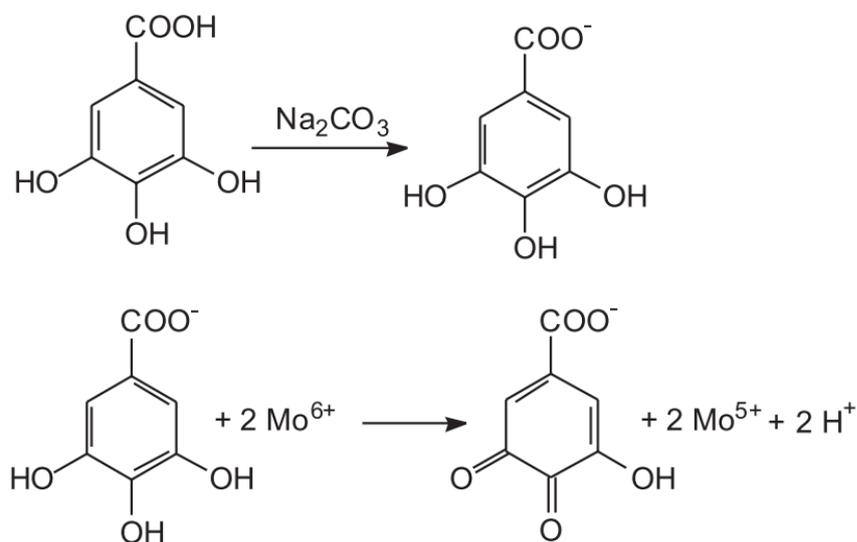
Embora a determinação quantitativa de polifenóis seja dificultada pela complexidade e diversidade estrutural do grupo, diversos são os métodos que tem sido descritos na literatura para a quantificação de polifenóis em espécies vegetais (LOPES et al., 2009; MØLLER; HANSEN, CORNETT, 2009; LOPES et al., 2010; PIERONE et al., 2011; HUCK, 2015; MESQUITA et al., 2015). Tais metodologias são baseadas em diferentes princípios e são usadas para determinar as diferenças estruturais presentes nesta classe de compostos.

4.1.2.1 Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A espectroscopia na região do ultravioleta e visível possui características favoráveis que garantem a sua escolha como ferramenta analítica, tais como: fácil implementação e baixo custo. Porém sua baixa seletividade faz com que a aplicação no controle de qualidade de matrizes vegetais seja limitada, uma vez que o estudo de matrizes complexas apresenta sobreposição espectral (SILVA; SANTOS; BATISTUTI, 2013).

A quantificação de polifenóis por espectroscopia no UV-Vis utiliza comumente reações colorimétricas. Os métodos de Folin-Denis, Folin-Ciocalteu e azul da Prússia fazem parte do elenco de técnicas em que acontecem as reações de oxi-redução com formação de complexo. Tais métodos envolvem o doseamento de polifenóis mediante a formação de complexo de coloração azul mensurável na região do visível, derivado da redução dos reagentes com as hidroxilas fenólicas (Figura 2). A intensidade da coloração obtida é proporcional ao conteúdo de polifenóis presentes em solução. Neste método, a concentração total de grupos fenólicos presentes no material vegetal é mensurada (FOLIN, CIOCALTEU, 1927; SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001; EVERETTE et al., 2010).

Figura 2 – Reação de oxi-redução das hidroxilas fenólicas utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico.



Fonte: Próprio autor.

O ensaio que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é bastante empregado na determinação do teor total de polifenóis, sendo descritos em diversas publicações científicas com o respaldo de compêndios oficiais (FOLIN, 1927; OSSIPOVA et al., 2001; TSAO;

YANG, 2003; LAPORNIK; PROSEK; GOLC, 2005; VERZA et al., 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; BUENO et al., 2012; LONNI et al., 2012; BLAINSKY; LOPES; MELLO, 2013; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2013; DICIAULA et al., 2014; ALVES et al., 2015).

No ensaio de Folin-Ciocalteu, ocorre uma reação de redução entre o ácido fosfotúngstico e as hidroxilas presentes nos polifenóis, formando um complexo azulado constituído de ácido fosfotúngstico-fosfomolibidênio e polifenóis. A absorção máxima do complexo depende da alcalinidade da solução e da concentração de compostos fenólicos da amostra. Além disso, a adição de carbonato de sódio ao final promove a basificação necessária para finalizar a reação. Alguns parâmetros da técnica podem ser modificados como a quantidade do reagente Folin-Ciocalteu, concentração de carbonato de sódio, padrão usado e tempo de leitura (VERZA, 2006; BLAINSKY; LOPES; MELLO, 2013; CHEN; CHEN; LIANG, 2015).

4.1.2.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE)

As matrizes complexas, como matérias primas vegetais, possuem grande quantidade de constituintes os quais podem ser considerados fontes de novas moléculas terapêuticas. Para o desenvolvimento de novas drogas de origem vegetal, é importante estabelecer parâmetros de processo no preparo das amostras e obtenção de ativos isolados para posterior realização da atividade biológica. A associação entre a atividade biológica e a composição química é importante na obtenção de informações sobre os constituintes das espécies vegetais. A composição química pode ser obtida a partir de métodos cromatográficos, tais como a cromatografia em camada delgada (CCD) (JOSHI, 2012).

A análise por CCD ainda é bastante utilizada atualmente, devido à simplicidade na verificação da presença de marcadores conhecidos, além de ser considerado um método rápido e de baixo custo. Normalmente é utilizada com finalidade qualitativa, em virtude de sua baixa reprodutibilidade, já que sua realização é manual (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2010; PATRA et al., 2010; NICOLETTI, 2011).

Devido à susceptibilidade deste procedimento a diversas fontes de variação, especialmente relacionadas às condições operacionais, o desenvolvimento de sistemas automatizados se tornou imprescindível, uma vez que foram capazes de incrementar a eficiência e reprodutibilidade da técnica. Conhecida como cromatografia em camada delgada de alta eficiência ou CCD-AE (do inglês, *High Performance Thin Layer Chromatography* -

HPTLC), o método mantém o princípio e as vantagens da CCD, porém está amparado por um complexo conjunto de ferramentas desenvolvido para controlar as condições de análise. Desta forma, os cromatogramas obtidos apresentam um grau de resolução e reprodutibilidade tal, que podem ser empregados satisfatoriamente para melhor separação dos componentes da matriz, diminuindo os erros manuais e melhorando a repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados (NICOLLETI, 2011; SRIVASTAVA, 2011; JOSHI, 2012).

Além disso, a técnica apresenta entre outras vantagens: a utilização de quantidades reduzidas de fase móvel; análise de várias amostras simultaneamente e potencial na caracterização qualitativa e quantitativa, fornecendo informações preliminares a cerca dos compostos encontrados (PATRA et al., 2010).

Embora nos últimos anos o emprego de CCD-AE tenha se expandido na análise quantitativa de produtos de origem vegetais, a técnica tem encontrado emprego importante no estabelecimento de impressões digitais (ID). O número, a sequência, e a coloração das manchas de um cromatograma são fiéis à composição química da amostra, mesmo para compostos em concentrações muito baixas. Assim, a integridade química da amostra é assegurada, cuja diversidade, muitas vezes, não pode ser detectada por outras técnicas tal como cromatografia líquida de alta eficiência (NICOLLETI, 2011, HARIPRASAD, RAMAKRISHMAN, 2012; GUNALAN; SARASWATHY; VIJAYALAKSHMI, 2012; SALMON et al., 2012).

Algumas limitações relacionadas à quantificação de compostos por CCD-AE, como a necessidade da utilização de densitômetros, têm feito com que as análises realizadas por esta técnica sejam complementadas por técnicas mais específicas de quantificação tal como cromatografia líquida de alta eficiência (TIAN; XI; LIU, 2009; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI et al., 2010; SALMON et al., 2012).

4.1.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), é provavelmente a técnica analítica disponível, mais utilizada e eficiente para as necessidades atuais do âmbito farmacêutico e/ou químico. A capacidade da técnica deve-se a seletividade, a qual permite a quantificação simultânea de diversos compostos num mesmo passo analítico, característica fundamental para a avaliação de matrizes complexas, tal como drogas vegetais (PRATHAP et al., 2013).

Trata-se de uma técnica bastante utilizada na área de produtos naturais, que consegue separar uma mistura de compostos, além de quantificar e identificar os principais componentes da matriz sem a necessidade de etapas complexas na obtenção dos extratos (WOLFENDER et al., 2015).

Na CLAE, o equipamento é totalmente automatizado, e apresenta maior seletividade e sensibilidade. As condições cromatográficas dos métodos por CLAE, utilizadas para polifenóis, incluem o uso de, quase exclusivamente, uma coluna C₁₈ de fase reversa; uma fase móvel contendo água e um solvente orgânico polar (normalmente acetonitrila ou metanol), e, a utilização de ácidos em ambas as fases para promover uma eficiência da separação (NACZK; SHAHIDI, 2006; WOLFENDER et al., 2015). Além disso, uma das principais vantagens da utilização desta técnica é a possibilidade de acoplar vários detectores. Diversas publicações científicas têm enfatizado a utilização de detectores ultravioleta (UV) e de arranjo de fotodiodos (DAD), no caso de compostos que absorvem luz UV (TISTAERT et al., 2011; COSTA et al., 2015; MESQUITA et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Com a utilização na rotina cada vez mais comum, a CLAE tem se tornado o método de escolha quando se trata da obtenção de *fingerprints* de matérias-primas vegetais, em virtude de sua sensibilidade e eficiência de separação dos componentes (LIU et al., 2011; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; WANG et al., 2014; XU et al., 2015).

4.1.3 Validação de Métodos Analíticos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis a partir de uma determinada amostra, ele deve passar por uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004). A validação de procedimentos analíticos reúne uma série de ensaios laboratoriais capazes de confirmar a adequabilidade do mesmo ao uso que se propõe. Diversos documentos apresentam os passos a serem seguidos para realização da validação de métodos analíticos. Entretanto, a diretriz da *International Conference on Harmonisation - ICH* (ICH, 2005) “Validação de Procedimentos Analíticos: Texto e Metodologia - Q2(R1)” reflete o atual estado técnico e científico sobre o tema (ICH, 2005).

No Brasil, os parâmetros de validação para métodos analíticos estão descritos no “Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, publicado pela ANVISA (BRASIL, 2003). Portanto, quando não houver ou não forem usadas referências de monografias farmacopeicas reconhecidas, o método analítico deve ser avaliado conforme os

seguintes parâmetros: especificidade; linearidade; precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade); limites de detecção e quantificação; exatidão e robustez; cujas definições estão resumidas a seguir:

Especificidade. Neste ensaio é demonstrada a capacidade que o método possui em medir exatamente o composto de interesse na presença de substâncias que podem ser interferentes tais como impurezas, produtos de degradação e compostos químicos da matriz estudada.

Linearidade. Para este parâmetro é determinada a capacidade de uma metodologia analítica de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Enquanto o LOD corresponde à menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada pelo método, o LOQ representa a menor quantidade de analito que pode ser quantificada (BRASIL, 2003).

Precisão. Traduz a capacidade do procedimento analítico em reproduzir a resposta analítica em uma série de medidas de análises múltiplas a partir de uma mesma amostra. O parâmetro é avaliado em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão intercorrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). (BRASIL, 2003).

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

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

Os resultados obtidos nos ensaios devem ser expressos como desvio padrão relativo (DPR%), ou coeficiente de variação (CV%) onde são aceitos resultados inferiores a 5%.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material Vegetal

As amostras do material vegetal constituído dos frutos de *Libidibia ferrea*, foram coletadas em diversas localidades do país (Quadro 1). Após coleta, o material foi submetido a secagem em estufa de ar circulante sob 40 °C (LUCA 82/480, Lucadema®) durante 7 dias.

Quadro 1 - Localidade de coleta das amostras dos frutos de *L. ferrea*.

Amostras	Localidade	Amostras	Localidade
1	Limoeiro (Região 1) - PE	8	Manaus (Região 2) - AM
2	Recife (Mercado público) - PE	9	Caruaru - PE
3	Palmares - PE	10	Maceió - AL
4	Fortaleza - CE	11	Mossoró - RN
5	Belo Jardim - PE	12	Mato Grosso do Sul – MS
6	Arcoverde - PE	13	Limoeiro (Região 2) - PE
7	Manaus (Região 1) - AM	14	Brasília - GO

AL - Alagoas; AM - Amazonas; CE – Ceará; GO – Goiás; MS – Mato Grosso do Sul; PE – Pernambuco; RN – Rio Grande do Norte.

Fonte: Próprio Autor.

4.2.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Preparação da amostra

Para preparação das amostras cerca de 1,0 g do material vegetal seco e triturado foi submetido à refluxo durante 1 min em banho maria sob temperatura de 85 °C, empregando como solvente 25,0 mL de metanol. Em seguida, as misturas foram filtradas através de algodão hidrófilo.

Análise por CCD

Alíquota de 25,0 µL de cada amostra ou dos padrões foram aplicados em forma de bandas com 7 mm de largura, com o auxílio de sistema de aplicação de amostras semiautomático Linomat V (Camag®), munido de seringa de 100 µL (Hamilton®) e

controlado por programa computacional winCATS[®]. As bandas foram aplicadas em placas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F₂₅₄, 20 × 10 cm; 250 µm espessura (Merck[®]). A ordem de aplicação das amostras de *L. ferrea* foi a mesma descrita no quadro 1 (1-14), seguidas pelos padrões: ácido gálico (98%, Sigma-Aldrich[®]) (15) e ácido elágico (96%, Sigma-Aldrich[®]) (16).

As placas foram desenvolvidas em câmara vertical de vidro (20 x 10 cm; Camag[®]) utilizando acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v/v) como a fase móvel. A câmara foi saturada com a fase móvel durante 30 minutos sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Todos os solventes empregados foram de grau P.A. (JT Baker[®], USA). Após desenvolvimento, a placa foi seca em capela e os componentes foram visualizados sob luz UV em 254 nm. Em seguida, a placa foi derivatizada com os reagentes NEU (difênilbórico ácido-β-etilamino éster–difênilboriloxietilamina) + PEG (Polietilenoglicol 4000) e visualizada sob luz UV em 365 nm. Cada análise foi realizada em duplicata. As cromatoplasmas foram digitalizadas com o auxílio de fotodocumentador MultiDoc-It[®] (UVP[®], USA) munido de fontes de radiação UV (254 e 365 nm), Câmera fotográfica digital EOS 1100D (Canon[®], Japão) e controlado por sistema computacional Doc-ItLS (UVP[®], USA).

4.2.3 Obtenção da Solução Extrativa

Solução Estoque

A solução extrativa da matéria prima vegetal foi preparada utilizando 1,0 g em balão de fundo redondo de 250 mL com 150 mL de água ultrapura (PURELAB[®] Classic UV, ELGA LabWater). A mistura foi levada a aquecimento em banho maria (LUCA-150/24/D; Lucadema[®]) por 30 minutos (85 – 90 °C) e em seguida submetida a resfriamento com água corrente. O conteúdo do balão foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL com auxílio de funil. O balão de fundo redondo foi lavado e as águas de lavagem transferidas para o balão volumétrico. O volume foi então aferido com água ultrapura. A solução foi deixada em repouso para os sólidos suspensos decantarem, depois foi filtrada em papel de filtro (porosidade 20-25 µm), descartando os primeiros 50 mL do filtrado, constituindo a *Solução Estoque* (SE).

4.2.4 Doseamento de Polifenóis Totais

Uma alíquota de 5,0 mL de SE foi transferida para balão volumétrico de 25,0 mL e o volume aferido com água ultrapura (S1). Então, uma alíquota de 2,0 mL da S1 foi transferida para balão volumétrico de 25,0 mL, adicionados 2,0 mL de Folin-Ciocalteu (Dinâmica[®]), 10,0 mL de água e aferido com solução de carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) 29% (Vetec[®]). As absorbâncias das amostras foram mensuradas em 760 nm empregando espectrofotômetro ultravioleta/visível (Micronal[®]) após 30 minutos da adição do último reagente. Água ultrapura foi usada como branco. Ácido gálico e ácido elágico foram utilizados como padrões e os resultados foram expressos como equivalente por grama de peso seco da amostra. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média, desvio padrão e desvio padrão relativo (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2013).

4.2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Método Referência)

4.2.5.1 Preparo das soluções para análise por CLAE-DAD

- a) **Solução amostra:** uma alíquota de 3,75 mL da SE (item 3.2.3) foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume aferido com água ultrapura. Ao final, esta solução foi filtrada em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com tamanho de poro 0,45 µm (Macherey-Nagel[®]), diâmetro igual a 25 mm e acondicionada em vials para as análises.
- b) **Soluções estoque dos padrões:** a solução padrão de ácido gálico (AG) foi preparada pesando exatamente 0,0250 g para balão volumétrico de 25 mL, dissolvido em água ultrapura e colocada em banho de ultrassom por 30 minutos para completa dissolução (concentração final = 0,001 g/mL). A solução padrão do ácido elágico (AE) foi preparada pesando exatamente 0,050 g para balão volumétrico de 10 mL, dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec[®]) e colocado em banho de ultrassom (Ultracleaner 1600A, Unique) por 30 minutos até completa dissolução (concentração final = 0,005 g/mL). As soluções foram armazenadas em frasco âmbar, bem fechado, em geladeira até o momento da utilização no trabalho.

4.2.5.2 Condições Cromatográficas

A quantificação dos ácidos gálico e elágico foram conduzidas em Cromatógrafo Líquido (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific[®]), acoplado com Detector de Arranjo de Fotodiodos (DAD; Thermo Fisher Scientific[®]) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific[®]), degaseificador e amostrador automático com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific[®]). Os dados cromatográficos foram processados com o auxílio do programa computacional Chromeleon versão 6.0 (3000 RS Dionex, Thermo Fisher Scientific[®]). O comprimento de onda foi fixado em 254 nm para detecção do ácido elágico e em 270 nm para ácido gálico, de acordo com o máximo de absorção observado no espectro de varredura capturado pelo DAD. A separação cromatográfica foi realizada com coluna C₁₈ (250 mm x 4.6 mm d.i., tamanho de partícula 5 µm; Dionex[®]) protegida por pré-coluna (C₁₈, 4 mm x 3.9 µm, Phenomenex[®]). As separações foram realizadas com temperatura do forno da coluna a 24 °C. A fase móvel consistiu em água ultrapura (A) e metanol (B) ambos acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético, com fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa gradiente foi aplicado como segue: 0–10min, 12,5–25% B; 10–15min, 25–40% B; 15–25min, 40–75% B; 25–30 min, 75–75% B; 30–33min, 75-12,5% B.

Foram injetados, separadamente, 20 µL das soluções padrão e solução amostra, e, os cromatogramas foram registrados para mensurar as áreas dos picos. O resultado foi expresso em %m/m de ácido gálico e %m/m de ácido elágico, de acordo com a curva analítica construída com os respectivos padrões. Os cálculos consideraram a perda por dessecação da amostra e a pureza de 98% e 96%, para os padrões de ácido gálico e de ácido elágico, respectivamente.

4.2.5.3 Desenvolvimento e validação do método por CLAE-DAD para quantificação de ácido gálico e ácido elágico nos frutos de *L. ferrea*

Para a validação do método desenvolvido foram utilizados como referência a guia Q2(R1) preconizada pelo ICH (ICH, 2005) e a RE 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003). A matéria prima vegetal utilizada para esta etapa foi a amostra (1) identificada no Herbário do IPA.

4.2.5.3.1 Seleção do comprimento de onda, especificidade e identificação dos picos

O comprimento de onda para determinação dos picos foi observado nos espectros obtidos por varredura dos picos dos padrões na faixa de 190 nm a 400 nm, com o auxílio do detector de arranjo de diodos. Os espectros de varredura dos padrões também foram usados para confirmação da identidade dos picos correspondentes na amostra. Por fim, a solução amostra contaminada pelos padrões foi analisada para observação de qualquer variação no comprimento de onda máximo de absorção.

4.2.5.3.2 Linearidade

- a) **Curva do padrão ácido gálico:** uma alíquota de 1,0 mL da *SE* foi diluída a 10 mL com água ultrapura, originando solução de concentração igual a 100 µg/mL (*SI*). Ao final, uma série de diluições (2,40; 2,70; 3,00; 3,30 e 3,60 mL) foi realizada para obter a curva analítica, sendo elaboradas de acordo com a faixa de concentração estabelecida em 80, 90, 100, 110 e 120% (24 a 36 µg/mL).
- b) **Curva do padrão ácido elágico:** uma alíquota de 1,0 mL da *SE* foi diluída para 10 mL com solução metanol:água (3:2, v/v), originando solução de concentração igual a 500 µg/mL (*SI*). Ao final, uma série de diluições (2,32; 2,61; 2,90; 3,19 e 3,49 mL) foi realizada para obter a curva analítica, sendo elaboradas de acordo com a faixa de concentração estabelecida em 80, 90, 100, 110 e 120% (23,2 a 34,9 µg/mL).
- c) **Curva analítica da matéria prima de *L. ferrea*:** a curva de linearidade para a matéria prima (jucá fruto) foi elaborada a partir solução estoque utilizando uma série de diluições (3,00; 3,375; 3,75; 4,125 e 4,50 mL) de acordo com a faixa de concentração estabelecida em 80, 90, 100, 110 e 120% (1200 a 1800 µg/mL).

4.2.5.3.3 Especificidade e pureza do pico

Os espectros de varredura da solução amostra e para a solução intencionalmente adicionada de soluções dos padrões (ácidos elágico e gálico) foram empregados para confirmar a identidade dos compostos de interesse. Os espectros foram obtidos na faixa de

190 a 400 nm e utilizados para verificar a ocorrência ou a ausência de desvio do comprimento de onda máximo.

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

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pelas equações das curvas analíticas obtidas para os padrões (ácidos elágico e gálico). As equações abaixo foram utilizadas para os cálculos:

$$LD = 3,3 \cdot \left(\frac{S}{I} \right) \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = 10 \cdot \left(\frac{S}{I} \right) \quad \text{Equação 2}$$

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

4.2.5.3.5 Precisão - Repetitividade (intracorrída)

Para a avaliação da repetitividade do método, seis amostras independentes foram preparadas pelo mesmo operador, no mesmo dia, conforme descrito anteriormente no item 3.2.5.1, a 100% da concentração teste, 1500 µg/mL. As amostras foram injetadas em triplicata e os teores calculados de acordo com as curvas analíticas obtidas para os padrões. Os resultados foram expressos pela média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

4.2.5.3.6 Precisão - Precisão intermediária (intercorrída)

A precisão intermediária do método foi avaliada através da análise de três amostras independentes por 2 operadores diferentes e em 2 dias diferentes, conforme descrito anteriormente no item 3.2.5.1 (100% da concentração teste, 1500 µg/mL). As amostras foram injetadas em triplicata e os teores calculados de acordo com as curvas analíticas obtidas para os padrões. Os resultados foram expressos pela média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

4.2.5.3.7 Exatidão

A determinação da exatidão do método foi realizada através do ensaio de recuperação, pelo qual foi adicionada à solução amostra (1500 µg/mL) quantidades conhecidas das soluções dos padrões (AG – 24,0; 30,0 e 36,0 µg/mL; AE – 23,2; 29,0 e 34,9 µg/mL), correspondente aos níveis de concentração de 80, 100 e 120% da concentração de trabalho estabelecidos a partir das curvas analíticas dos padrões. As amostras foram injetadas em triplicata e as taxas de recuperação calculadas de acordo com a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

4.2.5.3.8 Robustez

A robustez foi avaliada durante o desenvolvimento do método através da realização de pequenas alterações no método original, tais como o pH da fase móvel, fluxo e temperatura da coluna. Para tanto, a performance cromatográfica da *Solução amostra* (1500 µg/mL) foi avaliada sob as seguintes condições experimentais: fluxo em nível baixo (0,790 mL/min) e alto (0,810 mL/min); pH da fase móvel utilizada (pH 2,0A/3,0B – pH 3,0A/4,0B); temperatura do forno (23 °C e 25 °C). As influências das variações testadas sobre a resposta analítica foram verificadas através de alterações no teor e na resolução dos picos correspondentes aos marcadores analisados. As amostras foram injetadas em triplicata e os resultados expressos pela média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

4.2.6 Obtenção dos extratos brutos

4.2.6.1 Métodos de Obtenção

Extração por Turbólise

O material vegetal seco e triturado foi submetido a turboextração em liquidificador industrial (Metvisa®) por 20 minutos. A operação foi realizada em quatro ciclos de 5 minutos com intervalos de 30 segundos. Os extratos foram preparados na proporção planta/solvente de 10% (m/v) empregando como diferentes líquidos extratores a água ou diferentes proporções etanol:água (20, 40, 60 e 80%, v/v).

Extração por Decocção sob Refluxo

O material vegetal seco e triturado foi submetido ao processo de decocção sob refluxo durante 30 minutos, em banho maria, com temperatura igual a 85 °C. Os extratos foram preparados na proporção planta/solvente de 10% (m/v) empregando como líquidos extratores a água ou diferentes proporções etanol:água (20, 40, 60 e 80%, v/v).

Extração em Banho de Ultrassom

O material vegetal seco e triturado foi submetido a extração em banho de ultrassom (Ultracleaner 1600A, Unique®) por 30 minutos. Os extratos foram preparados na proporção planta/solvente de 10% (m/v) empregando como líquidos extratores a água ou diferentes proporções etanol:água (20, 40, 60 e 80%, v/v).

Processamento dos Extratos

Após realização das operações de extração, os extratos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório (RV10 Basic, IKA®) para eliminação do solvente orgânico, empregando temperatura entre 40 e 50 °C. Os resíduos aquosos dos extratos foram congelados em freezer -80 °C por 3 dias e em seguida liofilizados (Modelo L101, Liotop®), originando os extratos brutos liofilizados (EB).

4.2.6.2 Validação do método analítico por CLAE-DAD para o doseamento de ácido gálico e ácido elágico em extrato bruto aquoso dos frutos de *L. ferrea*

A metodologia desenvolvida e validada para a matéria prima dos frutos de *L. ferrea*, foi aplicada e validada para o extrato bruto aquoso, obedecendo a RE899/2003 da legislação em vigor (BRASIL, 2003). Foram então realizados os ensaios de especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez, tomando como base os parâmetros estabelecidos previamente para a matéria prima.

Para tanto, cerca de 0,0500 g do EB exatamente pesados (AUY 220, Shimadzu®), foram transferidos para balões volumétricos com capacidade de 25 mL, diluídos com 20 mL de água ultrapura e levados ao banho de ultrassom (Unique®) durante 15 minutos para total

dissolução do extrato. Ao final, o volume foi aferido com água ultrapura. Procedeu-se com as diluições necessárias para realização das análises. Todas as soluções foram individualmente filtradas diretamente para os vials através de membranas de PVDF com tamanho de poro igual a 0,45 μm e diâmetro de 25 mm.

4.2.7 Obtenção das frações

Os extratos brutos que apresentaram maiores e menores teores de ácido gálico e ácido elágico foram selecionados para realização desta etapa, em virtude da grande quantidade de amostras.

Nesta etapa, os extratos brutos foram dispersos em água destilada e particionados 10 a 12 vezes com acetato de etila (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996; FERREIRA, 2012). As fases orgânicas foram reunidas, concentradas sob pressão reduzida (temperatura entre 40 e 50 °C) e, após congelamento, liofilizadas (fração acetato de etila - FOr). A fase aquosa também foi concentrada, congelada e liofilizada (fração aquosa - FAq).

4.2.8 Caracterização dos extratos brutos e frações

4.2.8.1 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

Para a análise por CCD-AE, as amostras dos extratos e frações foram diluídas em metanol na proporção (1 mg/mL). O padrão de ácido gálico foi preparado em metanol (1 mg/mL) enquanto que o padrão de ácido elágico (1 mg/mL) foi preparado em metanol:água (3:2). As condições experimentais utilizadas (reagentes, solventes e equipamentos) estão descritas no item 3.2.2. As análises foram realizadas empregando cromatoplaças de vidro para HPTLC de sílica gel 60 F₂₅₄.

4.2.8.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para a análise quantitativa por CLAE de extratos brutos e frações, cerca de 0,0250 g da amostra exatamente pesados foram transferidos para balões volumétricos com capacidade de 25 mL e diluídos com 20 mL de água ultrapura. Após dissolução total da amostra em banho de ultrassom durante 15 minutos, o volume foi aferido com água ultrapura.

As amostras foram filtradas individualmente diretamente para os vials empregando membrana de PVDF com tamanho de poro igual a 0,45 μm e diâmetro de 25 mm. As injeções foram realizadas em triplicata e os resultados representados pela média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

As condições operacionais do cromatógrafo estão descritas no item 4.2.5.2.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

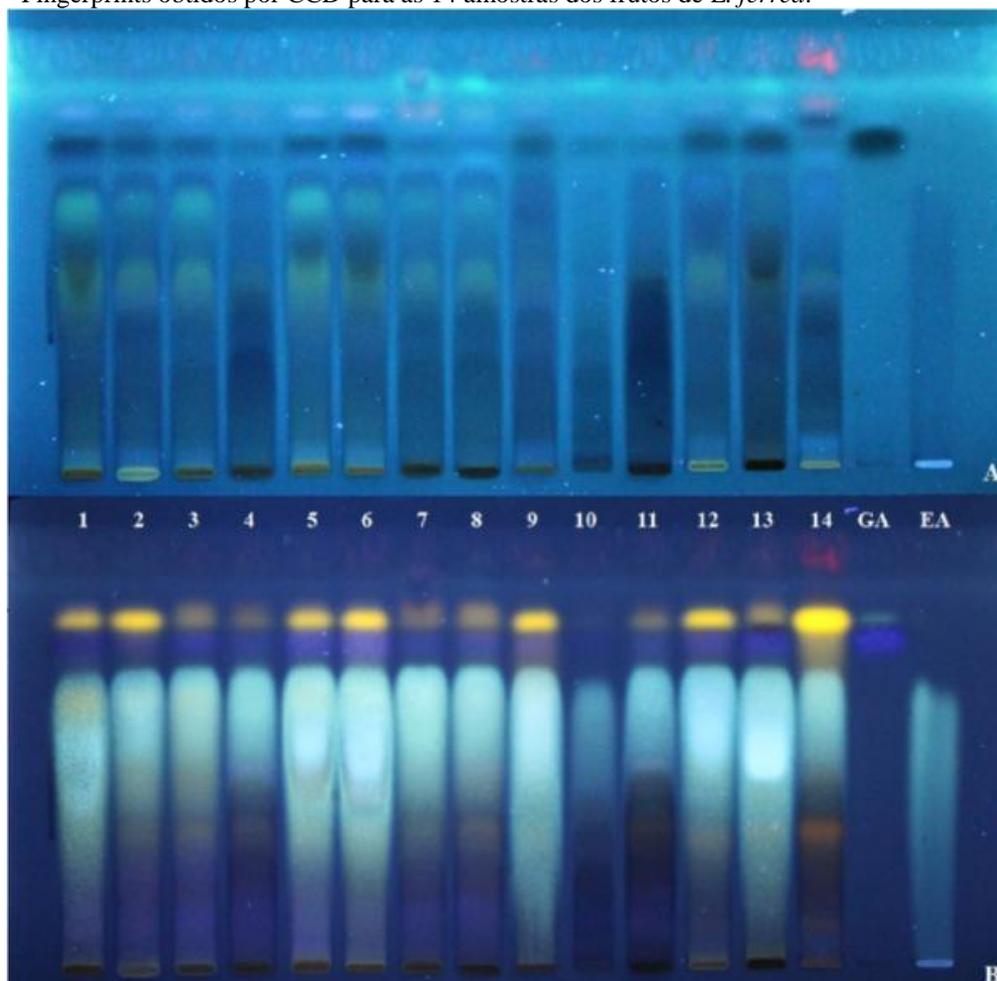
4.3.1 Cromatografia em Camada Delgada

A análise cromatográfica sugere que os polifenóis são os compostos majoritários nos frutos de *L. ferrea*. As bandas obtidas foram caracterizadas neste estudo sob radiação UV em 254 nm antes da derivatização, e em 365 nm após derivatização com reagente NEU + PEG. Em seguida, os valores de R_f foram calculados e comparados com os padrões utilizados.

Nas cromatoplasmas, os padrões de ácido elágico e de ácido gálico foram detectados como bandas escuras sob radiação em 365 nm antes da derivatização com o reagente NEU + PEG. Após derivatização, o ácido elágico apresentou banda de coloração verde e o ácido gálico coloração azul. Considerando esta metodologia, a derivatização com NEU seguido de PEG e a subsequente visualização em 365 nm foi mais apropriada para detecção das bandas.

Na figura 3 estão apresentados os *fingerprints* obtidos a partir dos frutos de *L. ferrea* nos quais pode ser observada a presença marcante de polifenóis. Todas as amostras (1-14) apresentaram bandas correspondentes a ambos os padrões (ácido elágico e ácido gálico), confirmado pela coloração das bandas e valor de R_f (R_f ácido elágico 0,60 e R_f ácido gálico 0,68). As amostras número 1, 5, 6, 12 e 13, apresentaram maior intensidade do ácido elágico e ácido gálico. Além disso, uma banda adicional de coloração amarela e R_f de 0,73 foi observada em todas as amostras; e uma outra banda de cor laranja com R_f 0,31 foi observada em algumas amostras. Por fim, outra banda de cor laranja com R_f 0,10 foi observada apenas na amostra proveniente de Brasília (amostra 14). Essas bandas de cor laranja podem corresponder à presença de flavonoides considerando as condições extrativas e cromatográficas utilizadas.

Figura 3 - Fingerprints obtidos por CCD para as 14 amostras dos frutos de *L. ferrea*.



A. Placa antes da derivatização; B. Placa após derivatização com reagente NEU + PEG; 1-14: amostras; AG: Ácido Gálico; AE: Ácido Elágico.

Fonte: Próprio Autor.

Devido à diversidade de atividades farmacológicas atribuídas às espécies vegetais que contêm polifenóis em sua composição, a identificação e separação desses compostos é um aspecto de grande importância para a análise fitoquímica (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Nesse sentido, uma gama de métodos tem sido descritos na literatura para a investigação de polifenóis, entre eles a CCD e CCD-AE.

Considerando a possibilidade de separação e identificação de polifenóis em frutos de *L. ferrea*, a análise com aplicador semi-automático foi útil nessas vertentes, tornando possível separar e identificar os compostos de interesse. Arelado a isso, foi possível evidenciar que todas as amostras apresentaram resultado positivo para a presença dos ácidos gálico e elágico, confirmando a presença dos compostos fenólicos.

As amostras dos diferentes frutos de *L. ferrea* apresentaram um perfil fitoquímico típico de polifenóis, o que garante a autenticidade das amostras estudadas. Entretanto,

algumas das variações observadas, seja na intensidade das bandas ou presença de bandas em amostras específicas, podem ser devido aos fatores ambientais. Fatores como: diferentes locais de coleta, variações de clima, diferentes condições de solo, idade ou estágio de desenvolvimento do indivíduo, disponibilidade de água e radiação incidente podem afetar a composição química das plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

4.3.2 Doseamento de Polifenóis Totais

A confirmação da presença de polifenóis observada por cromatografia em camada delgada nas diversas amostras dos frutos do jucá corrobora com os relatos existentes na literatura a cerca da importância da presença dessa classe de compostos para esta espécie, em virtude das propriedades biológicas atribuídas para este grupo de metabólitos secundários (NAKAMURA et al., 2002; SAMPAIO et al., 2009; DA COSTA; GUILHON-SIMPLICIO; DE SOUZA, 2015). A análise quantitativa de polifenóis nas amostras foi conduzida por UV-Vis empregando o método de Folin-Ciocalteu. Os dados encontrados foram expressos em g% de ácido gálico e ácido elágico e estão sumarizados na tabela 1. As amostras que apresentaram maiores teores de polifenóis foram 1, 6, 7 e 9, cuja faixa de concentração ficou entre 27,95 a 37,85 g% expressos como ácido gálico; e, entre 21,01 a 29,09 g% expressos como ácido elágico. É importante destacar que as amostras que apresentaram maior teor de polifenóis por espectrofotometria, também foram as mesmas que apresentaram maior intensidade de bandas nas cromatoplacas. O dado reforça o poder preditivo de qualidade química dos perfis cromatográficos obtidos por CCD.

Tabela 1 - Teor de Polifenóis Totais por UV-Vis nas amostras de matéria prima vegetal dos frutos de *L. ferrea*.

Amostras	TPT (g%)	
	Ác. Gálico	Ác. Elágico
1 Limoeiro (Região 1) - PE	32,86 (0,21)	25,26 (0,21)
2 Recife (Mercado Público) - PE	19,41 (0,88)	14,92 (0,88)
3 Palmares - PE	20,06 (0,53)	15,42 (0,53)
4 Fortaleza - CE	13,99 (0,32)	10,75 (0,32)
5 Belo Jardim - PE	20,87 (0,65)	16,05 (0,65)
6 Arcoverde - PE	37,85 (0,23)	29,09 (0,23)
7 Manaus (Região 1) - AM	27,95 (0,47)	21,49 (0,47)
8 Manaus (Região 2) - AM	20,74 (0,51)	15,94 (0,51)
9 Caruaru - PE	27,33 (0,00)	21,01 (0,00)
10 Maceió - AL	22,06 (0,28)	16,96 (0,28)
11 Mossoró - RN	26,48 (0,40)	20,36 (0,40)
12 Mato Grosso do Sul – MS	18,84 (2,14)	14,49 (2,14)
13 Limoeiro (Região 2) - PE	21,64 (0,16)	16,63 (0,16)
14 Brasília - GO	21,45 (0,52)	16,49 (0,52)

AL - Alagoas; AM - Amazonas; CE – Ceará; GO – Goiás; MS – Mato Grosso do Sul; PE – Pernambuco; RN – Rio Grande do Norte.

Os valores foram plotados como Média (Desvio Padrão Relativo).

Fonte: Próprio Autor.

4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

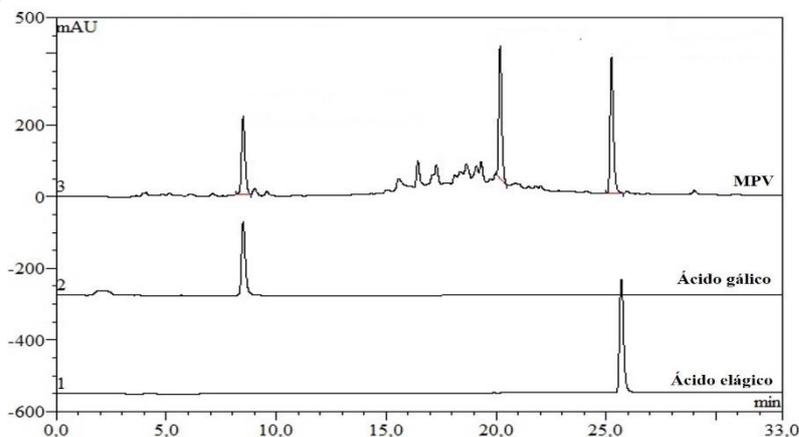
Em razão da diversidade estrutural da classe dos polifenóis, o número de métodos por CLAE relatados na literatura para sua quantificação é elevado. Muito embora o tema seja estudado em profundidade, nem sempre a separação analítica desses compostos é simples. Maior complexidade é observada para a análise de polifenóis de elevado peso molecular (tal como taninos). Portanto, a CLAE figura na literatura como a principal alternativa analítica para os polifenóis. As condições mais comuns incluem análise em fase reversa empregando colunas C₁₈ e como fases móveis combinações de metanol/acetonitrila e água, ambos acidificados. Para acidificação das fases, podem ser empregados os ácidos fórmico, ácido acético, ácido fosfórico e tetrahidrofurano. Em concentrações que variam entre 0,05 a 3% (v/v), cada um dos ácidos tem aplicações específicas para o sistema: ácido fórmico é usado em razão do baixo pK que auxilia a hidrossolubilização dos compostos; o ácido acético é volátil e apresenta baixa supressão iônica em LC-MS; enquanto que os ácidos fosfórico e

trifluoracético são amplamente usados em CLAE-DAD (ARAPITSAS, 2012; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Neste estudo, as condições cromatográficas foram estabelecidas a partir de análises preliminares objetivando as melhores condições de separação dos marcadores (ácido elágico e ácido gálico) em um curto tempo de análise. Então, diversas fases móveis foram utilizadas e programas de eluição em gradiente foram avaliados. Em razão da polaridade dos componentes de interesse, o processo de separação cromatográfica foi realizado empregando gradiente de eluição utilizando água e metanol. As fases móveis foram avaliadas em diferentes proporções, com fluxo 0,8 mL/min e gradiente de eluição inicial usando proporção de 12,5 a 25,0% de metanol, para melhor separação e resolução do pico ácido gálico. Entretanto, nessas condições o ácido elágico não eluiu, e dessa forma foi necessário aumentar a proporção de metanol (75%). Estudos realizados por DIEZ et al. (2008) relatam a dificuldade de eluição que apresenta o ácido elágico em baixas proporções de metanol.

Ambas as fases móveis foram acidificadas com ácido trifluoracético (ATF) para ajuste do pH e prevenção da ionização dos grupos hidroxila, promovendo maior eficiência de separação. Nessa etapa do trabalho, três ácidos foram avaliados: ATF, ácido acético glacial e ácido fosfórico. O ATF a 0,05% (v/v) foi eleito em razão da maior eficiência do sistema de separação resultando em maior resolução e separação dos picos no cromatograma referente à matriz vegetal. Assim, empregando as condições selecionadas na avaliação preliminar foi possível separar e detectar os padrões de ácido gálico e ácido elágico na matéria prima vegetal, confirmando a adequabilidade dos padrões como marcadores para as análises de amostras dos frutos de *L. ferrea* (Figura 4).

Figura 4 - Cromatograma obtidos para os padrões (ácido gálico e ácido elágico) e para o material vegetal dos frutos de *L. ferrea*.



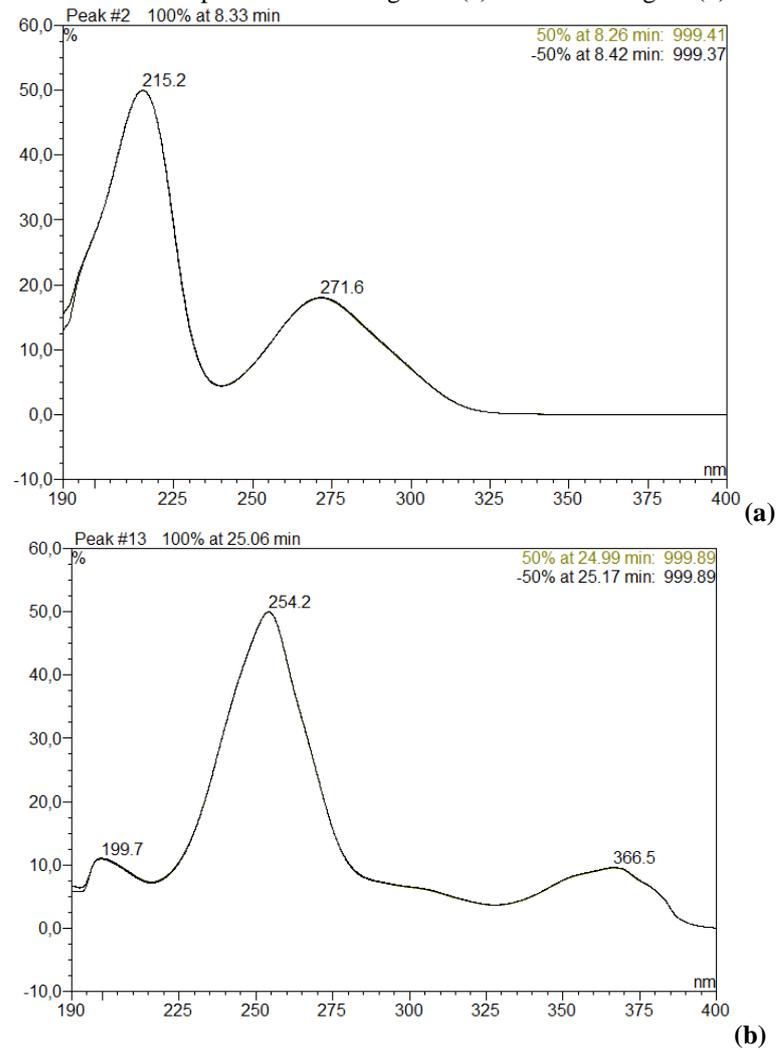
Fonte: Próprio Autor.

4.3.3.1 Procedimento de validação para análise quantitativa

4.3.3.1.1 Seleção do comprimento de onda, especificidade e identificação dos picos

Os máximos de absorção foram escolhidos após a realização do espectro de varredura dos picos referentes aos padrões no cromatograma (Figura 5). Assim, para o ácido gálico a análise cromatográfica foi realizada em 270 nm, enquanto o ácido elágico foi avaliado em 254 nm. Nessas condições, ácido gálico e ácido elágico foram identificados como os componentes majoritários nos frutos de *L. ferrea*, e apresentaram separação cromatográfica satisfatória com tempos de retenção de 8,5 e 25,0 minutos para ácido gálico e ácido elágico, respectivamente. O tempo total de análise também é um parâmetro importante durante o desenvolvimento de métodos cromatográficos. As análises por CLAE de matrizes complexas são frequentemente longas em razão da diversidade química presente e, conseqüentemente, das diferentes propriedades físico-químicas dos compostos. Deste modo, longo tempo de análise apresenta características não desejadas, tais como: elevado consumo de solventes, utilização de recursos instrumentais por muito tempo (p. ex. vida útil da lâmpada do detector), ou ainda, riscos de degradação da amostra em razão do longo período de permanência na coluna após a injeção, ou da longa permanência aguardando novo ciclo de injeção e análise. Com frequência são relatados métodos cromatográficos desta natureza com tempo total de análise superiores à 60 minutos e podendo alcançar até 80 minutos. Pouco frequentes são os métodos com tempo de análise inferior a 45 minutos e raros aqueles que se aproximam dos 30 minutos. Neste contexto, merece destaque o fato de que o procedimento reportado neste estudo permitiu a realização da análise num tempo total de 33 minutos (ARAPITSAS, 2012).

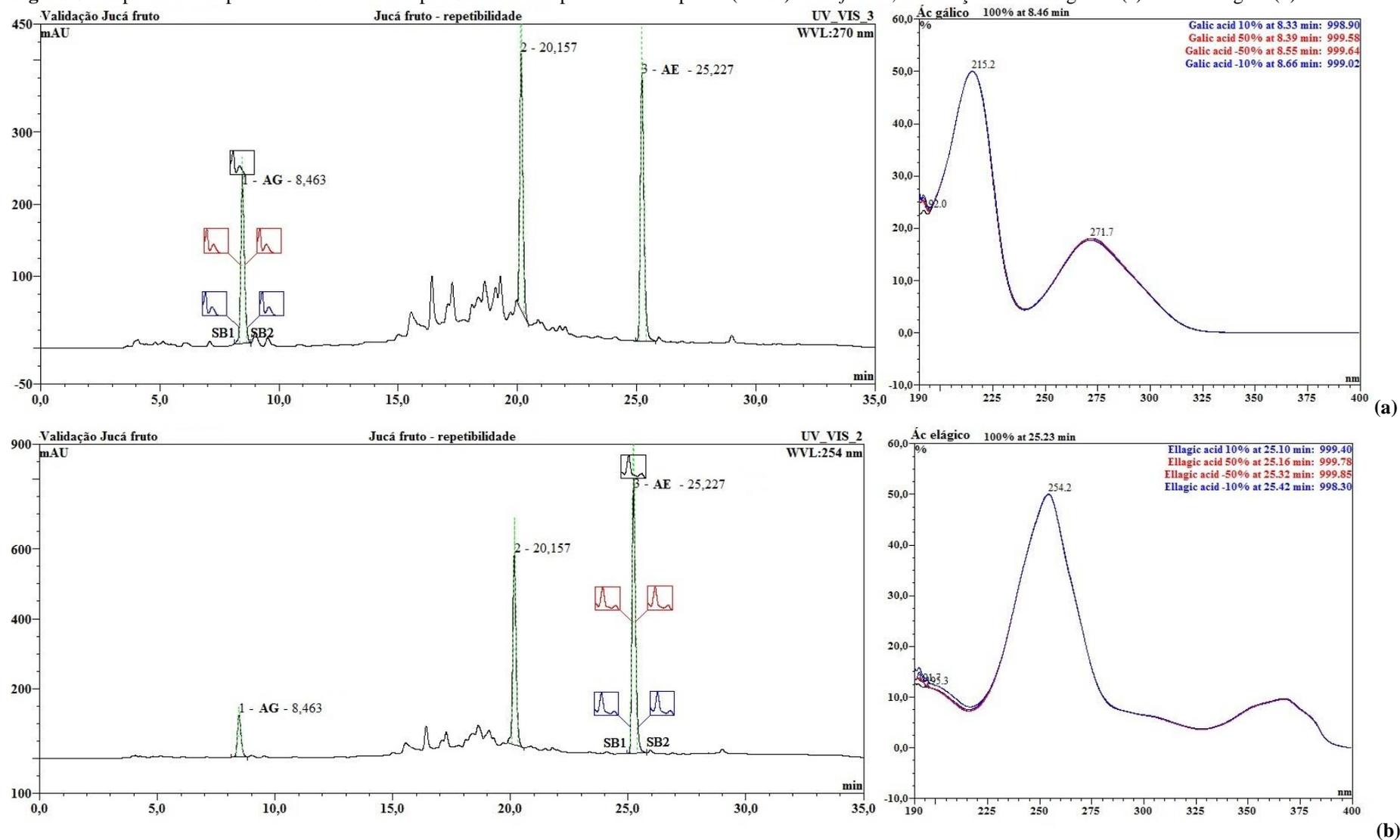
Figura 5 - Espectros de varredura dos padrões de ácido gálico (a) e de ácido elágico (b).



Fonte: Próprio Autor.

A especificidade do método foi confirmada pela análise de pureza do pico, verificada nos cromatogramas obtidos com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos. A figura 6 apresenta o cromatograma obtido para a solução amostra após a adição dos ácidos gálico e elágico.

Figura 6 - Especificidade para o método analítico por CLAE-DAD para a matéria prima (frutos) de *L. ferrea*, em relação ao ácido gálico (a) e ácido elágico (b)



Fonte: Próprio Autor.

4.3.3.1.2 Curvas analíticas, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

As curvas analíticas dos padrões, ácido gálico e ácido elágico, com cinco níveis de concentração, foram lineares nas faixas de 24,0 a 36, $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2) e de 23,2 a 34,9 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3), respectivamente. Para a matéria prima, a faixa de concentração avaliada entre 1200 e 1800 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4) também foi considerada linear. Os valores de R^2 foram acima de 0,99 em todos os casos.

Tabela 2 - Áreas obtidas os picos da curva analítica do ácido gálico na avaliação da linearidade.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Média \pm DP (DPR%)
24,0	31,365	32,673	32,576	32,21 \pm 0,73 (2,26)
27,0	36,415	37,240	37,224	36,96 \pm 0,47 (1,28)
30,0	41,749	41,815	41,086	41,55 \pm 0,40 (0,97)
33,0	46,862	46,787	46,953	46,87 \pm 0,08 (0,18)
36,0	51,692	51,577	51,034	51,43 \pm 0,35 (0,68)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%).

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 3 - Áreas obtidas para os picos da curva analítica do ácido elágico na avaliação da linearidade.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Média \pm DP (DPR%)
23,2	112,492	112,790	114,638	113,31 \pm 1,16 (1,03)
26,1	127,341	127,300	127,891	127,51 \pm 0,33 (0,26)
29,0	139,991	139,377	139,817	139,72 \pm 0,32 (0,23)
31,9	153,062	153,966	154,131	153,72 \pm 0,57 (0,37)
34,9	165,074	166,908	168,362	166,78 \pm 1,65 (0,99)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%).

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 4 - Áreas obtidas para os picos correspondentes ao ácido gálico e ao ácido elágico na curva analítica na avaliação de linearidade nos frutos de *L. ferrea*.

Linearidade da Amostra - Para Ácido gálico				
Concentração (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média ± DP (DPR%)
1200	32,008	32,297	31,946	32,08± 0,19 (0,58)
1350	35,806	36,359	36,573	36,25± 0,39 (1,59)
1500	40,987	41,108	41,096	41,06± 0,07 (0,16)
1650	44,610	44,837	44,801	44,75± 0,12 (0,27)
1800	48,475	48,615	48,675	48,59± 0,10 (0,21)
Linearidade da Amostra - Para Ácido elágico				
Concentração (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média± DP (DPR%)
1200	110,967	112,349	112,222	111,85± 0,76 (0,68)
1350	125,965	126,405	125,037	125,80± 0,70 (0,56)
1500	139,275	139,313	139,291	139,29± 0,02 (0,01)
1650	154,563	153,766	154,321	154,22± 0,41 (0,26)
1800	166,242	167,141	166,210	166,53± 0,53 (0,32)

Fonte: Próprio Autor.

Os resultados da análise de regressão linear, demonstram regressão significativa (no nível de 95% de confiança) e distribuição aleatória dos resíduos. Na análise de variância, foi realizado o teste *F* para falta de ajuste para cada curva. Quando o valor de *F* é estimado pela razão (média quadrática devido a falta de ajuste)/(média quadrática devido ao erro puro), é comparado com os valores da distribuição de *F* com 4 e 10 graus de liberdade ($\alpha = 0,05$), não foi evidenciada falta de ajuste para o modelo linear (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; KROMIDAS, 2011).

Com a curva analítica para os ácidos gálico e elágico na droga vegetal, foi possível calcular os limites de detecção e quantificação para o método. A tabela 5 mostra os resultados obtidos indicando que o método analítico apresenta sensibilidade apropriada para detectar e quantificar ácido elágico e ácido gálico na matéria prima (frutos) de *L. ferrea*.

Tabela 5 - Dados da análise estatística das curvas de calibração para os padrões (ácido gálico, ácido elágico) e matéria prima dos frutos de *L. ferrea*.

Parâmetros	Ácido gálico	Ácido elágico	Matéria prima	
			Ácido gálico	Ácido elágico
Faixa de concentração (µg/mL)	24,0 - 36,0	23,2 - 34,9	1200 - 1800	
LOD (µg/mL)	-	-	1,64	1,26
LOQ (µg/mL)	-	-	4,97	3,83
Coefficiente angular (a)	1,61	4,56	0,03	0,09
Coefficiente linear (b)	-6,53	7,88	-0,97	1,75
R²	0,999	0,999	0,997	0,999

Fonte: Próprio Autor.

4.3.3.1.3 Repetitividade e Precisão Intermediária

Considerando que a precisão é a medida do desvio do valor medido com base em um valor correto, devido a erros sistemáticos, a reprodutibilidade do procedimento pode ser afetada por diversos fatores, como: vidrariras, pipetas e/ou analistas (BETZ; BROWN; ROMAN, 2011; KROMIDAS, 2011). Nesse contexto, os teores de ácido gálico e ácido elágico foram determinados usando soluções da matéria prima preparadas no mesmo dia da análise. Para a avaliação da repetitividade do método, seis amostras independentes (a 100% da concentração teste) foram analisadas por CLAE-DAD. Os teores de ácido gálico e ácido elágico foram 2,25 %m/m e 2,11 %m/m, com desvio padrão relativo (DPR) igual a 0,34% e 0,40%, respectivamente (Tabela 6).

Os experimentos da precisão intermediária, avaliados em dois dias diferentes e conduzidos por dois operadores, expressaram as variações do método. Os resultados da quantificação de ácido gálico mostraram valores de DPR entre 0,27% e 1,05%, e, do ácido elágico entre 0,50% e 0,63%, em concordância com os valores preconizados (< 5%) pela Resolução RE 899 (BRASIL, 2003).

Tabela 6 - Ensaio de repetitividade e de precisão intermediária para a matéria prima dos frutos de *L. ferrea*.

Padrão	Parâmetro	Teor (%m/m) (Média ± DP; DPR%)	
	Repetitividade	2,250 ± 0,0086 (0,34)	
Ácido gálico	Precisão intermediária	Dia 1	Dia 2
	Analista 1	2,250 ± 0,008 (0,37)	2,210 ± 0,007 (0,30)
	Analista 2	2,210 ± 0,008 (0,36)	2,201 ± 0,005 (0,22)
	Repetitividade	2,110 ± 0,008 (0,40)	
Ácido elágico	Precisão intermediária	Dia 1	Dia 2
	Analista 1	2,120 ± 0,011 (0,51)	2,110 ± 0,018 (0,84)
	Analista 2	2,110 ± 0,013 (0,60)	2,120 ± 0,010 (0,49)

Fonte: Próprio Autor.

A média global das 12 determinações em diferentes dias e operadores foi de 2,220 %m/m para o ácido gálico e 2,120 %m/m para o ácido elágico com valores de DPR < 0,88%.

4.3.3.1.4 Exatidão

Na investigação da exatidão, quantidades conhecidas de ácido elágico e ácido gálico, em três níveis de concentração (80, 100 e 120%), foram adicionadas a solução extrativa aquosa e as amostras foram analisadas de acordo com o método descrito previamente. Percentuais de recuperação entre 100,6-106,5% (DPR = 3,9%) foram para o ácido gálico e entre 99,1-105,2% (DPR = 4,0%) para o ácido elágico (Tabelas 7 a 10).

Os resultados mostram que o método desenvolvido apresenta recuperação satisfatória, quando observados os valores preconizados pelos órgãos oficiais (FDA, 2004; BRASIL, 2003; ICH, 2005). De acordo com as taxas de recuperação observadas o método por CLAE-DAD pode ser aplicado à matéria prima constituída dos frutos de *L. ferrea*, apresentando desempenho dentro dos limites recomendados pela resolução e relatado na literatura indicando que a resposta analítica é proveniente dos analitos estudados.

Tabela 7 – Ensaio de exatidão: resultados obtidos para a área dos picos dos marcadores da matéria prima de *L. ferrea*.

Amostras	Área para AG	Área para AE
1	40,38	139,27
2	40,62	139,31
3	40,50	139,29
Média ± DP (DPR%)	40,50 ± 0,12 (0,30)	139,29 ± 0,02 (0,01)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%), AE: ácido elágico; AG: ácido gálico.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 8 - Ensaio de exatidão: resultados obtidos para as áreas dos padrões.

AG - Média ± DP (DPR%)	AE - Média ± DP (DPR%)
32,2 ± 0,7 (2,26)	113,3 ± 1,2 (1,03)
41,5 ± 0,4 (0,97)	139,7 ± 0,3 (0,23)
51,4 ± 0,3 (0,68)	166,7 ± 1,6 (0,99)

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%); AE: ácido elágico; AG: ácido gálico.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 9 - Ensaio de exatidão: resultados obtidos (média) para concentrações teóricas e experimentais, a partir da equação da reta dos padrões.

Percentual	Teórica - AG	Experimental - AG	Teórica - AE	Experimental - AE
80%	48,65	48,36	53,68	53,07
100%	55,09	53,65	59,47	58,42
120%	61,26	59,36	65,41	66,03

AE: ácido elágico; AG: ácido gálico.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 10 - Ensaio de exatidão: resultados de recuperação para os marcadores na matriz dos frutos de *L. ferrea*.

Réplicas	% Ácido elágico			% Ácido gálico		
	80	100	120	80	100	120
1	104,61	105,59	102,66	102,31	105,07	105,59
2	99,81	100,48	97,61	100,04	101,67	102,18
3	99,19	109,47	97,07	99,51	112,80	101,92
Média	101,20	105,18	99,11	100,62	106,51	103,23
DP	2,97	4,51	3,09	1,48	5,70	2,05
DPR%	2,93	4,28	3,12	1,48	5,35	1,98

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%).

Fonte: Próprio Autor.

4.3.3.1.5 Robustez

A robustez foi avaliada durante o desenvolvimento do método através de pequenas mudanças no método original, como alteração do pH da fase móvel, fluxo e temperatura do forno da coluna (BETZ; BROWN; ROMAN, 2011). Nas condições normais de análise (fluxo = 0,800 mL/min; pH das fases móveis = A2,5/B3,5; e, temperatura da coluna = 24 °C) os teores obtidos foram iguais a 2,21% m/m (0,37%) e 2,12% m/m (0,51%), respectivamente para ácido gálico e elágico. Os resultados obtidos para os parâmetros modificados estão apresentados na tabela 11. Não houve diferenças significativas nas áreas, tempos de retenção e teor de ácido gálico e ácido elágico (ANOVA, $\alpha = 0,05$), e todas as análises apresentaram DPR < 1,14%. Assim, o método proposto pode ser considerado robusto para ambos os marcadores sob as condições avaliadas.

Tabela 11 - Ensaio de robustez: teor dos marcadores na matéria prima dos frutos de *L. ferrea*.

Fonte de variação	Parâmetros	AG Média (DPR%)	AE Média (DPR%)
Fluxo (mL/min)	0,790	2,16 (0,44)	2,10 (0,82)
	0,810	2,19 (0,15)	2,10 (1,14)
pH da fase móvel	A2,0/B3,0	2,15 (0,04)	2,12 (0,84)
	A3,0/B4,0	2,18 (0,55)	2,12 (0,99)
Temperatura da coluna (°C)	23	2,17 (0,13)	2,11 (0,84)
	25	2,16 (0,11)	2,11 (0,20)

DPR: Desvio padrão relativo (%); AE: ácido elágico; AG: ácido gálico.

Fonte: Próprio Autor.

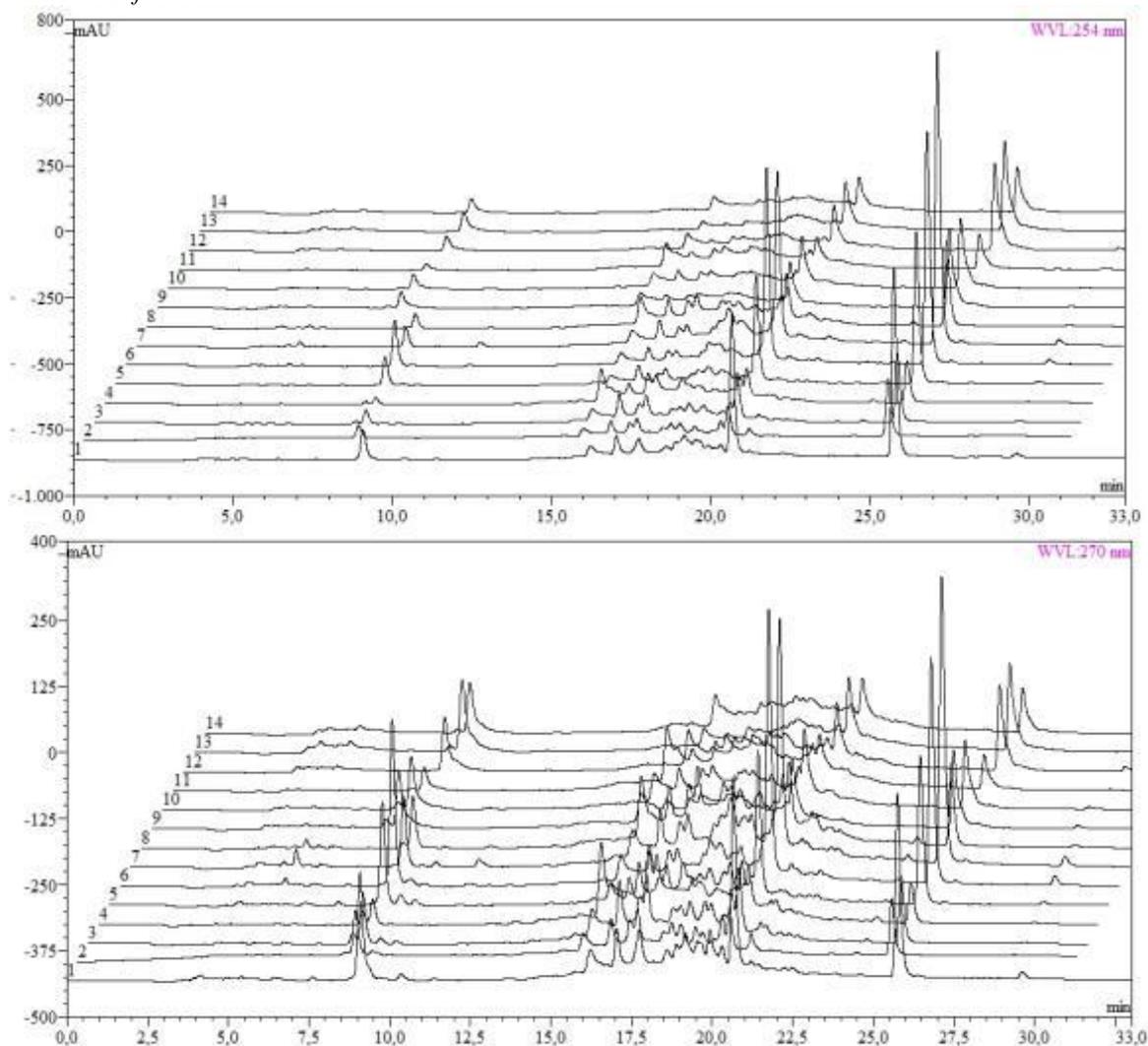
4.3.3.2 Obtenção do perfil cromatográfico de diferentes amostras por CLAE

Após desenvolvimento e validação do método por CLAE-DAD, as amostras coletadas em diferentes regiões foram submetidas à análise qualitativa e quantitativa por CLAE.

A análise qualitativa realizada através da comparação dos perfis cromatográficos das amostras com o material de referência (droga autenticada pelo herbário) objetivou a busca de regiões de similaridade nos cromatogramas (Figura 5).

Nos cromatogramas podem ser observadas as regiões características dos padrões para as 14 amostras de frutos de *L. ferrea*: entre 8,0 e 10,0 minutos, intervalo correspondente à presença do ácido gálico; entre 15,0 e 22,0 minutos; e, a região correspondente à presença do ácido elágico, entre 24,0 e 26,0 minutos (Figura 7).

Figura 7 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD (em 254 e 270 nm) para as quatorze amostras dos frutos de *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

A análise quantitativa denota a elevada heterogeneidade das amostras através dos teores dos marcadores (Tabela 12). As variações podem ser atribuídas aos diversos fatores que afetam a qualidade química de drogas vegetais e já discutidas anteriormente. Entretanto exemplificam o desafio de dificuldade da padronização de produtos desta natureza, especialmente àqueles destinados ao uso humano, como os fitoterápicos.

Tabela 12 – Teor médio de ácido gálico e ácido elágico obtido por CLAE-DAD em diferentes amostras dos frutos de *L. ferrea*.

Amostras	Teor (%m/m)	
	Ác. gálico (270 nm)	Ác. elágico (254 nm)
1 Limoeiro (Região 1) - PE	1,96 (0,12)	2,13 (0,11)
2 Recife (Mercado Público) - PE	0,90 (0,05)	0,72 (0,15)
3 Palmares - PE	0,93 (0,10)	0,84 (0,14)
4 Fortaleza - CE	0,57 (0,03)	0,54 (0,12)
5 Belo Jardim - PE	1,78 (0,01)	1,71 (0,15)
6 Arcoverde - PE	2,68 (0,03)	2,57 (0,16)
7 Manaus (Região 1) - AM	1,26 (0,09)	3,23 (0,13)
8 Manaus (Região 2) - AM	0,97 (0,04)	1,00 (0,11)
9 Caruaru - PE	1,31 (0,01)	1,09 (0,12)
10 Maceió - AL	1,22 (0,02)	0,97 (0,17)
11 Mossoró - RN	0,71 (0,02)	0,56 (0,12)
12 Mato Grosso do Sul – MS	1,35 (0,01)	1,21 (0,13)
13 Limoeiro (Região 2) - PE	1,68 (0,04)	1,23 (0,18)
14 Brasília - GO	1,24 (0,02)	0,66 (0,10)

Os dados foram expressos como teor médio (desvio padrão relativo). PE: Pernambuco; CE: Ceará; AM: Amazonas; AL: Alagoas; RN: Rio Grande do Norte; MS: Mato Grosso do Sul; GO: Goiás.
Fonte: Próprio Autor.

4.3.4 Obtenção e Caracterização dos Extratos Brutos e Frações

No processo de obtenção de extratos vegetais, o objetivo é extrair seletivamente e totalmente as substâncias utilizando um solvente ou mistura de solventes. Mesmo com a diversidade de solventes conhecidos e a limitação no conhecimento a cerca das suas propriedades de extração, aspectos tecnológicos e toxicidade dos mesmos, os solventes utilizados comumente para obtenção de extratos brutos são compostos pela mistura de água-etanol.

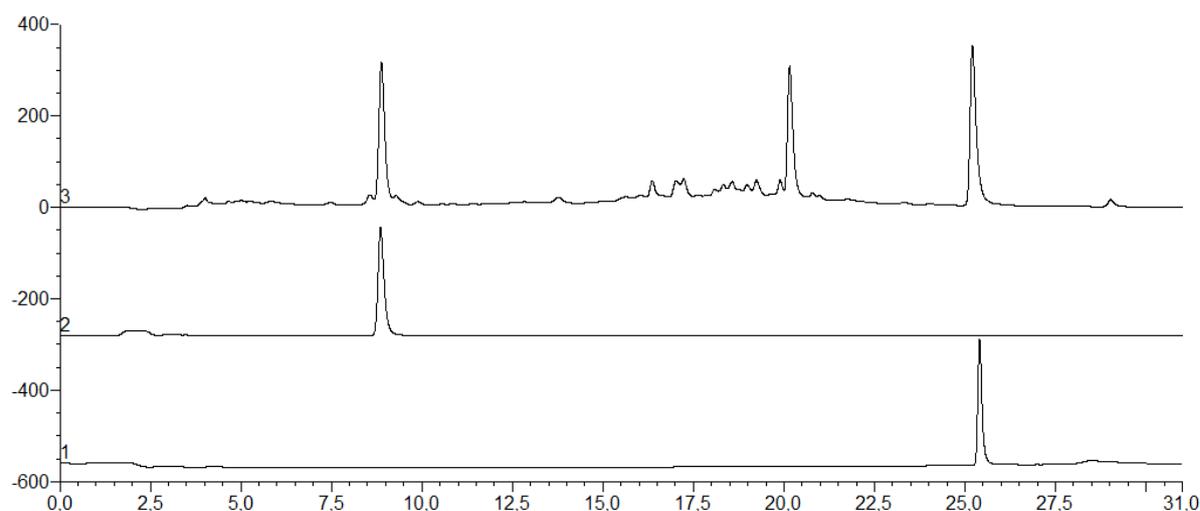
Com o solvente e método extrativo apropriados é possível obter, desde o início, um extrato rico nas substâncias de interesse e com baixo teor das não desejadas, podendo assim refletir na atividade biológica do extrato. Considerando esses aspectos, variando-se a polaridade dos solventes e/ou método extrativo é possível obter extratos com diferentes composições químicas (BAUER, 1998; VIERLING et al., 2003; ENDALE; SCHMIDT; GEBRE-MARIAM, 2004; SIMÕES et al., 2010).

Considerando a importância de se controlar os extratos brutos e as frações enriquecidas, procedeu-se com a validação da metodologia analítica por CLAE-DAD para o doseamento de ácido gálico e ácido elágico nos derivados de *L. ferrea*, além da obtenção dos perfis químicos quali-/quantitativos por CLAE-DAD e CCD-AE.

4.3.4.1 Validação do método analítico por CLAE-DAD para o doseamento de ácido gálico e ácido elágico em extrato bruto aquoso dos frutos de *L. ferrea*

Inicialmente, foi obtido o perfil cromatográfico obtido para o extrato bruto e os padrões (Figura 8). O cromatograma do extrato bruto apresentou picos correspondentes aos padrões de ácido gálico e ácido elágico, assim como observado para a matéria prima (frutos) anteriormente. Os tempos de retenção dos picos de interesse foram aproximadamente 8,5 e 25,5 minutos, para o ácido gálico e ácido elágico, respectivamente.

Figura 8 - Cromatograma obtido para os padrões (ácido gálico e ácido elágico) e para o extrato bruto dos frutos de *L. ferrea*.



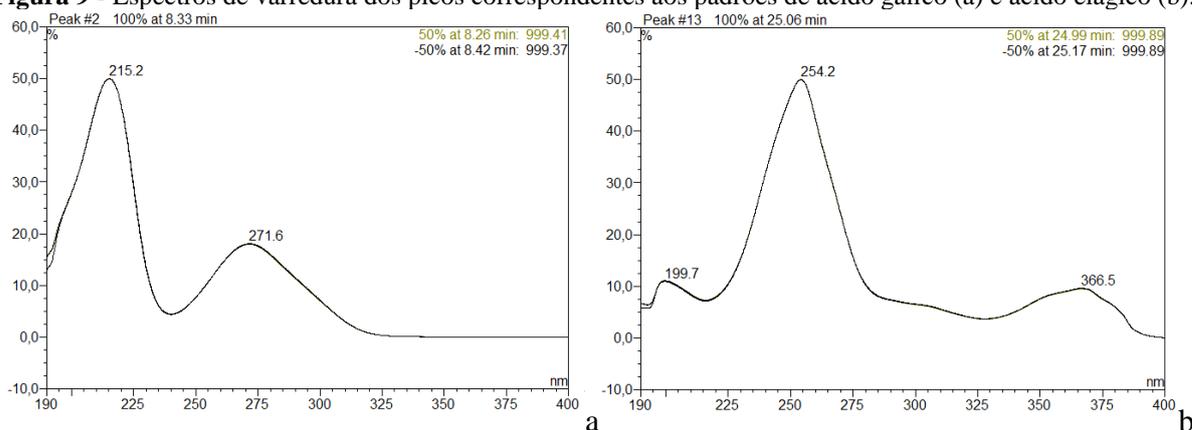
1: Ácido elágico; 2: Ácido gálico; 3: Extrato Bruto.

Fonte: Próprio Autor.

4.3.4.1.1 Seleção do comprimento de onda, especificidade e identificação dos picos

Assim como para a matéria prima vegetal, os cromatogramas do extrato bruto foram monitorados a 270 nm para o ácido gálico e a 254 nm para o ácido elágico (Figura 9). Nessas condições, ácido gálico e ácido elágico também foram identificados como os componentes majoritários do extrato bruto analisado, com tempo de análise cromatográfica em 33 minutos.

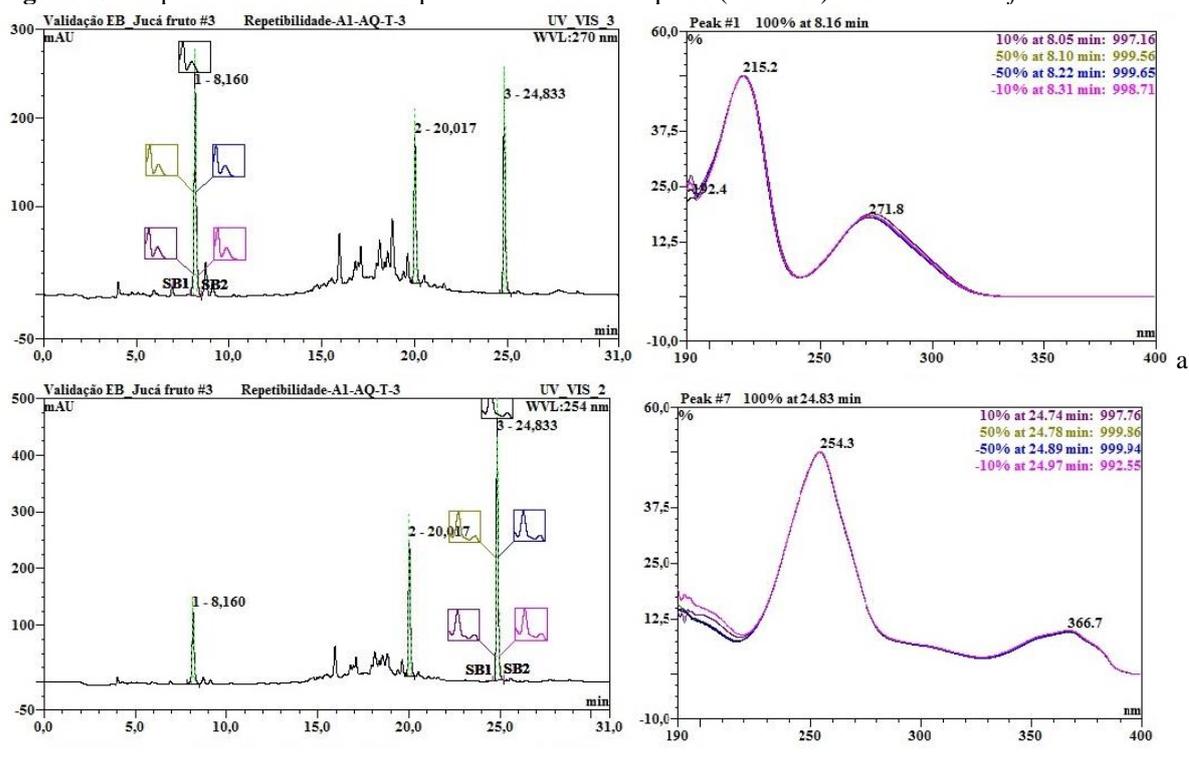
Figura 9 - Espectros de varredura dos picos correspondentes aos padrões de ácido gálico (a) e ácido elágico (b).



Fonte: Próprio Autor.

A especificidade do método também foi confirmada pela análise de pureza do pico, verificada nos cromatogramas obtidos com o auxílio do software utilizado. A figura 10 apresenta o cromatograma obtido para o extrato bruto após a adição dos padrões.

Figura 10 - Especificidade do método para o extrato bruto aquoso (turbólise) dos frutos de *L. ferrea*.



Fonte: Próprio Autor.

4.3.4.1.2 Curvas analíticas, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

As curvas analíticas para os padrões de ácido gálico e de ácido elágico, com cinco níveis de concentração, apresentaram comportamento linear nas faixas de 24,0 a 36,0 $\mu\text{g/mL}$ e

de 5,0 a 25,0 µg/mL, respectivamente. Para o extrato bruto, a faixa de concentração avaliada entre 800 e 1200 µg/mL também foi considerada linear. Os valores de R^2 foram superiores a 0,99 em todos os casos. A partir dos dados obtidos das curvas dos padrões, foram calculados os limites de detecção e quantificação. A tabela 13 mostra os resultados obtidos para a análise das curvas analíticas, indicando que o método apresenta sensibilidade apropriada para detectar e quantificar ácido elágico e ácido gálico no extrato bruto aquoso.

Tabela 13 - Dados de calibração para os padrões de ácido gálico, ácido elágico e extrato bruto dos frutos de *L. ferrea*.

Parâmetros	Ácido gálico	Ácido elágico	Extrato bruto	
			Ácido gálico	Ácido elágico
Faixa de concentração (µg/mL)	24,0-36,0	5,0-25,0	800 – 1200	
LOD (µg/mL)	-	-	1,64	1,43
LOQ (µg/mL)	-	-	4,98	4,33
Coefficiente angular (a)	1,61	5,11	0,03	0,06
Coefficiente linear (b)	-6,56	-8,84	3,43	12,71
R^2	0,999	0,991	0,999	0,993

Fonte: Próprio Autor.

Os resultados da análise de regressão linear, demonstraram que a regressão significativa (95% de confiança) e distribuição aleatória dos resíduos. Na análise de variância, também foi realizado o teste F para falta de ajuste para cada curva, sendo evidenciado que não houve evidência de falta de ajuste, no nível de 95% de confiança (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; KROMIDAS, 2011).

4.3.4.1.3 Repetitividade e Precisão Intermediária

Para a avaliação da repetitividade do método, seis amostras independentes (a 100% da concentração teste) foram analisadas por CLAE-DAD. Os teores de ácido gálico e ácido elágico foram 2,25 %m/m e 2,11 %m/m, com desvio padrão relativo (DPR) igual a 1,34% 0,88%, e respectivamente (Tabela 14). Os experimentos da precisão intermediária mostraram valores de DPR entre 0,54% e 1,83% para o ácido gálico; e, entre 0,50% e 0,97% para o ácido elágico, em concordância com os valores preconizados (< 5%) pela Resolução RE 899 (BRASIL, 2003). A média global das 12 determinações em diferentes dias e operadores foi de

2,30 %m/m para o ácido gálico (DPR = 1,56%) e 2,31 %m/m (DPR = 0,89%) para o ácido elágico.

Tabela 14 - Repetitividade e precisão intermediária para o extrato bruto aquoso (turbólise) dos frutos de *L. ferrea*.

Padrão	Parâmetro	Teor (%m/m) (Média ± DP; DPR%)	
	Repetitividade	2,33 ± 0,031 (1,34)	
Ácido gálico	Precisão intermediária	Dia 1	Dia 2
	Analista 1	2,27 ± 0,034 (1,52)	2,32 ± 0,022 (0,54)
	Analista 2	2,28 ± 0,042 (1,83)	2,29 ± 0,019 (0,83)
	Repetitividade	2,30 ± 0,020 (0,88)	
Ácido elágico	Precisão intermediária	Dia 1	Dia 2
	Analista 1	2,31 ± 0,013 (0,55)	2,33 ± 0,018 (0,50)
	Analista 2	2,29 ± 0,018 (0,81)	2,29 ± 0,022 (0,97)

Fonte: Próprio Autor.

4.3.4.1.4 Exatidão

No ensaio de exatidão, percentuais de recuperação entre 101,2-108,1% foram obtidos para o ácido gálico e entre 99,8-100,7% para o ácido elágico (Tabela 15). Os resultados mostram que o método apresenta recuperação satisfatória, quando observados os valores preconizados pelos órgãos oficiais (FDA, 2004; BRASIL, 2003; ICH, 2005). De acordo com as taxas de recuperação observadas o método por CLAE-DAD pode ser aplicado aos extratos brutos constituídos dos frutos de *L. ferrea*.

Tabela 15 – Exatidão: resultados de recuperação para o extrato bruto aquoso (turbólise) dos frutos de *L. ferrea*.

Réplicas	% Ácido gálico			% Ácido elágico		
	80	100	120	80	100	120
1	108,55	105,08	101,25	99,87	100,41	100,76
2	108,73	106,41	101,29	99,87	100,42	100,76
3	106,97	104,88	101,27	99,86	100,41	100,76
Média	108,08	105,45	101,27	99,86	100,41	100,75
DP	0,97	0,83	0,017	0,007	0,007	0,0002
DPR%	0,89	0,79	0,02	0,01	0,01	0,00

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo (%).

Fonte: Próprio Autor.

4.3.4.1.5 Robustez

Os resultados de robustez obtidos para os parâmetros modificados estão apresentados na tabela 16. Nas condições normais de análise (fluxo = 0,800 mL/min; pH das fases móveis = A2,5/B3,5; e, temperatura da coluna = 24 °C) os teores obtidos foram iguais a 2,33% m/m (1,34%) e 2,30% m/m (0,88%), respectivamente para ácido gálico e elágico. Não houve diferenças significativas nas áreas, tempos de retenção e teor de ácido gálico e ácido elágico (ANOVA, $\alpha = 0,05$), e todas as análises apresentaram DPR < 1,08%. Assim, o método proposto pode ser considerado robusto para ambos os marcadores sob as condições avaliadas.

Tabela 16 - Robustez: teor de ácido gálico e ácido elágico (%m/m) em extrato bruto aquoso dos frutos de *L. ferrea*.

Fonte de variação	Parâmetros	AG (Média; DPR%)	AE (Média; DPR%)
Fluxo (mL/min)	0,790	2,28 (0,74)	2,30 (0,90)
	0,810	2,31 (0,93)	2,32 (1,08)
pH da fase móvel	A2,0/B3,0	2,30 (0,79)	2,32 (0,81)
	A3,0/B4,0	2,32 (0,25)	2,33 (0,97)
Temperatura da coluna (°C)	23	2,30 (0,95)	2,30 (0,31)
	25	2,29 (0,98)	2,32 (1,01)

DPR: Desvio padrão relativo (%); AG: ácido gálico; AE: ácido elágico.

Fonte: Próprio Autor.

4.3.4.2 Preparação e caracterização cromatográfica de extratos brutos e frações obtidos dos frutos de *L. ferrea*

Considerando a possibilidade de obter frações enriquecidas em polifenóis, a partir dos frutos de *L. ferrea*, foram obtidos extratos brutos, utilizando três metodologias de preparação (turbólise, refluxo e ultrassom) e diversas proporções de solventes (Aquoso e Etanólico nas proporções 20, 40, 60 e 80%, v/v), a fim de verificar possíveis diferenças no teor dos marcadores (com ênfase nos ácidos elágico e gálico) quando submetidos a diferentes condições.

A escolha do método extrativo e solvente para esta etapa do trabalho foi baseada na literatura, que indica que a mistura de solventes (água e solventes orgânicos) é apropriada para maximizar o rendimento da extração desta classe de compostos (SIMÕES et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011; BUENO et al., 2012; LONNI et al., 2012; DICIAULA et al., 2014; COSTA et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

A investigação de métodos utilizados na extração de compostos ativos de droga vegetal e a utilização de mistura de solventes são parâmetros de grande importância, para obtenção de extratos ricos nas substâncias de interesse (ILOKI-ASSANGA et al., 2015). Além disso, fatores como temperatura de extração, relação droga vegetal/solvente, tempo de contato do material vegetal com o solvente e procedimento empregado na concentração do extrato, possuem influência na composição e perfil químico qualitativo e quantitativo do extrato. No que diz respeito à concentração do extrato, esta operação deve ser realizada por um método que não afete a estabilidade das substâncias de interesse. Assim, na obtenção dos extratos e concentração dos mesmos, é importante avaliar o efeito desses fatores nos perfis químicos quali-/quantitativos obtidos (ENDALE; SCHMIDT; GEBRE-MARIAM, 2004).

O principal objetivo de se obter frações enriquecidas está no fato de que as frações podem ser consideradas mais ativas. Adicionalmente, algumas das frações obtidas apresentam menor teor dos constituintes não ativos, em relação ao extrato bruto. A obtenção de frações enriquecidas pode ser realizada de acordo com a polaridade das substâncias de interesse, e entre as metodologias mais empregadas são a partição entre solventes imiscíveis e as técnicas cromatográficas (BAGETTA et al., 2012; CHAWLA et al., 2013).

Quando as frações são obtidas por partição com solventes imiscíveis, o processo baseia-se nos coeficientes de partição dos compostos que estão presentes no extrato bruto. Com o emprego de sucessivas partições, a fração vai conter, em princípio, diferentes classes de compostos. No caso de partições realizadas com água e acetato de etila, os compostos mais polares permanecem na fração aquosa e os compostos de média polaridade migram para a fração acetato de etila (HARBORNE, 1998; SIMÕES, et al., 2010).

Após preparação, os extratos brutos foram caracterizados por CCD-AE e CLAE-DAD e aqueles extratos que apresentaram maior rendimento em ácido elágico e ácido gálico foram selecionados para preparação de frações enriquecidas.

4.3.4.2.1 Perfil químico típico obtido por CCD-AE

Bandas correspondentes aos padrões foram evidenciadas em todos os extratos brutos e frações enriquecidas obtidas, sendo a banda correspondente ao ácido gálico, semelhante em coloração azulada (após derivatização em 365 nm) e em R_f (0,94); e a banda correspondente ao ácido elágico apresentou coloração esverdeada e R_f de 0,56. Adicionalmente, o perfil típico das diversas amostras apresentou diferenças quanto à intensidade e número de bandas observadas, sendo observadas outras bandas bem definidas e evidentes, de colorações alaranjadas, azuladas e esverdeadas em alguns extratos e frações.

Nesse estudo, a CCD-AE foi utilizada para verificar se os compostos de interesse (ácido elágico e ácido gálico) estavam sendo extraídos, de acordo com a proporção de solvente e metodologia utilizada para extração. Além disso, as cromatoplasmas foram essenciais para observação da uniformidade e intensidade das bandas relacionadas aos compostos presentes nos extratos brutos e frações enriquecidas.

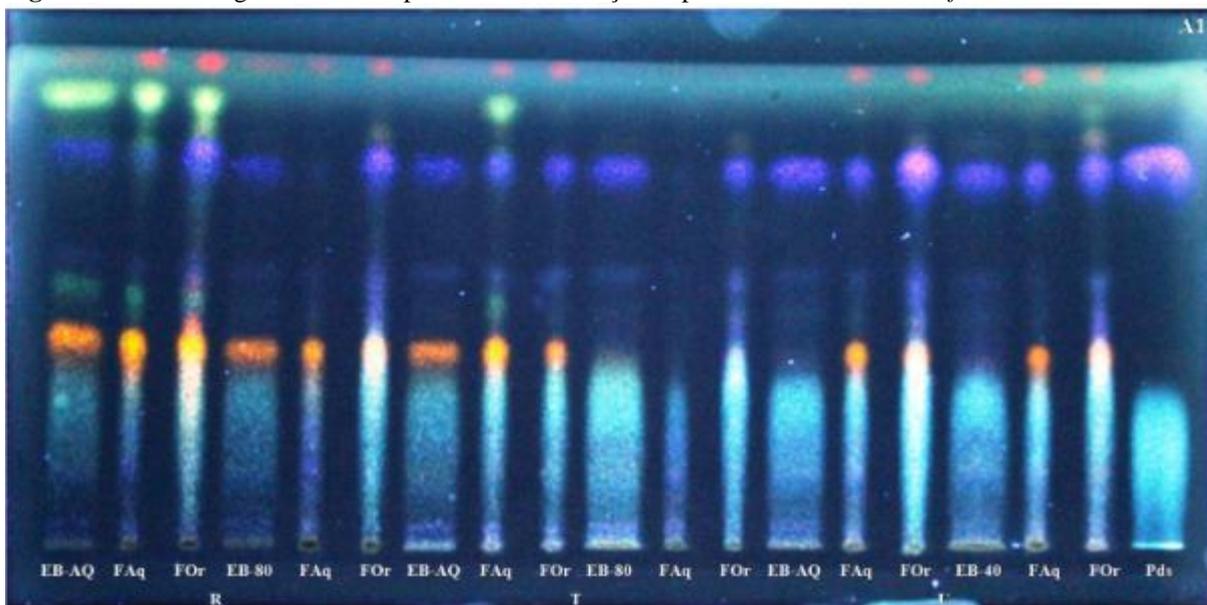
A combinação acetato de etila: ácido fórmico: água como fase móvel da análise de CCD-AE de diferentes extratos e frações de *L. ferrea* resultou em bandas bem separadas e simétricas, sendo possível estabelecer perfis químicos típicos dos extratos e frações obtidos a partir dos frutos de *L. ferrea*.

O rendimento de um processo extrativo é dependente do tipo de solventes (diferentes polaridades), tempo de extração, temperatura e proporção droga:solvente, além da composição e características das amostras. Em relação à solubilidade dos polifenóis, a extração é medida pela natureza da amostra, bem como da polaridade dos solventes utilizados (DAI; MUMPER, 2010). De acordo com o exposto, é possível observar que, de uma forma geral, quando se utiliza a mistura etanol:água acima de 50% na obtenção dos extratos brutos, as bandas correspondentes aos marcadores (ácidos gálico e elágico) tendem a diminuir em intensidade.

No cromatograma referente aos extratos/frações obtidos a partir da amostra autenticada (1), observa-se que a maioria das amostras apresentou uma banda de coloração alaranjada (Figura 11). Além disso, o extrato aquoso e suas respectivas frações apresentaram

bandas esverdeadas evidentes. Também foi verificado que com o processo de fracionamento, as bandas correspondentes às frações orgânicas dos extratos apresentaram maior intensidade quando comparada com a fração aquosa, evidenciando o enriquecimento de polifenóis na fração orgânica.

Figura 11 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 1 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

Perfis semelhantes com bandas bem definidas foram observados para as demais amostras. Os cromatogramas referentes aos principais extratos brutos e suas respectivas frações (amostras 2 a 14) estão apresentados no apêndice A (Figuras 1 a 13). Os perfis de CCD-AE se apresentaram de comportamento semelhante, com intensidade de bandas variável, sugerindo similaridade de conteúdo químico, porém em concentrações diferentes. Dessa forma, o perfil qualitativo obtido com o auxílio da técnica de CCD-AE foi confirmado pela quantificação por CLAE-DAD dos marcadores estabelecidos (ácido gálico e ácido elágico).

Os extratos/frações da amostra 2 apresentaram uniformidade quanto a intensidade de coloração das bandas. Também foi verificada a presença de bandas alaranjadas em grande parte das amostras analisadas. Aqueles obtidos a partir da amostra 3 apresentaram intensidades mais fracas da banda correspondente ao ácido elágico, além da presença de bandas alaranjadas também em menor intensidade quando comparadas as amostras 1 e 2.

Em relação à amostra 4, os extratos/frações também apresentaram bandas de intensidade fraca em relação aos dois padrões. Foi evidenciado o enriquecimento da fração orgânica, quando observadas as bandas que correspondem ao padrão ácido gálico, uma vez que apresentam maior intensidade quando comparadas as bandas referentes aos extratos brutos e as frações aquosa.

Os extratos e frações obtidos das amostras 5 e 6, foram aqueles que assim como a amostra 1, apresentaram bandas bem evidentes correspondentes ao ácido gálico e ácido elágico, confirmando o enriquecimento da fração orgânica. Nos extratos e frações referentes a amostra 6 as bandas de colorações alaranjadas e esverdeadas se apresentaram bem evidentes.

Os extratos e frações obtidos da amostra 7 apresentaram mesmo perfil cromatográfico de bandas correspondentes aos padrões. Os derivados da amostra 8 apresentaram-se com menor intensidade das bandas obtidas. Os extratos e frações referentes às amostras 9 e 10 também fazem parte do elenco de amostras que apresentaram bom rendimento quanto aos métodos extrativos, além de bandas cromatográficas com maior intensidade e o enriquecimento da fração orgânica bem evidenciado. Foi observado que as amostras 11 e 13 apresentaram problemas de solubilização, e dessa forma as bandas não foram bem evidenciadas nas cromatoplacas. Apesar disso, é possível verificar o enriquecimento da fração orgânica nestas amostras, o que também é evidente nas amostras 12 e 14.

Com base nos perfis obtidos por CCD-AE para os extratos brutos e frações dos frutos de *L. ferrea* e de acordo com Giri et al. (2010) e Aladdin et al. (2016), a separação de substâncias por CCD-AE pode ser útil no desenvolvimento e otimização de processos, em processos de validação, na identificação e caracterização de uma classe de compostos e no direcionamento para isolar/purificar compostos de interesse.

4.3.4.2 Perfil químico típico obtido por CLAE-DAD e quantificação de ácido gálico e ácido elágico nos extratos brutos e frações

Os perfis químicos típicos qualitativos obtidos por CLAE-DAD para os principais extratos brutos e suas respectivas frações estão representados no apêndice B.

No que pese à utilização de diferentes processos extrativos foi observado que as amostras obtidas por turbólise apresentaram maiores teores de ácido gálico (Tabela 17) e ácido elágico (Tabela 18), seguidas de refluxo e ultrassom; além disso, a utilização de

diferentes proporções de etanol promoveu a obtenção de extratos brutos com diferentes teores desses compostos, como esperado.

A literatura relata que solventes como acetona, etanol e metanol, ou suas combinações muitas das vezes com água (BUENO et al., 2012; LONNI et al., 2012; DICIAULA et al., 2014), têm sido bastante utilizados para extrair polifenóis de matrizes vegetais. O etanol, utilizado em diferentes proporções neste estudo, apresenta eficácia para extração de polifenóis, além de ser seguro para utilização pelo homem (DAI; MUMPER, 2010; GIRONI; PIEMONTE, 2011).

Como citado anteriormente, as metodologias de refluxo e turbólise maximizam a extração de polifenóis quando comparadas com a obtenção dos extratos por ultrassom. Nesse sentido, sabe-se que a obtenção de extratos em sua composição é influenciada pela metodologia empregada, pela utilização de temperatura, bem como o tempo de extração.

Em relação à turbólise, a extração ocorre simultaneamente à redução do tamanho da partícula, devido às forças de cisalhamento aplicadas. A redução do tamanho de partícula e o rompimento das células favorecem o processo, resultando em menor tempo de extração e o quase esgotamento da droga (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010). Já em relação à extração sob refluxo, além da utilização de aparatos que promovem a condensação do líquido extrator, e o aumento na temperatura de extração pode promover uma maior solubilidade, redução da viscosidade e da tensão superficial dos solventes a penetração nas matrizes vegetais, melhorando o processo extrativo (SIMÕES et al., 2010). A extração por ultrassom tem sido bastante utilizada (DAI; MUMPER, 2010; WANG et al., 2010; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; RODRIGUES et al., 2016; TOMŠIK et al., 2016), já que não utiliza equipamentos complexos e é de baixo custo. A extração é favorecida devido à criação de uma força que gera bolhas de cavitação e essas produzem efeitos que resultam na ruptura das membranas das matrizes vegetais.

Tabela 17 – Teores de ácido gálico (%m/m) obtidos por CLAE-DAD para os extratos brutos e frações dos frutos de *L. ferrea*.

Amostras	Turbólise						Refluxo						Ultrassom						
	EB		FO		FA		EB		FO		FA		EB		FO		FA		
	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	
A1	AQ	3,99	2,48	12,03	0,25	1,98	0,28	4,55	0,89	9,22	0,14	3,94	3,85	4,79	0,87	-	-	-	-
	20%	4,43	0,24	6,53	0,06	5,22	0,37	5,17	0,63	-	-	-	-	4,42	1,67	-	-	-	-
	40%	3,39	0,65	-	-	-	-	4,67	0,51	-	-	-	-	4,29	0,83	4,77	0,37	0,05	3,96
	60%	1,61	0,64	2,69	0,09	2,16	0,25	2,77	0,81	3,00	0,14	0,60	1,03	1,97	0,43	-	-	-	-
	80%	1,84	0,32	2,04	0,27	1,02	0,08	1,91	2,40	2,66	0,21	0,29	0,05	2,85	0,17	-	-	-	-
A2	AQ	1,46	0,64	1,51	2,68	1,18	1,27	0,86	0,09	1,51	1,79	0,34	1,06	1,58	1,31	-	-	-	-
	20%	1,68	0,12	1,67	0,16	0,45	6,10	1,14	0,10	1,56	2,68	0,27	0,63	1,63	0,41	2,93	0,14	0,05	0,31
	40%	1,41	0,08	-	-	-	-	0,89	0,04	-	-	-	-	1,58	0,25	-	-	-	-
	60%	1,28	0,02	-	-	-	-	0,96	0,19	-	-	-	-	1,37	0,16	-	-	-	-
	80%	0,99	0,13	1,19	0,08	0,24	0,07	0,95	0,18	-	-	-	-	1,20	0,23	-	-	-	-
A3	AQ	1,68	0,69	3,88	0,05	1,41	7,03	1,06	0,81	1,39	5,78	0,58	1,14	1,28	1,07	3,13	0,15	0,16	0,70
	20%	1,53	0,64	3,30	0,37	0,43	6,10	0,74	1,11	0,95	0,41	0,65	1,25	1,71	0,11	2,58	0,12	0,13	0,23
	40%	1,59	0,10	3,00	0,03	0,77	1,15	1,04	0,51	-	-	-	-	1,59	0,19	-	-	-	-
	60%	1,49	0,14	1,88	0,39	0,98	1,32	1,13	1,73	-	-	-	-	1,45	0,91	-	-	-	-
	80%	1,42	1,83	3,01	0,77	0,48	0,75	1,21	1,47	1,48	0,16	0,32	1,02	1,34	0,42	-	-	-	-
A4	AQ	1,64	2,23	-	-	-	-	0,42	0,42	1,07	0,70	0,44	1,37	1,50	0,46	2,14	0,07	0,33	2,61
	20%	1,69	1,03	-	-	-	-	0,56	0,81	-	-	-	-	1,65	0,53	-	-	-	-
	40%	1,92	0,19	3,15	0,15	1,54	2,65	0,48	0,03	-	-	-	-	0,88	0,29	1,05	2,55	0,24	0,77
	60%	1,54	0,58	-	-	-	-	0,61	0,24	0,71	0,26	0,19	0,25	2,00	0,98	2,82	0,72	0,36	0,31
	80%	1,37	0,09	1,59	0,11	0,55	0,15	0,54	0,12	0,69	0,18	0,20	0,21	2,38	1,04	2,96	0,50	0,35	0,08

Continuação da tabela 17.

Amostras	Turbólise						Refluxo						Ultrassom					
	EB		FO		FA		EB		FO		FA		EB		FO		FA	
	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%
AQ	3,91	0,07	7,03	1,55	0,11	3,99	4,13	0,06	4,55	1,48	0,05	0,01	4,80	0,03	7,31	0,07	0,05	0,37
20%	3,81	0,04	-	-	-	-	3,24	0,18	-	-	-	-	3,81	0,04	-	-	-	-
A5 40%	2,95	0,06	3,61	4,36	0,19	0,38	3,58	0,01	3,64	0,84	0,15	0,50	2,81	1,16	4,92	13,38	0,09	0,30
60%	2,89	0,08	-	-	-	-	3,08	0,95	-	-	-	-	2,97	1,52	-	-	-	-
80%	3,66	0,52	-	-	-	-	3,55	0,01	-	-	-	-	3,67	0,74	10,55	2,18	0,08	0,25
AQ	4,42	0,23	6,10	3,04	0,26	0,64	4,77	0,07	-	-	-	-	5,18	0,14	10,29	0,60	0,57	0,59
20%	4,86	0,43	6,95	0,02	0,99	0,32	4,36	0,32	-	-	-	-	4,73	0,03	5,59	0,41	0,74	0,29
A6 40%	4,72	0,02	-	-	-	-	3,85	0,52	5,14	0,15	0,36	0,34	4,19	0,17	-	-	-	-
60%	4,70	1,46	5,20	0,79	0,70	0,58	4,33	0,54	6,97	0,51	0,57	0,49	4,42	0,18	-	-	-	-
80%	4,70	0,05	-	-	-	-	4,45	0,23	-	-	-	-	5,33	0,08	-	-	-	-
AQ	1,51	0,47	2,66	0,67	0,35	1,24	1,29	0,83	1,37	0,10	0,09	0,24	2,05	1,50	-	-	-	-
20%	2,03	0,11	-	-	-	-	1,12	0,08	1,77	0,86	0,14	0,10	2,09	0,13	2,97	0,68	0,48	0,68
A7 40%	1,63	0,14	-	-	-	-	1,12	0,12	-	-	-	-	1,76	2,66	-	-	-	-
60%	1,29	0,05	-	-	-	-	1,20	2,71	-	-	-	-	1,40	0,88	-	-	-	-
80%	1,28	0,04	-	-	-	-	1,32	1,46	3,00	0,57	0,04	0,76	1,44	3,59	-	-	-	-
AQ	1,02	0,08	1,25	0,56	0,16	1,59	1,00	1,78	-	-	-	-	1,53	1,41	1,82	0,65	0,06	0,16
20%	0,80	3,12	-	-	-	-	1,02	0,10	1,53	0,66	0,41	0,82	0,87	0,07	-	-	-	-
A8 40%	0,68	0,19	-	-	-	-	0,89	0,08	0,94	0,97	0,77	0,52	0,80	0,07	1,07	0,48	0,18	0,75
60%	0,80	0,24	-	-	-	-	0,86	0,07	0,54	1,21	0,26	2,79	0,89	0,14	-	-	-	-
80%	0,84	0,43	-	-	-	-	0,91	0,02	-	-	-	-	0,85	0,02	-	-	-	-

Continuação da tabela 17.

Amostras	Turbólise						Refluxo						Ultrassom						
	EB		FO		FA		EB		FO		FA		EB		FO		FA		
	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	
A9	AQ	3,33	0,82	4,15	1,61	0,32	0,41	2,75	1,20	4,97	0,21	0,40	0,45	2,35	0,36	4,19	0,20	0,09	0,66
	20%	3,01	0,08	-	-	-	-	2,68	1,13	4,17	0,17	0,18	0,04	2,61	0,20	-	-	-	-
	40%	3,27	0,07	5,11	0,10	0,22	0,11	2,55	1,86	-	-	-	-	2,63	0,15	4,61	0,18	0,12	0,27
	60%	3,23	0,40	5,49	0,32	0,16	0,29	2,37	1,00	4,22	0,14	0,40	6,74	2,98	0,56	-	-	-	-
	80%	2,86	0,29	3,33	0,34	0,26	0,38	2,10	0,06	3,57	0,51	0,52	0,26	2,68	0,25	-	-	-	-
A10	AQ	2,85	0,11	5,96	0,38	0,15	0,11	3,09	0,15	3,60	0,02	0,22	1,80	3,04	0,21	6,45	0,34	1,16	0,16
	20%	2,88	0,05	-	-	-	-	2,06	0,22	-	-	-	-	2,87	0,26	-	-	-	-
	40%	3,09	0,09	4,52	0,29	0,45	1,04	2,09	0,43	2,64	0,06	0,38	1,63	2,61	0,32	-	-	-	-
	60%	2,78	0,15	-	-	-	-	2,04	0,39	-	-	-	-	2,72	0,09	-	-	-	-
	80%	2,52	0,41	4,02	0,06	0,25	0,75	2,03	0,65	-	-	-	-	2,47	0,09	3,39	0,09	0,11	0,48
A11	AQ	1,10	0,13	1,49	0,37	0,29	1,71	0,43	0,02	0,78	0,53	0,02	0,15	1,39	0,06	1,11	0,51	0,38	0,42
	20%	1,18	0,40	-	-	-	-	0,45	0,03	-	-	-	-	1,34	0,33	-	-	-	-
	40%	1,19	0,02	-	-	-	-	0,47	0,29	0,81	0,21	0,02	0,41	1,13	0,46	-	-	-	-
	60%	1,20	0,01	1,74	0,36	0,28	1,79	0,44	0,04	-	-	-	-	1,24	0,27	-	-	-	-
	80%	1,17	0,71	-	-	-	-	0,52	0,08	0,01	1,19	0,63	4,56	1,06	0,07	1,34	0,32	0,25	0,26
A12	AQ	4,49	0,24	8,40	0,10	1,58	7,17	2,34	0,27	8,74	0,09	0,62	0,80	4,56	0,11	9,12	0,21	1,17	0,60
	20%	4,74	0,25	5,03	0,65	7,56	0,43	3,36	1,19	5,66	0,65	0,58	0,25	5,26	0,55	11,15	0,18	2,06	0,65
	40%	4,40	0,17	6,72	0,24	1,32	0,84	3,26	0,77	-	-	-	-	4,77	0,03	5,77	0,15	1,31	0,45
	60%	4,50	0,01	-	-	-	-	3,02	0,26	-	-	-	-	4,14	0,78	-	-	-	-
	80%	3,91	0,25	4,35	0,78	0,67	0,95	2,78	3,20	-	-	-	-	3,22	0,30	4,44	0,42	1,39	0,87

Continuação da tabela 17.

Amostras	Turbólise						Refluxo						Ultrassom					
	EB		FO		FA		EB		FO		FA		EB		FO		FA	
	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%
AQ	6,80	0,64	11,16	1,12	2,96	0,63	3,29	0,09	3,96	0,30	0,72	0,44	6,82	0,04	-	-	-	-
20%	5,53	0,15	-	-	-	-	3,21	0,06	5,64	0,55	0,36	0,11	6,90	0,13	-	-	-	-
A13 40%	4,34	0,10	8,42	1,20	2,01	1,66	2,79	0,09	4,47	0,16	0,36	0,57	6,13	0,10	6,78	0,65	0,83	0,52
60%	3,54	0,03	7,91	0,63	2,01	1,07	3,57	0,06	3,70	0,23	0,39	11,60	7,15	0,27	5,06	0,66	0,30	0,39
80%	7,78	0,15	10,73	0,10	1,32	1,08	3,07	0,25	-	-	-	-	6,77	0,35	4,69	0,14	0,65	0,44
AQ	2,58	0,32	-	-	-	-	1,74	0,11	3,29	0,08	0,39	1,41	1,32	0,65	2,38	3,82	0,58	0,89
20%	2,66	0,30	4,07	0,12	0,26	0,71	1,19	0,25	-	-	-	-	1,27	0,47	2,61	0,16	0,89	0,88
A14 40%	2,12	0,05	-	-	-	-	1,30	0,64	2,47	6,55	0,15	2,02	1,40	0,15	-	-	-	-
60%	2,01	0,14	2,58	0,14	0,63	0,59	1,28	0,03	-	-	-	-	1,68	0,09	-	-	-	-
80%	1,95	0,11	3,80	0,04	0,17	1,03	1,19	0,07	2,13	0,05	0,15	2,31	1,81	0,11	3,25	0,05	1,06	1,17

Os valores foram expressos como média e desvio padrão relativo (%). EB: Extrato Bruto; FO: Fração Orgânica; FA: Fração Aquosa.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 18 – Teores de ácido elágico (%m/m) obtidos por CLAE-DAD para os extratos brutos e frações dos frutos de *L. ferrea*.

Amostras	Turbólise						Refluxo						Ultrassom						
	EB		FO		FA		EB		FO		FA		EB		FO		FA		
	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	Média	DPR%	
A1	AQ	2,96	0,45	3,06	1,08	1,22	0,23	2,54	0,74	-	-	-	-	2,60	0,22	-	-	-	-
	20%	2,78	0,94	3,28	0,44	1,16	0,25	2,68	1,78	2,70	0,10	0,32	3,05	2,69	1,42	-	-	-	-
	40%	2,89	0,42	-	-	-	-	2,48	0,91	2,67	0,22	0,20	0,25	2,98	0,10	3,39	0,25	0,13	1,06
	60%	2,73	1,76	3,35	0,24	1,83	0,04	1,76	0,78	2,56	0,20	0,75	0,12	2,51	0,22	-	-	-	-
	80%	2,61	0,31	3,53	0,05	1,11	0,12	2,13	0,63	-	-	-	-	2,53	0,08	-	-	-	-
A2	AQ	1,32	2,16	2,19	0,71	0,48	0,36	1,12	0,56	1,76	0,68	0,55	1,75	1,72	0,74	-	-	-	-
	20%	1,56	1,48	1,89	0,55	0,60	0,07	1,65	0,75	2,22	0,91	0,16	1,39	1,69	1,07	2,01	0,21	0,10	0,96
	40%	1,68	2,00	-	-	-	-	1,34	0,26	-	-	-	-	1,61	0,35	-	-	-	-
	60%	1,71	0,18	-	-	-	-	1,36	0,80	-	-	-	-	1,79	0,65	-	-	-	-
	80%	1,77	2,96	2,02	1,37	0,52	0,16	1,54	0,20	-	-	-	-	1,76	0,17	-	-	-	-
A3	AQ	1,63	0,34	1,97	1,26	0,19	0,45	1,26	0,22	1,63	1,05	0,09	5,96	1,18	0,59	2,19	0,07	0,12	0,72
	20%	1,84	0,56	2,12	0,55	0,16	0,40	0,65	0,74	1,50	1,62	0,41	2,77	1,59	0,09	1,70	0,22	0,07	1,06
	40%	1,88	0,58	1,98	0,70	0,68	1,27	0,67	1,11	-	-	-	-	1,61	0,01	-	-	-	-
	60%	1,76	0,23	1,55	1,37	0,54	1,55	0,73	1,64	-	-	-	-	1,50	0,62	-	-	-	-
	80%	1,70	0,46	1,17	2,94	0,77	4,23	1,15	0,19	1,88	0,15	0,61	0,65	1,39	0,22	-	-	-	-
A4	AQ	1,22	0,27	-	-	-	-	0,54	1,28	1,39	0,32	0,11	2,16	1,08	0,98	1,18	0,36	0,01	0,58
	20%	1,28	0,05	-	-	-	-	0,73	0,25	-	-	-	-	1,06	2,23	-	-	-	-
	40%	1,29	0,17	1,59	0,84	0,88	0,99	0,55	0,27	-	-	-	-	0,87	0,38	0,99	0,64	0,12	2,17
	60%	1,21	1,61	-	-	-	-	0,75	0,18	0,89	0,17	0,33	0,12	0,82	0,56	0,94	0,32	0,12	1,93
	80%	0,94	0,34	1,14	0,38	0,22	0,14	0,75	0,08	0,84	0,39	0,27	0,07	0,91	1,96	1,00	0,28	0,08	0,42

Continuação da tabela 18.

AQ	2,26	1,36	-	-	-	-	2,76	0,17	3,98	0,58	0,08	0,30	1,28	0,31	1,34	0,42	0,17	1,64
20%	2,34	0,12	2,81	0,41	0,44	1,21	2,48	0,16	-	-	-	-	2,66	0,16	-	-	-	-
A5 40%	2,19	0,03	-	-	-	-	2,03	0,03	-	-	-	-	2,35	0,26	3,71	2,54	0,20	0,35
60%	1,96	0,08	3,94	1,44	0,09	0,07	2,39	0,44	4,24	0,11	0,10	2,68	2,95	0,35	-	-	-	-
80%	2,16	0,40	-	-	-	-	2,25	0,04	-	-	-	-	3,00	0,79	4,83	0,15	0,08	4,04
AQ	2,39	0,61	2,78	0,93	0,14	1,73	3,12	0,38	-	-	-	-	3,26	0,24	3,72	0,62	0,63	1,90
20%	2,75	0,31	2,97	0,16	0,16	0,41	3,30	0,08	-	-	-	-	3,09	0,11	-	-	-	-
A6 40%	3,10	0,13	-	-	-	-	2,93	0,58	3,09	0,14	0,36	0,16	2,86	0,62	3,24	0,29	0,06	0,05
60%	3,20	0,16	3,60	0,38	0,16	2,84	3,30	0,05	3,40	0,09	0,17	0,38	2,94	0,63	-	-	-	-
80%	2,65	0,27	-	-	-	-	3,13	0,14	-	-	-	-	3,06	0,08	-	-	-	-
AQ	1,78	1,19	3,97	1,09	0,15	2,58	2,88	0,21	2,93	0,24	0,30	0,87	2,87	0,36	-	-	-	-
20%	2,47	0,90	-	-	-	-	2,43	0,21	3,75	0,15	0,37	6,61	2,76	0,07	3,01	2,80	0,62	1,97
A7 40%	2,62	0,38	-	-	-	-	2,73	1,41	-	-	-	-	2,90	1,38	-	-	-	-
60%	2,73	2,06	-	-	-	-	2,91	1,48	-	-	-	-	2,54	0,13	-	-	-	-
80%	2,98	1,35	-	-	-	-	3,12	0,37	3,59	0,23	0,25	0,36	2,49	1,31	-	-	-	-
AQ	1,14	0,94	1,32	0,33	0,13	0,22	1,30	0,25	-	-	-	-	1,76	0,21	1,83	0,23	0,21	0,29
20%	1,26	0,69	-	-	-	-	1,46	0,29	1,56	0,79	0,19	1,19	1,38	0,21	-	-	-	-
A8 40%	1,43	0,21	-	-	-	-	1,22	1,34	0,62	0,70	0,66	0,12	1,07	0,83	1,38	0,09	0,24	0,14
60%	1,38	0,24	-	-	-	-	1,23	0,16	1,39	0,21	0,09	0,13	1,19	0,60	-	-	-	-
80%	1,29	0,12	-	-	-	-	1,29	1,14	-	-	-	-	1,42	1,12	-	-	-	-

Continuação da tabela 18.

	AQ	2,69	0,78	3,16	0,51	0,18	0,53	2,89	0,20	3,15	0,29	0,22	0,67	0,56	2,62	0,87	0,46	0,32	0,42
	20%	2,56	0,29	-	-	-	-	3,13	0,21	3,50	0,25	0,34	0,53	1,63	0,40	-	-	-	-
A9	40%	1,67	0,30	2,27	1,36	0,46	0,56	2,62	0,07	-	-	-	-	2,24	0,85	-	-	-	-
	60%	2,01	0,60	2,50	1,20	0,54	0,56	2,45	0,90	3,66	0,05	0,17	6,22	2,33	0,49	2,43	0,25	0,17	2,19
	80%	2,70	0,37	3,35	1,38	0,87	0,50	2,84	0,62	2,90	0,25	0,15	2,07	2,39	0,39	-	-	-	-
	AQ	2,46	0,31	3,18	0,20	1,64	0,23	1,52	0,57	2,70	0,44	0,08	14,93	2,21	0,06	2,42	2,59	0,28	0,09
	20%	2,10	0,12	-	-	-	-	2,15	0,37	-	-	-	-	2,18	0,42	-	-	-	-
A10	40%	2,30	0,18	3,48	0,31	3,04	0,17	2,01	0,20	2,45	2,76	0,09	1,09	2,13	0,07	-	-	-	-
	60%	2,14	0,29	-	-	-	-	2,12	0,33	-	-	-	-	2,13	0,17	-	-	-	-
	80%	2,06	0,04	2,55	2,83	0,35	0,10	2,15	0,06	-	-	-	-	2,62	36,73	2,99	0,47	0,12	0,16
	AQ	1,11	0,68	1,39	0,48	0,28	0,08	0,62	0,86	0,82	0,35	0,08	2,38	1,48	0,44	1,91	13,85	0,17	0,42
	20%	1,01	0,27	-	-	-	-	0,64	0,12	-	-	-	-	1,17	1,09	-	-	-	-
A11	40%	0,99	0,28	-	-	-	-	0,71	0,74	0,90	0,19	0,10	0,43	1,30	1,34	-	-	-	-
	60%	0,95	0,12	1,28	0,94	0,14	0,23	0,69	0,17	-	-	-	-	1,23	0,12	-	-	-	-
	80%	0,97	0,98	-	-	-	-	0,63	0,16	0,71	0,86	0,12	2,83	0,93	1,09	0,97	0,46	0,12	0,26
	AQ	2,89	0,23	3,45	0,77	1,05	2,66	2,34	0,31	2,80	0,34	1,08	0,39	4,21	0,27	4,46	2,27	0,33	0,60
	20%	3,29	0,32	3,79	2,63	1,08	0,45	3,81	0,10	3,92	0,53	0,73	0,27	3,88	0,16	4,00	0,14	0,78	0,65
A12	40%	3,25	0,11	-	-	-	-	3,06	0,12	-	-	-	-	2,56	0,57	2,86	1,54	0,88	0,45
	60%	3,53	0,08	3,89	1,20	0,32	0,54	3,67	2,33	-	-	-	-	3,09	1,33	-	-	-	-
	80%	3,21	0,19	3,47	1,87	0,36	1,77	3,84	0,09	-	-	-	-	3,54	0,75	3,88	0,09	0,63	0,87

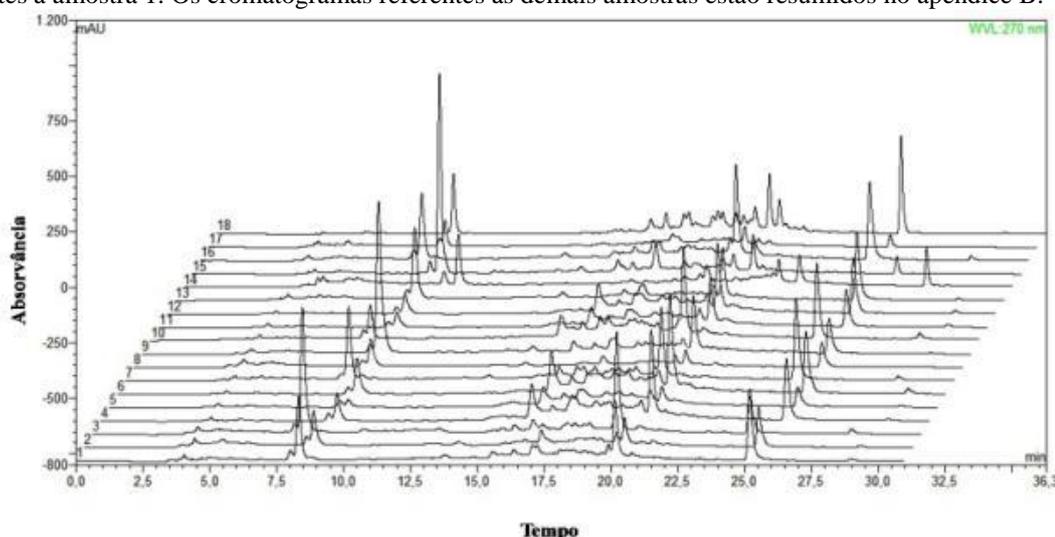
Continuação da tabela 18.

AQ	2,97	0,85	3,04	0,34	0,17	0,36	3,08	0,07	3,58	0,18	0,99	0,46	2,88	0,08	-	-	-	-
20%	2,84	0,35	-	-	-	-	2,67	1,57	3,75	0,23	1,16	0,18	2,86	0,54	-	-	-	-
A13 40%	2,55	0,40	2,79	10,82	0,10	1,12	3,19	0,42	3,88	0,32	1,00	0,26	2,59	0,49	2,78	0,19	0,20	0,52
60%	2,94	0,15	3,26	0,05	0,10	0,35	3,22	0,25	3,73	0,60	0,90	6,54	2,62	0,04	2,89	0,24	0,14	0,39
80%	2,69	1,00	2,89	0,49	0,16	0,29	2,82	0,07	-	-	-	-	2,93	0,26	3,26	0,26	0,12	0,44
AQ	1,25	0,23	-	-	-	-	1,39	0,23	2,02	0,11	0,64	1,05	0,59	1,94	1,10	0,64	0,08	0,89
20%	1,53	0,50	1,87	0,94	0,28	0,33	1,48	0,25	-	-	-	-	0,66	0,62	1,27	0,42	0,21	0,88
A14 40%	1,23	0,47	-	-	-	-	1,37	0,28	2,02	0,46	0,47	1,35	0,84	1,19	-	-	-	-
60%	1,02	0,37	1,31	1,12	0,12	0,44	1,56	0,44	-	-	-	-	0,99	0,69	-	-	-	-
80%	1,14	0,21	1,61	1,07	0,17	0,16	1,62	0,54	1,89	3,00	0,60	1,08	1,07	0,93	1,40	0,84	0,30	1,17

Os valores foram expressos como média e desvio padrão relativo (%). EB: Extrato Bruto; FO: Fração Orgânica; FA: Fração Aquosa.
Fonte: Próprio Autor.

Assim, de acordo com os perfis cromatográficos obtidos e os teores evidenciados acima é possível afirmar que os extratos brutos e frações orgânica correspondentes às amostras 1, 5, 6 e 9 apresentaram maiores teores dos ácidos gálico e elágico, evidenciando o enriquecimento da fração orgânica (Figura 12). Os extratos/frações referentes às amostras 4, 8 e 10 foram aqueles que apresentaram menor rendimento quanto aos teores dos marcadores. Por fim, assim como para as matérias primas analisadas neste estudo, os picos que correspondem aos marcadores apresentam-se bem definidos e isolados dos demais picos.

Figura 12 - Cromatogramas representativos para a para os extratos/frações dos frutos de *L. ferrea*. Dados referentes à amostra 1. Os cromatogramas referentes às demais amostras estão resumidos no apêndice B.



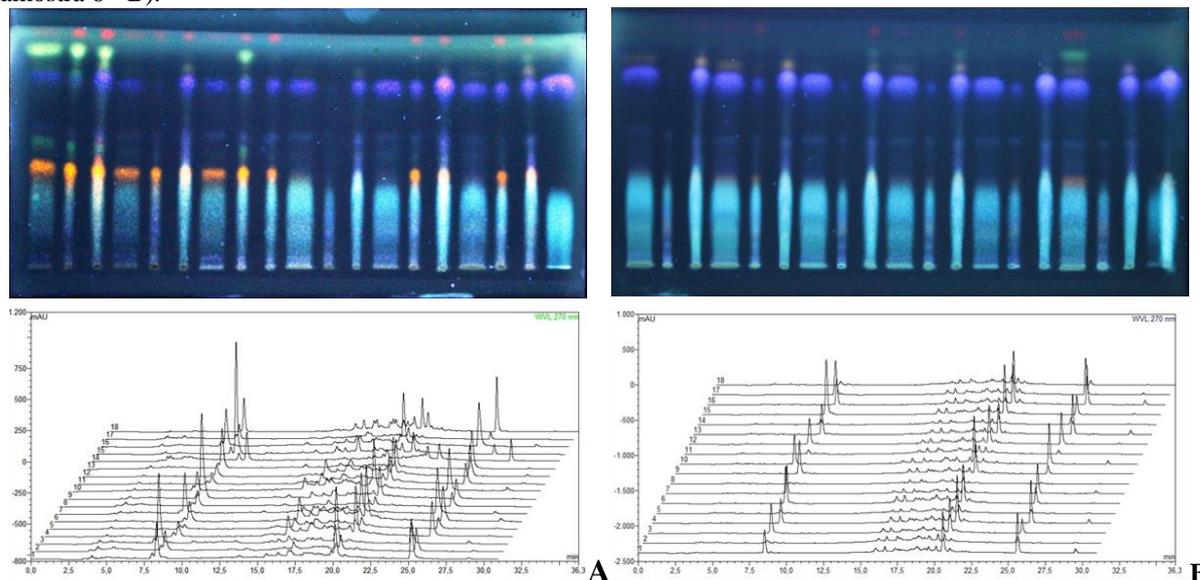
Fonte: Próprio autor.

A análise comparativa dos dados cromatográficos obtidos por CCD-AE e por CLAE através dos sinais correspondentes aos marcadores, revelou tendência de similaridade de comportamento entre a intensidade das manchas nos cromatoplas e as áreas dos picos no cromatograma.

Como pode ser observado nas figuras apresentadas nos apêndices A e B, a redução nas áreas dos picos dos padrões observada nos cromatogramas em razão da mudança de metodologia de extração (turbólise > refluxo > ultrassom), também foi detectada nas cromatoplas com a nítida diminuição da intensidade das manchas correspondente aos marcadores.

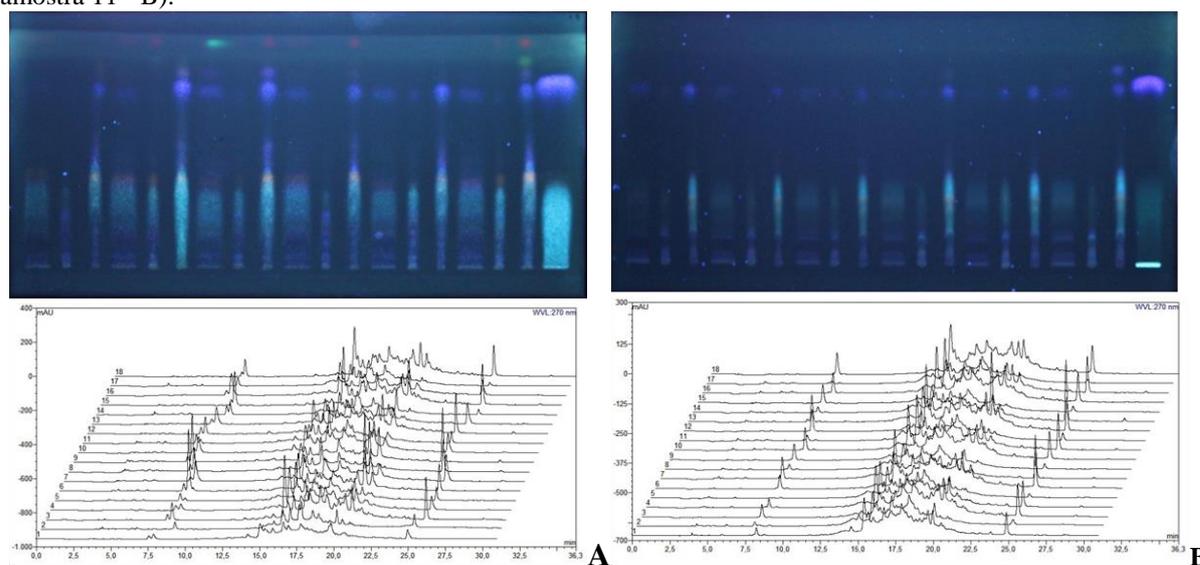
As figuras 13 e 14 ilustram os dados observados para cromatoplas e cromatogramas obtidos neste trabalho.

Figura 13 - Cromatogramas obtidos por CCD-AE *versus* CLAE-DAD (extratos e frações da amostra 1 – A e amostra 6 - B).



Fonte: Próprio autor.

Figura 14 - Cromatogramas obtidos por CCD-AE *versus* CLAE-DAD (extratos e frações da amostra 4 – A e amostra 11 - B).



Fonte: Próprio autor.

As amostras 1 e 6 correspondem às amostras com as maiores concentrações de ácido elágico e ácido gálico (CLAE-DAD), apresentando ao mesmo tempo bandas mais evidentes nas cromatoplas (Figura 13). Por outro lado, para as amostras 4 e 11 (Figura 14) foram encontrados as menores concentrações dos padrões e consequentemente, as respectivas bandas nas cromatoplas apresentaram bandas de menor intensidade.

Desse modo, os dados reafirmam a relevância da investigação e do estabelecimento de *fingerprints* por CCD-AE e CLAE-DAD como parâmetro de qualidade de materiais vegetais. Adicionalmente, a reprodutibilidade dos *fingerprints* obtidos por CCD-AE sugerem que os

cromatogramas poderão ser empregados em estudos de classificação e quantificação a partir de bancos de imagens digitalizadas conforme descrito previamente por Wong e colaboradores (2014).

4.4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos o desenvolvimento da metodologia analítica para a determinação do teor de ácido elágico e ácido gálico na matéria prima e extratos brutos dos frutos de *Libidibia ferrea* apresentou os requisitos mínimos aceitáveis estipulados pela RE nº 899/2003, garantindo que o método pode ser utilizado para a finalidade proposta, além de poder ser aplicado aos demais derivados da espécie, tais como frações enriquecidas.

Os *fingerprints* obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE), para as diferentes amostras dos frutos de *L. ferrea*, extratos e frações produzidos a partir dessas, foram obtidos satisfatoriamente e podem inferir a cerca do perfil típico de polifenóis dos frutos da espécie. Adicionalmente, o teor das diversas amostras foi calculado com êxito por CLAE, sendo possível obter uma correlação preliminar entre os teores/picos encontrados com as intensidades das bandas observadas nos cromatogramas de CCD-AE.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA-CARBO, A. F.; AUGUR, C.; PRADO-BARRAGAN, L. A.; AGUILAR, C. N.; FAVELA-TORRES, E. Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. **Chemical Papers**, v. 62, n. 4, p. 440–4, 2008.
- ALADDINM N-A.; JAMAL, J. A.; TALIP, N.; HAMSANI, N. A. M.; RAHMAN, M. R. A.; SABANDAR, C. W. et al. Comparative study of three *Marantodes pumilum* varieties by microscopy, spectroscopy and chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 1–14, 2016.
- ALVES, I. A. B. S.; MIRANDA, H. M.; BARBOSA, A. P.; RANDAU, K. P.; SOARES, L. A. L. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl. **Revista Árvore**, v. 39, p. 37-47, 2015.
- ARAPITSAS, P. Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1708–1717, 2012.
- ARDILA, J. A.; FUNARI, C. S.; ANDRADE, A. M.; CAVALHEIRO, A. J.; CARNEIRO, R. L. Cluster Analysis of Commercial Samples of *Bauhinia* spp. Using HPLC-UV/PDA and MCR-ALS/PCA Without Peak Alignment Procedure. **Phytochemical Analysis**, v. 26, n. 5, p. 367–373, 2015.
- BAGETTA, G.; COSENTINO, M.; CORASANITI, M. T.; SAKURADA, S. **Herbal Medicines: Development and Validation of Plant-Derived Medicines for Human Health**. New York: CRC Press, 2012.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria**. Campinas: UNICAMP, 2010.
- BART, H. J.; PILZ, S. **Industrial Scale Natural Product Extraction**. Weinheim: Wiley-VCH, 2011.
- BAUER, R. Quality criteria and standarization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standars be achieved? **Drug Information**, v. 32, p. 101-110, 1998.
- BETZ, J. M.; BROWN, P. N.; ROMAN, M. C. Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research. **Fitoterapia**, v. 82, p. 44-52, 2011.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules (Basel. Online)**, v. 18, p. 6852-6865, 2013.
- BOTH, S.; KOUDOUS, I.; JENELTEN, U.; STRUBE, J. Model-based equipment-design for plant-based extraction process – considering botanic and thermodynamic aspects. **Comptes Rendus Chimie**, v. 17, p. 187-196, 2014.
- BOROS, B.; JAKABOVÁ, S.; MOLNÁR, T. M. R.; GALAMBOSI, B.; KILÁR, F.; FELINGER, A.; FARKAS, Á. Validated HPLC Method for Simultaneous Quantitation of Bergenin, Arbutin, and Gallic Acid in Leaves of Different *Bergenia* Species. **Chromatographia**, v. 77, p. 1129–1135, 2014.

BRASIL. RE nº 899, de 29 de Maio de 2003, Dispõe sobre o **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. DOU de 02/06/2003.

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

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

CARVALHO, M. G.; FREIRE, F. D.; RAFFIN, F. N.; ARAGÃO, C. F. S.; MOURA, T. F. A. L. LC Determination of Gallic Acid in Preparations Derived from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Chromatographia**, Suppl. 2, v. 69, n. 2, p. S249-53, 2009.

CHAWLA, R.; THAKUR, P.; CHOWDHRY, A.; JAISWAL, S.; SHARMA, A.; GOEL, R. et al. Evidence based herbal drug standardization approach in coping with challenges of holistic management of diabetes: a dreadful lifestyle disorder of 21st century. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, p. 35, 2013.

CHEN, L-Y; CHENG, C-W; LIANG, J-Y. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. **Food Chemistry**, v. 170, p. 10–15, 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da Unicamp, 2010.

COSTA, A. C. O.; FERNANDES, J. M.; NETO, T. S. N.; MENDONÇA, J. N.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P. et al. Quantification of Chemical Marker of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) Leaves by HPLC–DAD. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, n. 7, p. 795-800, 2015.

DA COSTA, L. M.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; DE SOUZA, T. P. *Libidibia ferrea* (Mart. EX Tul) L. P. Queiroz var. *Ferrea*: Pharmacological, phytochemical and botanical aspects. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 48-53, 2015.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DICIAULA, M. C.; LOPES, G. C.; SCARMINIO, I. S.; MELLO, J. C. P. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química nova**, v. 37, n. 1, p. 158-163, 2014.

DÍEZ, M. T.; GARCÍA DEL MORAL, P.; RESINES, J. A.; ARÍN, M. J. Determination of phenolic compounds derived from hydrolysable tannins in biological matrices by RP-HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 2797-803, 2008.

DHOOGHE, L.; MEERT, H.; CIMANGA, R. K.; VLIETINCK, A. J.; PIETERS, L.; APERS, S. The Quantification of Ellagic Acid in the Crude Extract of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 4, p. 361–6, 2011.

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

EMA. European Medicines Agency. Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/2011_EMA_QUALITY_HERBAL_GUIDELINE.PDF; 2011.

ENDALE, A.; SCHMIDT, P. C.; GEBRE-MARIAM, T. Standardisation and physicochemical characterization of the extracts of seeds of *Glinus lotoides*. **Die Pharmazie**, v. 59, n. 1, p. 34–38, 2004.

EVERETTE; J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139–44, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. 2010.

FARMACOPEIA CHINESA. English Edition. Chinese Pharmacopoeia Commission, 2010.

FARMACOPEIA EUROPEIA. 8th ed. 2013.

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

FERNANDES, F. H. A.; BATISTA, R. S. A.; MEDEIROS, F. D.; SANTOS, F. S.; MEDEIROS, A. C. D. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 208–11, 2015.

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

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

GHARRAS, H. E. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2512–2518, 2009.

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.

- GIRONI, F.; PIEMONTE, V. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree Wood. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 7, p. 857–862, 2011.
- 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.
- GOVINDARAGHAVAN, S.; HENNELL, 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.
- GUGGENBICHLER, W.; HUCK, C.; KOBLER, A.; POPP, M.; BONN, G. Near infrared spectroscopy, cluster and multivariate analysis – contributions to wine analysis. **Journal of Food, Agricultural and Environment**, v. 4, p. 98–106, 2006.
- GUNALAN, G.; SARASWATHY, A.; VIJAYALAKSHMI, K. HPTLC fingerprint profile of *Bauhinia variegata* L. leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S21-S25, 2012.
- HAGERMAN, A. E. **The Tannin Handbook**. Miami University, Oxford. 2002.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. 3 Ed. London: Chapman & Hall, 1998.
- HARIPRASAD, P.; RAMAKRISHNAN, N. Chromatographic finger print analysis of *Rumex vesicarius* L. by HPTLC technique. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, S57-S63, 2012.
- HUCK, C.W. Advances of infrared spectroscopy in natural product research. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 384–393, 2015.
- ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use Q2A. “**Text on Validation of Analytical Procedures**” March, 1995; Geneva, 1995. 2005.
- ILOKI-ASSANGA, S. B.; LEWIS-LUJÁN, L. M.; LARA-ESPINOZA, C. L.; GIL-SALIDO, A. A.; FERNANDEZ-ÂNGULO, D.; RUBIO-PINO, J. L. et al. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 396, 2015.
- JOSHI, D. D. **Herbal Drugs and Fingerprints: Evidence Based Herbal Drugs**. Springer: India, 2012.
- KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.
- KROMIDAS, S. **Handbuch Validierung in der Analytik**. Weinheim: Wiley-VCH, 2011.
- LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, p. 1150–1160, 2011.

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.

LIANG, Y.; XIE, P.; CHAU, F. Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 410–421, 2010.

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.

LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINIO, I. E. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. **Analytica Chimica Acta**, v. 719, p. 57–60, 2012.

LOPES, G. C.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. RP-LC-UV Determination of proanthocyanidins in *Guazuma ulmifolia*. **Chromatographia**, v. 69, S175–S181, 2009.

LOPES, G. C.; BLAINSKI, A.; SANTOS, P. V. P.; DICIAULA, M. C.; MELLO, J. C. P. Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. Celastraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 781–788, 2010.

MARSTON, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2676-2683, 2011.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Strypnodendorn adstringens*. **Phytochemistry**, v.41, n.3, p.807-812, 1996.

MESQUITA, M; L.; LEÃO·W. F.; FERREIRA, M. R. A.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; SOARES, L. A. L. Reversed-phase-liquid chromatography method for separation and quantification of gallic acid from hydroalcoholic extracts of *Qualea grandiflora* and *Qualea parviflora*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 44, p. 316-321, 2015.

MOK, D. K. W.; CHAU, F. T. Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, n. 1-2, p. 210-7, 2005.

MØLLER C.; HANSEN, S. H.; CORNETT, C. Characterization of Tannin-Containing Herbal Drugs by HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n.3, p. 231–239, 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1523–1542, 2006.

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

NATISHAN, T. K. Recent developments of achiral HPLC methods in pharmaceuticals using various detection modes. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 27, p. 237–1316, 2005.

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.

NIMAL PUNYASIRI, P. A.; JEGANATHAN, B.; KOTTAWA-ARACHCHI, J. D.; RANATUNGA, M. A. B.; ABEYSINGHE, I. S. B.; KUMUDINI GUNASEKARE, M. T. et al. New Sample Preparation Method for Quantification of Phenolic Compounds of Tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze): A Polyphenol Rich Plant. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, Article ID 964341, 6 pages, 2015.

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

PATEL, R. K.; PATEL, V. R.; PATEL, M. G. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous determination of Embelin, Rottlerin and Ellagic acid in *Vidangadi churna*. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 5, p. 366–371, 2012.

PATRA, K. C. et al. Traditional approaches towards standardization of herbal medicines-A review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 11, p. 372-379, 2010.

PFERSCHY-WENZIG, E. M.; BAUER, R. The relevance of pharmacognosy in pharmacological research on herbal medicinal products. **Epilepsy & Behavior**, v. 52, Part B, p. 344–362, 2015.

PIERONI, L. G.; REZENDE, F. M.; XIMENES, V. F.; DOKKEDAL, A. L. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**, v. 16, p. 9439–9450, 2011.

PIMENTEL, M. F.; DE BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

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.

PORTER, L. J. **Tannins**. In J. B. HARBORNE (Ed.), *Methods in plant biochemistry* (Vol.1). Plant phenolics (pp. 389–419). London: Academic Press Hagerman, A. E. 2002. Tannin Handbook, Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University, USA. 1989.

RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; TONGKAO-ON, W.; KIMBLE, B.; QIAO, V. L.; BEILUN, L.; LI, K. M. et al. Multiple Chromatographic and Chemometric Methods for Quality Standardisation of Chinese Herbal Medicines. **World Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 99-106, 2010.

RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; TONGKAO-ON, W.; KIMBLE, B.; QIAO, V. L.; BEILUN, L.; LI, K. M. et al. Multiple Chromatographic and Chemometric Methods for Quality Standardisation of Chinese Herbal Medicines. **Mode Tradit Chin Med Mater Med**, v. 12, n. 1, p. 99-106, 2010.

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

RODRIGUES, M. C. M.; BORGES, L. L.; MARTINS, F. S.; MOURÃO, R. H. V.; CONCEIÇÃO, E. C. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Myrcia amazônica* DC. (*Myrtaceae*) leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 45, p. 9-12, 2016.

SALMON, C. A. N.; BAILEY-SHAW, Y. A.; HIBBERT, S.; GREEN, C.; SMITH, A. M.; WILLIAMS, L. A. D. Characterisation of cultivars of Jamaican ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by HPTLC and HPLC. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1517-1522, 2012.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SHARMA, D.; SINGLA, Y. P. Analysis of Gallic acid and 4-Hydroxy benzoic acid in *Prosopis cineraria* leaf extract using High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 2, n. 4, p. 790-4, 2013.

SHERMA, J. Biennial review of planar chromatography: 2009-2011. **Journal of AOAC International**, v. 95, p. 992-1009, 2012.

SILVA, W. M.; SANTOS, F. R.; BATISTUTI, J. P. Doseamento do ácido fólico. **Brazilian Journal of Food Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 275-282, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. 1104p. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SPANGENBERG, B.; POOLE, C.; WEINS, C. **Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey**. Springer: Dordrecht, 2011.

SRIVASTAVA, M. M. **High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)**. Springer Heidelberg. 2011.

TIAN, R. T.; XI, P. S.; LIU, H. P. Evaluation of traditional Chinese herbal medicine: Chaihu (*Bupleuri Radix*) by both high- performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic fingerprint and chemometric analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2150-2155, 2009.

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.

TOMŠIK, A.; PAVLIC, B.; VLADIC, J.; RAMIC, M.; BRINDZA, J. VIDOVIC, S. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 502–511, 2016.

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

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

VERZA, S. G. **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.

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

VIERLING, W.; BRAND, N.; GAEDCKE, F.; SENSCH, K. H.; SCHNEIDER, E.; SCHOLZ, M. Investigation of the pharmaceutical and pharmacological equivalence of different Hawthorn extracts. **Phytomedicine**, v. 10, n. 1, p. 8-16, 2003.

XU, C.; YANG, B.; ZHU, W.; LI, X.; TIAN, J.; ZHANG, L. Characterisation of polyphenol constituents of *Linderae aggregate* leaves using HPLC fingerprint analysis and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 186, p. 83–89, 2015.

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

ZHANG, Q-A; SHEN, H.; XUE-HUI, F.; SHEN, Y.; WANG, X.; SONG, Y. Changes of gallic acid mediated by ultrasound in a model extraction solution. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 149–154, 2015.

ZHOU, B.; WU, Z.; LI, X.; ZHANG, J.; HU, X. Analysis of Ellagic Acid in Pomegranate Rinds by Capillary Electrophoresis and High-performance Liquid Chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 86–89, 2008.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. New York: CRC Press, 2008.

WANG, Y.; MEI, M.; NI, Y.; KOKOT, S. Combined NIR/MIR analysis: A novel method for the classification of complex substances such as *Illicium verum* Hook. F. and its adulterants. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 539–545, 2014.

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.

WONG, K. H.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; LI, K. M.; LI, G. Q.; CHAN, K. Differentiating *Puerariae lobatae* Radix and *Puerariae thomsonii* Radix using HPTLC coupled with multivariate classification analyses. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 95, p. 11-9, 2014.

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

CAPÍTULO III
ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS E
QUIMIOMÉTRICAS

5 CAPÍTULO III - ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS E QUIMIOMÉTRICAS

A aceitação pela comunidade científica de drogas vegetais e produtos derivados baseia-se na adoção de marcadores para a proposição de especificações da qualidade, recorrendo-se ao emprego de métodos analíticos capazes de quantificar um ou alguns dos diversos compostos, ou métodos gerais de doseamento de grupos. Com a aplicação da quimiometria é possível realizar análise multivariada das respostas.

Diferentes técnicas quimiométricas vêm sendo aplicadas a dados analíticos, especialmente para planejamento experimental para análise e calibração multivariada de dados espectroscópicos (OTTO, 1999; BARROS NETO; BRUNS; SCARMINO, 2006). Ao longo dos últimos anos, as aplicações têm sido diversificadas, e uma grande expansão é observada na área biológica e médica.

Após a difusão da quimiometria, alguns métodos analíticos foram implantados na pesquisa e rotina de laboratórios, possibilitando a análise de uma grande quantidade de dados que anteriormente não eram possíveis. Logo, ferramentas quimiométricas foram desenvolvidas, com o intuito de realizar o tratamento de dados de acordo com a necessidade de cada análise, entre tais ferramentas, as mais utilizadas são: métodos de planejamento e otimização de experimentos; pré-processamento de dados espectrais; reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação); seleção de amostras e variáveis espectrais; calibração multivariada; monitoramento e modelagem de processos multivariados e métodos de inteligência artificial (BEEBE et al., 1998; OTTO, 1999; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

A maioria das pesquisas desenvolvidas e com maior número de aplicações em diversas áreas é realizada utilizando a região do infravermelho médio (ESCAMILLA et al., 2013; HUCK et al., 2014; FERREIRA et al., 2014). Nos últimos anos, a técnica, tem sido utilizada na investigação de produtos farmacêuticos (WATERWI; NEUBERT, 2005), na indústria têxtil (HIMMELSBACH; HELLGETH; MCALISTER, 2006) e de alimentos (DOWNEY, 1998; SCHULZ et al., 2004; RODRIGUEZ-SAONA et al., 2006; 2011), vinhos (OELOFSE et al., 2010).

A utilização de metodologias que enfatizam a região do infravermelho próximo tem sido bastante difundida, quanto à qualificação de amostras, como o agrupamento de amostras semelhantes e determinação de amostras anômalas. Esta técnica é também muito utilizada na determinação quantitativa dos constituintes de uma amostra. Contudo, sua aplicação ao estudo

de produtos naturais se encontra em expansão em virtude da complexidade destas matrizes (BARBIN et al., 2014; FERREIRA et al., 2014; SHI et al., 2012).

A maior parte dos estudos na literatura científica está voltada para a Análise de Componentes Principais; obtenção de *Fingerprints* para diversas espécies, a fim de verificar seu comportamento nas diversas estações do ano ou a diferença entre espécies coletadas em diferentes localidades; análise de misturas para prever qual melhor cromatograma se aplica a análise, entre outros (NICOLETTI, 2011; LONNI et al., 2012; SÂRBU et al., 2012; SOARES; BRUNS; SCARMINIO, 2012).

5.1 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1.1 Métodos Espectroscópicos

5.1.1.1 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível

A espectroscopia é a ciência que compreende o estudo da interação da radiação eletromagnética (raios gama, raios X, ultravioleta, visível, infravermelho, micro-ondas e ondas de rádio, entre outras) com a matéria em diferentes estados: gasoso, líquido e sólido (PAVIA et al., 2010).

A espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV/Vis) é a medida da atenuação da radiação electromagnética por uma substância absorvente. As medidas podem ser realizadas pontualmente, em um único comprimento de onda, ou através de varredura utilizando uma faixa de comprimento de onda. A faixa que compreende as regiões do ultravioleta está entre 190 e 500 nm (TISSUE, 2002).

É uma técnica bastante utilizada na rotina de laboratórios de pesquisa e indústrias, na quantificação de compostos. Na quantificação de compostos fenólicos, a utilização da técnica se apresenta principalmente em duas vertentes: a primeira consiste na análise realizada a 280 nm (SOARES et al., 2006; SÓLON et al., 2007), que apresenta como vantagens a simplicidade da técnica e ausência de reagentes durante o procedimento; entretanto, com a ausência de reagentes, substâncias que possuam outros tipos de ligações podem interferir no resultado; a segunda consiste na utilização de reagentes, Folin-Ciocalteu e Carbonato de sódio anidro, o qual é capaz de mensurar os fenóis, porém está sujeito a interferências de outros compostos (como frutose) (FOLIN, 1927; BUENO et al., 2012; DICIAULA et al., 2014; ALVES et al., 2015).

Poucos são os estudos na literatura a cerca da determinação de polifenóis por UV-Vis combinado com calibração multivariada. Talvez, porque a utilização da calibração multivariada em dados UV-Vis apresenta a desvantagem na estabilidade do equipamento.

Şahin, Işık e Demir (2012) utilizaram a calibração multivariada, regressão em componentes principais (PCR) e regressão pelos mínimos quadrados parciais (PLS) para predizer o teor de polifenóis totais em quatro espécies de *Prunella*. Os autores utilizaram o método para doseamento de polifenóis totais por Folin-Ciocalteu como referência para as análises. A faixa de concentração estudada foi de 1,0 a 24,63 mg.g⁻¹ de droga seca, calculados como equivalentes de ácido gálico (GAE). Em relação à análise por PLS, foram obtidos valores de RMSECV e RMSEP iguais a 2,47 e 1,61 mg.g⁻¹ (GAE) de droga seca, respectivamente, considerando os valores brutos; e, 4,83 e 2,76 mg.g⁻¹ (GAE) de droga seca, considerando os espectros após pré-processamentos.

Fuentes et al. (2012) analisaram a viabilidade da determinação de polifenóis totais por UV-Vis associado a técnicas quimiométricas (PLS) em amostras de óleo de oliva. O teor de polifenóis totais obtido apresentou faixa de concentração entre 90 e 168 mg.kg⁻¹ calculados como ácido caféico. Os dados de calibração multivariada foram analisados de acordo com as faixas espectroscópicas, e revelaram valores de RMSECV entre 7,2 e 15,4 mg.kg⁻¹ (calculados como ácido caféico). Enquanto que os valores de RMSEP calculados apresentaram valores entre 4,5 e 9,5 mg.kg⁻¹.

Bernardes, Figueiredo e Barbeira (2014) utilizaram a espectrofotometria no UV-Vis como método de referência para a análise o teor de polifenóis totais em amostras de cachaça envelhecida, utilizando modelo de PLS adequando a metodologia que utiliza reações de oxirredução. Os autores obtiveram valores de RMSECV e RMSEP iguais a 4,79 mg GAE.L⁻¹ e 4,11 mg GAE.L⁻¹, respectivamente, calculados como ácido gálico, com faixa de concentração entre 0,73–82,34 mg GAE.L⁻¹, valores superiores aos encontrados neste estudo.

5.1.1.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

A espectroscopia vibracional divide-se em técnicas distintas, sendo a de absorção na região do Infravermelho de interesse neste estudo. A região espectral do Infravermelho está situada antes da região do visível no espectro eletromagnético e abrange a radiação com números de onda no intervalo de 12800 a 10 cm⁻¹. Em relação à aplicação e instrumentação, o espectro de infravermelho é dividido em radiação no Infravermelho próximo (do inglês – *Near Infrared* NIR), médio (do inglês – *Middle Infrared* MIR) e distante (do inglês – *Far*

Infrared FIR). A tabela 1 apresenta os limites apropriados para cada região (SKOOG et al., 2009).

Tabela 1 - Regiões espectrais no Infravermelho.

Região	Número de onda ($\bar{\nu}$)	Comprimento de onda (λ)	Frequências (ν)
	cm^{-1}	nm	Hz
Próximo	12 800 a 4000	780 a 2500	$3,8 \times 10^{14}$ - $1,2 \times 10^{14}$
Médio	4000 a 200	2500 a 5000	$1,2 \times 10^{14}$ - $6,0 \times 10^{12}$
Distante	200 a 10	5000 a 100000	$6,0 \times 10^{12}$ - $3,0 \times 10^{11}$

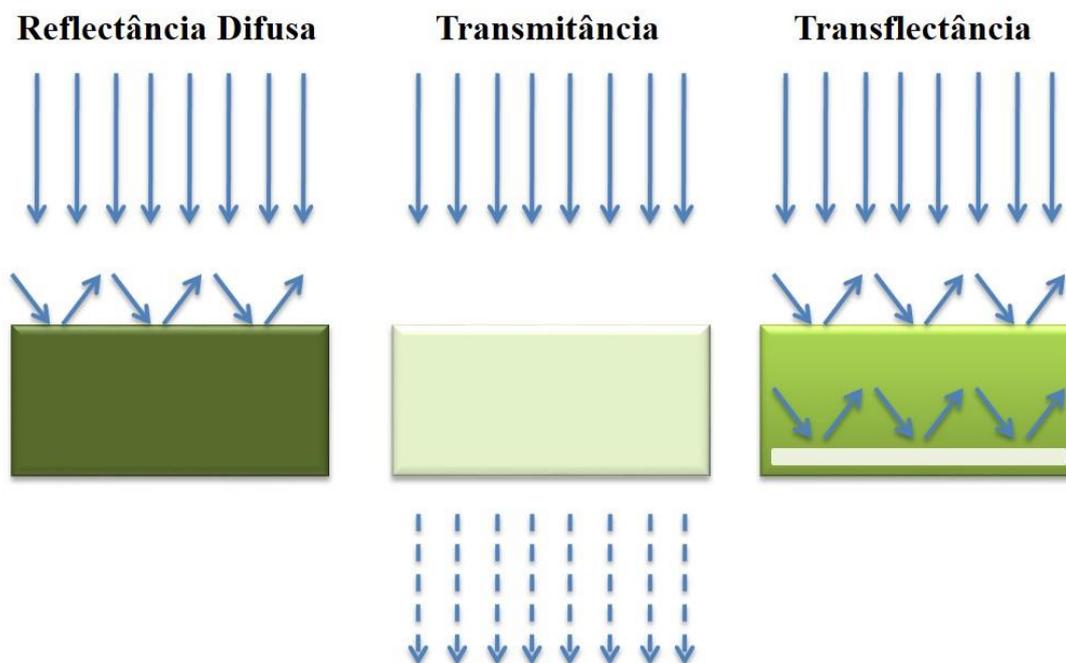
Fonte: Adaptado de SKOOG et al. (2009).

A espectroscopia na região do infravermelho próximo alcançou grande desenvolvimento devido à potencialidade que a técnica apresenta na caracterização e quantificação de diferentes espécies químicas. Esta técnica apresenta atratividade para medidas analíticas, uma vez que as medidas são realizadas de maneira não destrutiva, permitindo o desenvolvimento de métodos não invasivos, rápidos, com baixo impacto ambiental (com mínimo de reagentes/solventes) e baixo custo (PASQUINI, 2003; SARRAGUÇA et al., 2014).

A radiação infravermelha não possui energia suficiente para causar transições eletrônicas como acontece em outras regiões espectrais (ultravioleta, visível, raios X), e, assim, a absorção dessa radiação é restrita às espécies que possuem pequenas diferenças de energia entre os vários estados rotacionais e vibracionais. Para que ocorra absorção da radiação no Infravermelho é necessário que a molécula apresente variações no momento de dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. O momento de dipolo é determinado pela magnitude das diferenças de carga e distância entre dois centros de cargas. Apenas nessas situações o campo elétrico alternado da radiação é capaz de interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos (WORKMAN et al., 1996; HIGSON, 2009; SKOOG et al., 2009).

Os espectros podem ser obtidos a partir de amostras em diferentes estados da matéria, sólidas, líquidas e gasosas. A qualidade dos espectros irá depender tanto da amostra quanto da forma de aquisição dos espectros. As medidas podem ser obtidas por reflectância, no caso de amostras sólidas; transmitância/absorbância, em amostras sólidas ou líquidas; e, transflectância, em amostras líquidas (Figura 1). Em geral, a medida de reflectância pode ser dividida em difusa e total atenuada (ATR), sendo esta última utilizada para aquisição de espectros na região do infravermelho médio e próximo.

Figura 1 - Princípios de transmitância, transfectância e reflectância difusa.



Fonte: Adaptado de HUCK (2015).

5.1.1.2.1 Infravermelho Médio

A maioria das pesquisas desenvolvidas e com maior número de aplicações em diversas áreas é realizada utilizando a região do infravermelho médio (ESCAMILLA et al., 2013; FERREIRA et al., 2014). Nos últimos anos, a técnica, tem sido utilizada na investigação de produtos farmacêuticos (WATERWIG; NEUBERT, 2005), na indústria têxtil (HIMMELSBACH; HELLGETH; MCALISTER, 2006) e de alimentos (DOWNEY, 1998; SCHULZ et al., 2004; RODRIGUEZ-SAONA et al., 2006; RODRIGUEZ-SAONA; ALLENDORF, 2011), e vinhos (OELOFSE et al., 2010).

Grande parte das aplicações está voltada para a identificação de compostos orgânicos, pois é nesta região que ocorrem as transições fundamentais, além da existência da faixa espectral conhecida como região de impressão digital (1200 a 400 cm^{-1}). Nesta região, pequenas diferenças na estrutura e constituição de uma molécula irão resultar em mudanças nas bandas de absorção. Dessa forma, pequena semelhança entre dois ou mais espectros, quando ocorrem nessa região, revela forte evidência da identidade dos compostos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012). Além disso, a maioria dos grupos funcionais pode ser observada nessa região desde que as suas ressonâncias vibracionais estejam dentro da faixa de frequência de excitação (GORDON, 2011; HELL et al., 2016).

Atualmente a espectroscopia de infravermelho tem sido bastante utilizada na rotina de laboratórios de pesquisa e de indústrias, por se tratar de uma tecnologia que utiliza ensaios não-destrutivos, rápida aquisição dos espectros e a ausência de reagentes/solventes (LI et al., 2015). Os espectros de infravermelho, sejam na região NIR ou MIR, normalmente fornecem muitas informações a cerca da composição de acordo com a frequência das bandas de absorção (ZHAO, 2012). Nesse sentido, os espectros de infravermelho podem ser utilizados como ferramentas para obter a impressão digital das espécies vegetais/seus derivados, devido à identificação dos grupos funcionais presentes, podendo ser realizada uma análise qualitativa dos extratos.

Para aplicações analíticas da espectroscopia MIR, em geral, é necessário a associação com técnicas quimiométricas multivariadas para tratamentos dos dados. Trabalhos recentes na área de produtos naturais têm sido voltados para a determinação e quantificação de grupos de metabólitos secundários em algumas espécies (ESCAMILLA et al., 2013; SCHÖNBICHLER et al., 2013), como é o caso da utilização desta técnica no estudo de compostos fenólicos em frutos de uvas (FRAGOSO et al., 2011); para identificar a natureza de extratos que contem polifenóis em sua composição (GRASEL; FERRÃO; WOLF, 2016) ou ainda na identificação/diferenciação de plantas que podem possuir mesmo nome popular, entretanto são caracterizadas como diferentes espécies vegetais (KEONG et al., 2016).

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de quantificar compostos ou a totalidade deles em espécies vegetais. Alguns deles utilizam a comparação entre os métodos de quantificação por NIR e MIR, associado à análise multivariada dos dados, como a quantificação de verbenalina e verbascosídeo em espécies de *Verbena officinalis* (SCHÖNBICHLER et al., 2013), que apresentou resultados satisfatórios de RMSEC, RMSECV e RMSEP (abaixo de 0,31 %); alguns autores também utilizaram esta comparação entre NIR e MIR, para realizar a determinação de baicalina e o total de baicaleína em *Scutellariae radix*, apresentando valores de RMSEP compreendidos entre 1,02 e 1,31 % em relação a análise por MIR, e, 1,19 e 1,50 % para as análises por NIR, respectivamente (ESCAMILLA et al., 2013); a utilização das técnicas para determinar parâmetros de qualidade em amostras, também tem sido bastante estudada, como no caso de amostras de soja (FERREIRA et al., 2014).

5.1.1.2.2 Infravermelho Próximo

Os espectros na região do infravermelho próximo apresentam, principalmente, bandas relacionadas a sobretons e combinações das vibrações envolvendo ligações -CH, -OH, -NH e -SH dos vários grupos funcionais, gerando espectros complexos, menos intensos e com interpretação mais difícil que os espectros na região MIR (PASQUINI, 2003; REICH, 2005; HIGSON, 2009; SKOOG et al., 2009; SOUZA et al., 2013).

A utilização de metodologias que enfatizam a região do infravermelho próximo tem sido bastante difundida, quanto ao agrupamento de amostras semelhantes e determinação de amostras anômalas. Esta técnica é também muito utilizada na determinação quantitativa dos constituintes de uma amostra (PASQUINI, 2003; LÓPEZ et al., 2013).

Sua aplicação ao estudo de produtos naturais se encontra em expansão em virtude da complexidade dessas matrizes, entretanto, ultimamente tem surgido vários trabalhos na área (SHI et al., 2012; BARBIN et al., 2014; FERREIRA et al., 2014; HUCK, 2014). A técnica do infravermelho próximo tem sido utilizada para autenticar e discriminar geograficamente espécies como trata a revisão realizada por WANG e YU (2015); na determinação de principais compostos/isoflavonoides em processos extrativos (WANG et al., 2015); na determinação de polifenóis totais (CASCANT et al., 2016), além de polifenóis e metilxantinas bioativos (MAGALHÃES et al., 2016).

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) é uma tecnologia relativamente nova e tem sido bastante utilizada para realizar a análise dos principais compostos em espécies vegetais, em diversas frutas e para rápida detecção de compostos voláteis (SÁNCHEZ et al., 2012; INÁCIO et al., 2013; FERREIRA et al., 2014; MABOOD et al., 2015; YE et al., 2016).

Diversos são os estudos recentes que realizam análises e calibração multivariada associada à técnica de infravermelho próximo. Alguns têm utilizado a regressão linear e não linear para determinar polifenóis em amostras de tabaco por infravermelho próximo, utilizando CLAE como método de referência, sendo observado que a regressão linear é eficaz na predição de amostras desconhecidas (HUANG et al., 2015). Wang e colaboradores (2015) obtiveram excelentes resultados na determinação de isoflavonoides de *Pueraria lobata* por infravermelho próximo. Viegas e colaboradores (2016), como citados anteriormente, determinaram a qualidade dos frutos de *Syzygium malaccense*, por NIR, com valores de RMSEP elevados.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de ferramentas computacionais e de novos métodos matemáticos, tem impulsionado a capacidade de análise de dados. Desta forma, o emprego das técnicas espectroscópicas no infravermelho tem avançado e se consolidado nas análises farmacêuticas de matrizes complexas tal como plantas medicinais e seus derivados.

5.1.2 Quimiometria

Quimiometria é uma área da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para selecionar um procedimento experimental ótimo e realizar o tratamento de dados obtidos, de modo que consiga extrair a maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). Com a utilização da quimiometria é possível determinar muitas vezes, de maneira indireta, substâncias que seriam difíceis de determinar diretamente em algumas metodologias (LAVINE, 2000). Logo, ferramentas quimiométricas foram desenvolvidas, com o intuito de realizar o tratamento de dados de acordo com a necessidade de cada análise, entre tais ferramentas, as mais utilizadas são: métodos de planejamento e otimização de experimentos; pré-processamento de dados espectrais; reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação); seleção de amostras e variáveis espectrais; calibração multivariada; monitoramento e modelagem de processos multivariados e métodos de inteligência artificial (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; OTTO, 2007).

Após a difusão da quimiometria, alguns métodos analíticos foram inseridos na pesquisa e rotina de laboratórios, possibilitando a análise de uma grande quantidade de dados complexos que anteriormente não eram possíveis, como espectros na região do Infravermelho (NIR e MIR).

Técnicas quimiométricas associadas à análise e calibração multivariada têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de métodos aplicados a produtos de origem natural, tais como análise de açaí (SANDRA et al., 2013), café (MOREIRA; SCARMINIO, 2013; MAGALHÃES et al., 2016), soja (FERREIRA; PALLONE; POPPI, 2013), ginseng (KWON et al., 2014), anis estrelado (WANG et al., 2014), chás (CAI et al., 2015), entre outros.

Uma das linhas da quimiometria mais utilizada para fins quantitativos é a calibração multivariada, processo no qual são construídos modelos que visam prever características ou

propriedades de interesse de amostras desconhecidas (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

O modelo construído irá relacionar os espectro

5.1.2.1 Pré-processamento dos dados

Durante a construção dos modelos, uma etapa relevante é o pré-processamento dos dados espectrais, uma vez que esses podem apresentar informações não relevantes para o objetivo pretendido e que podem ser oriundos de fontes de variação indesejáveis. Tais fontes podem ser de origem sistemática ou aleatória e devem ser minimizadas ou removidas para que os modelos construídos não sejam comprometidos (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; WEHRENS, 2011).

No caso de produtos naturais, por se tratarem de matrizes complexas, com diferentes aspectos físicos/químicos/biológicos, ruídos e interferentes podem comprometer a construção do modelo. Alguns efeitos, como espalhamento da luz, ocorrem, por exemplo, na reflectância difusa em espectrofotometria no Infravermelho próximo, causando algumas perturbações inesperadas nos espectros (diferenças na linha de base, não linearidade, entre outras) (OSBORNE; FEARN; HINDLE, 1993).

Os espectros obtidos apresentam informações que não correspondem apenas às características químicas, mas também às características físicas da amostra e às condições de medidas (instabilidade do equipamento). Nesse sentido, a utilização de ferramentas de pré-processamentos dos dados espectrais são importantes na padronização dos dados a serem analisados, com a finalidade de corrigir, remover ou reduzir a variação não desejada dos dados espectrais (ROGGO et al., 2007; SIMÕES, 2008; BARBIN et al., 2014).

As técnicas mais comuns de pré-processamento são: normalização, suavização, correção de linha de base, correção multiplicativa de sinal (MSC), variação normal padrão (SNV) e derivação (primeira e segunda derivada) (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

Correção da linha de base

Além da presença de componentes com alta frequência (ruídos), o sinal mensurado também pode conter fontes com baixa frequência de variação que estão relacionadas com as características físicas do material, o que podem causar interferência na linha de base das análises (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Nesse caso, é importante realizar a correção

da linha de base (*Baseline correction*), para eliminar as possíveis variações geradas durante a análise.

Neste tipo de análise, o espectro pré-processado é obtido subtraindo-se os dados originais a partir de uma função de linha de base, a qual pode ser uma função linear (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Essa ferramenta também pode ser associada a técnicas de suavização para minimização do ruído, tais como: filtro média móvel e polinômio móvel com filtro de Savitzky Golay.

Correção Multiplicativa de Sinal

A correção multiplicativa de sinal (*Multiplicative Scatter Correction – MSC*) é uma técnica comumente utilizada para corrigir o efeito da dispersão da luz presente nos espectros de infravermelho que utilizam reflectância. Tais espectros apresentam variação da linha de base e efeito multiplicativo devido às diferenças, por exemplo, na granulometria das partículas (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; GEMPERLINE, 2006). A técnica faz uma regressão de cada espectro contra um espectro de referência, que normalmente é o espectro médio do conjunto de calibração. Assim, os espectros são corrigidos subtraindo-se dos valores originais o coeficiente linear da reta de regressão e em seguida dividindo-se pela inclinação dessa mesma regressão (HONORATO, 2007; GEMPERLINE, 2006).

Variação Normal Padrão

A técnica de variação normal padrão (*Standard Normal Variate – SNV*) é semelhante à de MSC. É utilizada para corrigir os efeitos do espalhamento entre diferentes amostras (LUYPAERT et al., 2002). Nela, para cada valor espectral é subtraída a média e dividido pelo desvio padrão de todos os valores do espectro (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009). Assim ao contrário do MSC, a técnica de SNV padroniza cada espectro utilizando apenas os dados desse espectro (NAES et al., 2002).

Derivadas

As derivadas possuem a capacidade de remover efeitos aditivos e multiplicativos na linha de base dos espectros (SOUZA; MADARI; GUIMARÃES, 2012). A primeira derivada remove variação aditiva na linha de base, enquanto que a segunda derivada remove efeitos

multiplicativos da linha de base e as linhas de tendência (NAES et al., 2002; RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009).

Trata-se de uma das técnicas de pré-processamento mais utilizadas para corrigir variações em espectros do tipo NIR/MIR (LIRA et al., 2010a,b), possibilitando também melhor visualização de picos existentes nos sinais originais (PONTES, 2009). Entretanto, o uso dessa técnica provoca, no caso de espectros, uma diminuição na relação sinal/ruído, que pode ser minimizada utilizando filtro de suavização. Assim, o algoritmo mais utilizado para este fim é o de Savitzky-Golay, método utilizado para derivação numérica de um vetor incluindo uma etapa de suavização (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009; LIRA et al., 2010a,b).

É importante saber que a escolha da técnica de pré-processamento é uma etapa crítica da modelagem, pois ela pode tanto favorecer quanto desfavorecer o desempenho do modelo. Desse modo, para que se execute um bom pré-processamento é necessário que haja uma interação entre a técnica utilizada e a reavaliação dos dados originais, além do conhecimento da natureza dos dados e do processo químico ou físico do sistema em estudo (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

5.1.2.2 Métodos de Calibração Multivariada

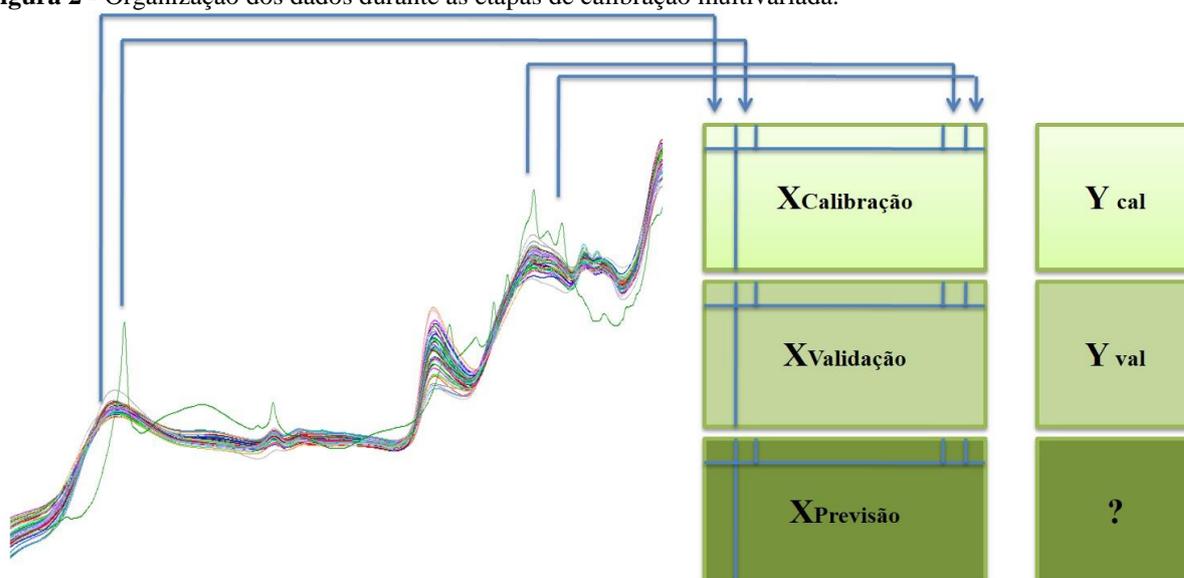
A principal linha da quimiometria, que tem atraído o interesse em aplicações quantitativas que utilizam técnicas espectroscópicas tem sido a construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem. O propósito da calibração multivariada é estabelecer uma relação matemática quantitativa entre os dados de saída de um instrumento e o parâmetro físico e/ou químico de interesse previamente determinado por uma técnica independente (FERREIRA et al., 1999).

O processo de construção de modelos de calibração multivariada é constituído por três etapas: *calibração*, *validação e previsão*. Na etapa de *calibração*, o modelo é construído utilizando métodos matemáticos para relacionar a matriz \mathbf{X} (dados das variáveis medidas – p. ex.: espectros no IR ou UV-Vis) com a matriz \mathbf{Y} de dados das propriedades de interesse determinados pelo método de referência (por exemplo, valores de teor dos constituintes das amostras obtidos por CLAE) (VALDERRAMA et al., 2010). Na etapa de *validação* o modelo construído será avaliado por ferramentas de diagnósticos. Por fim, na etapa de *previsão* o modelo de calibração criado e validado será aplicado para prever concentrações ou

propriedades de amostras desconhecidas (SIMÕES, 2008; GRANGEIRO JR, 2011; SOUZA, 2011; SOUZA et al., 2012).

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme ilustrado na figura 2. Os valores de absorvância dos espectros em cada número de onda correspondem às variáveis independentes (Matriz \mathbf{X}), de dimensão $n \times m$, enquanto que as concentrações das amostras (ou outro parâmetro de interesse) obtidas pelo método de referência indicam as variáveis dependentes (vetor \mathbf{y}).

Figura 2 - Organização dos dados durante as etapas de calibração multivariada.



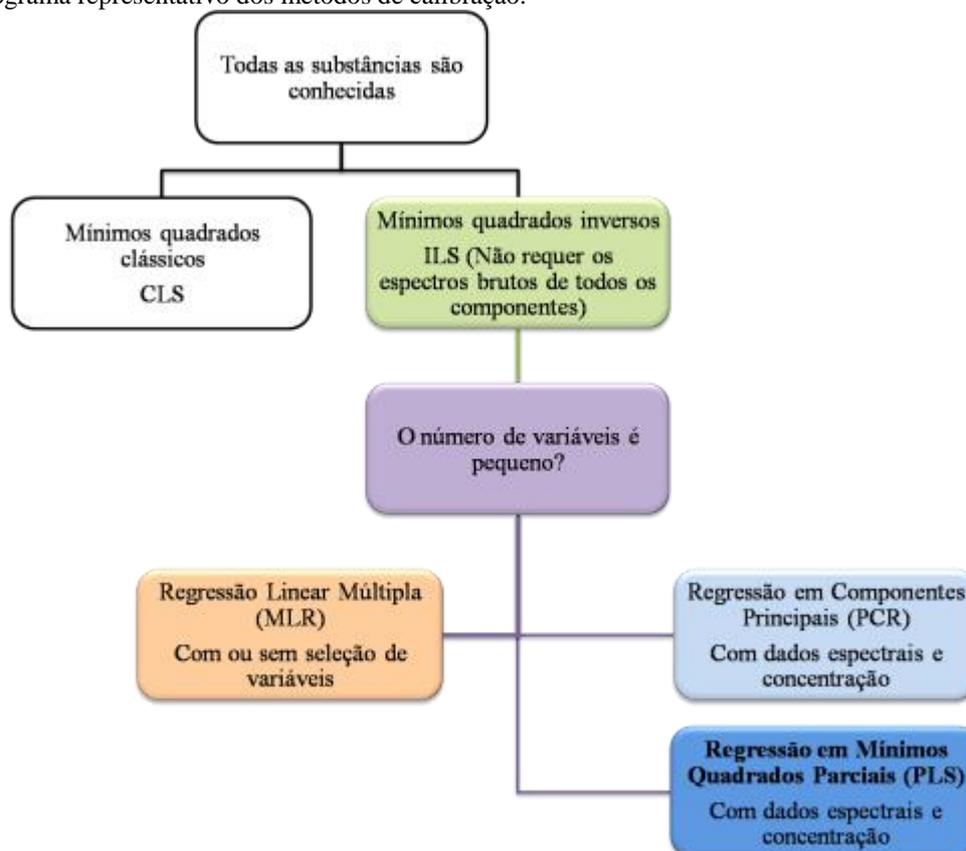
Fonte: Adaptado de GRANGEIRO JÚNIOR (2011).

Uma variedade de métodos de regressão vem sendo difundida para a construção de modelos de calibração multivariada, dentre esses tem merecido destaque na literatura: o método clássico dos mínimos quadrados (*Classical Least Square* - CLS); a regressão linear múltipla (*Multiple Linear Regression* - MLR); regressão por componentes principais (*Principal Component Regression* - PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Square* - PLS), que são métodos para ajuste linear entre as variáveis (Figura 3).

A utilização do ajuste linear entre as variáveis é bastante frequente na maioria dos métodos de calibração multivariada, por ser um modelo de fácil elaboração e interpretação (SIMÕES, 2008). No método CLS há necessidade de se conhecer os espectros puros de todos os constituintes das amostras, e por essa razão não é tão aplicado, principalmente no caso de amostras complexas como produtos naturais.

A regressão PLS geralmente utiliza toda a faixa espectral para a construção dos modelos de calibração multivariada; enquanto que, nos modelos MLR é necessário, em geral, o emprego de algoritmos de seleção de variáveis espectrais não redundantes dentro da faixa espectral de trabalho, para reduzir problemas de multicolinearidade (BRERETON, 2000).

Figura 3 - Fluxograma representativo dos métodos de calibração.



Fonte: Adaptado de HUCK (2014).

5.1.2.2.1 Regressão Linear Múltipla (MLR)

A Regressão Linear Múltipla pode ser considerada o método de calibração multivariada mais simples e de fácil interpretação. Cada vetor \mathbf{y}_{cal} da matriz \mathbf{Y}_{cal} , é expresso como uma combinação linear das variáveis independentes da matriz \mathbf{X}_{cal} e um vetor, \mathbf{b}_{MLR} , que contém os coeficientes de regressão (equação 1), onde \mathbf{e} é o resíduo.

$$\mathbf{Y}_{cal} = \mathbf{X}_{cal}\mathbf{b}_{MLR} + \mathbf{e}$$

Equação 1

Esta equação pode ser resolvida por mínimos quadrados para a obtenção do vetor dos coeficientes de regressão, conforme equação 2:

$$\mathbf{b}_{MLR} = (\mathbf{X}_{cal}^T \mathbf{X}_{cal})^{-1} \mathbf{X}_{cal}^T \mathbf{Y}_{cal} \quad \text{Equação 2}$$

Onde, os índices sobrescritos -1 e T representam a inversão e transposição matricial ou de um vetor, respectivamente.

Apesar de ser o modelo mais simples, a regressão linear múltipla apresenta algumas desvantagens que limitam sua aplicação. O número de amostras deve ser igual ou superior ao número de variáveis, uma vez que o modelo consiste na resolução de um sistema de equações lineares simultâneas. Tal condição necessita ser satisfeita sob o risco do sistema se tornar indeterminado. Outro problema, é que a matriz $(\mathbf{X}_{cal}^T \mathbf{X}_{cal})$ pode não apresentar inversa devido a alta correlação entre as variáveis (VANDEGINSTE et al., 1998). Tais problemas podem ser contornados utilizando métodos de PCR e PLS, pois empregam o princípio da análise de componentes principais (*Principal Component Analysis – PCA*) para reduzir a dimensão de dados (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; SIMÕES, 2008; GRANGEIRO JÚNIOR, 2011).

5.1.2.2.2 Regressão por Componentes Principais (PCR)

Na construção do modelo de PCR, a dimensão dos dados é reduzida utilizando PCA, que decompõe a matriz de dados \mathbf{X} em um produto de duas matrizes menores (BRERETON, 2000), como descrito na equação 3:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_A \mathbf{P}_A^T + \mathbf{E} \quad \text{Equação 3}$$

Onde \mathbf{T} é a matriz dos escores, \mathbf{P} a matriz dos pesos, \mathbf{A} o número de componentes principais utilizado (em geral pequeno) e \mathbf{E} é a matriz dos resíduos (fração que não é explicada pelo modelo).

Na análise de PCR, a matriz \mathbf{X} é decomposta como mostrado na equação 3 e o modelo de calibração é construído a partir da regressão dos escores \mathbf{T} contra as concentrações das amostras de calibração \mathbf{y} , e não mais a partir das variáveis originais \mathbf{X} , como na MLR (Equação 4). Os escores são ortogonais, eliminando, portanto, o problema de colinearidade na etapa de inversão.

$$\mathbf{b} = (\mathbf{T}_A^T \mathbf{T}_A)^{-1} \mathbf{T}_A^T \mathbf{y} \quad \text{Equação 4}$$

5.1.2.2.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O método de calibração multivariada PLS foi desenvolvido por Herman Wold. Este método não requer um conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras podendo realizar a previsão das amostras mesmo na presença de interferentes, desde que esses também estejam presentes por ocasião da construção do modelo (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

O modelo PLS é considerado o método mais usado em calibração multivariada e difere do PCR por usar tanto a informação da matriz de dados \mathbf{X} , como também do vetor \mathbf{y} no cálculo das variáveis latentes (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

Este método atende ao conceito de modelo inverso (propriedade como função da resposta instrumental) trocando as variáveis originais por um subconjunto truncado das variáveis latentes dos dados originais (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; SIMÕES, 2008; VALDERRAMA et al., 2009; SOUZA, 2011; GRANGEIRO JÚNIOR, 2011).

De uma forma geral podemos considerar as matrizes \mathbf{X}_{cal} e \mathbf{Y}_{cal} decompostas em suas matrizes de pesos e escores, como mostrado respectivamente nas equações 5 e 6.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad \text{Equação 5}$$

$$\mathbf{y} = \mathbf{U}\mathbf{Q}^T + \mathbf{F} \quad \text{Equação 6}$$

Onde: \mathbf{T} e \mathbf{U} são as matrizes dos escores e \mathbf{P} e \mathbf{Q} são as matrizes dos pesos das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{y} , respectivamente. \mathbf{E} é a matriz de resíduos espectrais e \mathbf{F} é a matriz dos resíduos de concentração.

Essa decomposição pode se feita por vários tipos de algoritmos, sendo o mais comum o NIPALS. Como na PCR, as variáveis latentes do PLS também apresentam a propriedade de ortogonalidade. No caso do NIPALS, diversos parâmetros do PLS são estimados: escores e loadings de \mathbf{X} (\mathbf{T} e \mathbf{P}), loadings de \mathbf{Y} (\mathbf{Q}) e os *loadings weights* (\mathbf{W}). Os coeficientes de regressão PLS podem ser calculados pela equação 7:

$$\mathbf{b}_{PLS} = \mathbf{W} (\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \mathbf{Q} \quad \text{Equação 7}$$

Quando os modelos de calibração estão sendo construídos, geralmente utiliza-se o método de validação cruzada completa (do inglês, *Full Cross Validation*) para estabelecer a dimensionalidade do modelo e o número de variáveis latentes (BARTHUS et al., 2007). Nesta análise uma amostra por vez, é removida do conjunto de calibração e um novo modelo é construído com os dados restantes. A amostra que foi removida tem seu valor previsto pelo modelo e um erro de calibração é calculado. Esse procedimento é repetido para cada uma das amostras até que cada uma delas tenha sido excluída em algum momento da calibração, até ser definido o número de variáveis latentes, comparando-se a variabilidade explicada pelo modelo (FERREIRA et al., 1999; NAES et al., 2002; SOUZA et al., 2013).

Quando o número de variáveis latentes é determinado, o modelo pode ser testado para prever uma determinada propriedade de interesse, a partir de um conjunto de amostras (validação externa) que não foram utilizadas no conjunto de calibração.

5.1.2.3 Seleção de Variáveis

A eficiência do modelo de calibração multivariada é, em geral, melhorada significativamente com a escolha correta das regiões espectrais. Assim, com a seleção de variáveis é possível fazer essa escolha, seja de um comprimento de onda ou de um conjunto de comprimento de ondas, de forma independente e mais restrita. A seleção de variáveis permite produzir modelos mais robustos, simples de interpretar, fornecendo uma descrição estatística mais representativa e adequada para o uso na previsão (OLIVEIRA et al., 2004; PONTES, 2009).

O algoritmo Jack-knifing (JK), também conhecido por teste de incerteza de Martens, é um dos métodos de seleção de variáveis proposto inicialmente por Efron (1982), e adaptado por Martens e Martens (2000) para se inserir no contexto da calibração multivariada. Esse algoritmo pode ser utilizado para selecionar as variáveis mais informativas na construção dos modelos de regressão, entre os quais o PLS. Nesse algoritmo, os erros padrão das estimativas dos coeficientes de regressão obtidos pelo modelo são avaliados empregando uma série de subconjuntos de dados. A partir daí, pode-se calcular os intervalos de confiança para os coeficientes de regressão e avaliar a significância de cada variável utilizada no modelo (HONORATO et al., 2007).

5.1.2.4 Seleção de amostras

Quanto as etapas para construção do modelo de calibração, a seleção de amostras é importante, uma vez que, as amostras devem ser escolhidas de forma a cobrir todo o intervalo de aplicação do modelo e distribuídas de maneira uniforme sempre que possível. O número de amostras também é um fator que contribui bastante para a construção do modelo, de forma geral deve ser bem maior que o número de amostras utilizadas em modelos univariados.

Na construção de modelos multivariados é necessário fazer a separação das amostras em dois subconjuntos (conjunto de calibração e conjunto de predição). O primeiro é utilizado na etapa de calibração e o segundo na etapa de validação externa.

As matrizes estudadas geralmente são complexas, logo a utilização de algoritmos que façam a divisão dos subconjuntos tem sido bastante útil. Entre os algoritmos utilizados estão o algoritmo de Kennard-Stone (KS) e SPXY (Sample set Partitioning based on joint \mathbf{X} - \mathbf{y} distances).

O algoritmo Kennard-Stone (KS) é utilizado para selecionar amostras se baseando nas distâncias euclidianas das respostas instrumentais (\mathbf{X}) (KENNARD; STONE, 1969). Ele seleciona duas amostras que possuem a maior distância euclidiana entre si na matriz \mathbf{X} , em seguida, calcula a distância mínima entre as amostras selecionadas e as amostras remanescentes. Então, será selecionada a amostra que possuir a maior distância mínima entre as amostras que foram selecionadas anteriormente. O procedimento é repetido até que o número de amostras estipulado pelo analista seja alcançado (HONORATO et al., 2007).

O SPXY é semelhante ao KS, entretanto ele considera tanto as diferenças de \mathbf{X} (respostas instrumentais) quanto às de \mathbf{y} (parâmetro de interesse) no cálculo das distâncias entre as amostras, havendo a mesma importância para a distribuição das amostras nos espaços \mathbf{X} e \mathbf{y} (GALVÃO et al., 2005). O objetivo do algoritmo SPXY é prever a distância definida na Equação 8 como a distância no espaço variável dependente (\mathbf{y}) do parâmetro em estudo. Cada distância $d_y(p,q)$ pode ser calculada para cada par de amostras p e q como:

$$d_y(p,q) = \sqrt{(y_p - y_q)^2 |y_p - y_q|} \quad \text{Equação 8}$$

De modo que a mesma importância seja atribuída para a distribuição das amostras nos espaços \mathbf{X} e \mathbf{Y} , as distâncias $d_x(p,q)$ e $d_y(p,q)$ são divididas pelos seus valores máximos no conjunto de dados. Assim a distância normalizada é calculada conforme a Equação 9.

$$d_{xy}(p, q) = \frac{d_x d(p, q)}{\max_{p, q \in [1, N]} d_x(p, q)} + \frac{d(p, q)}{\max_{p, q \in [1, N]} d_x(p, q)} \quad \text{Equação 9}$$

5.1.2.5 Número de variáveis

Para a escolha do número de variáveis latentes, um método bastante utilizado é o de validação cruzada, citado anteriormente. O número de variáveis latentes é escolhido com base no valor de RMSECV e na análise das ferramentas de diagnóstico do modelo (gráficos de: variância explicada *versus* RMSECV, loadings e resíduo dos modelos). Quando determinado o número de variáveis latentes, o modelo pode ser testado para prever uma determinada propriedade de interesse, a partir de um conjunto de amostras (validação externa) que não foi utilizado na etapa de calibração (SOUZA et al., 2013).

5.1.2.6 Parâmetros relacionados com a qualidade do modelo

Durante o desenvolvimento do modelo, deve-se analisar alguns parâmetros que indicam a qualidade do mesmo. Tais parâmetros podem ser utilizados para escolher o modelo adequado à predição dos resultados desejados, adotando como critérios de avaliação: coeficiente de determinação (R^2); coeficiente de correlação entre os valores previstos pelo modelo e os obtidos pelo método de referência (R); o valor da raiz quadrada do erro médio quadrático da calibração (do inglês, *Root Root Mean Square Error of Calibration* - RMSEC); o valor da raiz quadrada do erro médio quadrático da validação cruzada (do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation* – RMSECV); o valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (do inglês, *Root Mean Square Error of Prediction* - RMSEP); e, o número de variáveis latentes (VL) e valor de *bias* para calibração e previsão.

O valor do R^2 indica a qualidade de ajuste linear do modelo, seu valor pode variar de 0 a 1, e quanto mais próximo de 1 mais o modelo conseguirá descrever a variação que ocorre em y (PIMENTEL; DE BARROS NETO, 1996; GHASEMI et al., 2007). O número de variáveis latentes apresenta-se como um parâmetro importante para alcançar o melhor desempenho nas previsões, permitindo modelar o sistema com a quantidade ótima de informação, evitando sub ou superestimar o modelo. Normalmente é estimado a partir da análise da soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS), do procedimento de validação cruzada (MARTENS; NAES, 1996), citado anteriormente (GRANGEIRO JÚNIOR, 2011).

Um dos parâmetros mais importantes é a raiz quadrada do erro médio quadrático. Na etapa de calibração, quando se utiliza a validação cruzada, o parâmetro é chamado de RMSECV, que é estimado conforme a equação 10 (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; NAES et al., 2002).

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{Ncal} (y_{ical} - \hat{y}_{ical})^2}{Ncal}} \quad \text{Equação 10}$$

Onde: $Ncal$ é o número de amostras do conjunto de calibração, y_{ical} é o valor do parâmetro de interesse da i -ésima amostra do conjunto de calibração e \hat{y}_{ical} é o valor do parâmetro estimado pelo modelo.

A capacidade de previsão do modelo pode ser avaliada utilizando amostras que não participaram da etapa de construção dos modelos (conjunto correspondente à validação externa). Nesta etapa, a capacidade preditiva do modelo é expressa pelo RMSEP, determinado pelo conjunto de validação externa, conforme descrito na equação 11 (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{Nprev} (y_{i,prev} - \hat{y}_{i,prev})^2}{Nprev}} \quad \text{Equação 11}$$

Onde: $Nprev$ é o número de amostras do conjunto de previsão, $y_{i,prev}$ é o valor do parâmetro de interesse da i -ésima amostra do conjunto de previsão e $\hat{y}_{i,prev}$ é o valor do parâmetro estimado pelo modelo.

Além disso, o *bias* é considerado o erro sistemático, ou seja, o somatório das componentes do erro que não são aleatórias, e que pode afetar algumas figuras de mérito (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). O *bias* médio é calculado para o conjunto de calibração ou validação através da equação 12:

$$Bias = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)}{GL} \quad \text{Equação 12}$$

Onde: y_i são os valores de concentração das amostras de referência, \hat{y}_i são os valores de concentração das amostras preditas pelo modelo, N é o número de amostras de calibração ou validação e GL é o número de graus de liberdade da soma quadrática. No caso da calibração

com dados centrados na média, GL é igual a $(N_{cal} - VL - 1)$. N_{cal} é o número de amostras de calibração e VL é o número de variáveis latentes utilizadas no modelo. Para o conjunto de validação, GL é igual ao número de amostras de validação.

Amostras anômalas (*Outliers*)

A detecção de amostras anômalas, também conhecidas por *outliers*, é muito importante porque podem ser bastante influentes na estimativa dos coeficientes do modelo e no número de variáveis latentes. *Outliers* são amostras que apresentam comportamento diferente das demais que compõem o conjunto de calibração e/ou previsão. Quando esse tipo de amostras está presente no conjunto de calibração, pode conduzir a modelos com baixa capacidade de previsão (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998); quando estão no conjunto de validação, podem influenciar os resultados, indicando que o modelo não é adequado. Logo, identificar tais amostras é importante para a otimização dos conjuntos de calibração e validação, permitindo a construção de modelos mais eficientes e com melhor capacidade de previsão (MARTENS; NAES, 1996).

Diversas técnicas são utilizadas para identificar as amostras anômalas (HOY; STEEN; MARTENS, 1998; MAESSCHALCK; JOUN-RIMBAUD; MASSART, 2000; FERNÁNDEZ PIERNA et al., 2002; FERNÁNDEZ PIERNA et al., 2003), mas segundo as recomendações da norma E1655 (2012) da *American Society for Testing and Materials* (ASTM) para a detecção de amostras anômalas, devem ser utilizadas duas grandezas complementares: *leverage* e resíduos de Student.

Leverage é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão, cujo valor está relacionado à distância da amostra em relação à média do conjunto de calibração (ASTM, 2012). Alto resíduo em X significa que o espectro da amostra apresenta diferenças dos demais e resíduos altos em y correspondem a desvios entre os dados de referência e os estimados pelo modelo.

Uma maneira utilizada para detectar os *outliers* a partir do *leverage* é calcular o *leverage* crítico, multiplicando o número de variáveis latentes por três e dividindo esse valor pelo número de amostras utilizadas para construir o modelo de regressão. Amostras que possuem o *leverage* maior que *leverage* crítico devem ser excluídas do modelo de regressão (FERREIRA et al., 1999).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Espectroscopia de Absorção na região Ultravioleta (UV)

5.2.1.1 Preparo das soluções

- a) **Solução Estoque:** foram pesados, em balança analítica, cerca de 0,0250 g dos extratos brutos. Em seguida, transferidos para balões volumétricos com capacidade de 25 mL, diluídos com 20 mL de água ultrapura e levados ao banho de ultrassom durante 15 minutos para total dissolução do extrato/fração. Ao final, o volume foi aferido com água ultrapura, originando soluções de concentração igual a 1,0 mg/mL. Uma alíquota da Solução Estoque (0,5 mL) foi diluída para obter a *Solução de leitura*, com concentração igual a 20,0 µg/mL, uma vez que, apresentava valor máximo de absorbância adequado à metodologia (0,400 U.A.).
- b) **Solução padrão - ácido gálico:** foram pesados, em balança analítica, aproximadamente 0,0250 g do padrão ácido gálico e transferidos para balão volumétrico com capacidade de 25 mL, diluído com água ultrapura, para obter solução a 1,0 mg/mL (Solução Estoque). A partir da Solução Estoque foram realizadas diversas diluições para obter a curva de analítica com faixa de concentração entre 8,0 e 12,0 µg/mL.
- c) **Solução padrão - ácido elágico:** foram pesados, em balança analítica, aproximadamente cerca de 0,0250 g do padrão ácido elágico e transferidos para balão volumétrico com capacidade de 25 mL, diluído com DMSO, para obter solução a 1,0 mg/mL (Solução Estoque). A partir da Solução Estoque foram realizadas diversas diluições, utilizando metanol:água (3:2) como solvente, para obter a curva analítica com faixa de concentração entre 21,0 e 25,0 µg/mL.

5.2.1.2 Registro dos espectros

Os espectros de varredura foram registrados na região de 190 a 500 nm, utilizando espectrofotômetro (Modelo Evolution 60S, ThermoScientific®). As análises foram realizadas em triplicata.

5.2.2 Espectroscopia nas regiões do Infravermelho Médio e Próximo

5.2.2.1 Amostras e Padrão

Os extratos brutos liofilizados, assim como os padrões (ácido elágico e ácido gálico), foram armazenados em frascos de vidro e em dessecador até a realização das análises.

5.2.2.2 Aquisição dos espectros NIR e MIR

Os espectros dos extratos e padrões (ácido gálico e ácido elágico) foram adquiridos em espectrômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (Perkin Elmer®), em temperatura ambiente (22 ± 2 °C) com atmosfera controlada por desumificador (40 %). Cada espectro foi obtido com resolução de 8 cm^{-1} e média de 32 varreduras.

Os espectros de NIR foram adquiridos na faixa de 12.000 a 4.000 cm^{-1} com auxílio de acessório de reflectância difusa (NIRA). As análises de MIR foram realizadas na região de 4.000 a 650 cm^{-1} empregando acessório universal de reflectância total atenuada (UATR).

5.2.3 Análise Estatística

5.2.3.1 Detecção de *outliers*

As amostras anômalas (*outliers*) foram identificadas a partir dos gráficos de *leverage* e dos resíduos das matrizes **X** (matriz espectral) e **y** (propriedade de interesse) obtidos após a construção dos modelos PLS.

5.2.3.2 Pré-processamento de dados

Os conjuntos de dados espectrais (UV, NIR e MIR) utilizando um total de 210 amostras de extratos brutos, foram submetidos a vários pré-processamentos visando melhores resultados dos modelos PLS, tais como: correção de linha de base, a variação normal padrão (SNV), correção multiplicativa de sinal (MSC) combinadas com primeira/segunda derivadas, utilizando o filtro Savitzky-Golay com polinômio de 2º ordem, e em diferentes tamanhos de janelas.

5.2.3.3 Construção dos modelos de calibração e validação externa

Os conjuntos de calibração e de validação externa foram selecionados através do algoritmo SPXY (*Sample set Partitioning based on joint X-y distances*), utilizando em média 70% do conjunto total de amostras para calibração e 30% para validação externa. O algoritmo *Jack-knifing* foi utilizado para selecionar as variáveis espectrais que correspondem aos coeficientes significativos.

Os modelos foram obtidos utilizando validação cruzada completa para definir o número de variáveis latentes (VL). Para a escolha do melhor modelo foram analisados os valores dos menores erros de previsão (RMSECV e RMSEP). Além disso, foram avaliados os coeficientes de correlação dos conjuntos de calibração (R_{cal}) e validação externa (R_{val}), além do *Bias*.

Para comparar os valores de RMSECV e RMSEP entre os diferentes modelos foi realizado um teste F, no nível de 95% de confiança.

O programa UNSCRAMBLER[®] v 9.8 da CAMO foi empregado para pré-tratamento dos espectros e construção dos modelos PLS. E o programa MATLAB[®] R2008a foi utilizado para escolha dos conjuntos de calibração e validação externa.

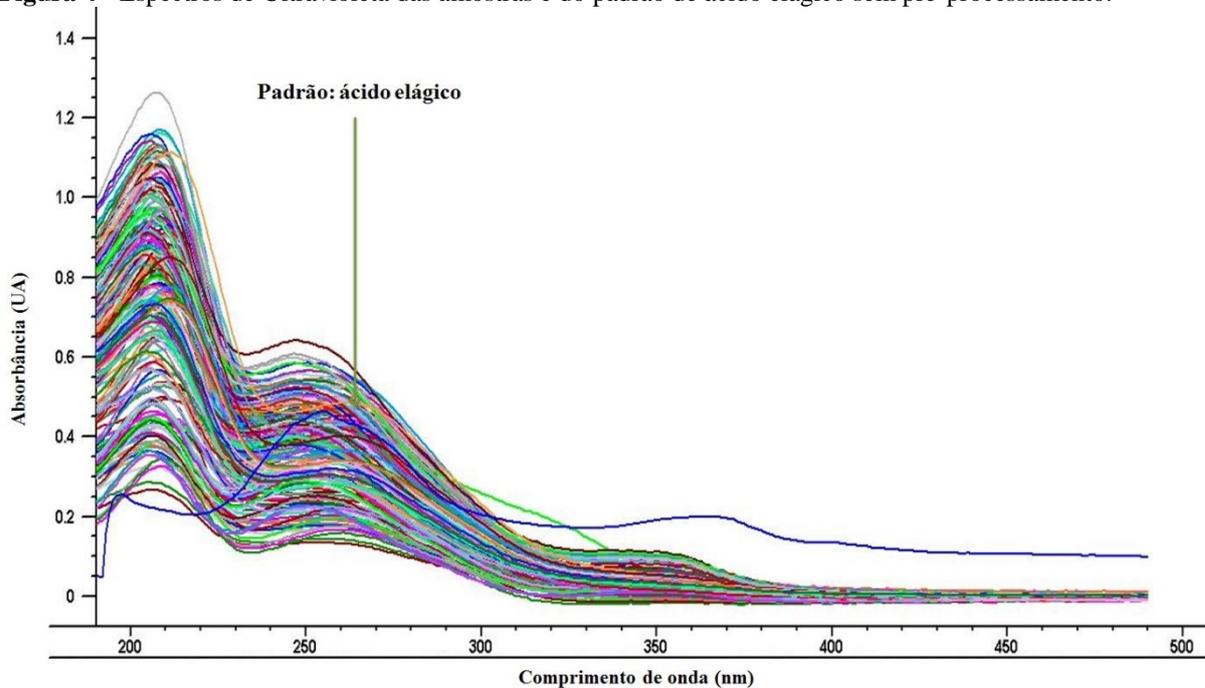
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Espectroscopia no UV

As figuras 4 e 5 mostram os espectros das amostras registrados em toda a faixa espectral do UV, sem que estes fossem submetidos a nenhum pré-processamento. Também são mostrados os espectros dos padrões de ácido elágico e ácido gálico.

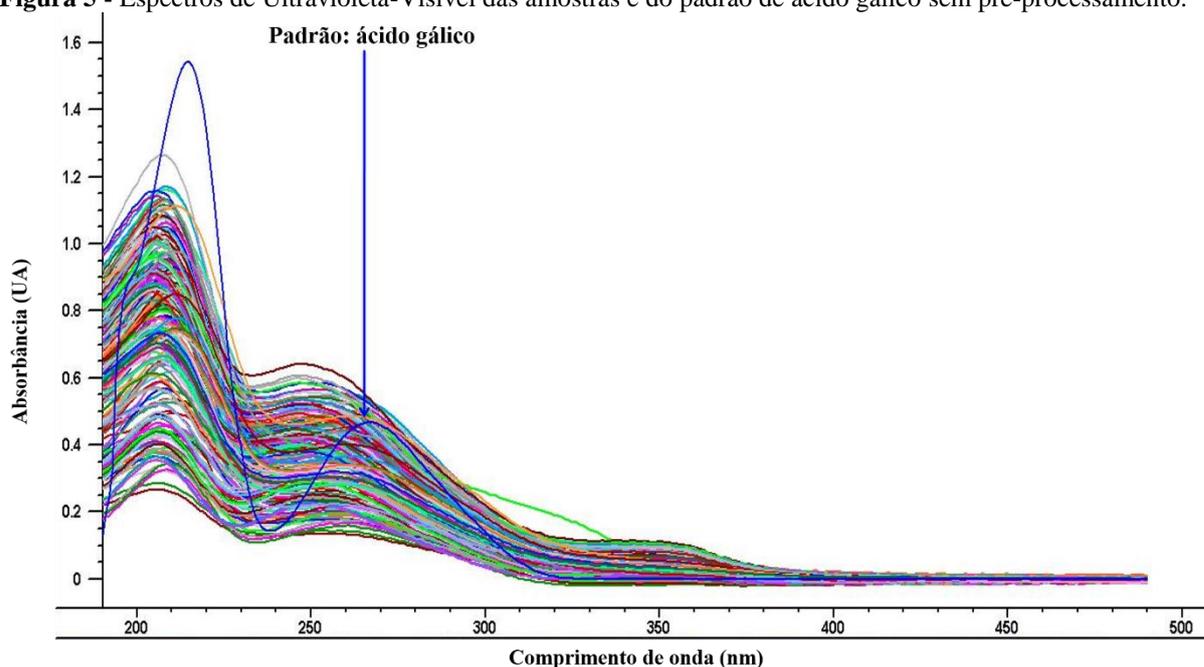
É possível notar que os espectros apresentam regiões não informativas, que podem prejudicar a construção do modelo, além de regiões que são semelhantes com os espectros de varredura correspondentes aos padrões utilizados.

Figura 4 - Espectros de Ultravioleta das amostras e do padrão de ácido elágico sem pré-processamento.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 5 - Espectros de Ultravioleta-Visível das amostras e do padrão de ácido gálico sem pré-processamento.



Fonte: Próprio Autor.

5.3.1.1 Pré-processamento espectral e avaliação de *outliers*

Cada linha das matrizes de calibração e previsão representa a média dos espectros de 3 leituras realizadas. Uma etapa importante antes de se iniciar a construção dos modelos de calibração multivariada é a análise dos espectros.

Foram construídos vários modelos PLS preliminares, levando em consideração amostras sem pré-processamento, com seleção de faixas espectrais e após pré-processamentos, contendo todas as amostras analisadas ($n = 210$). As amostras analisadas apresentaram faixa de concentração entre 0,42 e 7,78 %m/m e 0,54 e 4,21 %m/m, para o ácido gálico e ácido elágico, respectivamente.

Dessa forma, com o intuito de eliminar efeitos indesejados, alguns pré-processamentos espectrais foram testados (correção de linha de base, derivadas e suavizações). Durante as análises as faixas dos espectros avaliadas foram denominadas de: Faixa 1: compreendendo 190 a 500 nm; e, Faixa 2: 190 a 390 nm. Todos os pré-processamentos envolvendo derivadas foram realizados utilizando polinômio de segunda ordem e filtro de Savitzky Golay.

Os resultados dos melhores modelos PLS estão listados nas tabelas 2 e 3, respectivamente para o ácido elágico e ácido gálico. Aqueles que estão destacados, foram selecionados por apresentarem, em geral, melhores valores das figuras de mérito.

Tabela 2 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico na calibração por UV-VIS.

Pré-processamento	Todas as amostras			
	R^2	RMSECV	Bias	VL
SP_FAIXA 1	0,81	0,43	0,003160	4
FAIXA 1_CLB	0,84	0,39	-0,008543	6
FAIXA 1_1d_3pts	0,87	0,35	0,000517	6
FAIXA 1_1d_5pts	0,88	0,34	0,006626	8
FAIXA 1_1d_7pts	0,88	0,33	0,005498	8
SP_FAIXA 2	0,87	0,35	-0,000944	9
FAIXA 2_CLB	0,86	0,36	-0,001025	8
FAIXA 2_1d_3pts	0,86	0,36	0,001167	6
FAIXA 2_1d_5pts	0,88	0,34	0,006205	8
FAIXA 2_1d_7pts	0,88	0,33	0,004610	8

SP: Sem pré-processamento; CLB: Correção de linha de base;1d SG: primeira derivada Savitzky Golay; 3pts: janela de 3 pontos;5 pts: janela de 5 pontos; 7pts: janela de 7 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 3 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico na calibração por UV-VIS.

Pré-processamento	Todas as amostras			
	R^2	RMSECV	Bias	VL
SP_FAIXA 1	0,78	0,72	-0,003542	12
FAIXA 1_CLB	0,77	0,73	-0,003695	10
FAIXA 1_1d_3pts	0,77	0,73	0,008170	6
FAIXA 1_1d_5pts	0,79	0,71	0,008959	8
FAIXA 1_1d_7pts	0,79	0,71	-0,002967	9
SP_FAIXA 2	0,79	0,69	0,000256	13
FAIXA 2_CLB	0,78	0,72	0,007241	11
FAIXA 2_1d_3pts	0,78	0,71	0,009562	7
FAIXA 2_1d_5pts	0,78	0,72	0,010328	8
FAIXA 2_1d_7pts	0,78	0,71	-0,005985	9

SP: Sem pré-processamento; CLB: Correção de linha de base;1d SG: primeira derivada Savitzky Golay; 3pts: janela de 3 pontos;5 pts: janela de 5 pontos; 7pts: janela de 7 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

A avaliação de *outliers* foi realizada com os modelos empregando os melhores pré-processamentos destacados. Dessa forma, foram gerados gráficos de resíduos de X e em y em

função do *leverage*, e a partir dos gráficos obtidos, foi possível identificar e excluir os *outliers*. Os *outliers* foram considerados como sendo as amostras que apresentaram altos valores de *leverage* e de resíduos. A detecção e remoção desse tipo de amostra requerem maior atenção análise, pois a amostra pode conter informações que sejam importantes ao modelo de calibração, e assim, a remoção deste tipo de amostra deve ser avaliada com maior cuidado. Após a exclusão do(s) *outlier(s)*, uma nova calibração foi realizada e os valores do RMSECV calculados, sendo comparados os valores obtidos antes e depois da exclusão da(s) amostra(s) com a finalidade de avaliar o resultado da remoção.

Com base na redução no valor de RMSECV e melhor número de variáveis latentes e valores de R^2 , foi selecionado o modelo: **FAIXA 1_1d_3pts**, para ambos os analitos (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Valores de R^2 , RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico, com todas as amostras e após retirada dos *outliers*.

Pré-processamento	Todas as amostras				Após retirada de <i>outliers</i>			
	R^2	RMSECV	Bias	VL	R^2	RMSECV	Bias	VL
FAIXA 1_CLB	0,84	0,39	-0,008543	6	0,92	0,26	0,000516	7
FAIXA 1_1d_3pts	0,87	0,35	0,000517	6	0,93	0,24	-0,001785	5
FAIXA 2_1d_3pts	0,86	0,36	0,001167	6	0,92	0,28	-0,002886	5

Faixa 1: 190 a 500 nm; Faixa 2: 190 a 390 nm; CLB: Correção de linha de base; 1d: primeira derivada Savitzky Golay; 3pts: janela de 3 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 5 - Valores de R^2 , RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico, com todas as amostras e após retirada dos *outliers*.

Pré-processamento	Todas as amostras				Após retirada de <i>outliers</i>			
	R^2	RMSECV	Bias	VL	R^2	RMSECV	Bias	VL
FAIXA 1_1d_3pts	0,77	0,73	0,008170	6	0,91	0,38	0,001931	7
FAIXA 2_1d_3pts	0,78	0,71	0,009562	7	0,91	0,39	0,001028	7

Faixa 1: 190 a 500 nm; Faixa 2: 190 a 390 nm; 1d: primeira derivada Savitzky Golay; 3pts: janela de 3 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

5.3.1.2 Determinação dos conjuntos de calibração e validação externa

Para a construção dos modelos PLS foram separados os conjuntos de dados em amostras de calibração e validação externa. Para tal finalidade nesse trabalho foi utilizado o algoritmo SPXY (GALVÃO et al., 2005). O conjunto foi composto de 131 amostras de

calibração e 53 amostras de validação externa, para o ácido elágico; e 127 amostras de calibração e 55 amostras de validação externa, para o ácido gálico.

5.3.1.3 Construção do modelo PLS

Com os resultados dos pré-processamentos espectrais, retirada dos *outliers* e determinação dos conjuntos de calibração e validação externa, foram construídos os modelos definitivos de regressão. Com o intuito de melhorar o desempenho dos modelos de calibração foi utilizado o teste de significância das variáveis espectrais, o qual acessa a estabilidade do modelo de regressão. Este teste é realizado durante a validação cruzada e se baseia no princípio de Jack-knifing (JK) que retira da modelagem as variáveis espectrais que estão relacionadas aos coeficientes não significativos e são, portanto, menos informativas (CHIOQUOINE; HJALMARSSON, 2009).

De acordo com os dados de análise do modelo para AE, a retirada das variáveis espectrais que, em princípio, não trazem informação e podem perturbar o modelo, não evidenciou diferença nos valores destas figuras de mérito. Além disso, o número de variáveis latentes permaneceu inalterado. Deste modo, as análises foram conduzidas sem adição do algoritmo. No caso do AG, optou-se pelo modelo com seleção de variáveis porque houve uma diminuição do número de VL, constituindo o modelo mais simples (Tabela 6).

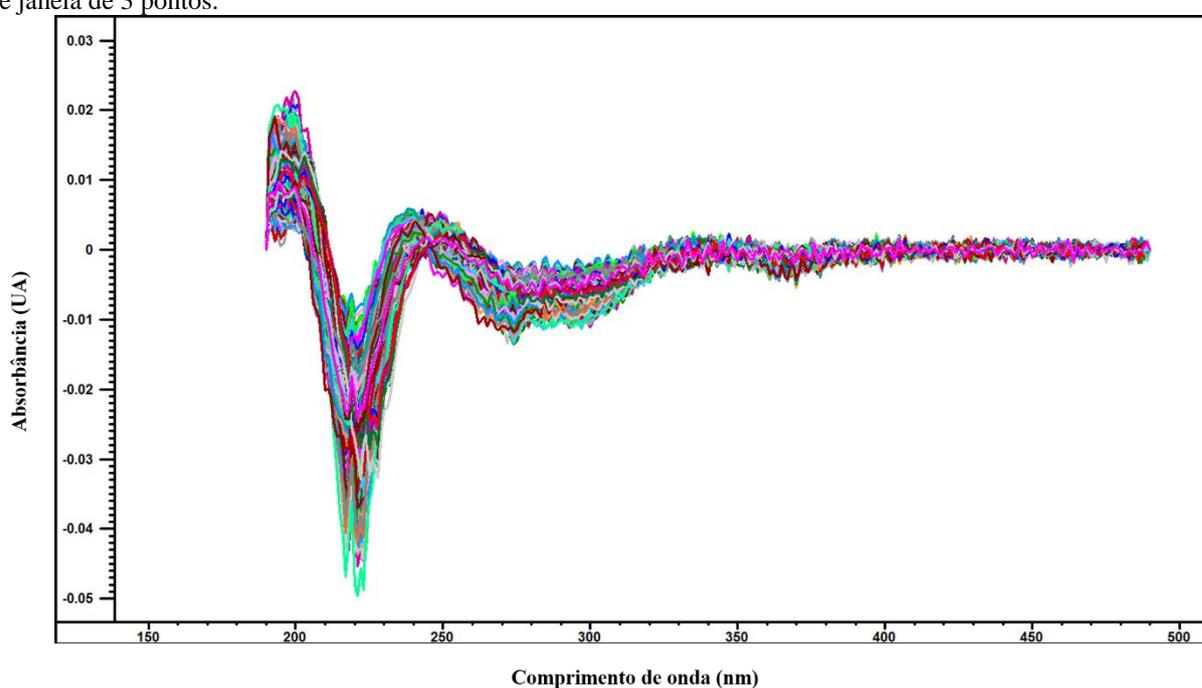
Tabela 6 - Valores de R^2 , RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico e ácido gálico nas etapas de calibração e validação.

Padrão	Pré-processamento	R^2	RMSECV	Bias	VL	R^2	RMSEP	Bias
AE	Faixa 1_1d_3pts	0,91	0,28	-0,00237	5	0,95	0,20	-0,00723
	Faixa 1_1d_3pts_JK	0,92	0,27	-0,00190	5	0,94	0,21	0,00141
	Faixa 2_1d_3pts	0,91	0,29	-0,00231	5	0,93	0,25	-0,01308
	Faixa 2_1d_3pts_JK	0,91	0,28	-0,00174	5	0,94	0,22	0,00311
AG	Faixa 1_1d_3pts	0,92	0,39	0,00497	8	0,91	0,35	0,07951
	Faixa 1_1d_3pts_JK	0,93	0,37	0,00102	6	0,90	0,36	0,07544
	Faixa 2_1d_3pts	0,90	0,41	0,00432	7	0,90	0,37	0,09705
	Faixa 2_1d_3pts_JK	0,90	0,40	-0,00141	6	0,90	0,39	0,05033

AE: Ácido elágico; AG: Ácido gálico; Faixa 1: 190 a 500 nm; Faixa 2: 190 a 390 nm; 1d: primeira derivada Savitzky Golay; 3pts: janela de 3 pontos; JK: Jack-knifing.
Fonte: Próprio Autor.

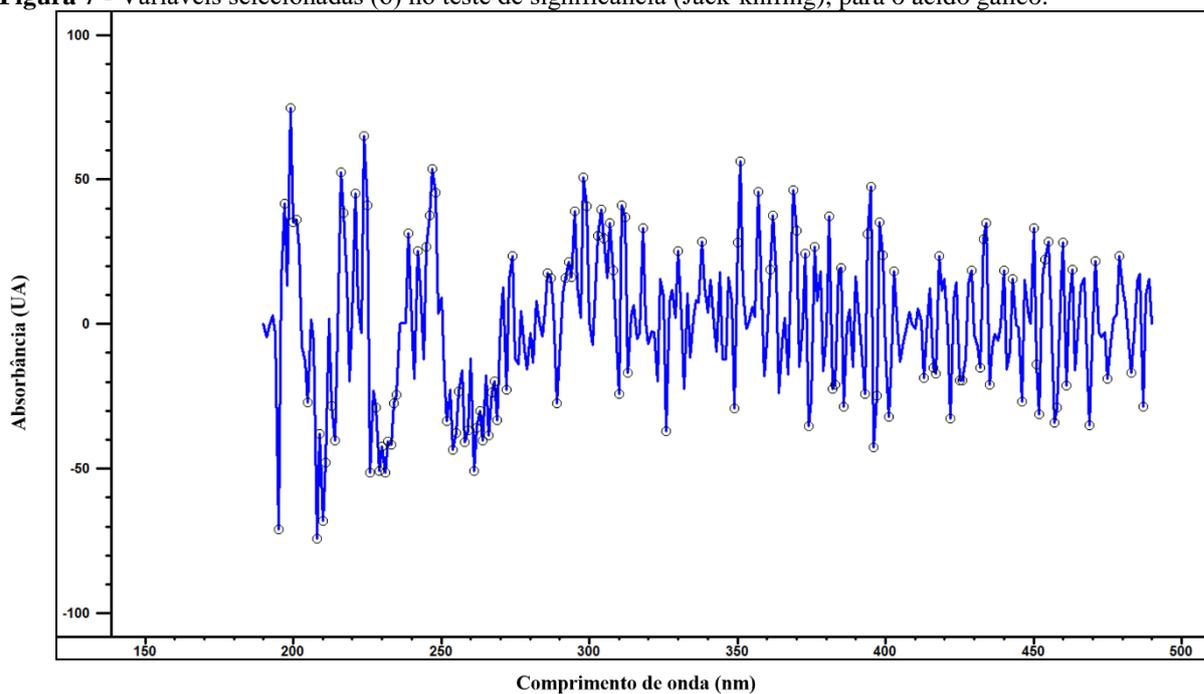
Para a realização do trabalho, foi escolhido o modelo cujos espectros passaram pela combinação dos pré-processamentos: toda faixa espectral, primeira derivada com filtro Savitzky-Golay e janela de 3 pontos, em relação ao ácido elágico; e, toda faixa espectral primeira derivada com filtro Savitzky-Golay e janela de 3 pontos adicionado do algoritmo de Jack-knifing, para o ácido gálico, uma vez que foi observada uma diminuição no número de variáveis latentes quando aplicado o algoritmo de Jack-knifing. A figura 6 mostra os espectros após o pré-processamento selecionado na avaliação dos modelos; e, a figura 7 apresenta as variáveis selecionadas no teste de significância, para o ácido gálico.

Figura 6 - Espectros de todas as amostras após pré-processamento primeira derivada com filtro Savitzky-Golay e janela de 3 pontos.



Fonte: Próprio Autor.

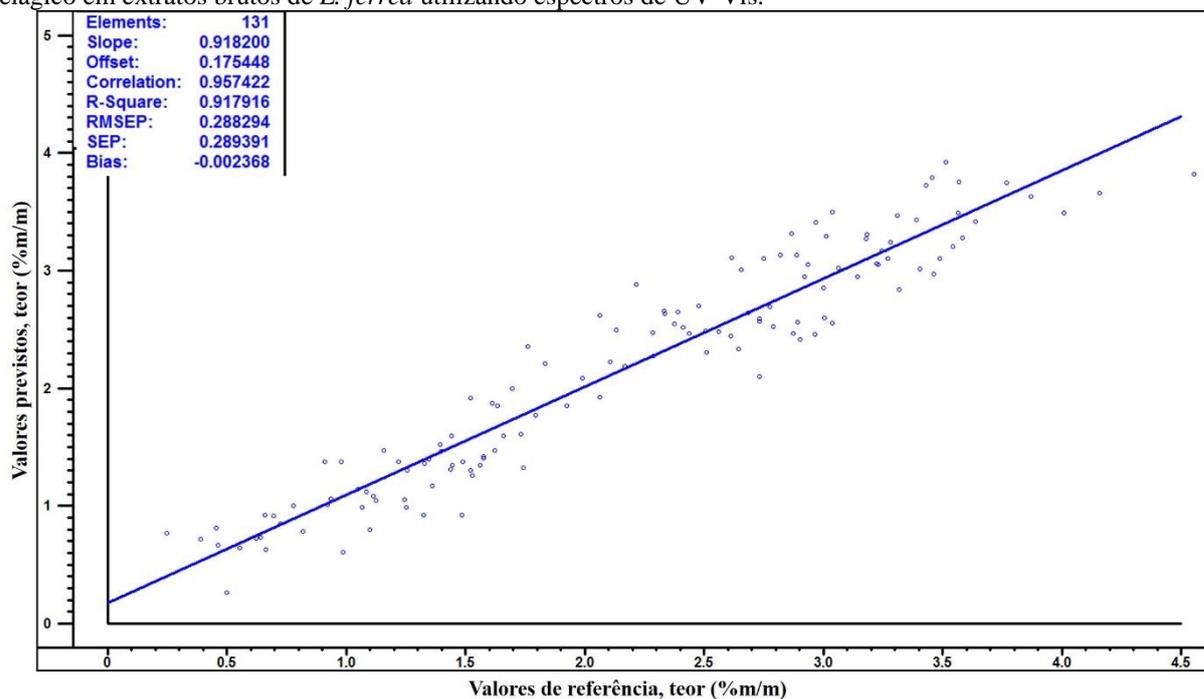
Figura 7 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), para o ácido gálico.



Fonte: Próprio Autor.

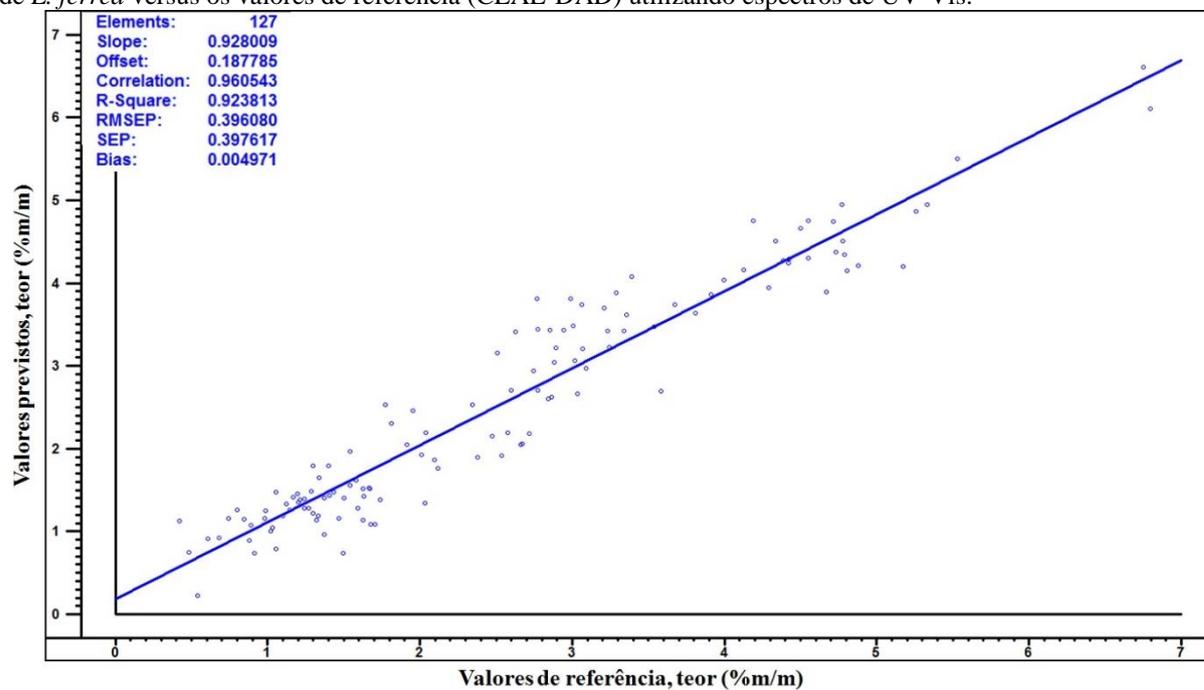
As figuras, 8 e 9, mostram os gráficos obtidos através da regressão por PLS e PLS-JK dos valores previstos no modelo *versus* os valores obtidos pelo método de referência (CLAE-DAD) para os conjuntos de calibração do ácido elágico e ácido gálico, respectivamente. É possível observar que os valores encontram-se distribuídos ao longo da linha (bissetriz do quadrante).

Figura 8 - Valores previstos *versus* os valores de referência (CLAE-DAD) para determinação do teor de ácido elágico em extratos brutos de *L. ferrea* utilizando espectros de UV-Vis.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 9 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido gálico em extratos brutos de *L. ferrea* versus os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de UV-Vis.

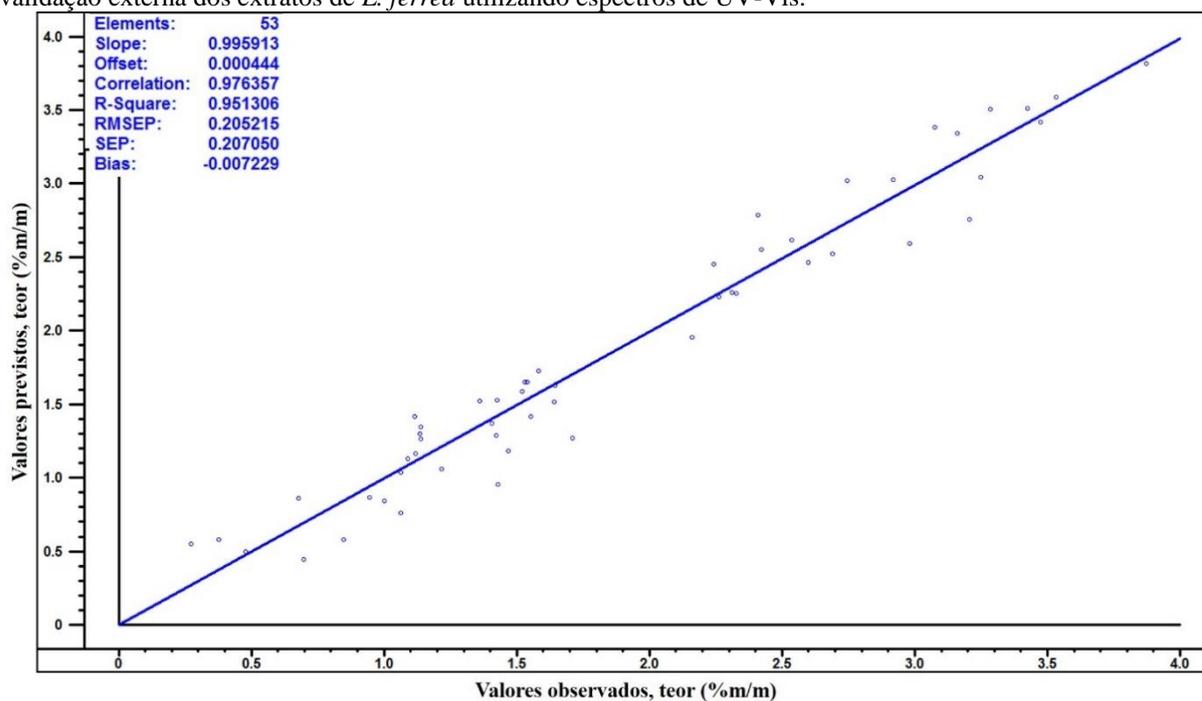


Fonte: Próprio Autor.

Para a realização da etapa de validação externa, 53 (para quantificação de ácido elágico) e 55 amostras (para quantificação de ácido gálico) foram selecionadas anteriormente pelo algoritmo SPXY (GALVÃO et al., 2005) e analisadas quanto às figuras de mérito. Os

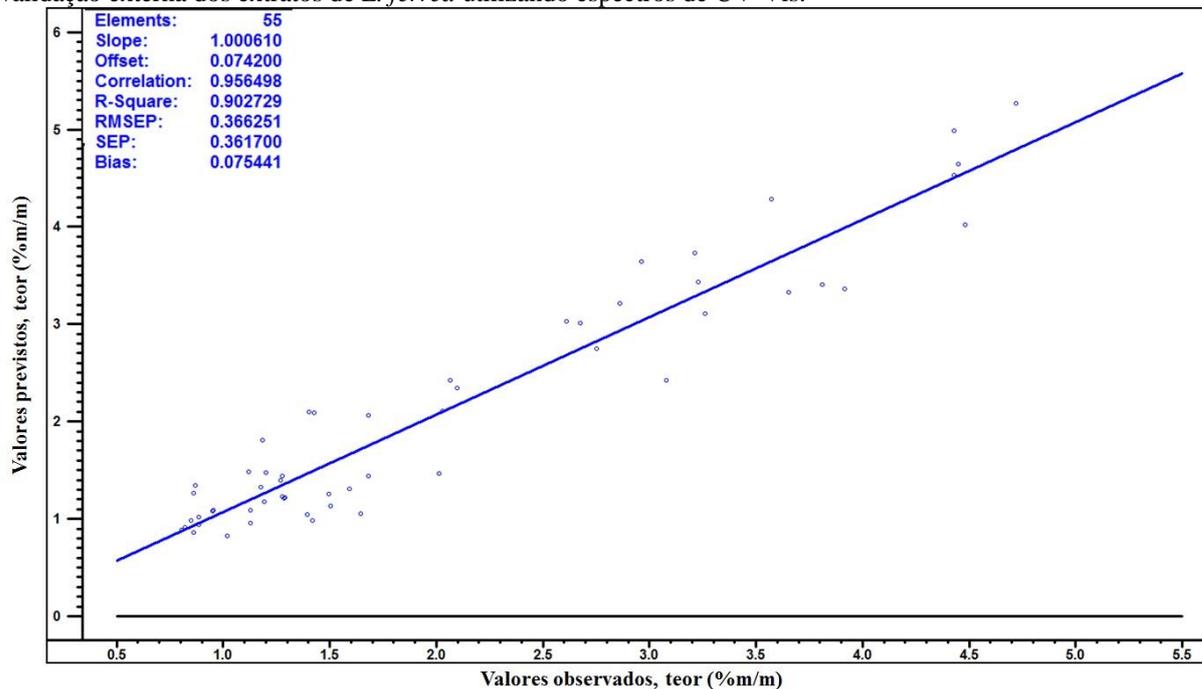
gráficos dos valores previstos no modelo *versus* os valores obtidos pelo método de referência (CLAE-DAD) para os conjuntos de validação do ácido elágico e ácido gálico estão apresentados nas figuras 10 e 11, respectivamente. É possível observar que os valores encontram-se distribuídos ao longo da linha (bissetriz do quadrante).

Figura 10 - Valores previstos *versus* observados para determinação do teor de ácido elágico em amostras de validação externa dos extratos de *L. ferrea* utilizando espectros de UV-Vis.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 11 - Valores previstos *versus* observados para determinação do teor de ácido gálico em amostras de validação externa dos extratos de *L. ferrea* utilizando espectros de UV-Vis.



Fonte: Próprio Autor.

Os valores de RMSEP e *Bias* obtidos foram considerados baixos, em ambos os métodos de quantificação (ácido elágico e ácido gálico), e tais parâmetros podem ser utilizados para avaliar a confiabilidade da metodologia multivariada desenvolvida.

Logo, é possível afirmar que a metodologia analítica por UV-Vis com modelos PLS desenvolvida neste trabalho apresenta viabilidade para a determinação de ácido elágico e ácido gálico em amostras dos frutos de *L. ferrea*. O método proposto pode promover a quantificação de ácido elágico e ácido gálico com confiabilidade. Além disso, pode ser considerado simples e sem os custos do doseamento de polifenóis por UV-Vis, que utiliza reações de oxi-redução, facilitando a determinação destes dois compostos em matrizes vegetais.

5.3.2 Infravermelho Médio

5.3.2.1 Espectros de MIR de ácido elágico e ácido gálico

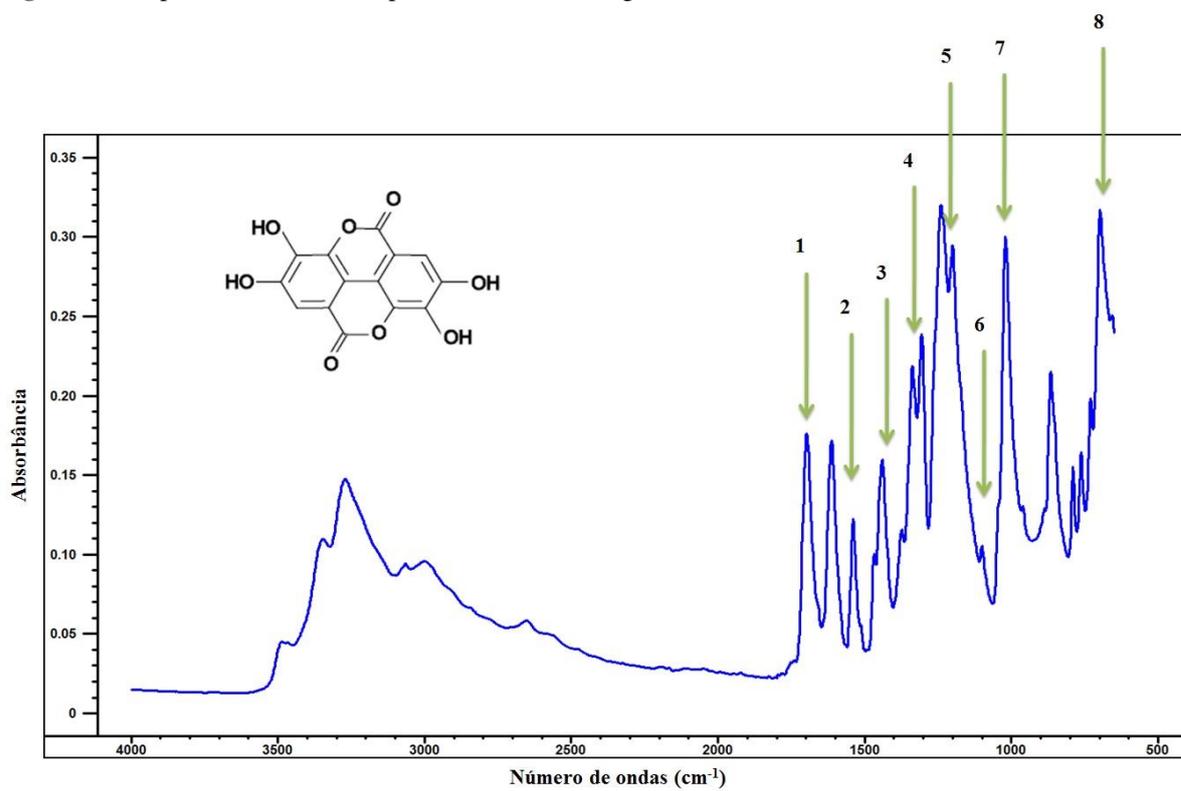
Os espectros obtidos por infravermelho médio para os padrões foram previamente caracterizados de acordo com as vibrações moleculares características de bandas correspondentes. O quadro 1 demonstra as principais regiões que são características de taninos hidrolisáveis, mais especificamente de ácido elágico e ácido gálico (GRASEL; FERRÃO; WOLF). As figuras 12 e 13 apresentam os espectros de infravermelho, com as bandas de maior importância destacadas.

Quadro 1 – Resumo das principais bandas características de ácido gálico e ácido elágico por MIR.

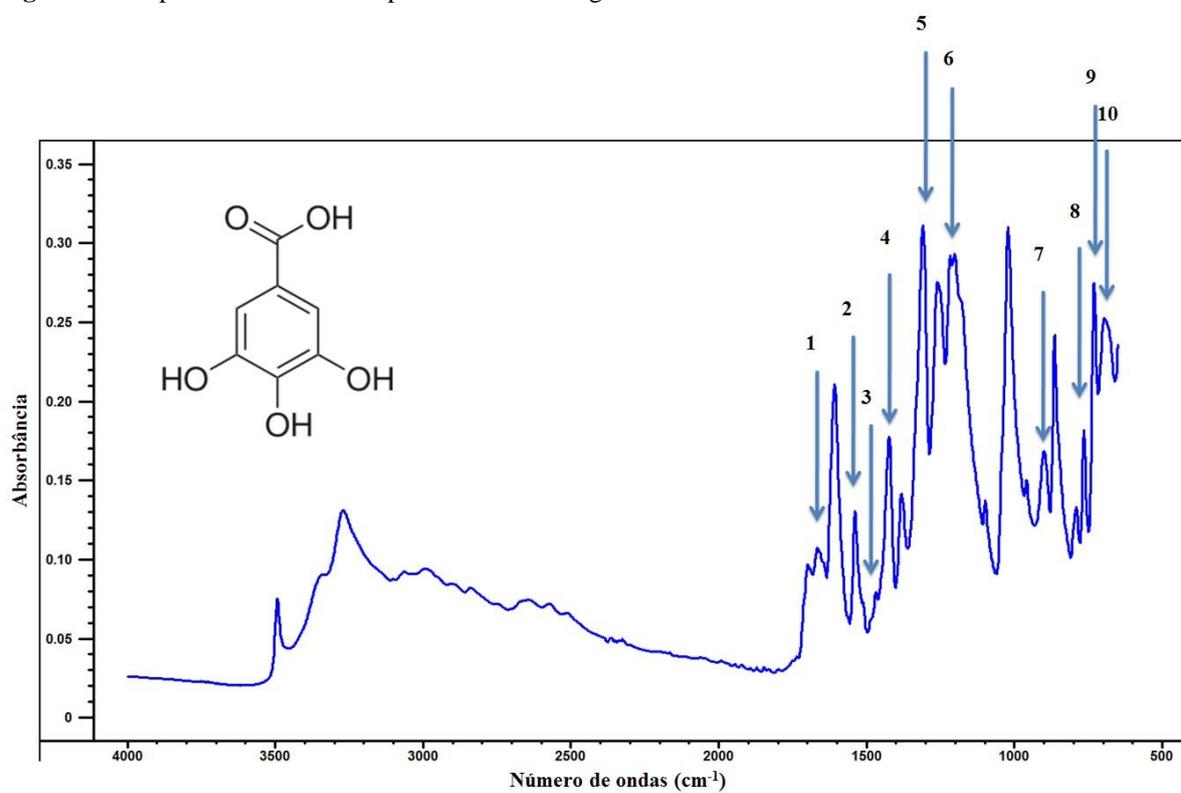
Bandas (cm⁻¹)	Ácido Elágico
1700 ^{(1)*}	C=O estiramento carbonila
1510 ⁽²⁾	C=C estiramento assimétrico aromático
1450 ⁽³⁾	C-H deformação angular aromática assimétrica, C-C estiramento anel B, C-O estiramento aromático
1350 ⁽⁴⁾	C-O estiramento
1195 ⁽⁵⁾	C-O estiramento aromático, C-O-C estiramento éster carbonila, C-H deformação angular aromática simétrica
1115 ⁽⁶⁾	C-O estiramento alifático (éter)
1045 ⁽⁷⁾	C-O estiramento aromático (éster), C-H deformação angular aromática simétrica no plano
645 ⁽⁸⁾	C-H deformação angular aromática fora do plano, C-C-C-O deformação angular
	Ácido Gálico
1700 ⁽¹⁾	C=O estiramento carbonila
1535 ⁽²⁾	C=C estiramento H simétrico aromático m-dihidroxi aromático
1450 ⁽³⁾	C-H deformação angular aromática assimétrica, C-C estiramento anel B, C-O estiramento aromático
1350 ⁽⁴⁾	C-O estiramento
1265 ⁽⁵⁾	C-O estiramento simples ou C-O estiramento carboxila, C-O-C estiramento éster, C-O estiramento anel B
1205 ⁽⁶⁾	OH deformações no plano
865 ⁽⁷⁾	C-H deformação do aromático fora do plano
735 ⁽⁸⁾	Deformação do anel A
670 ⁽⁹⁾	C-O deformação angular fora do plano, C-C-C deformação angular aromática
645 ⁽¹⁰⁾	C-H deformação angular aromática fora do plano, C-C-C-O deformação angular

*Os números entre parêntesis correspondem às bandas indicadas nas figuras abaixo.

Fonte: Próprio Autor.

Figura 12 - Espectro de MIR correspondente ao ácido elágico.

Fonte: Próprio Autor.

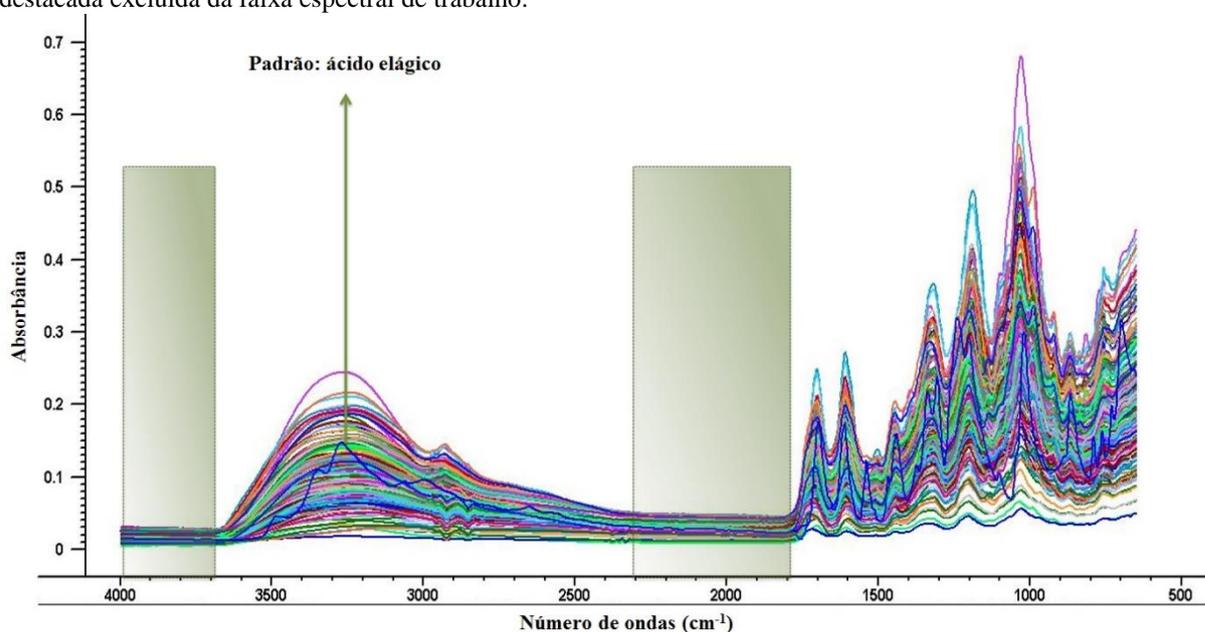
Figura 13 - Espectro de MIR correspondente ao ácido gálico.

Fonte: Próprio Autor.

5.3.2.2 Pré-processamento espectral e avaliação de *outliers*

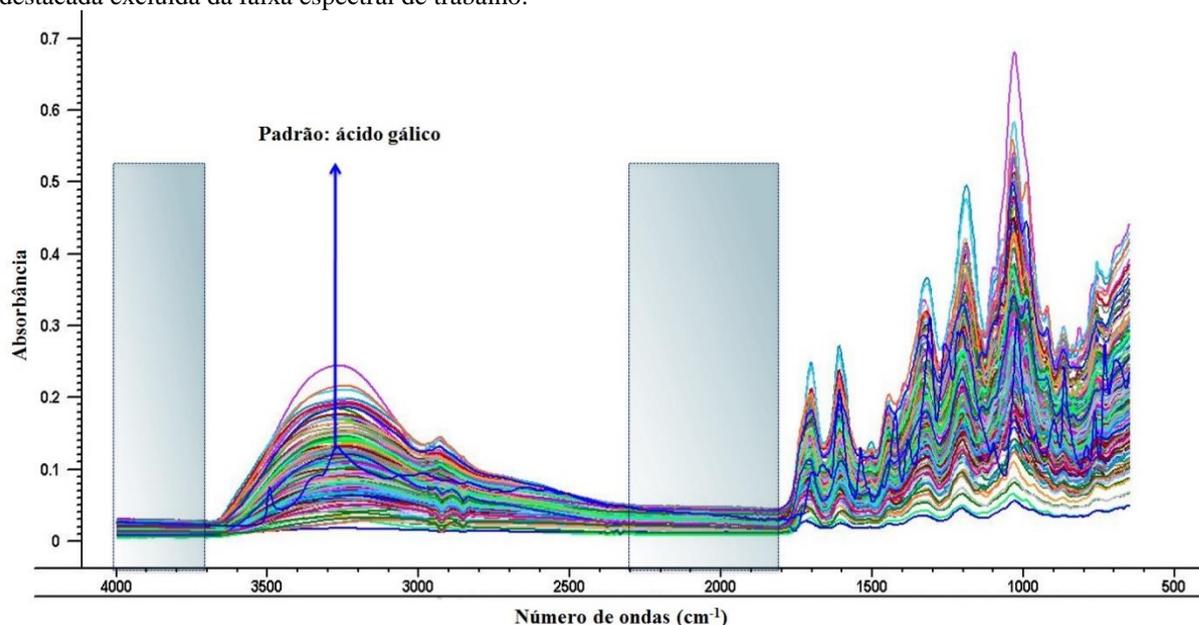
A análise por Espectrofotometria no Infravermelho Médio foi realizada utilizando o acessório UATR, cuja fundamentação da técnica é requisitar um preparo mínimo da amostra, para que a análise seja rápida e fácil. Nesse sentido, os espectros das amostras e dos padrões foram obtidos e estão representados nas figuras 14 e 15, respectivamente para o ácido elágico e ácido gálico. Como pode ser observado existem regiões que acrescentam poucas informações para as amostras, além disso, quando os espectros das amostras e padrões foram sobrepostos, as regiões em destaque não seriam importantes para os padrões.

Figura 14 - Espectros de MIR sem pré-tratamento para as amostras e para o padrão de ácido elágico, com a área destacada excluída da faixa espectral de trabalho.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 15 - Espectros de MIR sem pré-tratamento para as amostras e para o padrão ácido gálico, com a área destacada excluída da faixa espectral de trabalho.



Fonte: Próprio Autor.

Para verificar a importância das regiões destacadas na construção dos modelos, foram realizadas análises de PLS contendo toda a faixa espectral, denominada Faixa 1 (4000 a 400 cm^{-1}) e sem a faixa em destaque, denominada Faixa 2 (4000 a 3700 cm^{-1} e 2298 a 1798 cm^{-1}).

Foram realizadas diversas etapas de pré-tratamentos nos espectros (SNV, MSC e derivadas). Todos os pré-processamentos envolvendo derivadas foram realizados utilizando polinômio de segunda ordem e filtro de Savitzky-Golay. Os resultados dos principais modelos PLS estão listados nas tabelas 7 e 8, respectivamente para o ácido elágico e ácido gálico. Aqueles que estão destacados, foram selecionados por apresentarem, em geral, melhores valores das figuras de mérito (R^2 , RMSECV, Bias e Variáveis latentes).

Tabela 7 - Valores de R², RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico na calibração por MIR.

Pré-processamentos	Todas as amostras			
	R ²	RMSECV	Bias	VL
SP_FAIXA 1	0,73	0,52	-0,009270	12
FAIXA 1_MSC	0,82	0,43	0,001809	11
FAIXA 1_SNV	0,81	0,43	0,003325	11
FAIXA 1_1d_3pts	0,75	0,50	0,004111	7
FAIXA 1_1d_5pts	0,74	0,51	0,004628	7
FAIXA 1_1d_7pts	0,74	0,51	0,004903	8
FAIXA 1_1d_3pts_MSC	0,85	0,38	0,004033	8
FAIXA 1_1d_3pts_SNV	0,85	0,38	0,001988	8
SP_FAIXA 2	0,73	0,52	-0,001274	12
FAIXA 2_MSC	0,81	0,43	-0,001198	11
FAIXA 2_SNV	0,81	0,43	0,002795	11
FAIXA 2_1d_3pts	0,75	0,50	0,004372	7
FAIXA 2_1d_5pts	0,75	0,51	0,004554	7
FAIXA 2_1d_7pts	0,74	0,51	0,004306	8
FAIXA 2_1d_3pts_MSC	0,85	0,39	0,002829	8
FAIXA 2_1d_3pts_SNV	0,85	0,38	0,001549	8

SP: Sem pré-processamento; SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada; 3pts: janela de 3 pontos; 5 pts: janela de 5 pontos; 7pts: janela de 7 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 8 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico na calibração por MIR.

Pré-processamentos	R^2	RMSECV	Bias	VL
SP_FAIXA 1	0,70	0,84	-0,004884	14
FAIXA 1_MSC	0,72	0,81	-0,004845	11
FAIXA 1_SNV	0,72	0,81	-0,007584	11
FAIXA 1_1d_3pts	0,71	0,82	0,002543	9
FAIXA 1_1d_5pts	0,72	0,81	-0,009041	11
FAIXA 1_1d_7pts	0,69	0,85	0,004037	9
FAIXA 1_1d_3pts_MSC	0,75	0,76	-0,008956	8
FAIXA 1_1d_5pts_MSC	0,75	0,76	-0,011207	9
FAIXA 1_1d_7pts_MSC	0,72	0,81	-0,003308	6
FAIXA 1_1d_3pts_SNV	0,76	0,75	-0,008337	8
FAIXA 1_1d_5pts_SNV	0,75	0,77	-0,007660	8
FAIXA 1_1d_7pts_SNV	0,72	0,81	-0,002275	6
SP_FAIXA 2	0,70	0,84	-0,004069	14
FAIXA 2_MSC	0,70	0,85	-0,005153	8
FAIXA 2_SNV	0,75	0,76	-0,001388	13
FAIXA 2_1d_3pts	0,71	0,83	0,001726	9
FAIXA 2_1d_5pts	0,70	0,84	0,002717	9
FAIXA 2_1d_7pts	0,69	0,86	0,002931	9
FAIXA 2_1d_3pts_MSC	0,74	0,78	-0,008306	7
FAIXA 2_1d_5pts_MSC	0,75	0,76	-0,010379	9
FAIXA 2_1d_7pts_MSC	0,71	0,82	-0,002571	6
FAIXA 2_1d_3pts_SNV	0,76	0,75	-0,012209	8
FAIXA 2_1d_5pts_SNV	0,76	0,75	-0,009614	10
FAIXA 2_1d_7pts_SNV	0,72	0,82	-0,001626	6

SP: Sem pré-processamento; SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada; 3pts: janela de 3 pontos; 5 pts: janela de 5 pontos; 7pts: janela de 7 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

A avaliação de *outliers* foi realizada com os modelos empregando os melhores pré-processamentos destacados, devido aos melhores valores observados para as figuras de mérito. A partir dos gráficos de *leverage*, foi possível identificar e excluir os *outliers*. Após a exclusão do(s) *outlier(s)*, uma nova calibração foi realizada e os valores do RMSECV calculados, sendo comparados os valores obtidos antes e depois da exclusão da(s) amostra(s)

para avaliar o resultado da remoção. A partir deste resultado, os modelos foram julgados de forma definitiva. Com base na redução no valor de RMSECV e melhores valores de R^2 , foram selecionados os modelos descritos nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico, com todas as amostras e após retirada dos *outliers*, para MIR.

Pré-processamento	Após retirada de <i>outliers</i>			
	R^2	RMSECV	Bias	VL
FAIXA 1_1d_3pts	0,85	0,35	0,00252	9
FAIXA 1_1d_3pts_MSC	0,90	0,31	0,005892	8
FAIXA 1_1d_3pts_SNV	0,86	0,36	0,002454	5
FAIXA 2_1d_3pts	0,84	0,38	0,005482	9
FAIXA 2_1d_3pts_MSC	0,86	0,36	0,001885	4
FAIXA 2_1d_3pts_SNV	0,87	0,34	0,002587	5

Faixa 1: 190 a 500 nm; Faixa 2: 190 a 390 nm; SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada; 3pts: janela de 3 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 10 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico, com todas as amostras e após retirada dos *outliers*, para MIR.

Pré-processamento	Após retirada de <i>outliers</i>			
	R^2	RMSECV	Bias	VL
FAIXA 1_1d_3pts_MSC	0,85	0,53	-0,01339	8
FAIXA 1_1d_7pts_MSC	0,85	0,53	-0,02095	8
FAIXA 1_1d_3pts_SNV	0,85	0,53	-0,01468	8
FAIXA 1_1d_5pts_SNV	0,85	0,53	-0,01240	8
FAIXA 1_1d_7pts_SNV	0,86	0,52	-0,00565	9
FAIXA 2_MSC	0,81	0,60	0,00076	11
FAIXA 2_1d_3pts_MSC	0,82	0,58	0,00590	8
FAIXA 2_1d_7pts_MSC	0,83	0,56	-0,00308	9
FAIXA 2_1d_3pts_SNV	0,82	0,59	-0,00132	7
FAIXA 2_1d_7pts_SNV	0,85	0,54	-0,00401	10

Faixa 1: 190 a 500 nm; Faixa 2: 190 a 390 nm; SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada Savitzky Golay; 3pts: janela de 3 pontos, 5pts: janela de 5 pontos; 7pts: janela de 7 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

5.3.2.3 Determinação dos conjuntos de calibração e validação externa

Na construção dos modelos PLS os conjuntos de dados foram separados em amostras de calibração e validação externa, sendo utilizado o algoritmo SPXY (GALVÃO et al., 2005). O conjunto foi composto de 129 amostras de calibração e 56 amostras de validação externa, para o ácido elágico; e 132 amostras de calibração e 57 amostras de validação externa, para o ácido gálico.

5.3.2.4 Construção do modelo PLS

Por fim, foram construídos os modelos definitivos de regressão, sendo realizado o teste de significância das variáveis espectrais (algoritmo de Jack-knifing (JK)), para observar a melhora no desempenho dos modelos de calibração (CHIOQUINE; HJALMARSSON, 2009).

Os valores de RMSECV e RMSEP obtidos, entre os modelos, foram comparados utilizando F, no nível de 95% de confiança. De acordo com os dados do modelo, a análise com base nas variáveis espectrais mais importantes para o modelo, evidenciou diferença nos valores de algumas das figuras de mérito.

Em relação ao ácido elágico, o modelo escolhido foi aquele que apresentou redução no número de variáveis latentes e no valor do *Bias*, uma vez que os valores de RMSECV e RMSEP não apresentaram diferença estatística quando analisados por teste F. Desta forma, prosseguiu-se com as análises utilizando a faixa espectral reduzida com pré-processamento de primeira derivada de Savitzky-Golay com janela de 3 pontos, seguido de variação normal padrão (SNV) e adicionado do algoritmo de Jack-knifing. Quanto ao modelo construído para o ácido gálico, optou-se por trabalhar com toda faixa espectral com pré-processamento de primeira derivada de Savitzky-Golay com janela de 5 pontos, seguido de variação normal padrão (SNV), pois apresentou melhores valores de R^2 , número de variáveis latentes e *Bias* (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de R², RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico e ácido gálico nas etapas de calibração e validação.

Padrão	Pré-processamento	Calibração				Validação		
		R ²	RMSECV	Bias	VL	R ²	RMSEP	Bias
AE	FAIXA 1_1d_3pts_SNV	0,85	0,38	0,00623	5	0,83	0,37	0,04388
	FAIXA 1_1d_3pts_SNV_JK	0,86	0,37	0,00211	4	0,85	0,34	0,01583
	FAIXA 2_1d_3pts_MSC	0,87	0,37	0,00237	4	0,85	0,33	-0,04889
	FAIXA 2_1d_3pts_MSC_JK	0,87	0,37	0,00219	4	0,85	0,33	-0,05023
	FAIXA 2_1d_3pts_SNV	0,86	0,36	0,00351	5	0,86	0,35	-0,10615
	FAIXA 2_1d_3pts_SNV_JK	0,85	0,37	0,00024	3	0,86	0,35	-0,07693
AG	FAIXA 1_1d_3pts_MSC	0,82	0,60	-0,004223	7	0,84	0,46	0,126666
	FAIXA 1_1d_3pts_MSC_JK	0,84	0,56	-0,000296	6	0,82	0,49	0,149578
	FAIXA 1_1d_7pts_MSC	0,84	0,57	0,000875	9	0,87	0,46	0,100635
	FAIXA 1_1d_7pts_MSC_JK	0,86	0,53	0,001637	6	0,88	0,43	0,092621
	FAIXA 1_1d_3pts_SNV	0,83	0,58	-0,001671	8	0,85	0,49	0,091862
	FAIXA 1_1d_3pts_SNV_JK	0,85	0,54	0,001373	6	0,85	0,48	0,092202
	FAIXA 1_1d_5pts_SNV	0,84	0,56	-0,001405	8	0,85	0,50	0,081993
	FAIXA 1_1d_5pts_SNV_JK	0,84	0,56	-0,002885	5	0,88	0,44	0,073637
	FAIXA 2_1d_3pts_MSC	0,81	0,62	-0,007001	7	0,69	0,67	0,264434
	FAIXA 2_1d_3pts_MSC_JK	0,80	0,63	-0,000305	3	0,74	0,59	0,267900
	FAIXA 2_1d_3pts_SNV	0,83	0,59	-0,007488	8	0,80	0,51	0,067564
	FAIXA 2_1d_3pts_SNV_JK	0,84	0,57	0,002210	5	0,80	0,47	0,058288

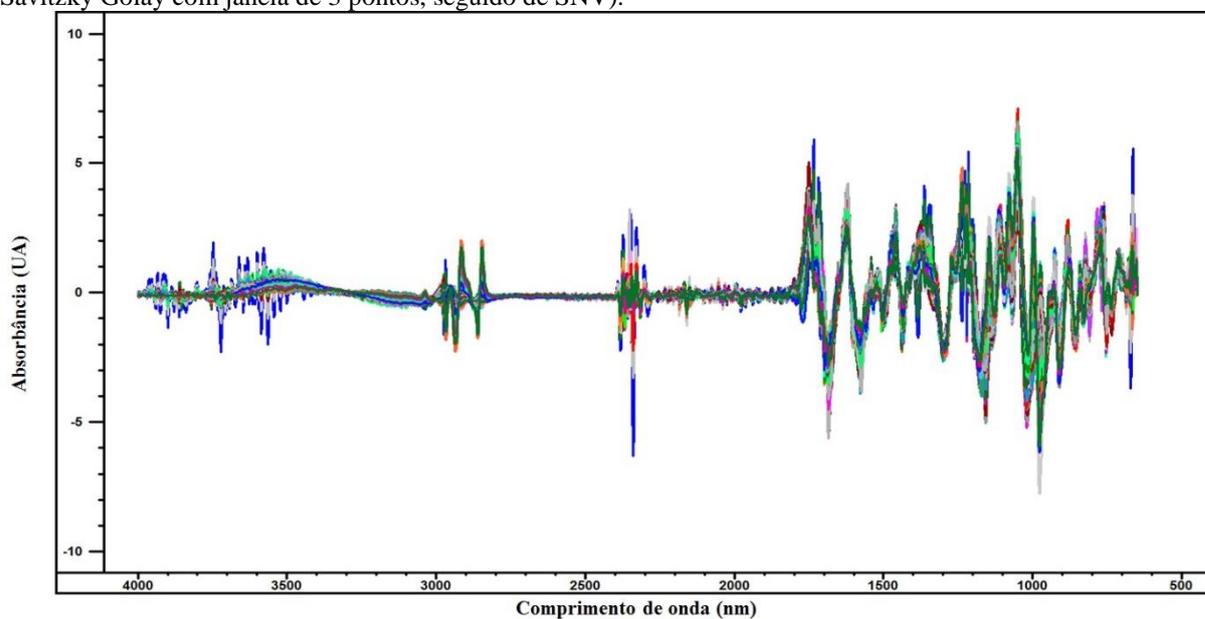
Faixa 1: 190 a 500 nm; Faixa 2: 190 a 390 nm; SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada Savitzky Golay; 3pts: janela de 3 pontos, 5pts: janela de 5 pontos; 7pts: janela de 7 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

Em resumo, foram selecionados os modelos **FAIXA 2_1d_3pts_SNV_JK** e **FAIXA 1_1d_5pts_SNV_JK**, respectivamente para ácido elágico e ácido gálico, de acordo com os menores valores das figuras de mérito: número de variáveis latentes e *Bias*. Ambos foram escolhidos com a adição do algoritmo de Jack-knifing por apresentarem redução no número de variáveis latentes quando comparados antes e após a aplicação do algoritmo.

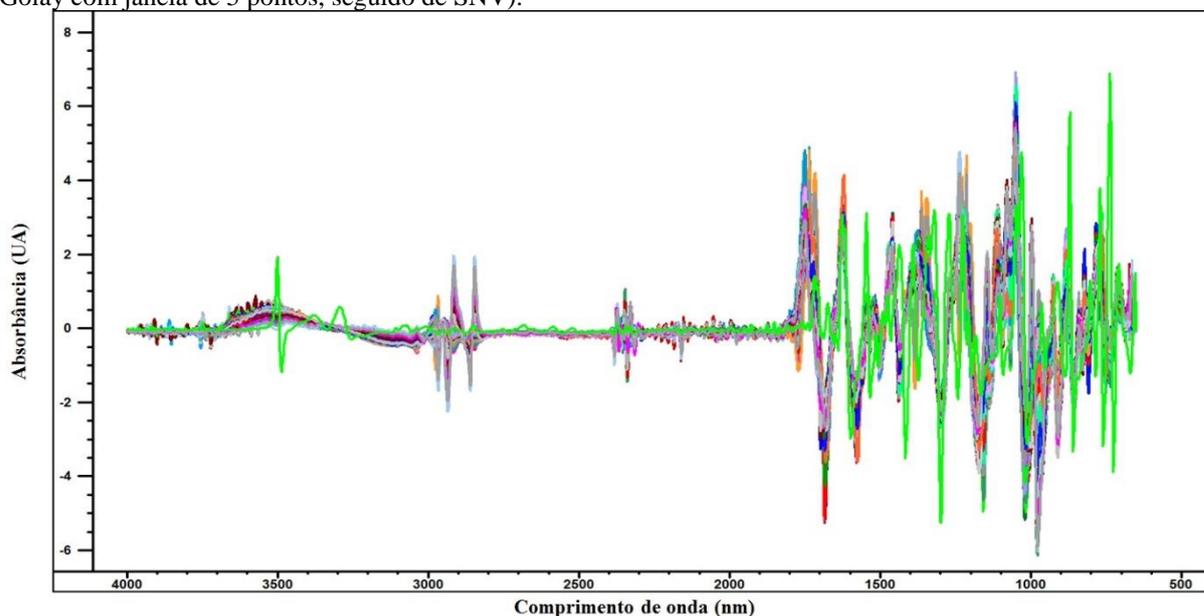
A figura 16 mostra os espectros após o pré-processamento selecionado na avaliação do modelo do ácido elágico; e, a figura 17 após o pré-processamento selecionado para o ácido gálico.

Figura 16 - Espectros de todas as amostras e do ácido elágico após pré-processamento (primeira derivada de Savitzky Golay com janela de 3 pontos, seguido de SNV).



Fonte: Próprio Autor.

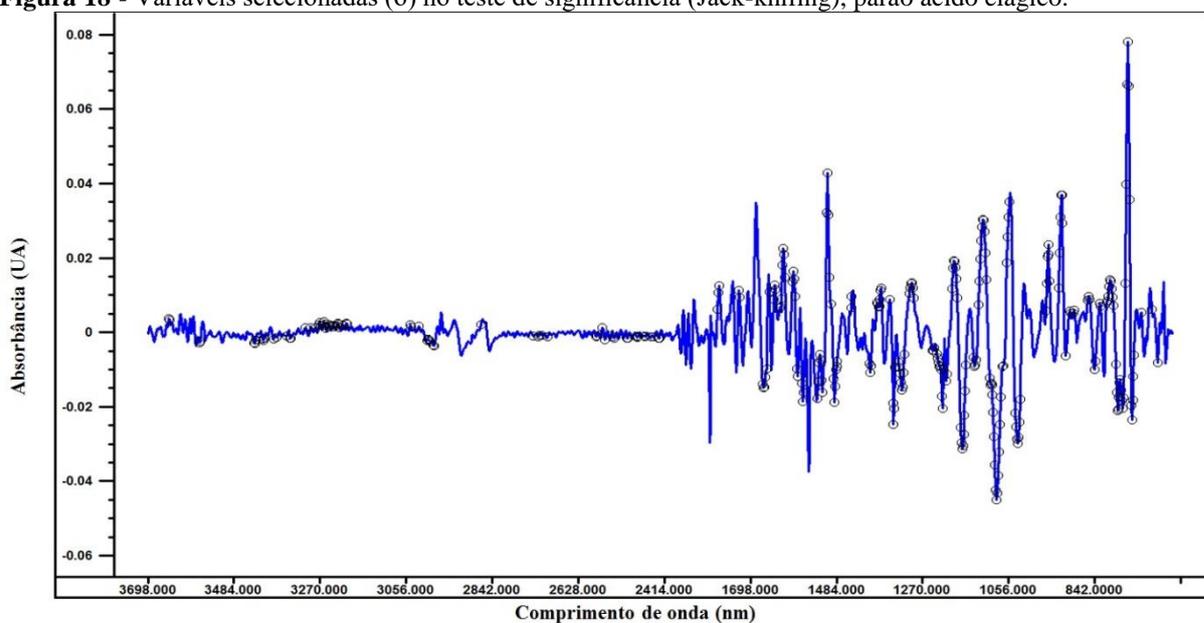
Figura 17 - Espectros de todas as amostras ácido gálico após pré-processamento (primeira derivada de Savitzky Golay com janela de 5 pontos, seguido de SNV).



Fonte: Próprio Autor.

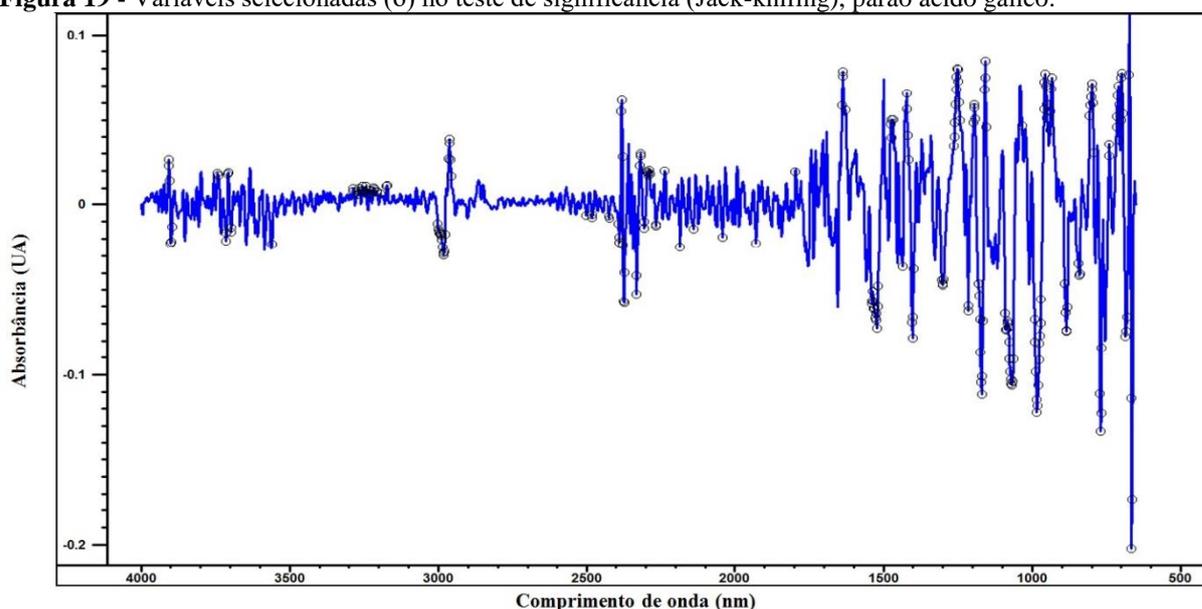
As figuras 18 (ácido elágico) e 19 (ácido gálico) representam as variáveis espectrais que apresentam significância para a construção dos modelos, após aplicação do algoritmo de Jack-knifing.

Figura 18 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), parao ácido elágico.



Fonte: Próprio Autor.

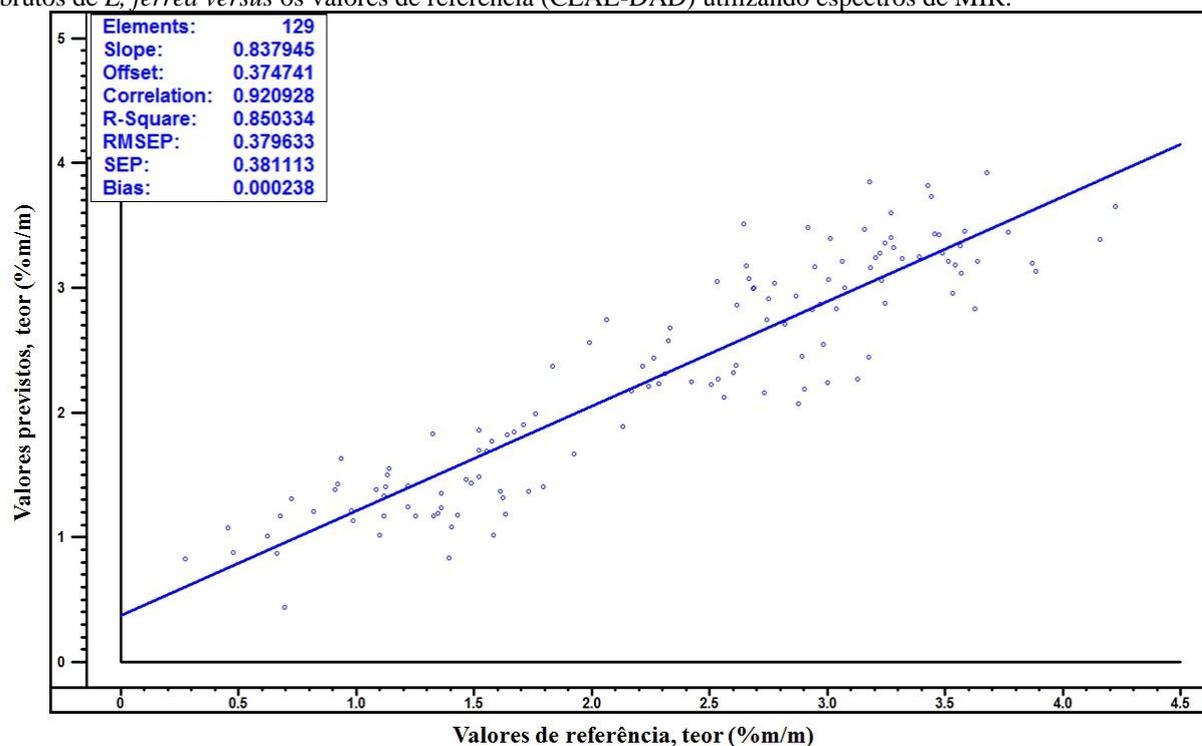
Figura 19 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), para ácido gálico.



Fonte: Próprio Autor.

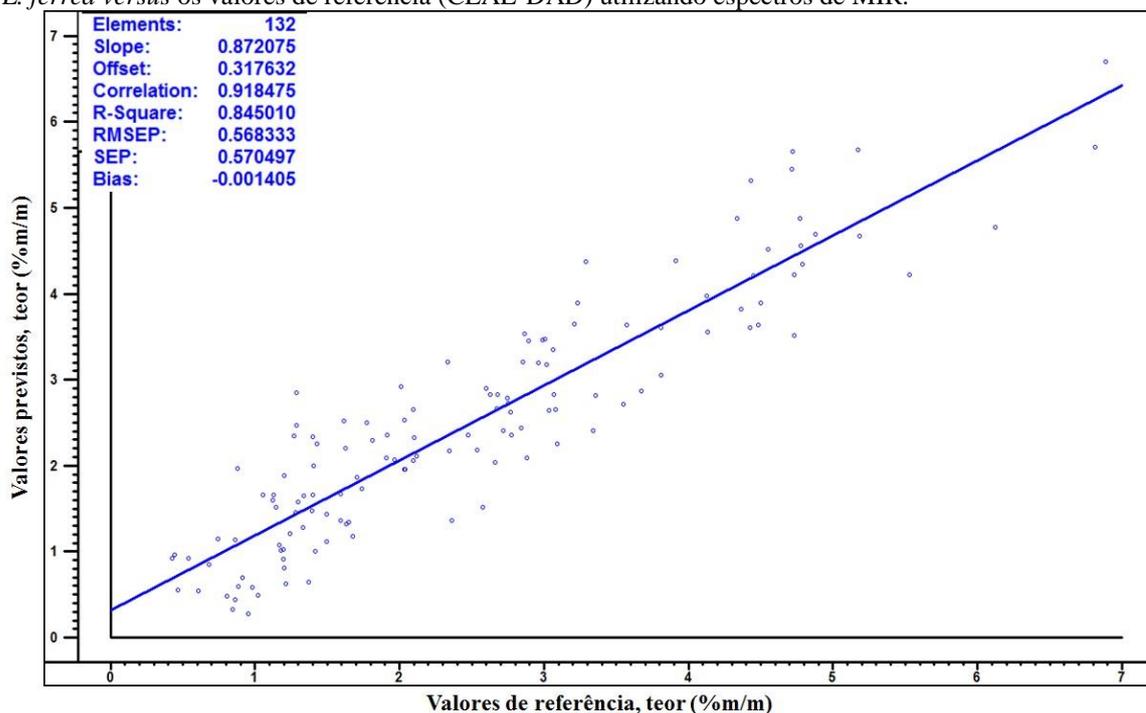
As figuras, 20 e 21, mostram os gráficos obtidos através da regressão por PLS-JK dos valores previstos no modelo *versus* os valores obtidos pelo método de referência (CLAE-DAD) para os conjuntos de calibração do ácido elágico e ácido gálico.

Figura 20 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido elágico em extratos brutos de *L. ferrea* *versus* os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de MIR.



Fonte: Próprio Autor.

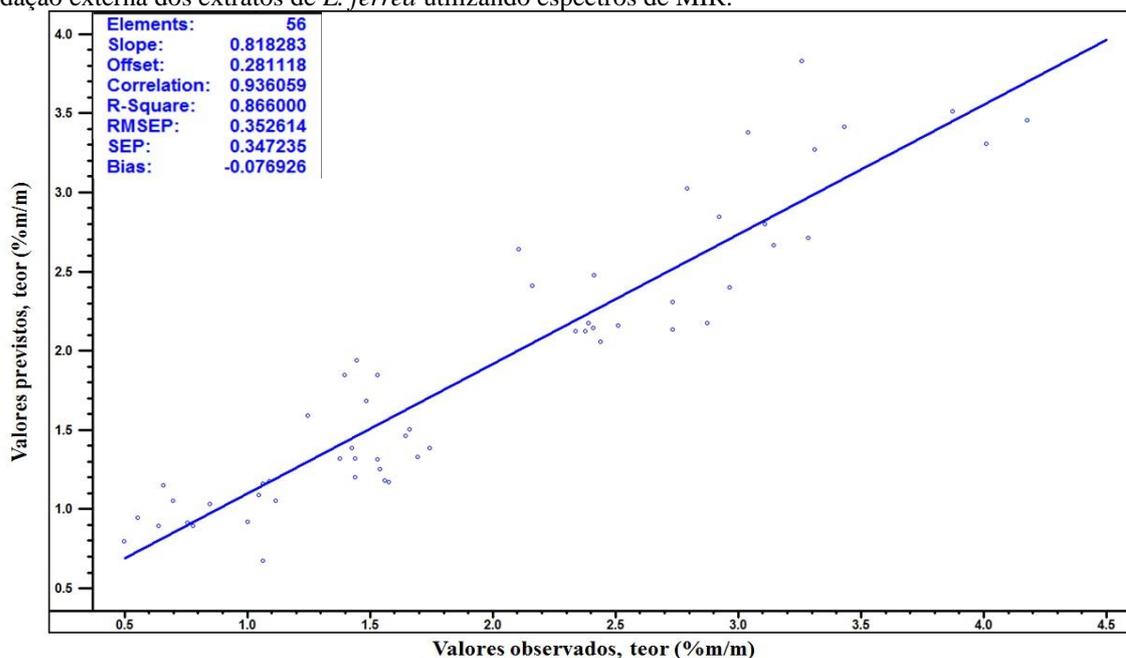
Figura 21 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido gálico em extratos brutos de *L. ferrea* versus os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de MIR.



Fonte: Próprio Autor.

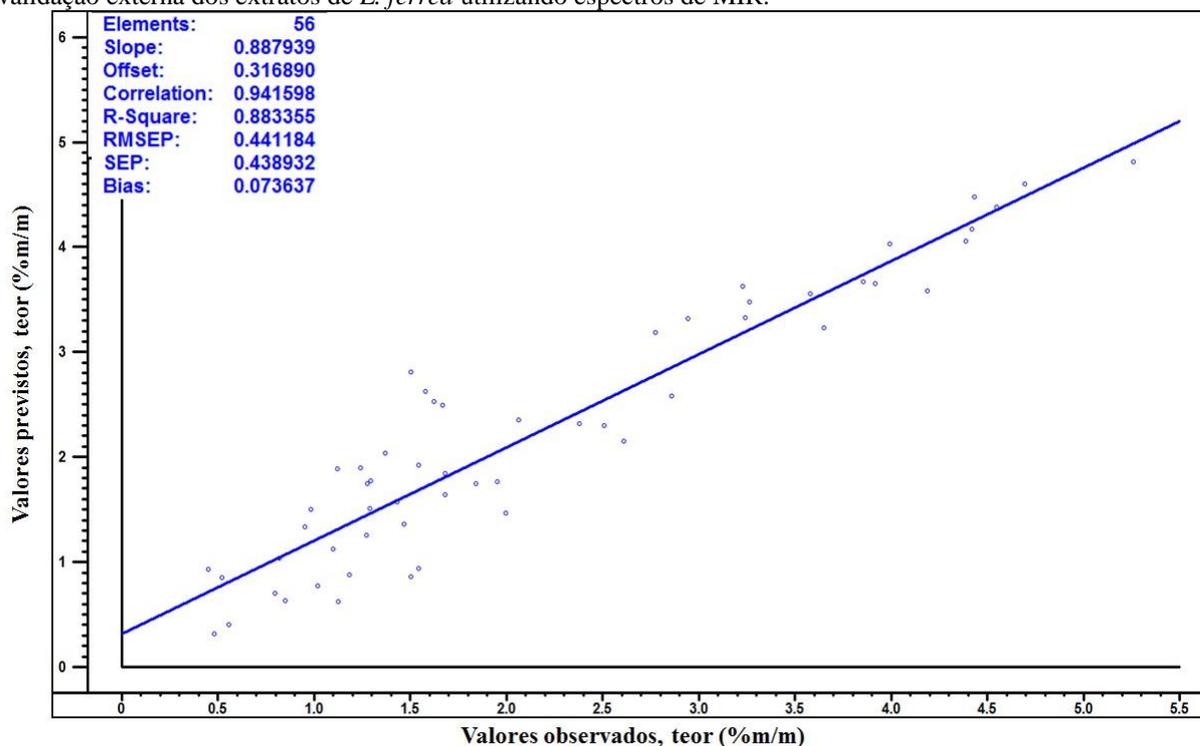
As Figuras 22 e 23 apresentam o gráfico dos valores previstos no modelo *versus* os valores obtidos pelo método de referência (CLAE-DAD) para os conjuntos de validação externa para a determinação do ácido elágico e ácido gálico, respectivamente.

Figura 22 - Valores previstos *versus* observados para determinação do teor de ácido elágico em amostras de validação externa dos extratos de *L. ferrea* utilizando espectros de MIR.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 23 - Valores previstos *versus* observados para determinação do teor de ácido gálico em amostras de validação externa dos extratos de *L. ferrea* utilizando espectros de MIR.



Fonte: Próprio Autor.

Kyrleou e colaboradores (2015) realizaram análise de espectroscopia de infravermelho para quantificação simultaneamente compostos fenólicos e taninos condensados em sementes de uva, e encontraram valores de RMSEP entre 3,97% e 10,13%, e afirmam a cerca da robustez da metodologia desenvolvida.

O método aqui desenvolvido apresentou valores de RMSEP iguais a 0,35% m/m e 0,44% m/m, com relação a quantificação de ácido elágico e ácido gálico, respectivamente, em extratos brutos dos frutos de *L. ferrea*. Dessa forma, é possível inferir que os valores de RMSEP foram baixos quando comparados com dados da literatura, considerando a faixa de concentração avaliada (0,5 a 5,5% m/m).

5.3.3 Infravermelho Próximo

5.3.3.1 Espectros de NIR de ácido elágico e ácido gálico

Os espectros obtidos por infravermelho próximo para os padrões foram previamente caracterizados de acordo com as vibrações moleculares características de bandas correspondentes. O quadro 2 demonstra as principais regiões que são características de taninos hidrolisáveis, mais especificamente de ácido elágico e ácido gálico. As figuras 24 e 25 demonstram as principais regiões que são características dos monômeros, ácido elágico e ácido gálico.

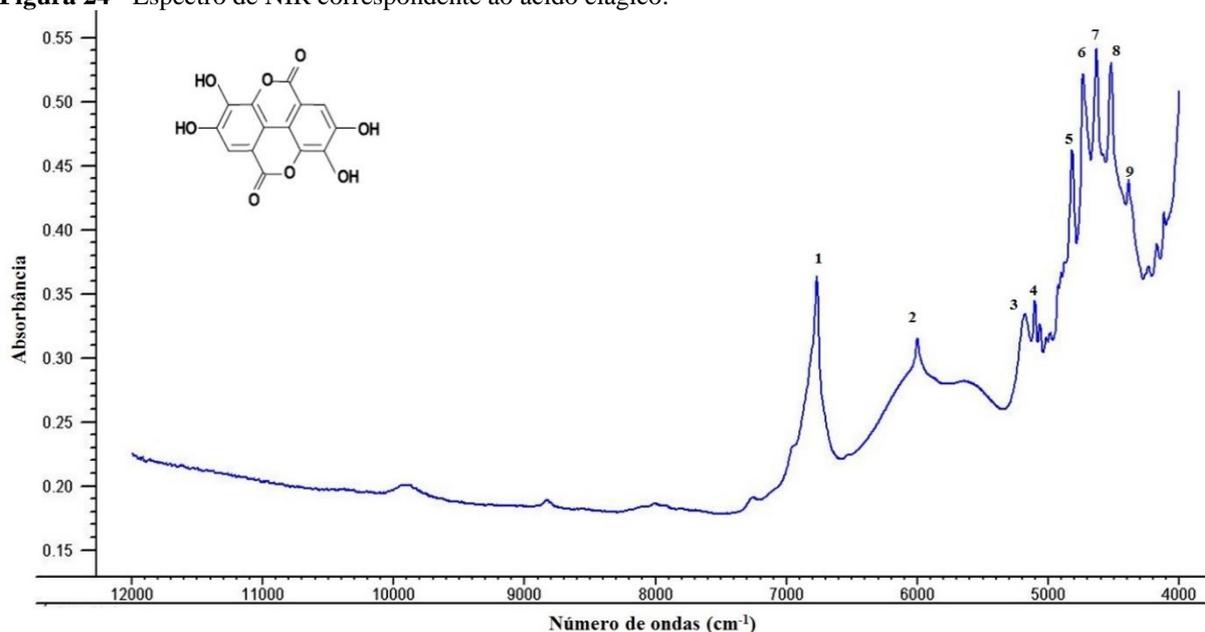
Quadro 2 – Resumo das principais bandas características de ácido gálico e ácido elágico por NIR.

Bandas (cm⁻¹)	Ácido Elágico e Ác gálico
6685 ^{(1)*}	Primeiro sobretom de fenóis (-OH)
6000 ⁽²⁾	-CH
5100 ⁽³⁾	Estiramento -OH e deformação -OH
5000 ⁽⁴⁾	C=O
4800 ⁽⁵⁾	Região de sobretom C=O
4700 ⁽⁶⁾	Região de sobretom C=O
4600 ⁽⁷⁾	Região de sobretom C=O
4500 ⁽⁸⁾	Região de sobretom C=O
4300 ⁽⁹⁾	Estiramento -CH e deformação -CH, combinação de -CH ₂ -CH ₃

*Os números entre parêntesis correspondem às bandas indicadas nas figuras abaixo.

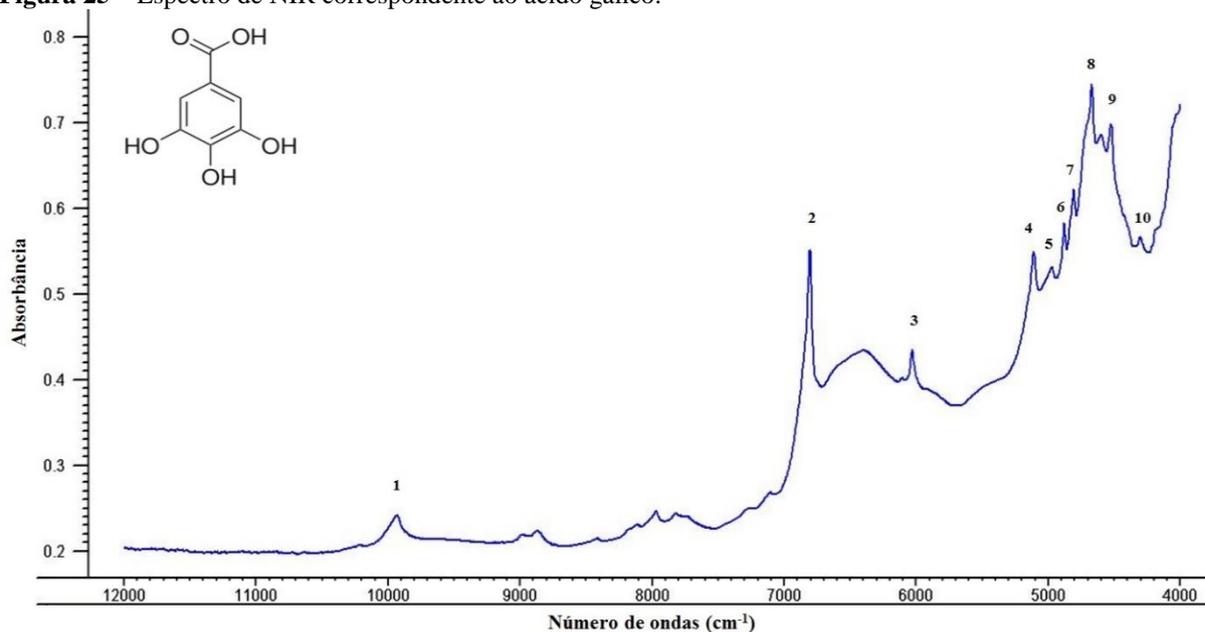
Fonte: Próprio Autor.

Figura 24 - Espectro de NIR correspondente ao ácido elágico.



Fonte: Próprio autor.

Figura 25 – Espectro de NIR correspondente ao ácido gálico.

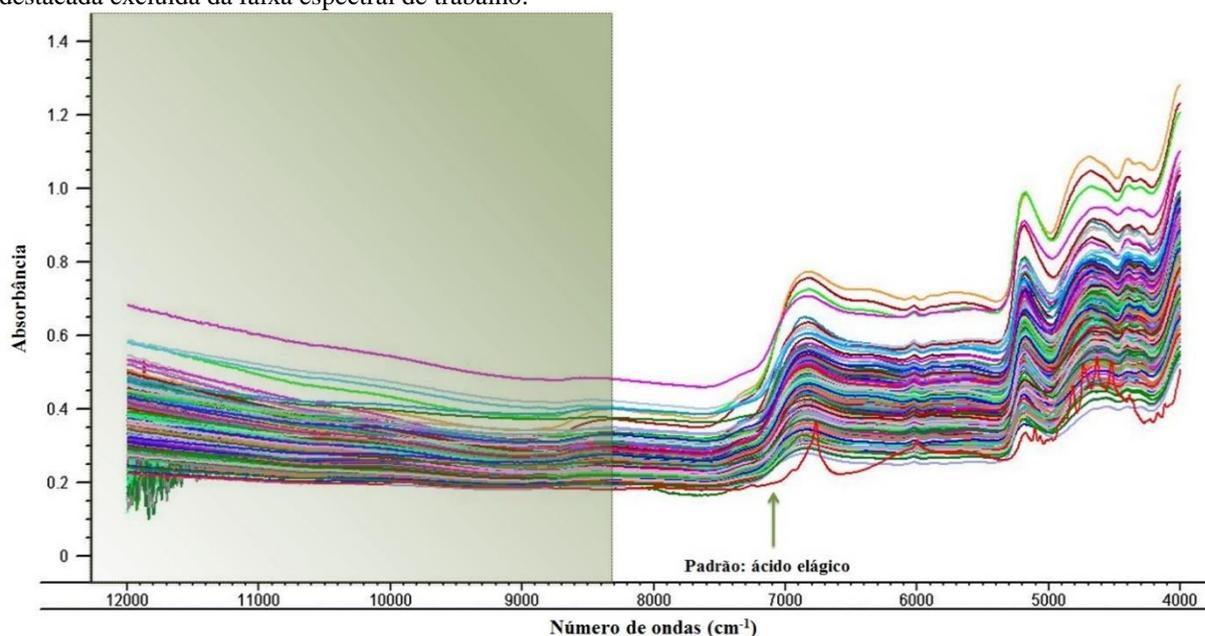


Fonte: Próprio autor.

5.3.3.2 Pré-processamento espectral e avaliação de *outliers*

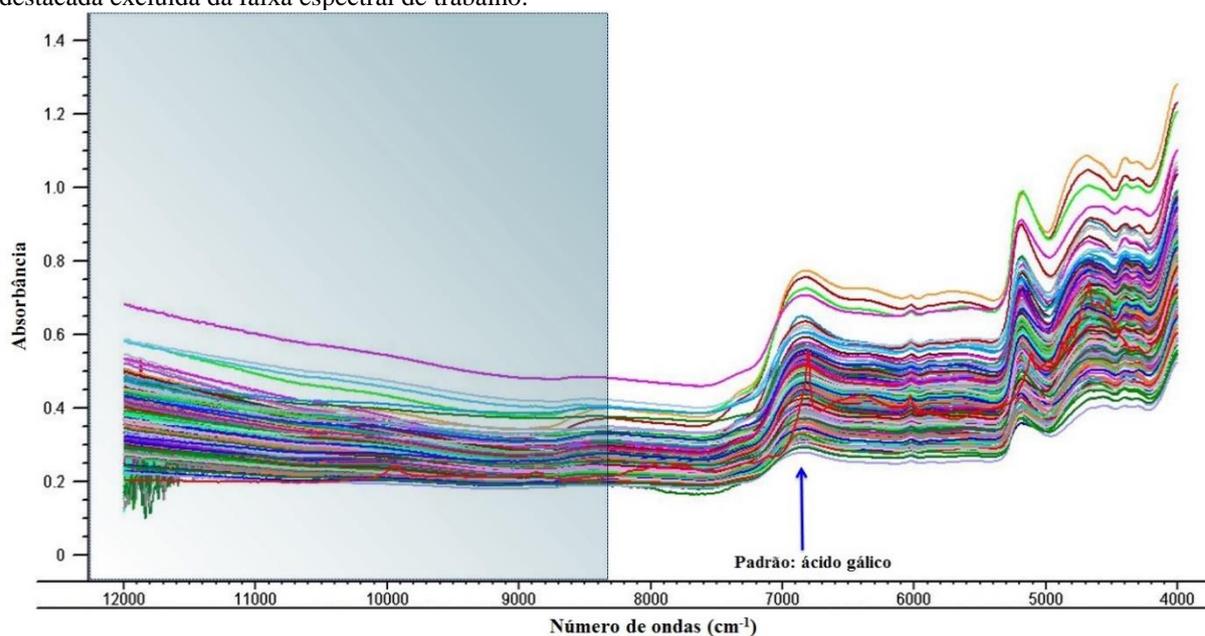
Para verificar a importância das regiões destacadas na construção dos modelos, foram realizadas análises de PLS contendo a faixa espectral sem a faixa em destaque, denominada (7500 a 4000 cm⁻¹). As figuras 26 e 27 demonstram os espectros obtidos para as amostras e os padrões de ácido elágico e ácido gálico respectivamente.

Figura 26 - Espectros de NIR sem pré-tratamento para as amostras e para o padrão de ácido elágico, com a área destacada excluída da faixa espectral de trabalho.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 27 - Espectros de NIR sem pré-tratamento para as amostras e para o padrão de ácido gálico, com a área destacada excluída da faixa espectral de trabalho.



Fonte: Próprio Autor.

Assim como para os modelos de UV e MIR, antes de iniciar a construção dos modelos definitivos de calibração, foram realizadas diversas etapas de pré-tratamentos nos espectros (SNV, MSC e derivadas). Todos os pré-processamentos que envolvem derivadas foram realizados utilizando polinômio de segunda ordem e filtro de Savitzky-Golay. Os resultados dos principais modelos PLS estão listados nas tabelas 12 e 13, respectivamente para o ácido

elágico e ácido gálico. Aqueles que estão destacados, foram selecionados por apresentarem, em geral, melhores valores das figuras de mérito (R^2 , RMSECV, Bias e Variáveis latentes).

Tabela 12 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico na calibração por NIR.

Pré-processamento	R^2	RMSECV	Bias	VL
Sem pré-processamento	0,75	0,40	-2,95e-06	14
MSC	0,71	0,43	-3,14e-06	10
SNV	0,73	0,42	-2,78e-07	11
1d_3pts	0,80	0,36	8,23e-08	8
1d_7pts	0,79	0,37	2,95e-08	9
1d_21pts	0,68	0,46	-0,0025	10
1d_3pts_MSC	0,74	0,41	3,74e-04	6
1d_7pts_MSC	0,77	0,39	2,32e-08	7
1d_21pts_MSC	0,66	0,47	0,00128	7
1d_3pts_SNV	0,81	0,35	5,87e-08	8
1d_7pts_SNV	0,76	0,39	2,78e-08	7
1d_21pts_SNV	0,71	0,43	-2,38e-08	6

SP: Sem pré-processamento; SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada; 3pts: janela de 3 pontos; 7pts: janela de 7 pontos; 21pts: janela de 21 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 13 - Valores de R^2 , RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico na calibração por NIR.

Pré-processamento	R^2	RMSECV	Bias	VL
Sem pré-processamento	0,61	0,85	4,40e-06	11
MSC	0,76	0,74	4,13e-06	14
SNV	0,74	0,77	3,33e-07	12
1d_3pts	0,67	0,87	-3,42e-08	6
1d_7pts	0,74	0,78	-2,26e-07	9
1d_21pts	0,70	0,83	-,154e-08	10
1d_3pts_MSC	0,70	0,84	-1,47e-07	6
1d_7pts_MSC	0,71	0,82	-1,069e-07	7
1d_21pts_MSC	0,67	0,87	-2,62e-08	7
1d_3pts_SNV	0,70	0,84	-1,47e-07	6
1d_7pts_SNV	0,71	0,82	-5,29e-08	7
1d_21pts_SNV	0,70	0,83	-1,54e-08	10

SP: Sem pré-processamento; SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada; 3pts: janela de 3 pontos; 7pts: janela de 7 pontos; 21pts: janela de 21 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

A avaliação de *outliers* foi realizada com os modelos empregando os melhores pré-processamentos destacados, devido aos melhores valores observados para as figuras de mérito. A partir dos gráficos de *leverage*, foi possível identificar e excluir os *outliers*. Após a exclusão do(s) *outlier(s)*, uma nova calibração foi realizada e os valores do RMSECV calculados, sendo comparados os valores obtidos antes e depois da exclusão da(s) amostra(s) para avaliar o resultado da remoção. A partir deste resultado, os modelos foram julgados de forma definitiva. Com base na redução no valor de RMSECV e melhores valores de R^2 , foram selecionados os modelos descritos nas tabelas 14 e 15.

Tabela 14 - Valores de R², RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico, com todas as amostras e após retirada dos *outliers*, para NIR.

Pré-processamento	Após retirada de <i>outliers</i>			
	R ²	RMSECV	Bias	VL
1d_3pts	0,87	0,28	4,026e-08	8
1d_3pts_SNV	0,82	0,33	-5,582e-08	6
1d_3pts_MSC	0,87	0,28	-3,506e-08	8
1d_7pts_SNV	0,86	0,29	-2,822e-08	7
1d_21pts_SNV	0,77	0,37	-1,192e-07	5

SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada; 3pts: janela de 3 pontos; 7pts: janela de 7 pontos; 21pts: janela de 21 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 15 - Valores de R², RMSECV, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido gálico, com todas as amostras e após retirada dos *outliers*, para NIR.

Pré-processamento	Após retirada de <i>outliers</i>			
	R ²	RMSECV	Bias	VL
1d_3pts	0,90	0,40	-1,097e-07	9
1d_3pts_SNV	0,88	0,47	-3,377e-08	8
1d_3pts_MSC	0,92	0,35	5,734e-08	8
1d_7pts_SNV	0,82	0,54	4,638e-08	7
1d_7pts_MSC	0,83	0,53	1,31e-07	7

SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada Savitzky Golay; 3pts: janela de 3 pontos, 7pts: janela de 7 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

5.3.3.3 Determinação dos conjuntos de calibração e validação externa

Na construção dos modelos PLS os conjuntos de dados foram separados em amostras de calibração e validação externa, sendo utilizado o algoritmo SPXY (GALVÃO et al., 2005). O conjunto foi composto de 132 amostras de calibração e 57 amostras de validação para ambos os padrões.

5.3.3.4 Construção do modelo PLS

Por fim, foram construídos os modelos definitivos de regressão, sendo realizado o teste de significância das variáveis espectrais (algoritmo de Jack-knifing (JK)), para observar

a melhora no desempenho dos modelos de calibração (CHIOQUOINE; HJALMARSSON, 2009).

Os valores de RMSECV e RMSEP obtidos, entre os modelos, foram comparados utilizando F, no nível de 95% de confiança. De acordo com os dados do modelo, a análise com base nas variáveis espectrais mais importantes, evidenciou diferença nos valores de algumas das figuras de mérito.

Em relação ao ácido elágico, o modelo escolhido foi aquele que apresentou redução no número de variáveis latentes, uma vez que os valores de RMSECV e RMSEP não apresentaram diferença estatística quando analisados por teste F. Desta forma, prosseguiu-se com as análises utilizando a faixa espectral reduzida (de 7500 a 4000 cm^{-1}) com pré-processamento de primeira derivada de Savitzky-Golay com janela de 7 pontos, seguido de variação normal padrão (SNV) e adicionado do algoritmo de Jack-knifing.

Quanto ao modelo construído para o ácido gálico, optou-se por trabalhar com faixa espectral reduzida (de 7500 a 4000 cm^{-1}) com pré-processamento de primeira derivada de Savitzky-Golay e janela de 3 pontos, seguido de correção multiplicativa de sinal (MSC), e adicionado do algoritmo de Jack-knifing, pois apresentou menor número de variáveis latentes e valores de RMSECV (Tabela 16).

Tabela 16 - Valores de R², RMSECV, RMSEP, Bias e VL observados para os modelos de PLS gerados para o ácido elágico e ácido gálico nas etapas de calibração e validação.

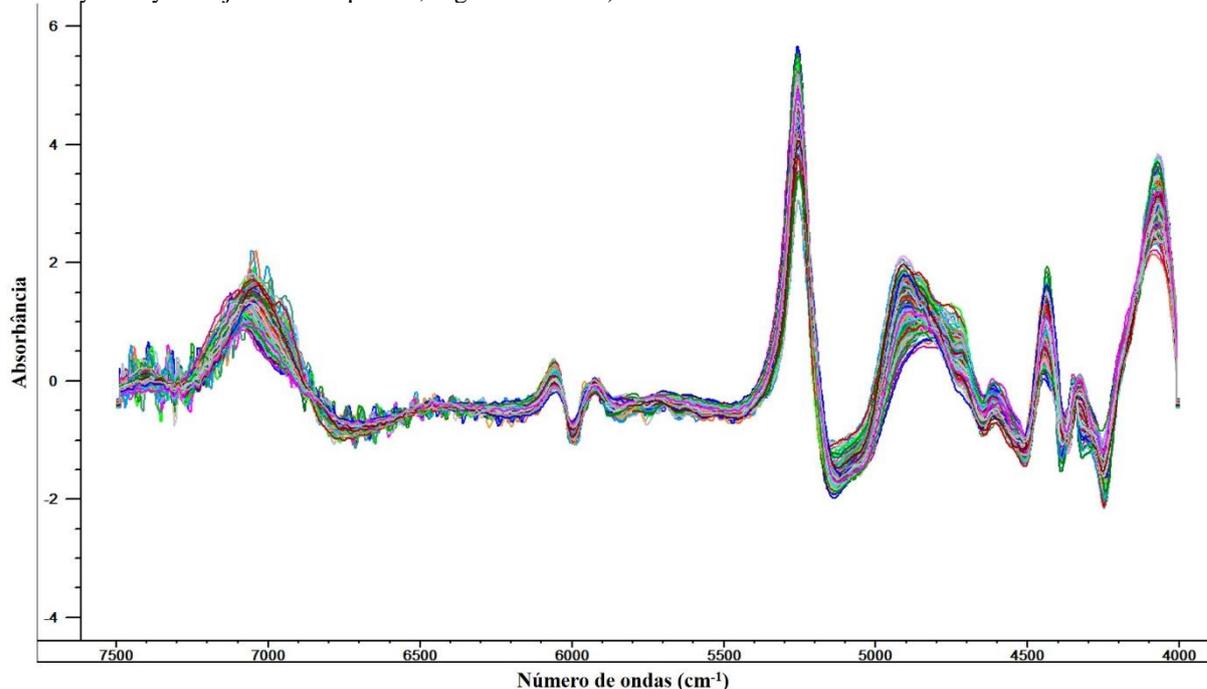
Padrão	Pré-processamento	Calibração				Validação		
		R ²	RMSECV	Bias	VL	R ²	RMSEP	Bias
AE	1d_7pts_SNV	0,91	0,24	2,502e-08	9	0,83	0,33	0,00247
	1d_7pts_SNV_JK	0,91	0,24	7,871e-08	8	0,86	0,30	-0,00350
AG	1d_3pts_MSC	0,89	0,47	-4,959e-08	8	0,74	0,75	0,00258
	1d_3pts_MSC_JK	0,88	0,49	-5,036e-08	6	0,83	0,59	-0,02200

SNV: variação normal padrão; MSC: correção multiplicativa de sinal; 1d: primeira derivada Savitzky Golay; 3pts: janela de 3 pontos; 17pts: janela de 17 pontos; 21pts: janela de 21 pontos.

Fonte: Próprio Autor.

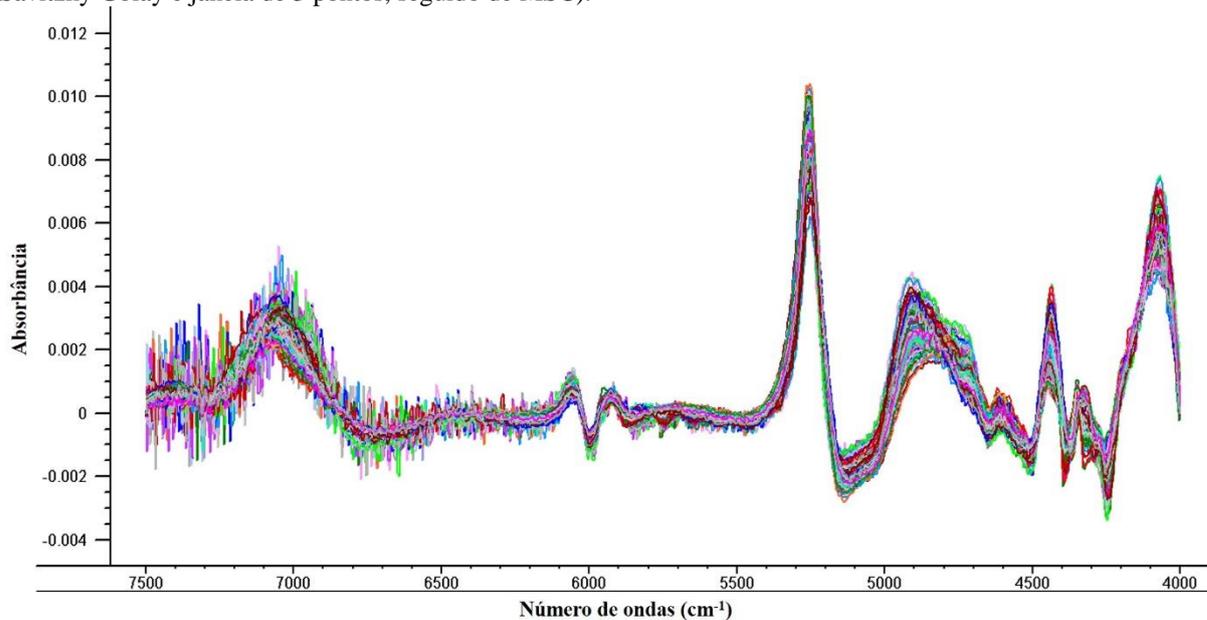
A figura 28 mostra os espectros após o pré-processamento selecionado na avaliação do modelo do ácido elágico; e, a figura 29 após o pré-processamento selecionado para o ácido gálico.

Figura 28 - Espectros de todas as amostras e do ácido elágico após pré-processamento (primeira derivada de Savitzky Golay com janela de 7 pontos, seguido de SNV).



Fonte: Próprio Autor.

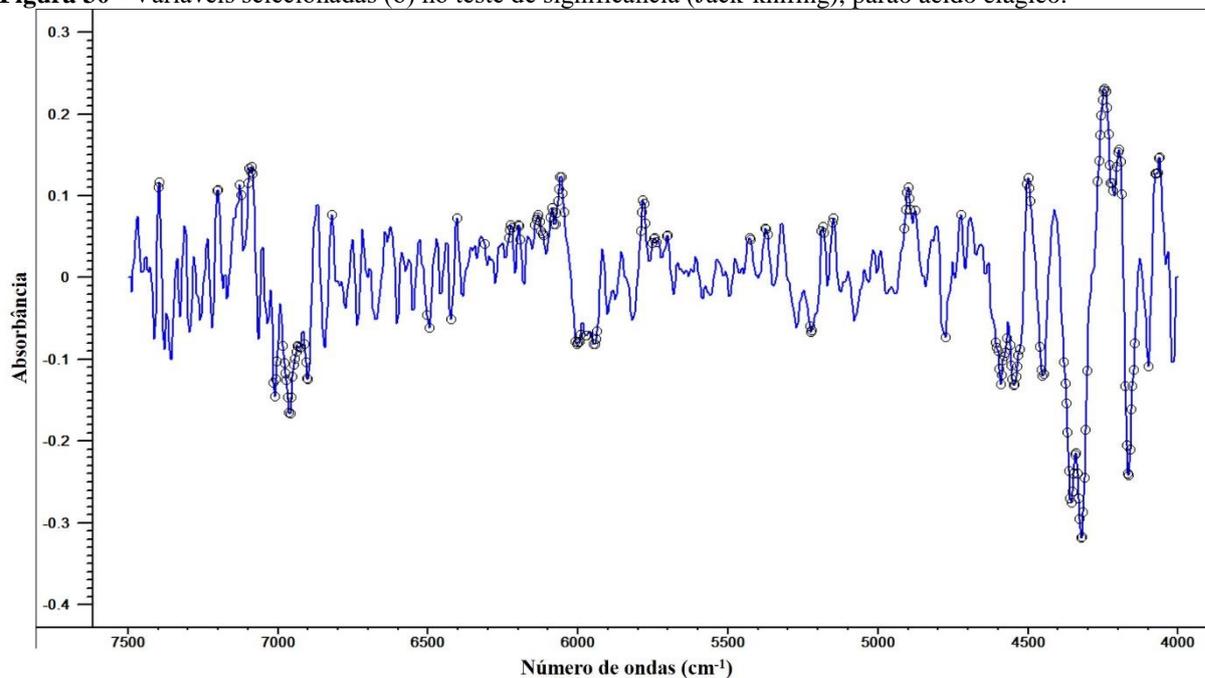
Figura 29 - Espectros de todas as amostras e do ácido gálico após pré-processamento (primeira derivada de Savitzky Golay e janela de 3 pontos, seguido de MSC).



Fonte: Próprio Autor.

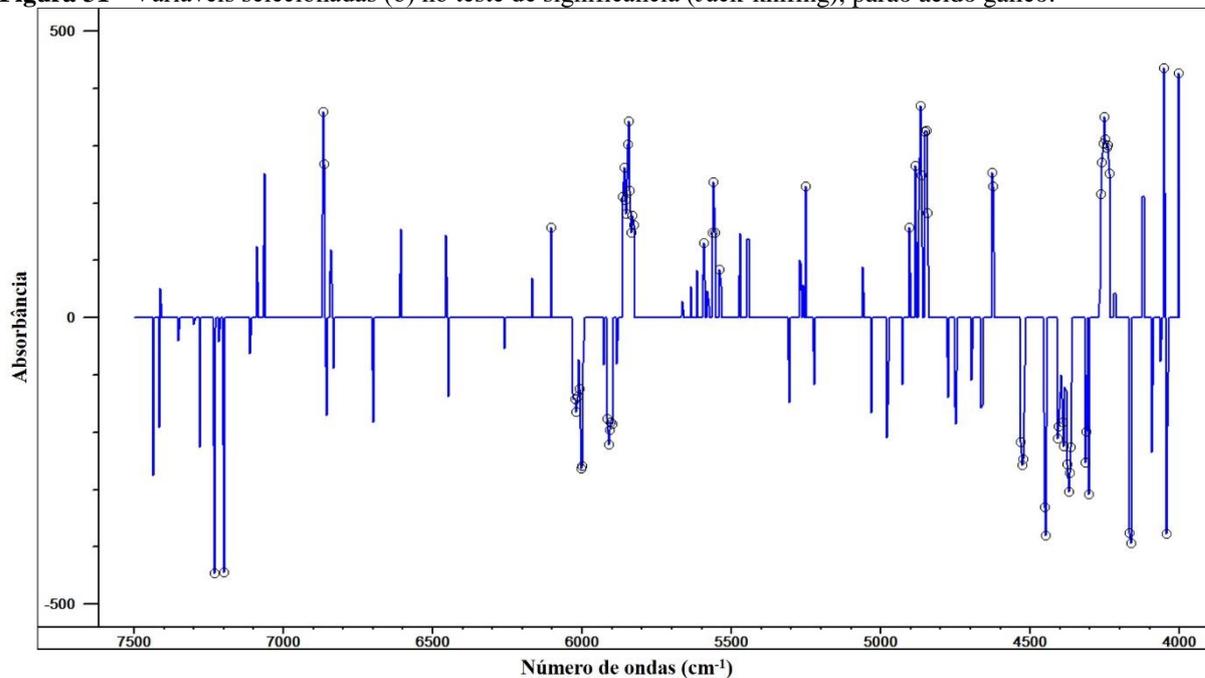
As figuras 30 e 31 representam as variáveis espectrais que apresentam significância para a construção dos modelos, após aplicação do algoritmo de Jack-knifing, respectivamente para o ácido elágico e ácido gálico.

Figura 30 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), parao ácido elágico.



Fonte: Próprio Autor.

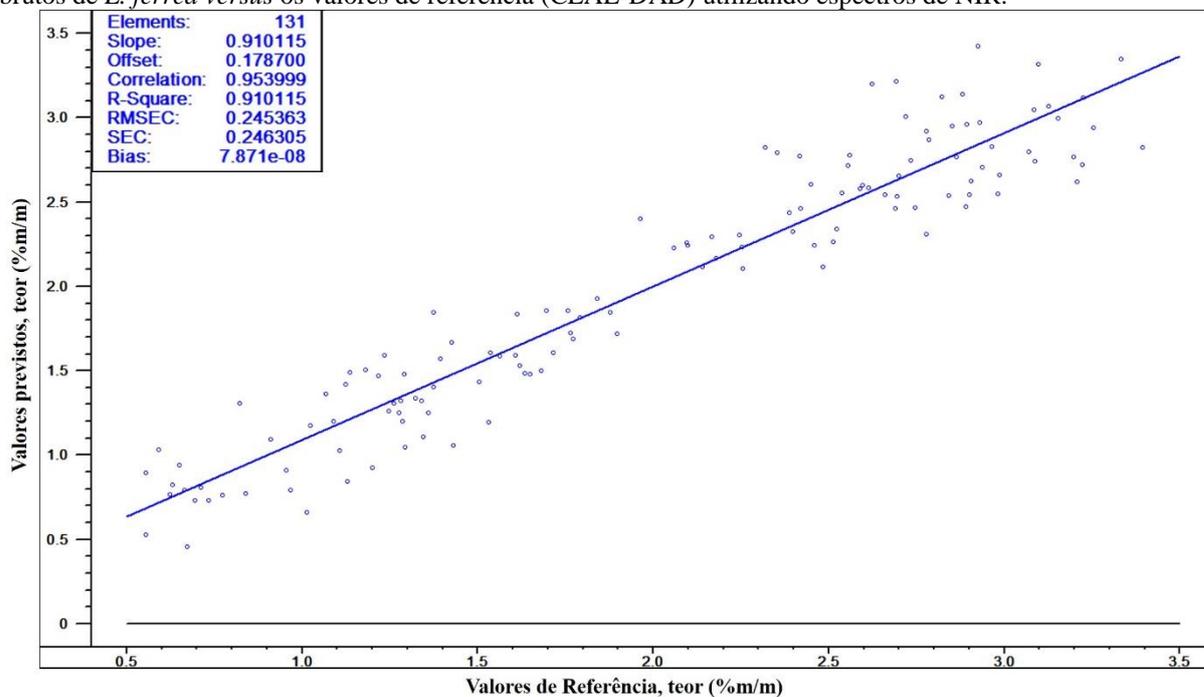
Figura 31 - Variáveis selecionadas (o) no teste de significância (Jack-knifing), parao ácido gálico.



Fonte: Próprio Autor.

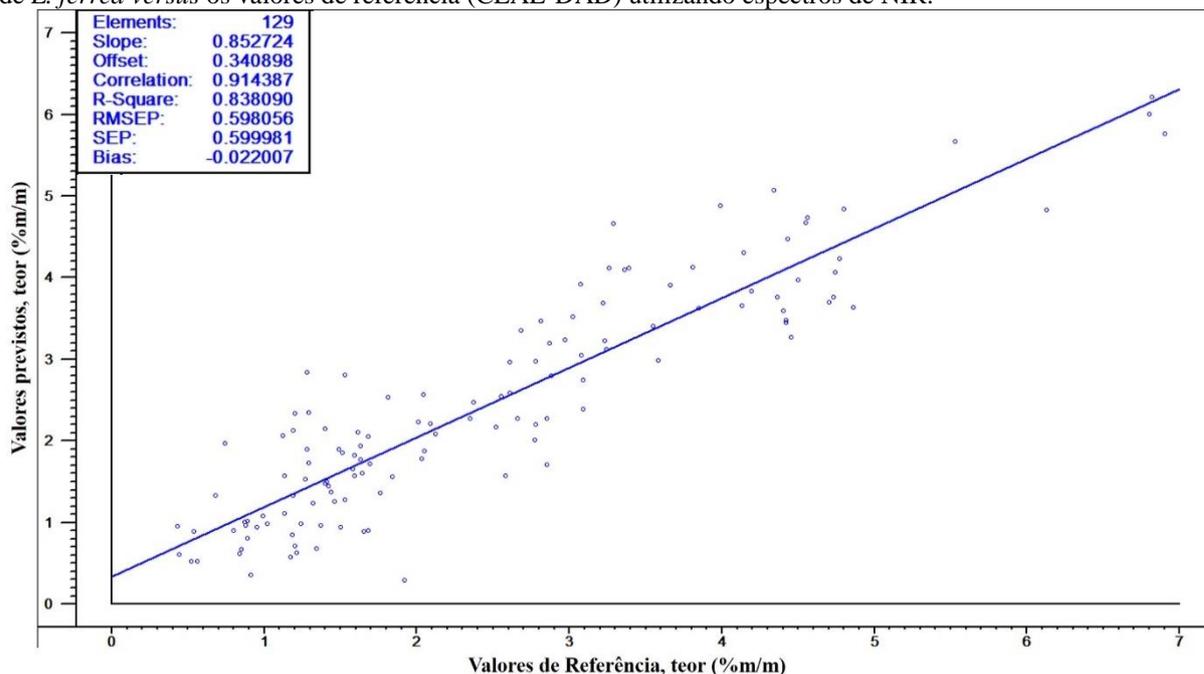
As figuras, 32 e 33, mostram os gráficos obtidos através da regressão por PLS-JK dos valores previstos no modelo *versus* os valores obtidos pelo método de referência (CLAE-DAD) para os conjuntos de calibração do ácido elágico e ácido gálico.

Figura 32 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido elágico em extratos brutos de *L. ferrea* *versus* os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de NIR.



Fonte: Próprio Autor.

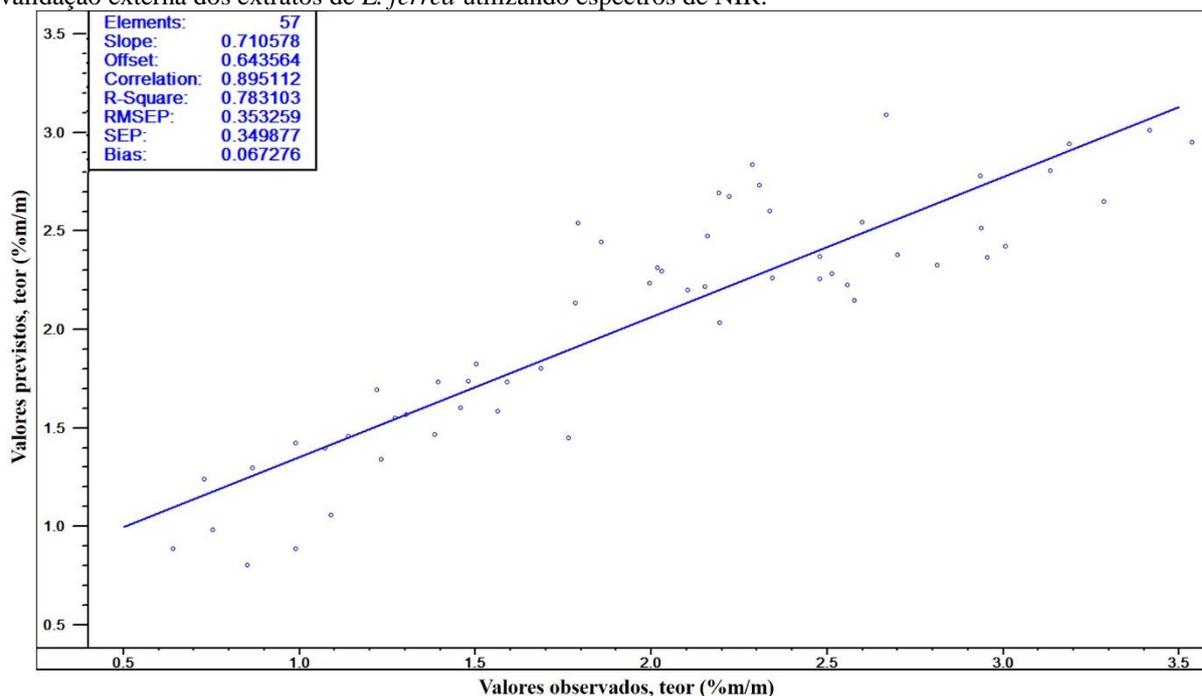
Figura 33 - Valores previstos pelo modelo PLS-JK para determinação do teor de ácido gálico em extratos brutos de *L. ferrea* *versus* os valores de referência (CLAE-DAD) utilizando espectros de NIR.



Fonte: Próprio Autor.

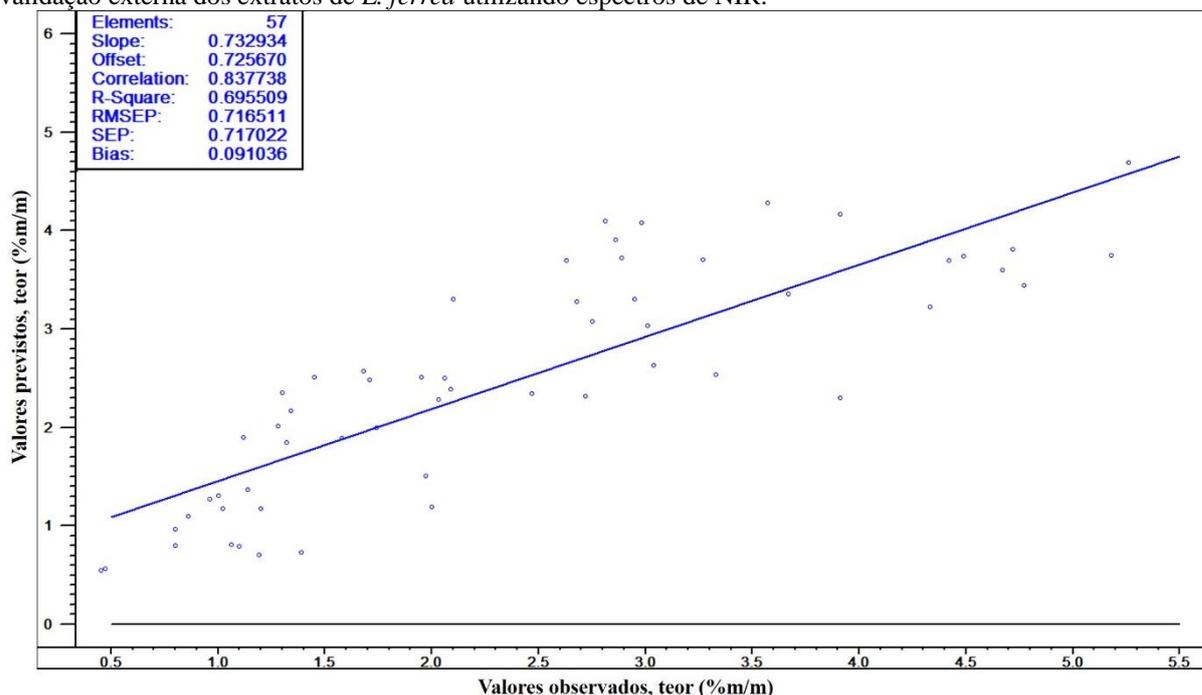
Para a realização da etapa de validação externa foram utilizadas 57 amostras para quantificação de ácido elágico e ácido gálico selecionadas também pelo algoritmo SPXY (GALVÃO et al., 2005). As figuras 34 e 35 mostram os gráficos dos valores previstos no modelo *versus* os valores obtidos pelo método de referência (CLAE-DAD) para os conjuntos de validação do ácido elágico e ácido gálico.

Figura 34 – Valores previstos *versus* observados para determinação do teor de ácido elágico em amostras de validação externa dos extratos de *L. ferrea* utilizando espectros de NIR.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 35 – Valores previstos *versus* observados para determinação do teor de ácido gálico em amostras de validação externa dos extratos de *L. ferrea* utilizando espectros de NIR.



Fonte: Próprio Autor.

Em 2006, Chen e colaboradores realizaram o doseamento de polifenóis totais e de cafeína em 50 amostras de chá verde, por NIR associado à análise por PLS. Em relação ao doseamento de polifenóis totais (UV-Vis por Folin-Ciocalteu) a faixa de trabalho foi estabelecida entre 19,15–30,23% na etapa de calibração e entre 19,38–29,17% na etapa de validação (calculados como ácido gálico). Os valores encontrados de RMSECV e RMSEP foram 1,0858 e 1,1138%, respectivamente.

Chen e colaboradores (2008) utilizaram a metodologia por FT-NIR associada à diferentes algoritmos PLS para determinar o teor de polifenóis totais em chás verdes. O valor obtido de RMSECV foi igual a 0.9141% e de RMSEP igual a 1.0719%. Nesse estudo o método de referência utilizado foi o doseamento por UV-Vis por Folin-Ciocalteu, com faixa de concentração analisada entre 14,93–25,46% para a etapa de calibração e 15,84–24,39% (calculados como ácido gálico) para a etapa de validação.

Considerando aspectos relatados na literatura, os espectros obtidos a partir desta técnica podem ser utilizados, assim como por MIR, para realizar uma análise qualitativa ou quantitativa. Entre as vantagens da utilização de metodologias por infravermelho, quando comparados com os métodos tradicionais pode-se citar: a amostra não requer pré-processamentos (como diluições); o custo de análise é baixo; a rapidez nas análises; não requer a utilização de padrões sempre que realizar as análises; além da possibilidade de

realização de análises quali-quantitativas, sendo esta última associada à métodos quimiométricos (COZZOLINO, 2015).

5.4 CONCLUSÕES

Os modelos de PLS construídos para determinação de ácido elágico e ácido gálico, através dos espectros nas três regiões espectrais avaliadas (UV-Vis, MIR e NIR), foram considerados adequados para implantação na rotina de controle de qualidade do processo. Os valores de RMSEP obtidos para o ácido gálico foram: 0,36%, 0,44% e 0,71%, para as regiões UV-VIS, MIR e NIR, respectivamente. No caso do ácido elágico, os valores de RMSEP foram de 0,20%, 0,36% e 0,35%, para as regiões UV-Vis, MIR e NIR, respectivamente. Sendo possível inferir que foram satisfatórios para proposta, considerando a diversidade e complexidade da matriz. Além disso, quando comparados os valores de RMSEP dos métodos desenvolvidos com o método de referência (para ácido gálico 3,20% e para o ácido elágico 3,73%), os valores são considerados inferiores e satisfatórios.

Comparando-se com o método convencional (doseamento de polifenóis totais por espectrofotometria no ultravioleta-visível, com reagente de Folin-Ciocalteu) utilizado na rotina e em indústrias para a obtenção desses parâmetros, o método UV-Vis associado à calibração multivariada apresenta a vantagem de não necessitar da adição de reagentes que contribuiu para a minimização de resíduos e do custo da análise. A desvantagem é em relação à estabilidade dos equipamentos nessa faixa espectral.

Com as técnicas empregadas para aquisição dos espectros na região do infravermelho (reflectância total atenuada e reflectância difusa) não há utilização de reagentes nem destruição da amostra. Os equipamentos tem maior estabilidade que aqueles na região UV-VIS permitindo a utilização dos modelos por um longo período. Com relação aos modelos PLS, os valores dos erros de previsão do conjunto de validação externa para ambos os ácidos gálico e elágico são significativamente menores (teste F com 95% de confiança) quando se utiliza a faixa do infravermelho médio.

REFERÊNCIAS

- ALVES, I. A. B. S.; MIRANDA, H. M.; BARBOSA, A. P.; RANDAU, K. P.; SOARES, L. A. L. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl.. **Revista Árvore**, v. 39, p. 37-47, 2015.
- ASTM E1655-05(2012), Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012.
- BARBIN, D. F.; FELICIO, A. L. S. M.; SUN, D-W.; NIXDORF, S. F.; HIROOKA, E. Y. Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview. **Food Research International**, v. 61, p. 23-32, 2014.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1401-1406, 2006.
- BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Aplicação de métodos de calibração multivariada para a determinação simultânea de Riboflavina (VB2), tiamina (VB1), piridoxina (VB6) e nicotinamida (VPP). **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1638-1643, 2007.
- BEEBE, K. R.; RANDY, J. P.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A practical guide**. Wiley Interscience: New York, 1998.
- BERNARDES, C. D.; FIGUEIREDO, M. C. P.; BARBEIRA, P. J. S. Developing a PLS model for determination of total phenolic content in aged cachaças. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 173–177, 2014.
- BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, p. 2125-2154, 2000.
- BUENO, F. G.; MACHARETH, M. A.; PANIZZON, G. P.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C.; LEITE-MELLO, E. V. Development of a UV/VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 822-826, 2012.
- CAI, J-X.; XI, X-G.; WANG, Y-F.; WEI, X-L. Using FTIR spectra and pattern recognition for discrimination of tea varieties. **Q1 International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 439-446. 2015.
- CASCANT, M. M.; SISOUANE, M.; TAHIRI, S.; KRATI, M. E. L.; CERVERA, M. L.; GARRIGUES, S. et al. Determination of total phenolic compounds in compost by infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 153, n. 1, p. 360–365, 2016.
- CHEN, Q.; ZHAO, J.; HUANG, X.; ZHANG, H.; LIU, M. Simultaneous determination of total polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 83, p. 42–47, 2006.
- CHEN, Q.; ZHAO, J.; LIU, M.; CAI, J.; LIU, J. Determination of total polyphenols

content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 568–573, 2008.

CHIOQUOINE, B.; HJALMARSSON, E. Jack-knifing stock return predictions. **Journal of Empirical Finance**, v. 16, p.793-803, 2009.

COZZOLINO, D. Infrared Spectroscopy as a Versatile Analytical Tool for the Quantitative Determination of Antioxidants in Agricultural Products, Foods and Plants. **Antioxidants**, v. 4, n. 3, p. 482–497, 2015.

DICIAULA, M. C.; LOPES, G. C.; SCARMINIO, I. S.; MELLO, J. C. P. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química nova**, v. 37, n. 1, p. 158-163, 2014.

DOWNEY, G. Food and food ingredient authentication by mid-infrared spectroscopy and chemometrica. **Trends Analytical Chemistry**, v. 17, v. 418–424, 1998.

EFRON, B. **The Jack-knife, the bootstrap and oder resampling plans**. Philadelphia, Pennsylvania: Society for Industrial and Applied Mathematics, 1982.

ESCAMILLA, M. N.; SANZ, F. R.; LI, H.; SCHÖNBICHLER, S. A.; YANG, B.; BONN, G. K.; HUCK C. W. Rapid determination of baicalin and total baicalein content in *Scutellariae radix* by ATR-IR and NIR spectroscopy. **Talanta**, v. 114, p. 304–310, 2013.

FERNÁNDEZ PIERNA, J. A.; WAHL, F.; NOORD, O. E.; MASSART, D. L. Methods for outlier detection in prediction. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 63, p. 27-39, 2002.

FERNÁNDEZ PIERNA, J. A.; JIN, L.; DASZYKOWSKI, M.; WAHL, F.; MASSART, D. L. A Methodology to detect outlier/inliers in prediction with PLS. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 68, p. 17-28, 2003.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, D. S.; PALLONE, J. A. L.; POPPI, R. J. Fourier transform near-infrared spectroscopy (FT-NIRS) application to estimate Brazilian soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] composition. **Food Research International**, v. 51, p. 53–58, 2013.

FERREIRA, D. S.; GALÃO, O. F.; PALLONE, J. A. L.; POPPI, R. J. Comparison and application of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy for determination of quality parameters in soybean samples. **Food Control**, v. 35, p. 227-232, 2014.

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

FRAGOSO, S.; ACEÑA, L.; GUASCH, J.; BUSTO, O.; MESTRES, M. Application of FTMIR spectroscopy for fast control of red grape phenolic ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2175–2183, 2011.

FUENTES, E.; BÁEZ, M. E.; BRAVO, M.; CID, C.; LABRA, F. Determination of Total Phenolic Content in Olive Oil Samples by UV-visible Spectrometry and Multivariate Calibration. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 1311–1319, 2012.

GALVÃO, R. K. H.; ARAUJO, M. C. U.; JOSÉ, G. E.; PONTES, M. J. C.; SILVA, E. C.; SALDANHA, T. C. B. A method for calibration and validation subset partitioning. **Talanta**, v. 67, p. 736–740, 2005.

GELADI, P. Review Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, p. 767–782, 2003.

GEMPERLINE, P. **Practical guide to chemometrics**. 2. ed. Nova York: CRC, 2006.

GHASEMI, J.; SAAIDPOUR, S.; BROWN, S. D. QSPR study for estimation of acidity constants of some aromatic acids derivatives using multiple linear regression (MLR) analysis. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 805, p. 27-32, 2007.

GORDON, G. A. **Application of fourier transform mid-infrared spectroscopy (FTIR) for research into biomass feed-stocks**. In Fourier transforms – new analytical approaches and FTIR strategies. Rijeka: InTech. 2011.

GRANGEIRO JÚNIOR, S. **Aplicação de Métodos Quimiométricos em Análises de Formas Farmacêuticas Sólidas Lamivudina (3TC) + Zidovudina (AZT) Baseados na Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta e do Infravermelho próximo**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. 134 p. 2011.

GRASEL, F. S.; FERRÃO, M. F.; WOLF, C. R. Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, p. 94–101, 2016.

HELL, J.; PRÜCKLER, M.; DANNER, L.; HENNIGES, U.; APPRICH, S.; ROSENAU, T. et al. A comparison between near-infrared (NIR) and mid-infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for the multivariate determination of compositional properties in wheat bran samples. **Food Control**, v. 60, p. 365-369, 2016.

HIGSON, S. P. J. **Química Analítica**. São Paulo: McGraw-Hill, 2009.

HIMMELSBACH, D. S.; HELLGETH, J. W.; MCALISTER, D. D. Development and Use of an Attenuated Total Reflectance/Fourier Transform Infrared (ATR/FT-IR) Spectral Database To Identify Foreign Matter in Cotton. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7405–7412, 2006.

HONORATO, F. A. **Previsão de propriedades das gasolinas do Nordeste empregando espectrofotometria NIR/MIR e transferência de calibração**. Tese (Doutorado em Química) Departamento de Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

HONORATO, F. A.; BARROS NETO, B.; MARTINS, M. N.; GALVÃO, R. K. H.; PIMENTEL, M. F. Transferência de calibração em métodos multivariados. **Química Nova**, v. 30, p. 1301, 2007.

HOY, M.; STEEN, K.; MARTENS, H. Review of partial least squares regression prediction error in Unscrambler. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 44, p. 123-33, 1998.

HUANG, Y.; DUC, G.; MA, Y.; ZHOU, J. Near-infrared determination of polyphenols using linear and nonlinear regression algorithms. **Optik**, v. 126, p. 2030–2034, 2015.

HUCK, C. W. Advances of vibrational spectroscopic methods in phytomics and bioanalysis. Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 26–35, 2014.

HUCK, C.W. Advances of infrared spectroscopy in natural product research. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 384–393, 2015.

INÁCIO, M. R. C.; DE LIMA, K. M. G.; LOPES, V. G.; PESSOA, J. D. C.; DE ALMEIDA TEIXEIRA, G. H. Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chemistry**, v. 136, n. (3–4), p. 1160–1164, 2013.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer-aided design of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137–148, 1969.

KEONG, C. Y.; LAN, J.; LIM, L. H.; CHEN, X-D.; WANG, X-G.; YANG, Y-P. Differential identification of mushrooms sclerotia by IR macro-fingerprint method. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 152, p. 34–42, 2016.

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

KWON, Y-K.; AHN, M. S.; PARK, J. S.; LIU, J. R.; IN, D. S.; MIN, B. W. et al. Discrimination of cultivation ages and cultivars of ginseng leaves using Fourier transform infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. **Journal of Ginseng Research**, v. 38, p. 52-58, 2014.

LAVINE, B. K. Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 72, p.91-97, 2000.

LI, X.; SUN, C.; LUO, L.; HE, Y. Determination of tea polyphenols content by infrared spectroscopy coupled with iPLS and random frog techniques. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 112, p. 28–35, 2015

LIRA, L. F. B.; VASCONCELOS, F. V. C.; PEREIRA, C. F.; PAIM, A. P.; STRAGEVITCH, L.; PIMENTEL, M. F. Prediction of properties of diesel/biodiesel blends by infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Fuel**, v. 89, p. 405, 2010a.

LIRA, L. F. B.; DE ALBUQUERQUE, M. S.; PACHECO, J. G. A.; FONSECA, T. M.; CAVALCANTI, E. H. S.; STRAGEVITCH, L.; PIMENTEL, M. F. Infrared spectroscopy and multivariate calibration to monitor stability quality parameters of biodiesel. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 126–131, 2010b.

LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINIO, I. E. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and

total polyphenol content from *Trichilia catigua*. **Analytica Chimica Acta**, v. 719, p. 57–60, 2012.

LÓPEZ, A.; ARAZURI, S.; GARCÍA, I.; MANGADO, J.; JARÉN, C. A Review of the Application of Near-Infrared Spectroscopy for the Analysis of Potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 5413–5424, 2013.

LUYPAERT, J.; HEUERDING, S.; DE JONG, S.; MASSART, D. L. An evaluation of direct orthogonal signal correction and other preprocessing methods for the classification of clinical study lots of a dermatological cream. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Belgium, p. 453–466, 2002.

MABOOD, F.; AL-HARRASI, A.; BOQUÉ, R.; JABEEN, F.; HUSSAIN, J.; HAFIDH, A. et al. Determination of sucrose in date fruits (*Phoenix dactylifera* L.) growing in the Sultanate of Oman by NIR spectroscopy and multivariate calibration. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 170–174, 2015.

MAESSCHALCK, R.; JOUN-RIMBAUD, D.; MASSART, D.L. The mahalanobis distance. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 50, p.1-18, 2000.

MAGALHÃES, L. M.; MACHADO, S.; SEGUNDO, M. A.; LOPES, J. A.; PÁSCOA, R. M. N. J. Rapid assessment of bioactive phenolics and methylxanthines in spent coffee grounds by FT-NIR spectroscopy. **Talanta**, v. 147, p. 460–467, 2016.

MARTENS, H.; MARTENS, N. Modified Jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling by partial least squares regression (PLSR). **Food Quality and Preference**, v. 11, p. 5, 2000.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate Calibration**. New York: John Wiley & Sons, 1996.

MOREIRA, I.; SCARMINIO, I. S. Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints **Talanta**, v. 107, p. 416–422, 2013.

NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T. **A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification**. Chichester: NIR Publications, 2004.

NICOLETTI, M. HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of Botanicals. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 5, p. 818–823, 2011.

OELOFSE, A.; MALHERBE, S.; PRETORIUS, I.; DU TOIT, M. Preliminary evaluation of infrared spectroscopy for the differentiation of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines. **International Journal Food Microbiology**, v. 143, p. 136–142, 2010.

OLIVEIRA, F. C.; SOUZA, A. T. P. C.; DIAS, J. A. DIAS, S. C. L.; RUBIM, J. C. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos, **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 218–225, 2004.

OSBORNE, B. G.; FEARN, T.; HINDLE, P. H. **Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis** (2nd ed.). Harlow, UK: Longman Scientific and Technical, 1993.

OTTO, M. **Chemometrics – Statistics and Computer application in Analytical Chemistry**. Weinheim: Wiley, 1999.

OTTO, M. **Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**. 2. ed. Weinheim: Wiley, 2007.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198 – 219, 2003.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PONTES, M. J. C. **Algoritmo das Projeções Sucessivas para Seleção de Variáveis**. 2009. 123 p. Tese (Doutorado) - Pós Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1109–1143, 2005.

RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, 2009.

ROGGO Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; LEMA-MARTINEZ, C.; EDMOND, A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 44, p. 683–700, 2007.

RODRIGUEZ-SAONA, L.; KOCA, N.; HARPER, W.; ALVAREZ, V. Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 1407–1412, 2006.

RODRIGUEZ-SAONA, L.; ALLENDORF, M. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 467–483, 2011.

SANDRA, K. L.; LUÍS, T. C.; JOSÉ, P. D. C.; LUÍS, C. J. C.; DE ALMEIDA GUSTAVO, T. H. Quantification of soluble solids in reconstituted açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp using near-infrared spectroscopy. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, p. 2514–2520, 2013.

SÁNCHEZ, M.-T.; DE LA HABA, M. J.; BENÍTEZ-LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ-NOVALES, J.; GARRIDOVARO, A.; PÉREZ-MARÍN, D. Non-destructive characterization and quality control of intact strawberries based on NIR spectral data. **Journal of Food Engineering**, v. 110 n. 1, p. 102–108, 2012.

SARRAGUÇA, M. C.; RIBEIRO, P. R. S.; SANTOS, A. O.; SILVA, M. C. D.; LOPES, J. A. A PAT approach for the on-line monitoring of pharmaceutical co-crystals formation with near infrared spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, p. 478–484, 2014.

SÂRBU, C.; NASCU-BRICIU, R. D.; KOT-WASIK, A. GORINSTEIN, S.; WASIK, A.; NAMIESNIK, J. Classification and fingerprinting of kiwi and pomelo fruits by multivariate

analysis of chromatographic and spectroscopic data. **Food Chemistry**, v. 130, p. 994–1002, 2012.

SCHÖNBICHLER, S. A.; BITTNER, L. K. H.; PALLUA, J. D.; POPP, M.; ABEL, G.; BONN, G. K.; HUCK, C. W. Simultaneous quantification of verbenalin and verbascoside in *Verbena officinalis* by ATR-IR and NIR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 97–102, 2013.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M.; QUILITZSCH, R.; SCHÜTZE, W. Determination of alkaloids in capsules, milk and ethanolic extracts of poppy (*Papaver somniferum* L.) by ATR-FT-IR and FT-Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 129, p. 917–920, 2004.

SHI, J-Y.; ZOU, X-B.; ZHAO, J-W.; HOLMES, M. Near infrared quantitative analysis of total flavonoid content in fresh *Ginkgo biloba* leaves based on different wavelength region selection methods and partial least squares regression. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 20, n. 2, p. 295-305, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. 490p. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SIMÕES, S. S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIRR e calibração multivariada**. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba. 97 p. 2008.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thompson Learning, 2006.

SOARES, L. A. L.; MAIA, A.; OLIVEIRA, A. L.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Avaliação de Complexos Formados por Catequina e Macromoléculas. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n.1, p. 10-16, 2006.

SOARES, P. K.; BRUNS, E. R.; SCARMINIO, I. E. Principal component and Tucker3 analyses of high performance liquid chromatography with diode-array detection fingerprints of crude extracts of *Erythrina speciosa* Andrews leaves. **Analytica Chimica Acta**, v. 736, p. 36–44, 2012.

SOLON, L. G. S.; COSTA, L. J. L.; WANDERLEY, A. G.; SOARES, L. A. L.; DE SOUZA, T. P. Avaliação de agentes complexantes na quantificação de taninos totais em soluções extrativas de *Schinus terebinthifolius* R. e *Psidium guajava* L. **Bio Farma**, v. 2, p. 275-281, 2007.

SOUZA, J. A. L. **Desenvolvimento de uma metodologia baseada na espectroscopia no infravermelho próximo para determinação do produto de degradação do captopril em comprimidos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. 68 p. 2011.

SOUZA, J. A. L.; GRANGEIRO JUNIOR, S.; ALBURQUERQUE, M. M.; SANTANA, D. P.; PIMENTEL, M. F.; SIMOES, S. Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril. **Vibrational Spectroscopy (Print)**, v. 62, p. 35-41, 2012.

SOUZA, D. M.; MADARI, B. E.; GUIMARÃES, F. F. Aplicação de técnicas multivariadas e inteligência artificial na análise de espectros de infravermelho para determinação de matéria orgânica em amostras de solos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1738-1745, 2012.

- SOUZA, A. M.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013.
- ŞAHIN, S.; IŞIK, E.; DEMIR, C. Prediction of Total Phenolic Content in Extracts of *Prunella* Species from HPLC Profiles by Multivariate Calibration. **ISRN Chromatography**, v. 2012, Article ID 120780, 7 pages, 2012.
- TISSUE, B. M. **Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy** in Characterization of Materials, 1st ed., v. 2, p. 688–698, Ed, Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia. 2002.
- VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.
- VALDERRAMA, P.; ROMERO, A. L.; IMAMURA, P. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; BONATO, P. S.; POPPI, R. J. Quantification of chlorpheniramine maleate enantiomers by ultraviolet spectroscopy and chemometric methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 181–188, 2010.
- VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L.; BUYDENS, L. M. C.; JING, S.; LEWI, P. J.; SMEYERS-VERBEKE, J. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B**. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- VIEGAS, T. R.; MATA, A. L. M. L.; DUARTE, M. M. L.; LIMA, K. M. G. Determination of quality attributes in wax jambu fruit using NIRS and PLS. **Food Chemistry**, v.190, p. 1–4, 2016.
- ZHAO, X. Advances and technology in infrared spectroscopy. **J. Anqing Teach College**, v. 18, n. 4, p. 94–97, 2012.
- WANG, Y.; MEI, M.; NI, Y.; KOKOT, S. Combined NIR/MIR analysis: A novel method for the classification of complex substances such as *Illicium verum* Hook. F. and its adulterants. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 539–545, 2014.
- WANG, P.; YU, Z. Species authentication and geographical origin discrimination of herbal medicines by near infrared spectroscopy: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 5, p. 277-284, 2015.
- WANG, P.; ZHANG H.; YANG, H.; NIE, L.; ZANG, H. Rapid determination of major bioactive isoflavonoid compounds during the extraction process of kudzu (*Pueraria lobata*) by near-infrared transmission spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 1403–1408, 2015.
- WARTEWI, G. S.; NEUBERT, R. H. H. Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. **Advances Drug Delivery Review**, v. 57, p. 1144–1170, 2005.
- WEHRENS, R. **Chemometrics with R - Multivariate Data Analysis in the Natural Sciences and Life Sciences**. New York: Springer, 2011.

WORKMAN, J. J.; MOBULEY, P. R.; KOWALSKI, B. R.; BRO, R. Review of chemometrics applied to spectroscopy. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 31, p.347-68, 1996.

YE, M.; GAO, Z.; LI, Z.; YUAN, Y.; YUE, T. Rapid detection of volatile compounds in apple wines using FT-NIR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 190, p. 701–708, 2016.

CAPÍTULO IV
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE
SISTEMAS DISPERSOS CONTENDO
EXTRATO E FRAÇÕES DOS FRUTOS DE *L.*
FERREA

6 CAPÍTULO IV - DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS DISPERSOS CONTENDO EXTRATO E FRAÇÕES DOS FRUTOS DE *L. ferrea*

6.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A utilização de produtos de origem vegetal tem vigorado como uma demanda do mercado devido ao seu apelo natural e de valorização da flora brasileira. Ademais, muitas espécies vegetais apresentam alternativas terapêuticas eficazes e de baixa toxicidade. Por estas razões, diversas políticas públicas foram postas em prática para promover o estudo e o uso racional de espécies nativas (BRASIL, 2006; 2009). Nesse contexto destaca-se a *Libidibia ferrea* (JUCÁ), cujos farmacógenos (frutos, folhas e cascas) apresentam diversos relatos de atividades biológicas importantes (FERREIRA; SOARES, 2015). Considerando os frutos do jucá, as atividades antimicrobiana e antifúngica têm sido uma das mais exploradas (FERREIRA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014; BIASI-GARBIN et al., 2016).

Diversas espécies vegetais são utilizadas tradicionalmente como agentes antimicrobianos e antifúngicos, sob a forma de extratos. Além disso, além do efeito terapêutico proporcionado pelas espécies vegetais está em questão em alguns casos a baixa toxicidade (JIANHUA; HAI, 2009). Dentre as atividades terapêuticas atribuídas aos polifenóis pode-se citar: antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e antifúngica, que justificam a utilização de extratos em formulações com fins terapêuticos (BALOGH, 2011).

As emulsões podem ser definidas como sistemas constituídos por dois líquidos imiscíveis estabilizados por tensoativos, em que um deles está finamente dividido e distribuído, na forma de gotículas, no outro. O líquido disperso ou fase interna geralmente consiste em gotículas de diâmetro variável, as quais são distribuídas na fase externa ou contínua (FERREIRA et al., 2010; DANIELS, 2012; FAHR, 2015).

De um modo geral, as emulsões têm grande importância para as indústrias cosmética e farmacêutica. Portanto, o desenvolvimento de emulsões figura como estratégia válida para obtenção de produtos farmacêuticos contendo ativos obtidos de espécies vegetais nativas destinados à aplicação tópica que, em razão da possibilidade de compartimentalização em uma das suas fases, podem ser associados diversos componentes à formulação, inclusive fármacos clássicos com baixa solubilidade em água.

Entretanto, emulsões são sistemas dispersos termodinamicamente instáveis e, portanto, para o seu desenvolvimento e produção é necessária a investigação de diversos parâmetros críticos como, por exemplo, os componentes da formulação (tipo e proporção) ou o método de

preparação, sob o risco de comprometimento da estabilidade do sistema. Sob este aspecto, a inclusão de emulsificantes adequados é determinante para a estabilização de emulsões, garantindo a manutenção da dispersão e prolongando seu período de validade em prateleira. Além disto, o ajuste e o controle das condições passos de fabricação são fundamentais para garantir a formação da dispersão e manutenção de sua homogeneidade (FAHR, 2015).

Para que o controle de qualidade de matérias primas vegetais e produtos fitoterápicos seja realizado através do uso de impressões digitais, uma vez que todo o espectro de compostos é considerado, faz-se necessário o desenvolvimento de produtos padronizados, sendo este um desafio no desenvolvimento tecnológico desses produtos. Tal desafio é evidenciado, pois durante as operações da cadeia produtiva resultam em produtos com propriedades farmacêuticas, sejam elas físicas, físico-químicas e/ou biofarmacêuticas, desfavoráveis à fabricação de medicamentos (VIYUCH; KLINGTHONG; SIRIPAISAL, 2003; LIMA et al., 2008; MAHMOOD et al., 2012; KHAN et al., 2013; JIN, et al., 2015; PINTADO et al., 2015).

Além disso, os tratamentos que utilizam produtos de origem vegetal são, em geral, menos dispendiosas, e indicadas como práticas complementares nos serviços de saúde, uma vez que podem ser a primeira escolha para diversas afecções, antes de recorrer a outros medicamentos mais agressivos (BRASIL, 2015).

A utilização de matéria-prima de origem vegetal tem vigorado como uma demanda do mercado devido ao seu apelo natural e de valorização da flora brasileira. Levando em consideração tais aspectos, a adição de extratos em sistemas dispersos pode agregar benefícios aos mesmos, já que os extratos apresentam atividades biológicas devido à presença de metabólitos, como os polifenóis. Dentre as atividades terapêuticas atribuídas aos polifenóis pode-se citar: antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e antifúngica, que justificam a utilização de extratos em formulações com fins terapêuticos (BALOGH, 2011).

Entretanto, a adição de extratos vegetais em sistemas dispersos apresentam problemas, como a solubilidade do extrato nos componentes da formulação (VIYUCH; KLINGTHONG; SIRIPAISAL, 2003; MASSON et al., 2005; TIKEKAR; PAN; NITIN, 2013; BERENDSEN; GÜELL; FERRANDO, 2015; NEMITZ et al., 2015).

6.1.1 Emulsões

Do ponto de vista farmacêutico, emulsões são definidas como misturas heterogêneas, com tamanho de gotículas entre 0,5 e 100 μm , que consistem de gotículas de um líquido

disperso numa segunda fase líquida imiscível contínua. Emulsão clássica é aquela em que uma das fases é composta por água e a outra um óleo (RAHATE; NAGARKAR, 2007; FAHR, 2015).

De acordo com a natureza da fase externa (fase contínua ou dispersante), uma emulsão pode ser classificada em: tipo água em óleo (A/O), na qual contém água como fase dispersa sob a forma de pequenas partículas (maior que 0,1 µm) na fase oleosa, e tipo óleo em água (O/A) em que a emulsão é composta pela dispersão do óleo na fase aquosa (FAHR, 2015).

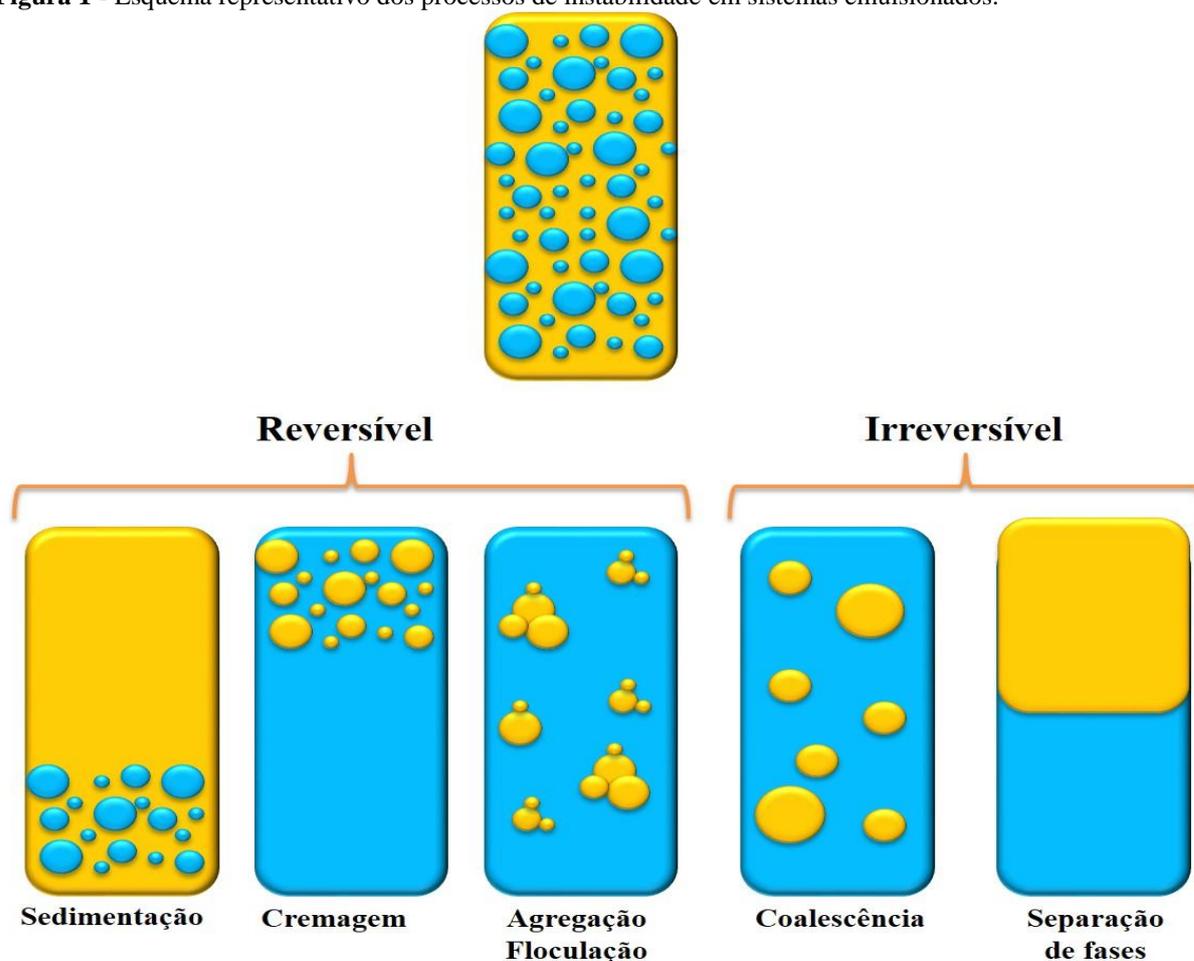
As emulsões mais comuns são a do tipo óleo em água (O/A). Elas são utilizadas para incorporação de fármacos hidrofóbicos, são absorvidas mais rápido (em virtude da menor proporção de óleo), mais fáceis de serem removidas e mais agradáveis por não apresentarem aspecto oleoso (AULTON, 2005; DALTON, 2011; DANIELS, 2012).

Como as emulsões são formadas por dois líquidos imiscíveis, a imiscibilidade líquido/líquido cria uma tensão interfacial entre os dois líquidos que atribui instabilidade termodinâmica para tais sistemas. A estabilidade de uma formulação é o fator essencial para a sua utilização como sistemas de liberação de fármacos, uma vez que estas formulações devem ser suficientemente estáveis durante sua fabricação e esterilização.

A consideração mais importante a respeito de emulsões cosméticas e/ou farmacêuticas é a estabilidade do produto final, que deve ser caracterizada pela ausência de coalescência da fase interna, ausência de cremagem e manutenção da performance com relação a aparência, odor, cor e outras propriedades físicas (FERREIRA et al., 2010; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012; LONNI, 2012; LONNI et al., 2015). Uma emulsão estável é aquela cujas gotículas dispersas mantêm suas características iniciais e permanecem uniformemente distribuídas por toda a fase contínua. Entretanto, podem ocorrer vários tipos de desvios desse comportamento ideal, como consequência dos processos de instabilidade que comprometem o sistema (DALTON, 2011; DANIELS, 2012; FAHR, 2015).

A perda de estabilidade de uma emulsão pode resultar da ocorrência dos processos de instabilidade, tais como: cremagem, floculação, sedimentação, sendo esses reversíveis; e, coalescência e separação de fases, considerados processos irreversíveis (Figura 1).

Figura 1 - Esquema representativo dos processos de instabilidade em sistemas emulsionados.



Fonte: Próprio Autor.

A estabilidade de uma formulação é relativa, varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos seus parâmetros. Os fatores relacionados à estabilidade de formulações podem ser extrínsecos ao produto como tempo, temperatura, luz, umidade, microorganismos; ou intrínsecos, como incompatibilidades físicas, químicas, reações entre os componentes da formulação (BRASIL, 2004).

Uma das maneiras de evitar que os processos de instabilidade ocorram é reduzir a energia interfacial do sistema, criando uma barreira de energia que impedirá a colisão das gotículas. Essa barreira pode ser fornecida aos sistemas através do uso de agentes emulsionantes.

A fim de produzir emulsões estáveis, tensoativos ou a combinação de tensoativos podem ser adicionados ao sistema. No caso da combinação de agentes tensoativos, os valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) deles devem ser próximos ao que é exigido para a fase oleosa (MACEDO et al., 2006; FRANGE; GARCIA, 2009; FERREIRA et al., 2010; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012).

Os tensoativos geralmente são considerados moléculas que possuem uma cadeia de hidrocarbonetos com um grupamento polar em sua porção terminal. Esta cadeia é solúvel em óleo, enquanto que o grupamento polar apresenta afinidade pela água. Assim, os tensoativos conseguem se localizar na interface óleo-água, atuando como estabilizador da interface das gotículas da emulsão. Os tensoativos conseguem formar uma camada em volta da gotícula, dificultando o fenômeno de coalescência, fazendo com que as emulsões apresentem menor tamanho das gotículas e por consequência, promovendo estabilidade ao sistema (DALTIM, 2011).

Tradicionalmente, tensoativos iônicos ou não-iônicos são utilizados. No último caso, ocorrerá uma estabilização do tipo estérica, já que estes tensoativos apresentam cadeias de ésteres de sorbitano polietoxilados longas. Essas cadeias se distribuem na superfície das gotículas da emulsão, do tipo O/A, impedindo que as gotículas se aproximem (FERREIRA et al., 2010; DALTIM, 2011; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012; FAHR, 2015).

No entanto, a baixa tolerância fisiológica a esses emulsificantes clássicos muitas vezes impede a sua utilização generalizada. Assim, vários estudos têm sido conduzidas na elaboração de sistemas que utilizam polímeros (derivados de celulose), partículas (sílica) e outros agentes para promover a estabilização, uma vez que estes exibem boa tolerância quando em contato com a pele, o que resulta na necessidade de se melhorar esta prática no Brasil (BARTA; DANIELS, 1994; SCHULZ; DANIELS, 2000; WOLLENWEBER; OSCHMANN; DANIELS, 2002; MELZER; KREUTER; DANIELS, 2003; FRELICHOWSKA, BOLZINGER, CHEVALIER, 2009; 2010; LUNTER, 2012; LUNTER; DANIELS, 2012; PANTELIC et al., 2013; BIDONE et al., 2014; SONG et al., 2015).

Os sistemas livres da presença dos tensoativos clássicos, são denominados de “emulsões livres de tensoativo” ou “Pickering”, cuja definição diz que é um sistema de gotas dispersas de um outro líquido imiscível, estabilizada por partículas sólidas. É bem conhecido que a molhabilidade e a floculação de partículas sólidas têm um papel importante na formação de emulsões Pickering, e, além disso, o tipo e a estabilidade das emulsões resultantes podem ser controlados pelas características das partículas sólidas (PICKERING, 1907; ZHANG; ZHOU; YANG, 2015).

Alguns polímeros (derivados de celulose), solúveis ou dispersíveis em água, que são comumente utilizados com outras funções (tais como espessantes), tem sido empregados na estabilização de emulsões. Neste caso, as propriedades de solvatação dos polímeros hidrossolúveis aumentam a proteção das gotículas, devido ao aumento da camada de moléculas de água que estão aderidas à superfície, consequentemente, aumentando a

viscosidade da fase contínua, diminuindo a possibilidade de colisão entre as gotículas, acarretando em melhoria da estabilidade da emulsão (BARTA; DANIELS, 1994; SCHULZ; DANIELS, 2000; WOLLENWEBER; OSCHMANN; DANIELS, 2002; MELZER; KREUTER; DANIELS, 2003; DALVIN, 2011; DANIELS, 2012).

6.1.2 Perfil de liberação *in vitro*

A incorporação de extratos vegetais ou de frações com ativos naturais enriquecidos tem sido cada vez mais utilizada pelos pesquisadores da área, como alternativas terapêuticas aos sistemas que contêm fármacos convencionais, o que pode ser proveniente, na maioria das vezes, dos efeitos benéficos produzidos pelos ativos naturais ou da associação desses em formas farmacêuticas.

Em uma formulação para uso tópico, vários aspectos devem ser considerados, incluindo a liberação da droga ou ativo. A liberação de fármacos ou ativos pode ser definida em uma forma simplificada, como sendo o processo pelo qual uma droga é liberada e como se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. Assim, a liberação tópica de moléculas bioativas pode ser considerada uma alternativa viável a redução da toxicidade sistêmica de tais compostos e restringir a ação a tecidos específicos (FASOLO; BASSANI; TEIXEIRA, 2009; BIDONE et al., 2014).

Neste sentido, a análise da liberação *in vitro* de substâncias ativas é uma ferramenta importante no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos. A liberação de substâncias ativas pode ser investigada por metodologias *in vitro*, utilizando as células de difusão de Franz (1975). Esta análise tem sido usada como um método para verificar a taxa de liberação de fármacos e ativos, especialmente devido à dificuldade em executá-las *in vivo* (FRANZ, 1975).

Os sistemas de liberação que utilizam as células de difusão de Franz modificadas (Figura 2) é uma variação dos métodos de dissolução. O perfil de liberação *in vitro* é obtido pela coleta de solvente por meio de um canal de comunicação e o monitoramento contínuo de concentração liberada do fármaco. O resultado obtido depende do volume do solvente, da temperatura e agitação, e da membrana de acetato de celulose (LONNI, 2012).

Figura 2 - Célula de Difusão de Franz modificada.



Fonte: Próprio Autor.

No “dispositivo” a pele ou membrana permanece em contato com a solução receptora, a amostra é adicionada ao sistema e é difundida, além disso, o volume do compartimento receptor é suficiente para garantir uma solução homogênea e diluição da solução. A temperatura do sistema é controlada por um banho termostaticado, mantendo-a constante em toda célula por meio de agitação do sistema, utilizando barras e agitadores magnéticos (LUNTER, 2012). Também é adicionada uma membrana entre os dois compartimentos, doador e receptor. As membranas utilizadas podem ser sintéticas ou pele de animal (pele suína). Tais membranas têm atuado como alternativa eficaz ao uso de pele humana, em razão às questões das limitações de trauma vez que são inviáveis de obter e devido às variabilidades (SIMON; MAIBACH, 2000; LONNI, 2012).

6.1.3 Sinergismo

No que pese os avanços na pesquisa de novos fármacos, o número de moléculas disponíveis para o tratamento das infecções ainda é limitada. A terapêutica tem se baseada na utilização de drogas em relação às quais os indivíduos adquirem cada vez mais resistência, tais como os utilizados em terapias antifúngicas, como cetoconazol, itraconazol, fluconazol e anfotericina B (PFALLER, 2012; LASS-FLÖRL, 2011).

O aumento da resistência a essas drogas continua oferecendo risco à população. Além disso, alguns desses fármacos apresentam problemas de baixa solubilidade em água, dificultando a incorporação em sistemas para uso tópico. Diante deste problema, uma estratégia terapêutica, aliada à tecnológica, seria a redução de dose dos compostos atuais por combinação com novos compostos com atividade terapêutica. Nesse sentido, os produtos

naturais atuam como protótipos para esta finalidade, devido ao amplo espectro de atividades biológicas a eles atribuídos (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Diversas espécies vegetais são utilizadas tradicionalmente como agentes antimicrobianos e antifúngicos, sob a forma de extratos. Além disso, além do efeito terapêutico proporcionado pelas espécies vegetais está em questão à baixa toxicidade (JIANHUA; HAI, 2009).

A combinação de fármacos é uma estratégia bastante comum na terapêutica, principalmente, nos casos de infecções causadas por mais de um micro-organismo ou para combater o aumento da resistência. Assim, quando a associação entre duas ou mais moléculas ativas resulta no efeito aditivo dos resultados de cada fármaco separadamente, pode-se dizer que temos sinergismo. Associações de dois ou mais antimicrobianos e associações de fármacos convencionais com produtos naturais têm sido bastante estudadas e figuram como uma importante alternativa para superar a crescente resistência aos fármacos clássicos e a carência de novas moléculas (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009; WAGNER, 2011).

Portanto, diversos casos são relatados na literatura como por exemplo a comprovação da atividade sinérgica resultante da associação de Anfotericina B (AmB) e um extrato de semente de uva (*Vitis vinifera*), que acarretou em maior diminuição no número de colônias da levedura *Candida* spp, do que as amostras testadas apenas com AmB (HAN, 2007a). Em outro estudo, o mesmo autor avaliou a combinação de AmB com galato de epigallocatequina obtido do chá de folhas de *Camellia sinensis*, e demonstrou que a combinação do composto com AmB apresentou efeito antifúngico sinérgico e capacidade de impedir a formação de hifas por *Candida albicans* (HAN, 2007b). Noutro caso, Calixto Júnior e colaboradores (2015) analisaram o efeito modulador de extrato *Luehea paniculata* sobre fluconazol frente a isolados multirresistentes de *Candida* spp e foi comprovada ação sinérgica da combinação, cuja atividade parece ter sido decorrente dos polifenóis presentes no extrato que potencializaram o efeito antifúngico do fluconazol frente a *C. tropicalis*. Em outro estudo recente, a associação de diferentes extratos vegetais (*Mentha piperita*, *Mentha longifolia* e *Ocimum basilicum*) frente a diversas cepas de bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*), os autores observaram que a combinação extratos das folhas das espécies com fármacos clássicos foram muito mais eficazes (ADHAM, 2015),

Considerando a possibilidade de associação entre fármacos antifúngicos comumente utilizados na terapêutica atual e os extratos produzidos e avaliados neste estudo, esta etapa do

trabalho consistiu em avaliar a viabilidade da veiculação do extrato bruto/frações obtidos dos frutos de *Libidibia ferrea* em emulsões e realizar um estudo de estabilidade preliminar das formulações obtidas.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Obtenção e Caracterização das Emulsões

6.2.1.1 Otimização dos parâmetros

6.2.1.1.1 *Ensaio eficiência de incorporação para extrato bruto e frações*

A porção de derivado vegetal (extrato ou fração) incorporada nos componentes da formulação foi investigada através da determinação espectrofotométrica do teor de polifenóis totais (TPT). Para tanto uma amostra de cada componente foi pesada e misturada com 1,0 g de solução de cloreto de sódio em vortex (Stuart[®]) e em seguida extraído com 1,5 mL de acetato de etila em agitador de microtubos (Vibrax VRX Basic, IKA[®]), em 1200 rpm durante 5 min. Os tubos foram colocados em uma microcentrífuga (miniSpin, Eppendorf[®]) e submetidos a 4.000 rpm por 5 min para a separação total das fases. As fases de acetato de etila foram reunidas, evaporadas e o resíduo foi dissolvido em água purificada e transferido para um balão volumétrico (25 mL), aferindo o volume com água purificada. Uma alíquota foi filtrada através de filtro com 0,45 µm de abertura de poro e 2,0 mL de amostra foram tomados para a determinação da porcentagem de polifenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA EUROPEIA, 2013). O ensaio de incorporação foi realizado em triplicata e o teor de polifenóis expressos pela média e desvio padrão de três determinações espectrofotométrica em cada amostra.

6.2.1.1.2 *Construção de Diagramas Pseudoternários*

A faixa de concentração dos componentes da formulação capazes de formar emulsões foi definida através de diagramas pseudoternários. Os diagramas foram construídos utilizando o método de diluição de água e a dispersão foi realizada com auxílio de ultraturrax (T25, IKA[®]) (YAN et al., 1994; FERREIRA et al., 2010; XAVIER et al., 2012).

Os diagramas foram elaborados a partir de três combinações de componentes: 1 - Sistemas estabilizados por tensoativos (contendo os tensoativos monolaurato de POE-sorbitano/Tween 20[®] e monooleato de sorbitano/Span 80[®]); 2 - Sistemas estabilizados por sílica (sílica hidrofílica/Aerosil 130[®] e sílica hidrofóbica/Aerosil R972[®]); e, 3 - Sistemas estabilizados por derivados de celulose (hidroxipropilmetilcelulose/HPMC 2208 USP[®]). O

Miglyol[®] 812 foi empregado como fase oleosa e a fase aquosa foi constituída por água ultrapura. O óleo e os demais componentes foram misturados em proporções que variaram de 1:9 a 9:1 e a titulação com a fase aquosa permitiu a obtenção de 99 formulações. A homogeneização e dispersão das formulações foram realizadas durante 2 minutos (T = 40 °C) em ultraturrax a 8000 rpm (T25, IKA[®]) e cada sistema foi preparado em duplicata.

A estabilidade dos sistemas obtidos foi avaliada macroscopicamente através da ocorrência de coalescência ou separação de fases. Os sistemas foram classificados de acordo com os seus aspectos físico-químicos em: microemulsão, emulsão, creme, ou separação de fases (FERREIRA et al., 2010).

6.2.1.1.3 Método de obtenção das emulsões

As regiões correspondentes à formação de emulsão foram identificadas nos diagramas pseudoternários e a proporção de cada componente na formulação determinada. A formulação eleita foi empregada como referência para o estudo de avaliação do método de preparação.

As emulsões foram obtidas por dispersão em ultraturrax e após 24 horas da preparação, os sistemas foram avaliados quanto ao pH (Seven easy, Mettler Toledo[®]) e as características macroscópicas.

6.2.1.1.4 Avaliação preliminar das condições de preparação e da composição da formulação

As influências das condições de fabricação (tempo de dispersão e velocidade do ultraturrax) e a composição da formulação (com/sem tensoativo e tipo de HPMC) sobre as características dos sistemas foram avaliadas preliminarmente. Os parâmetros de cada formulação estão descritos no quadro abaixo (Quadro 1). As emulsões foram preparadas conforme descrito e após 24 horas de fabricação os sistemas foram avaliados de acordo com: aspectos macro e microscópicos, pH, potencial zeta, tamanho de gotícula e viscosidade capilar (viscosidade dinâmica).

Quadro 1 – Avaliação das condições de preparação de emulsões estabilizadas por tensoativos ou HPMC.

Formulações	Fase Oleosa	Fase Aquosa*	Rotação (rpm)	Tempo (min)
A	Miglyol 812	HPMC 2208	8000	5
B	Miglyol 812	HPMC 2208	8000	10
C	Miglyol 812	HPMC 2208	13500	5
D	Miglyol 812	HPMC 2208	13500	10
E	Miglyol 812	HPMC 2910	8000	5
F	Miglyol 812	HPMC 2910	8000	10
G	Miglyol 812	HPMC 2910	13500	5
H	Miglyol 812	HPMC 2910	13500	10
I	Miglyol 812+Span 80	Tween 20	8000	5
J	Miglyol 812+Span 80	Tween 20	8000	10
K	Miglyol 812+Span 80	Tween 20	13500	5
L	Miglyol 812+Span 80	Tween 20	13500	10

*A fase aquosa foi composta pela solução do extrato bruto a 5% e pelos componentes descritos no quadro.
Fonte: Próprio Autor.

6.2.1.1.5 Emulsões contendo o extrato/frações

Os estudos preliminares conduziram a eleição de duas formulações mais promissoras; uma contendo a mistura de tensoativos (Tween[®] 20 e Span[®] 80) e a outra contendo o polímero (HPMC 2910).

Para preparação da emulsão contendo tensoativo, a fase hidrofílica foi constituída pela solução aquosa do extrato/frações (5%, p/v) adicionado de Tween[®] 20; enquanto que a fase oleosa foi composta por composta por Miglyol[®] 812 e Span[®] 80.

A formulação contendo o polímero, uma dispersão de HPMC em água a 80 °C foi preparada e sob agitação em temperatura ambiente (25 °C) até obtenção de uma solução translúcida. A fase aquosa foi composta pela dispersão de HPMC adicionada do extrato/frações (5%); enquanto a fase oleosa foi constituída de Miglyol[®] 812.

Ambas as fases foram aquecidas até 40 °C e em seguida a fase oleosa foi vertida na fase aquosa. A mistura foi homogeneizada em ultraturrax a 13500 rpm durante 5 minutos (WOLLENWEBER; OSCHMANN; DANIELS, 2002). A composição percentual de cada formulação está descrita na tabela 1.

Tabela 1 - Componentes da emulsão final.

Componentes	Emulsão Convencional	Emulsão Pickering
Miglyol® 812	10%	10%
Tween® 20, Span® 80	2%	-
Sol. do extrato/frações a 5%	88%	qsp
HPMC 2910	-	0,5 a 3,0%

Fonte: Próprio Autor.

6.2.1.2 Caracterização das Emulsões

Após fabricação, as emulsões foram deixadas em repouso por 24 horas e avaliadas conforme descrito a seguir:

- a) Resistência à Centrifugação: cerca de 10 mL de cada sistema foram transferidos para tubos do tipo Falcon e submetidos à centrifugação em três diferentes velocidades de rotação (276, 1105 e 2486 g), por 5 minutos sob temperatura ambiente (Centrífuga Labofuge 200, Heraeus®). Ao término de cada ciclo, as emulsões foram avaliadas quanto ao aspecto macroscópico, cremagem e separação de fases (ICH, 2003; ISAAC et al., 2008; LONNI et al., 2015).
- b) Análise visual: as emulsões foram avaliadas em busca de alterações visíveis ou outros indicativos de ocorrência de instabilidade tais como a cor, cremagem, coalescência, e/ou separação de fases (FERREIRA et al., 2010).
- c) Análise do tamanho de gotículas: as emulsões foram submetidas à análise do tamanho de gotícula por difratometria a laser em analisador (Mastersizer 2000, Malvern Instruments®) acoplado a unidade de dispersão em meio líquido (Hidro 2000, Malvern Instruments®). O tamanho das gotículas de cada uma das emulsões foi determinado em triplicata 24 h após a preparação. As distribuições de tamanho de gotículas foram caracterizadas pelo diâmetro médio D (50%), diâmetro em volume com 50% do volume da fase interna distribuídas em gotas menores que esse tamanho. Para a determinação do tamanho das gotículas cerca de 50 a 150 µL de cada emulsão foi adicionado a aproximadamente 500 mL de água ultrapura, até alcançar a obscuração necessária (entre 2 e 10%) e mantidos sob agitação a 1500 rpm no próprio equipamento. As análises foram

realizadas após 30 segundos de agitação e com intervalos de 30 segundos entre cada medição. Os dados representam a média de três determinações.

- d) Índice de cremagem: a taxa de formação de creme foi determinada experimentalmente pela medição do índice de cremagem (IC). Os valores de IC foram obtidos a partir da relação entre a altura total da camada de creme (CC) e a altura total da camada de emulsão (CE) (MACEDO et al., 2006; FERREIRA et al., 2010; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012). CC e CEs foram medidos diretamente nos tubos de armazenamento com a ajuda de uma escala graduada.
- e) pH: as emulsões foram analisadas em pHmetro pré-calibrado (Seven easy, Mettler Toledo®) com soluções tampão (pH 4,0 e 7,0) e o pH representa a média de três determinações (FERREIRA et al., 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; KHAN et al., 2013; JIN et al., 2015; LONNI et al., 2015).
- f) Microscopia: a análise microscópica das emulsões foi realizada através de microscopia de luz (Imager.Z1, Carl Zeiss®) com auxílio do software AxionVision® (SE64, Rel. 4.9.1).
- g) Viscosidade capilar: a viscosidade foi determinada em viscosímetro capilar (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2013). A escolha do capilar baseou-se na fluidez das formulações analisadas e as análises foram realizadas sob temperatura de 30 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata, e as determinações não podem ser superiores a 2% calculados em desvio. A viscosidade foi calculada segundo a equação:

$$V = K \times t \quad \text{Equação 1}$$

Onde: V = viscosidade dinâmica/capilar; K: constante capilar (mm²/s²); t = tempo (s). K = 0,3099 mm²/s².

- h) Reologia: a análise reológica das formulações foi realizada a 25 ± 2 °C em um reômetro (Modelo Physica MCR-501, Anton Paar®) equipado com cone e placa unidade com diâmetro de 50,011 mm (CP50-1). Amostras (1,0 mL) foram cuidadosamente aplicadas ao cone, assegurando que o cisalhamento da formulação fosse minimizado, e deixou-se equilibrar durante pelo menos 5 minutos antes da análise. Na análise contínua de cisalhamento (viscosidade), ascendente e descendente, as curvas de escoamento para cada

formulação foram registradas sobre taxas de corte que variam de 10 a 200 rpm. A taxa de cisalhamento variou de 10 a 300 s⁻¹ durante 150 s, permanecendo nas condições superiores por 10 s, e, em seguida, a taxa de cisalhamento foi gradativamente reduzida ao longo de um período de 150 s. As propriedades de cisalhamento foram determinadas e a curvas de fluxo ascendente/descendente foram modeladas utilizando a equação de Oswald (JONES et al., 2009; BRUSCHI, 2006; LONNI et al., 2015).

- i) Potencial Zeta: o potencial zeta das emulsões foi mensurado em Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments®). As medições foram feitas a 25 °C em amostras apropriadamente diluídas em água ultrapura. As amostras foram colocadas em cubeta específica para realização da análise.
- j) Análise quantitativa: as análises para quantificação de polifenóis totais (UV-Vis) e determinação dos teores de ácido gálico e ácido elágico (CLAE-DAD) nas emulsões foram realizadas de acordo com o método descrito anteriormente para matéria prima, extrato bruto e frações enriquecidas, com adaptações.

Para a análise de polifenóis totais, alíquotas de 0,5 mL das emulsões foram transferidas para balão volumétrico contendo 10 mL de água deionizada, adicionados 1,0 mL de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich®) e o volume foi aferido com solução de Na₂CO₃ a 29% (Merck®). As absorvâncias foram mensuradas em 760 nm, com auxílio de espectrofotômetro (UV mini-1240, Shimadzu®) 30 minutos após da adição do último reagente.

Considerando a quantificação dos marcadores por CLAE, uma alíquota de 0,5 mL da emulsão foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume aferido com água ultrapura. Em seguida, a solução foi filtrada diretamente para o vial através de filtro de PVDF com abertura de poro de 0,45 µm. Procedeu-se com as análises em cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com bomba quaternária (P680, Dionex®), amostrador/injetor automático (ASI-100, Dionex®), forno de coluna (5100, SunTherm®) e detector UV (D170U). Foi utilizada coluna C₁₈ (250 mm x 4.6 mm d.i., tamanho de partícula 5 µm, Nucleosil, Macherey-Nagel®) protegida por pré-coluna de mesma composição. O método gradiente foi o mesmo descrito no item 4.2.4.1.2.

6.2.2 Estudos de Estabilidade

6.2.2.1 Estabilidade Intrínseca

Alíquotas de 10 mL foram armazenadas verticalmente em tubos sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C), e avaliados a presença de fenômenos de instabilidade (cremagem, coalescência ou separação de fases) após 1, 2, 4, 6 e 24 h de preparação.

6.2.2.2 Ciclo gelo/degelo

Alíquotas de 10 mL de cada emulsão foram transferidas para tubos e esses foram armazenados verticalmente em ciclos repetidos de temperatura: -20 °C/16h: 25 °C/8h. A avaliação macroscópica das amostras foi realizada durante 7 ciclos.

6.2.2.3 Estabilidade Acelerada

As amostras de 10,0 mL de cada uma das emulsões foram colocadas em tubos hermeticamente fechados e armazenados em posição horizontal sob diferentes condições: temperatura ambiente (25 ± 2 °C), baixa temperatura (4 ± 2 °C) e alta temperatura (40 ± 2 °C). Os aspectos macroscópicos (cor, odor e aparência) e índice de cremagem das amostras foram avaliados após 1, 15, 30, 60 e 90 dias de exposição de armazenamento.

As amostras também foram armazenadas em embalagens plásticas sob temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 1, 15, 30, 60 e 90 dias. Durante o período de armazenamento as amostras foram caracterizadas quanto a: pH, tamanho de gotícula, turbidez, teor de polifenóis totais (UV-Vis), teor de ácido gálico e ácido elágico (CLAE) e potencial zeta. Todos os testes foram realizados em triplicata.

6.2.3 Ensaio de Liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados utilizando células de difusão de Franz modificadas com volume do meio receptor de 12 mL. O fluido receptor foi constituído por tampão salina fosfato (PBS) com valor de pH 7,4. As células de difusão de Franz com área de difusão igual a $1,77$ cm² (Gauer Glas) foram preenchidas com o meio receptor degaseificado e pré-aquecido a 32 °C (Banho maria Lauda 020T, Thermo Fisher Scientific®).

Em seguida, as células de difusão foram equipadas com filtros de Policarbonato 0,03 μm (Nuclepore, Whatman International Ltd.[®]). Subsequentemente, 0,5 g de emulsão foram espalhadas sobre os filtros e as células foram cobertas com Parafilm M[®]. Os experimentos de liberação *in vitro* foram realizados sob 32 °C e com uma velocidade de agitação magnética constante de 500 rpm. As emulsões foram difundidas ao longo de um período de 6 h. Alíquotas de 100 μL foram retiradas em 10 intervalos de tempo (30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 6 h) e o volume de amostra foi substituído pelo meio receptor fresco, pré-aquecido. As amostras foram analisadas por CLAE (método descrito anteriormente 4.2.4.1.2). As taxas de liberação foram calculadas por coeficientes de regressão e de liberação lineares, calculadas dividindo-se as taxas de liberação pela concentração inicial de marcadores no veículo. Os experimentos foram realizados em quintuplicata (LUNTER; DANIELS, 2012; ROTTKE; LUNTER; DANIELS, 2014).

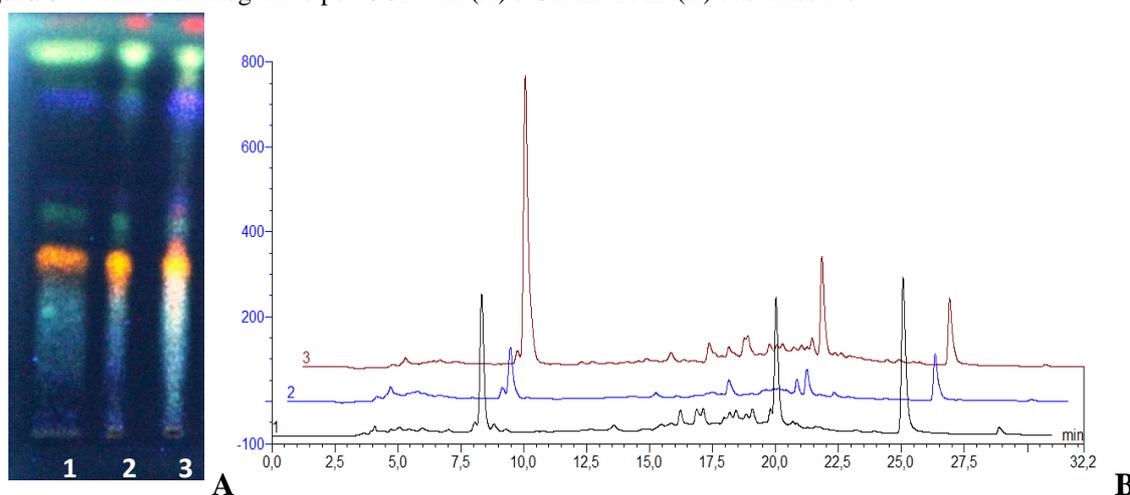
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Obtenção e Caracterização das Emulsões

A análise comparativa dos perfis químicos e dos dados quantitativos de extratos e frações dos frutos de *L. ferrea* realizada no capítulo 2 indicou que o extrato bruto aquoso preparado por turbólise e suas respectivas frações apresentaram o maior rendimento em marcadores. Por esta razão, estas condições extrativas foram selecionadas para preparação dos extratos avaliados durante o desenvolvimento dos sistemas emulsionados.

Os perfis químicos típicos por CCD-AE e CLAE-DAD de extratos e frações estão apresentados na figura 3.

Figura 3 - Perfil cromatográfico por CCD-AE (A) e CLAE-DAD (B) das amostras.



1: Extrato Bruto; 2: Fração Aquosa; 3: Fração Orgânica.

Fonte: Próprio Autor.

Os cromatogramas ilustram a diversidade química presentes nos extratos dos frutos de *L. ferrea*. Porém, também permitem observar variações importantes na intensidade das manchas mais marcantes reveladas na cromatoplate e que ficam mais evidentes no cromatograma obtido por CLAE. A análise conjunta dos perfis químicos indica a presença majoritária dos polifenóis, principalmente, os monômeros de taninos hidrolisáveis (confirmado pelas bandas e picos característicos dos marcadores da espécie, ácido gálico e ácido elágico).

Do ponto de vista quantitativo, os dados para os polifenóis totais por UV-Vis e os dados para os marcadores por CLAE-DAD estão descritos na tabela 2.

Os dados quantitativos, tanto para o teor de polifenóis totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, quanto para o teor de marcadores por CLAE-DAD, confirmaram o enriquecimento da fração orgânica. Os resultados médios obtidos por espectrofotometria foram de 47,86 %m/m e 56,64 %m/m, calculados como ácido gálico e ácido elágico respectivamente. Considerando as análises quantitativas realizadas por CLAE-DAD, corroboram os dados qualitativos e espectrofotométricos evidenciando o enriquecimento dos marcadores na fração orgânica, cujos teores obtidos foram iguais a 5,67 %m/m e 2,96 %m/m para o ácido gálico e o ácido elágico, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Teor de polifenóis totais (TPT – UV-Vis) e teor de ácido gálico e ácido elágico (CLAE) no extrato bruto e frações aquosa e orgânica.

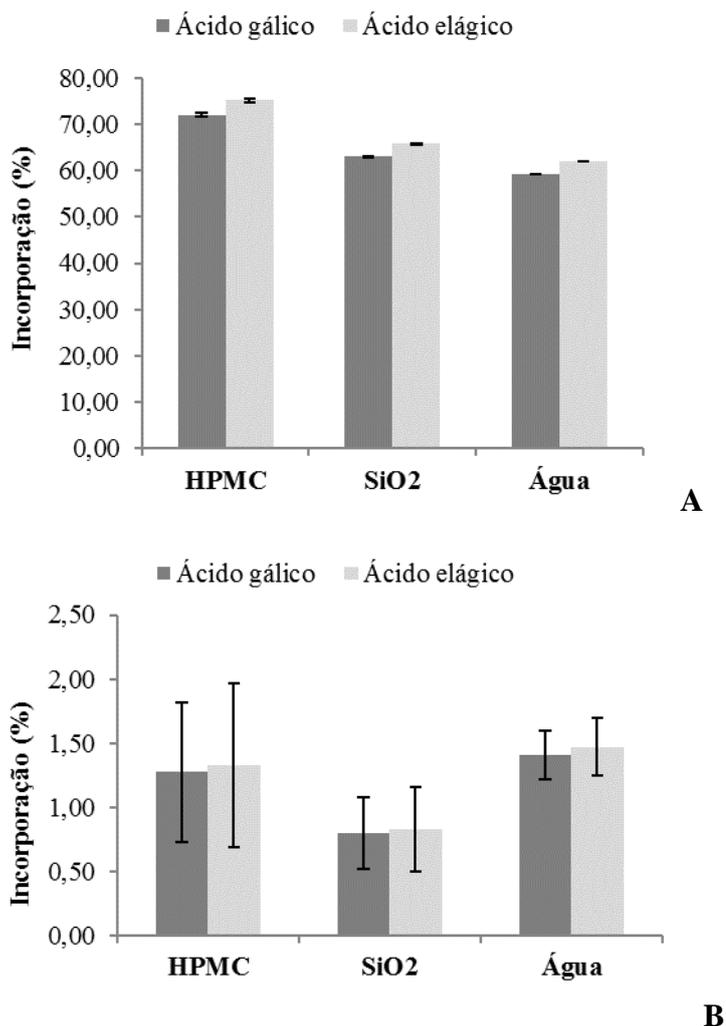
Amostra	TPT – UV-Vis (%m/m)	CLAE (%m/m)
	Ácido gálico - Média ± DP (DPR%)	
EB	33,09 ± 0,03 (0,08)	3,99 ± 1,20 (2,52)
FAq	25,57 ± 0,03 (0,10)	1,94 ± 0,06 (0,28)
FOr	47,86 ± 0,05 (0,11)	5,67 ± 1,15 (0,23)
	Ácido elágico - Média ± DP (DPR%)	
EB	39,17 ± 0,03 (0,08)	1,48 ± 0,61 (0,42)
FAq	30,27 ± 0,03 (0,10)	0,88 ± 0,52 (1,08)
FOr	56,64 ± 0,06 (0,11)	2,96 ± 0,26 (0,44)

EB-Aq: Extrato Bruto Aquoso; FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; DP: Desvio Padrão; DPR%: Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Próprio autor.

A primeira etapa para incorporação dos ativos (extrato ou frações) no sistema consistiu na avaliação da solubilidade do extrato bruto (EB) e frações (aquosa-FAq e orgânica-FOr) nos diferentes componentes da formulação. Os resultados obtidos para a distribuição dos marcadores nas fases aquosa e oleosa estão apresentados na figura 4, e revelam que os ativos apresentaram maior solubilidade nos componentes aquosos da formulação. Dessa forma, os ativos (extrato ou frações) foram adicionados à fase aquosa nas proporções equivalentes em resíduo seco necessário para obtenção da respectiva concentração do extrato fluido nativo.

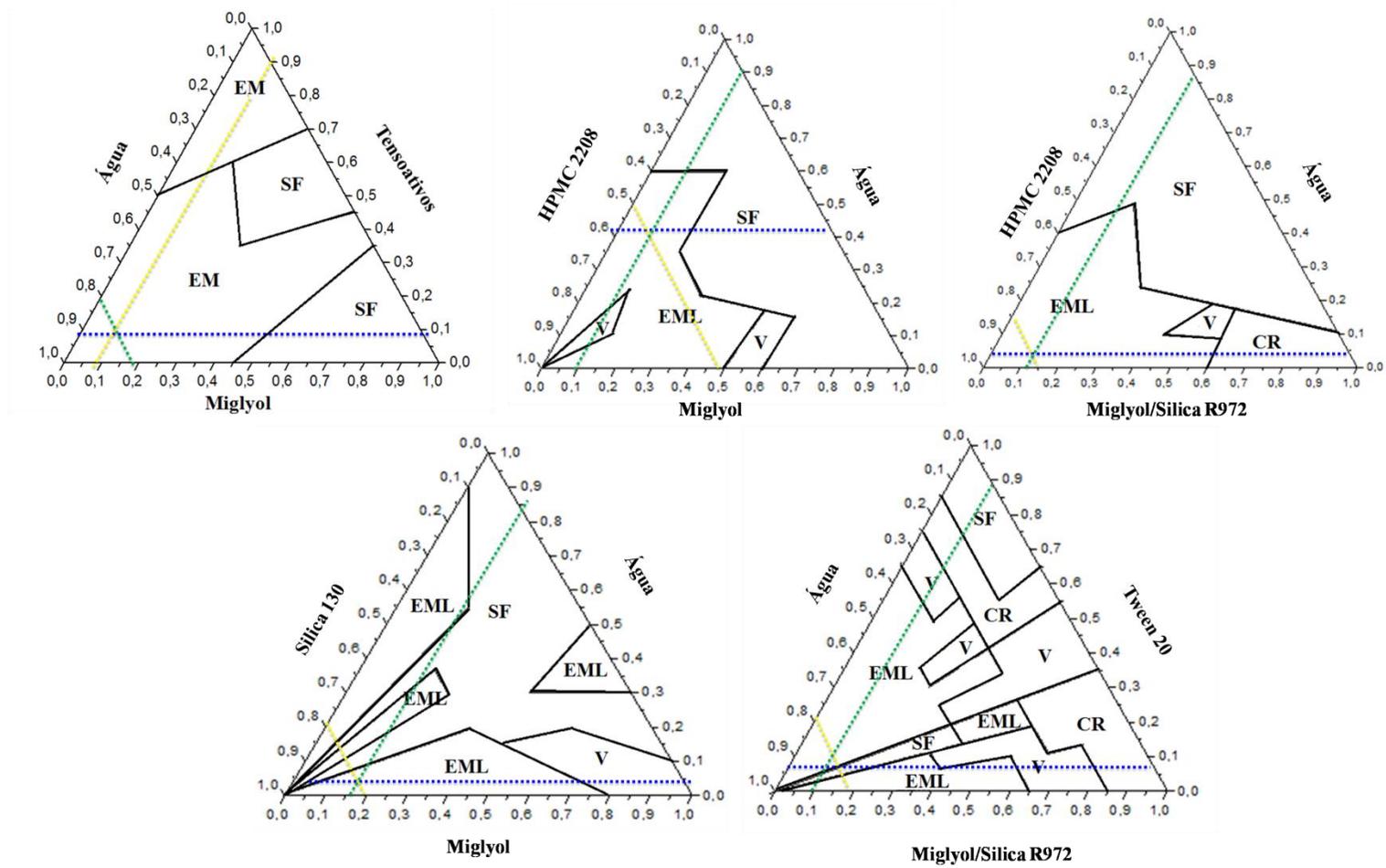
Figura 4 - Avaliação da solubilidade do extrato bruto (EB) e frações (aquosa-FAq e orgânica - FOr) nos componentes da formulação. A - fase aquosa, B - fase oleosa.



Fonte: Próprio autor.

Em seguida, os diagramas pseudoternários foram construídos a partir da dispersão em ultraturrax por 2 minutos das formulações estabilizadas por agentes tensoativos, polímeros ou partículas de sílica. Os diagramas permitiram identificar as várias regiões geradas, bem como a região que representasse a melhor combinação dos componentes avaliados em suas respectivas quantidades. Os diagramas confeccionados foram inspecionados visualmente para identificação das regiões de formação de sistemas emulsionados (Figura 5). Uma das vantagens da utilização de diagramas pseudoternários obtidos por titulação, é o amplo número de amostras de diferentes composições originado com rapidez, indicando as proporções nas quais os componentes devem ser misturados (SILVA et al., 2009). O encontro das linhas (azul, amarela e verde) indica a região escolhida para as análises posteriores.

Figura 5 - Diagramas de fase pseudoternários.



CR: Creme; EM: Emulsão; EML: Emulsão Líquida; V: Emulsão Viscosa; SF: Separação de fases.
 Fonte: Próprio autor.

Entre os objetivos deste estudo para a realização de diagramas pseudoternários, encontram-se a verificação de áreas que gerassem emulsão e aquelas que nessas regiões apresentassem maior quantidade de água. Dessa forma, foi possível verificar que em três dos diagramas obtidos, foram observadas grande região de separação de fases. Apesar disso, em todos os diagramas foram observadas as regiões de emulsão formadas, alcançando o objetivo pretendido.

Com a escolha das regiões que formaram emulsões, novas amostras de sistemas foram preparadas e avaliadas após 24 horas quanto ao aspecto visual. Entre os sistemas preparados, as formulações estáveis foram aquelas estabilizadas com mistura de tensoativos (Tween[®] 20 e Span[®] 80) ou HPMC. Portanto, as condições de confecção sobre as características de emulsões estabilizadas por tensoativos ou HPMC foram avaliadas e estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação das condições de preparação de emulsões estabilizadas por tensoativos ou HPMC.

Formulação	Ultraturrax							
	Estabilizante	Rotação (rpm)	Tempo (min)	Visual	pH	η	Zeta (mV)	d ₅₀ (μ m)
A	HPMC 2208	8000	5	SF	-	-	-	-
B	HPMC 2208	8000	10	SF	-	-	-	-
C	HPMC 2208	13500	5	B, Ho	5,54	0,63	-8,49	24,066
D	HPMC 2208	13500	10	B, Ho	5,44	0,45	-15,44	25,753
E	HPMC 2910	8000	5	SF	-	-	-	-
F	HPMC 2910	8000	10	SF	-	-	-	-
G	HPMC 2910	13500	5	B, Ho	5,57	0,37	-7,43	22,591
H	HPMC 2910	13500	10	B, Ho	5,51	0,33	-7,90	21,500
I	Span 80+ Tween 20	8000	5	B, Ho	4,19	2,21	-29,2	1,189
J	Span 80+ Tween 20	8000	10	B, Ho	4,25	2,25	-28,72	0,996
K	Span 80+ Tween 20	13500	5	B, Ho	4,05	2,26	-29,91	0,850
L	Span 80+ Tween 20	13500	10	B, Ho	4,29	3,17	-30,5	0,894

B: Branco; Ho: Homogêneo; SF: Separação de Fases.

Fonte: Próprio autor.

Com relação à velocidade de agitação analisada (8000 e 13500 rpm), observou-se formação de espuma principalmente nas emulsões que continham tensoativo na composição e aquelas que foram obtidas na maior velocidade de agitação. Aliado a este aspecto e

considerando a avaliação visual, na menor velocidade de agitação, observou-se que as formulações A, B, E e F apresentaram separação de fases e, por esta razão, não foram submetidas aos demais ensaios (Tabela 3).

Os valores de pH obtidos não indicaram diferenças entre as emulsões obtidas com tensoativo, permanecendo na faixa de 4,05 a 4,29, e entre as emulsões obtidas com o HPMC, com valores entre 5,44 e 5,57.

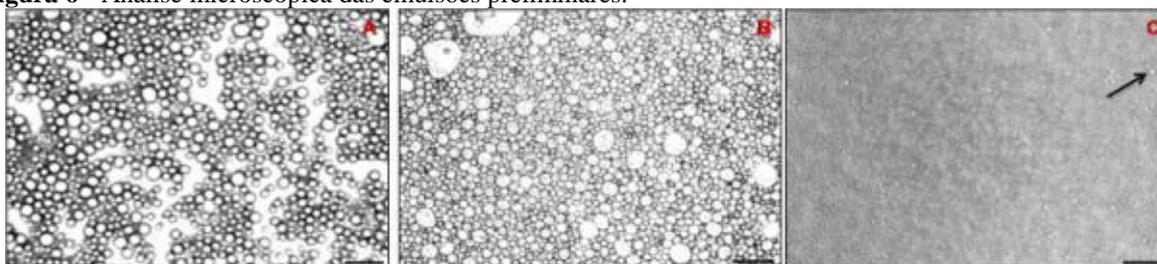
Quanto aos resultados de tamanho de gotícula obtidos, observou-se no geral uma diminuição no tamanho das gotículas das emulsões, quando essas foram fabricadas com velocidade de 13500 rpm. Estudos demonstram que, o tamanho da gotícula diminui quando há um aumento na intensidade de energia fornecida ao sistema ou quando há um aumento na duração do processo de obtenção (MCCLEMENTS, 2012). Com relação ao tempo, não foi observada mudança importante nos valores do diâmetro mensurado. Quanto ao tipo de HPMC utilizado e de acordo com os estudos de Schulz e Daniels (2000) e Wollenweber, Oschmann e Daniels (2002) o tamanho da gotícula é dependente do peso molecular do HPMC utilizado na emulsão e independente do tipo de substituição (HPMC 2208 apresenta 23,8% de grupamento metila e 5,3% de grupamento hidroxipropil; já o HPMC 2910 apresenta 28,7% de grupamento metila e 9,1% de grupamento hidroxipropil).

Corroborando com o tamanho de gotícula mensurado, a análise por microscopia confirmou os resultados obtidos. Na figura 6, pode-se observar que as emulsões obtidas com tensoativo apresentaram menor tamanho de gotícula.

De acordo com Gaspar e Maia Campos (2003), em relação à viscosidade das emulsões, os valores apresentados demonstraram aspecto fluido, caráter desejável em formulações destinadas a uso tópico, pois facilitam o espalhamento e recuperação da viscosidade no momento que se encerra a aplicação, evitando escoamento do produto.

Portanto, de acordo com o conjunto dos resultados relacionados ao aspecto visual e menor tamanho de gotícula, as condições de fabricação para fabricação de emulsões foram 13500 rpm durante 5 minutos.

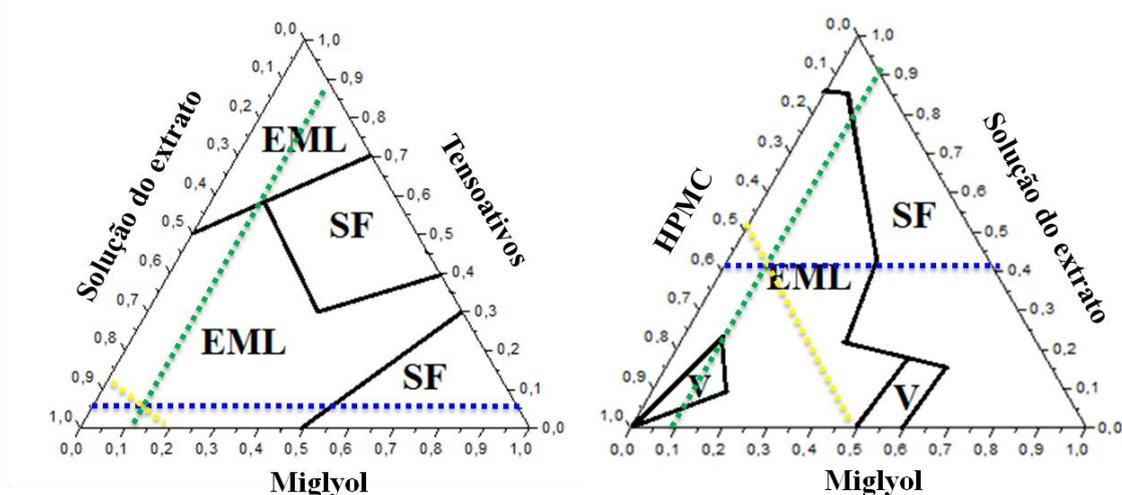
Figura 6 - Análise microscópica das emulsões preliminares.



A, B, C: formulações C, G e K, respectivamente; Tamanho da barra: 10 μm ; Objetiva: 10x.
Fonte: Próprio autor.

A partir dos achados do estudo acerca das condições de fabricação e da influência de HPMC sobre a estabilidade e as características de emulsões, novos diagramas pseudoternários foram confeccionados a partir de formulações contendo o extrato bruto dos frutos de *L. ferrea* (Figura 7).

Figura 7 - Diagramas de fase pseudoternários para sistemas contendo o extrato bruto dos frutos de *L. ferrea*.



CR: Creme; EM: Emulsão; EML: Emulsão Líquida; V: Emulsão Viscosa; SF: Separação de fases.
Fonte: Próprio autor.

Na construção dos diagramas contendo a solução do extrato bruto foram evidenciadas as mesmas regiões dos diagramas sem o extrato, região de emulsão líquida (fluida), separação de fases e emulsão viscosa. Comparando-se os diagramas, também é possível verificar um pequeno aumento na região de emulsão viscosa, do diagrama contendo HPMC (2910), já que no ensaio anterior foi utilizado um tipo diferente de HPMC (2208); além de um aumento na região que corresponde à formação de emulsões líquidas. Com relação ao diagrama contendo a combinação de tensoativos, houve um discreto aumento na região de separação de fases. No diagrama obtido sem a presença do extrato, a região de separação de fases ficou

compreendida entre 45 e 70% de tensoativos, e com a presença do extrato, permaneceu na faixa de 40 a 70%.

Dessa forma, optou-se por trabalhar com as regiões que contem 10% de óleo, 88% de solução do extrato/frações a 5% e 2% da mistura de tensoativos (Tween 20 e Span 80), para obter emulsões com tensoativo; e, com a região contendo 10% de óleo, 50% solução de HPMC entre 0,5 e 3,0% e qsp da solução do extrato/frações.

6.3.2 Estudo de Estabilidade

Com a seleção das regiões de emulsão mencionadas acima, indicadas pelo cruzamento das linhas (amarela, azul e verde), procedeu-se com o estudo de estabilidade das formulações obtidas com e sem tensoativo e com adição do extrato bruto/frações.

Durante a estabilidade de 90 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: centrifugação, índice de cremagem, análise macroscópica, pH, microscopia, tamanho de gotícula, potencial zeta, teor por UV-Vis e CLAE-DAD, além da análise de viscosidade e curvas de fluxo.

De acordo com os resultados de centrifugação (Quadro 2), apenas as emulsões contendo 1,0% de HPMC apresentaram separação de fases na maior força aplicada (2486 g). Este tipo de análise produz estresse na amostra, decorrente da simulação do aumento na força da gravidade e conseqüentemente forçando o deslocamento e sedimentação das gotículas antecipando assim possíveis processos de instabilidade que possam ocorrer. Tais alterações podem se manifestar sob a forma de precipitação, separação de fases ou coalescência (MCCLEMENTS, 2007).

Quadro 2 - Estabilidade sob centrifugação para emulsões contendo extrato/frações de *L. ferrea*.

EB	1600	3200	4800	FAq	1600	3200	4800	FOr	1600	3200	4800
T20S80				T20S80				T20S80			
HPMC 1,0%				HPMC 1,0%				HPMC 1,0%			
HPMC 2,0%				HPMC 2,0%				HPMC 2,0%			
HPMC 3,0%				HPMC 3,0%				HPMC 3,0%			

Cremagem

Separação de fases

Fonte: Próprio autor.

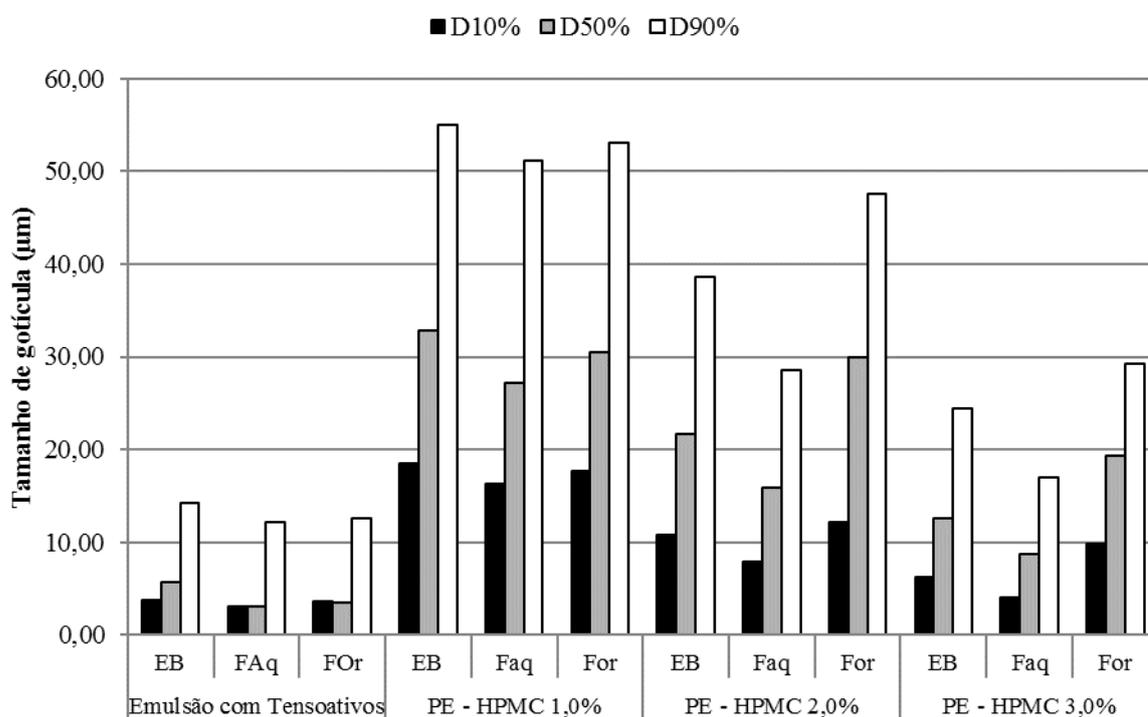
Quanto à estabilidade intrínseca, avaliada durante as primeiras 24 horas, todas as formulações apresentaram aspecto homogêneo, coloração amarela e formação de creme. Neste mesmo intervalo, a análise do tamanho de gotícula revelou que os menores tamanhos de

gotícula foram obtidos nas formulações estabilizadas por tensoativos ou por HPMC na proporção de 3,0% (Figura 8).

A utilização de tensoativos não iônicos resulta em formação de uma monocamada ao redor da gotícula dispersa, uma vez que permanece na interface óleo-água, atingindo saturação e tornando menor o tamanho da gotícula. Além disso, a quantidade de tensoativo possui influência sobre o tamanho da gotícula formada (FERREIRA et al., 2010; DALTIM, 2011). Os resultados obtidos para o tamanho de gotícula ($< 20 \mu\text{m}$) estão de acordo com dados encontrados na literatura que utilizam mesma composição de fase oleosa e mistura de tensoativos (MACEDO et al., 2006).

Quanto às emulsões contendo HPMC, a redução interfacial promovida pela adição do polímero não é tão acentuada quanto à utilização de tensoativos não iônicos, mas o polímero irá formar uma camada de proteção aderida à interface. Dessa forma, quanto maior a quantidade de polímero adicionada à emulsão, menor o tamanho de gotícula.

Figura 8 - Tamanho médio de gotículas de emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de *L. ferrea*.



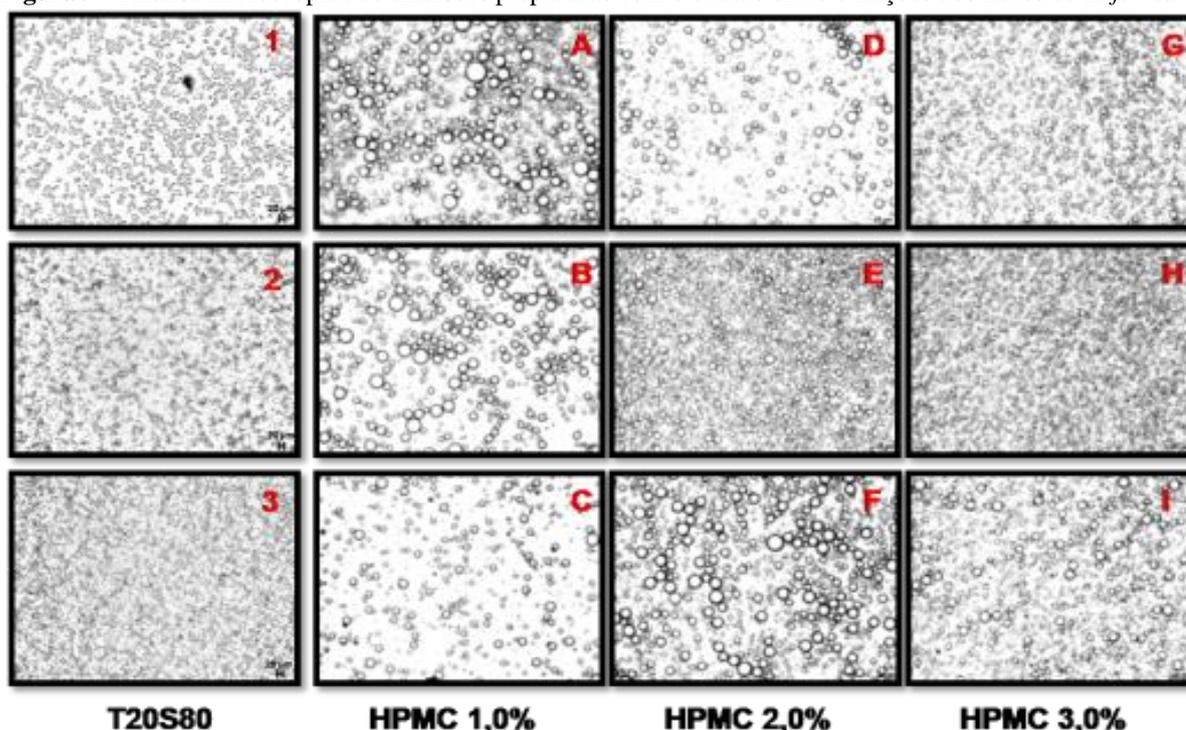
HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; PE: Pickering Emulsão.

Fonte: Próprio Autor.

Os resultados da análise das emulsões por microscopia revelaram que as gotículas apresentaram aspecto branco, devido à característica do óleo (Figura 9). Todas as formulações apresentaram cor característica do extrato e frações, marrom e aparência leitosa. De maneira

geral, as imagens da microscopia corroboram os dados obtidos na análise do tamanho de gotícula, onde as emulsões que contêm o extrato bruto ou a fração orgânica, seja com a presença de tensoativo e ou com HPMC a 3,0%, apresentaram maiores tamanhos de gotícula comparadas as que contêm a fração aquosa.

Figura 9 - Análise microscópica de emulsões preparadas com o extrato bruto e frações dos frutos de *L. ferrea*.



1, A, D, G: extrato bruto; 2, B, E, H: fração aquosa; 3, C, F, I: fração orgânica; T20S80: Tween 20, Span 80; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose.

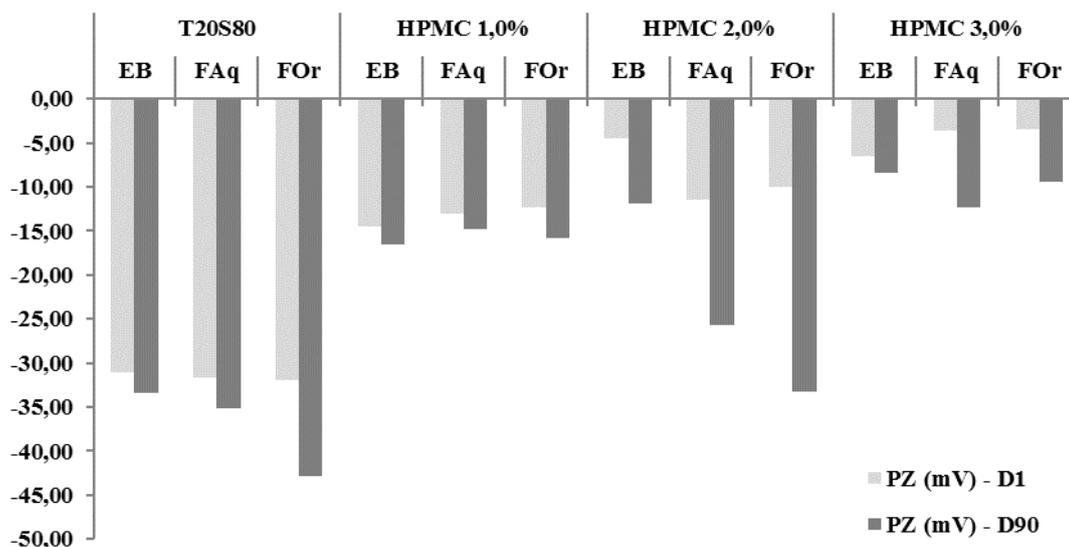
Fonte: Próprio Autor.

O potencial zeta é um indicativo de estabilidade de sistemas dispersos e depende da composição da formulação. Por esta razão, não há faixas preestabelecidas de potencial que sejam preditoras de estabilidade. Por outro lado, a variação deste parâmetro em uma mesma formulação é um forte indicativo de ocorrência de fenômenos que podem levar a instabilização do sistema. Neste estudo, os sistemas apresentaram variação significativa entre os grupos em razão das variações de formulação, especialmente entre o sistema estabilizado por tensoativo e os sistemas estabilizados com HPMC (Figura 10). Por outro lado, dentro dos grupos de mesma formulação, os sistemas não apresentaram variação relevante 24 horas após a fabricação. Considerando a natureza do sistema, o achado indica que a composição complexa dos derivados vegetais não proporciona distúrbio significativo a ponto de comprometer ou desencadear fenômenos perceptíveis que possam levar a desestabilização do sistema. Neste contexto, a manutenção dos derivados vegetais na fase externa pode

desempenhar diversas funções tal como conservante para formulação (KHAN et al., 2013) ou compor ativo sinérgico para veiculação de fármacos clássicos (WAGNER, 2011).

A avaliação do potencial Zeta após 90 dias demonstrou que alguns sistemas sofreram pouca influência do tempo de armazenamento. Exceção do sistema estabilizado por tensoativos contendo a fração orgânica e dos sistemas estabilizados por HPMC acima de 2% apresentaram alteração importante de potencial.

Figura 10 - Determinação do potencial Zeta de emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de *L. ferrea*.

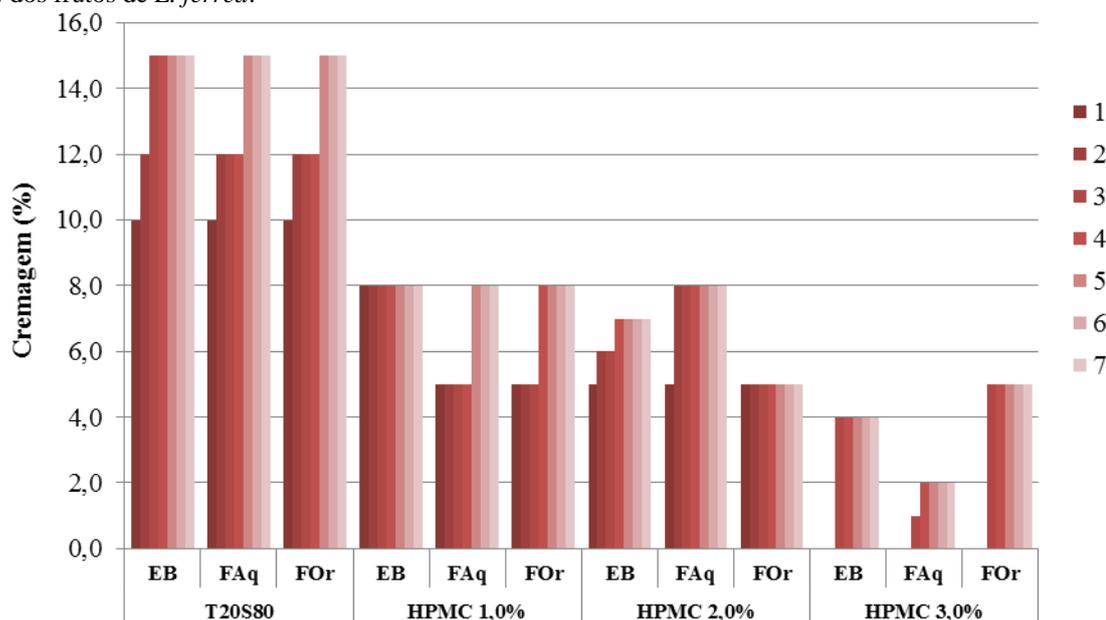


EB: Extrato Bruto; FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; T20S80: Tween 20, Span 80; PZ: Potencial Zeta.

Fonte: Próprio Autor.

Em relação à análise do ciclo gelo/degelo, os resultados permitiram observar que todas as emulsões apresentaram estabilidade durante os 7 ciclos. O comportamento de formação de creme para as emulsões estão sumarizados na figura 11. Os sistemas estabilizados por tensoativo apresentaram maior índice de cremagem quando comparadas com as formulações estabilizadas por HPMC, com destaque para as formulações preparadas com 3,0% de HPMC que apresentaram menor índice de cremagem.

Figura 11 - Ciclo gelo/degelo para avaliação de emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de *L. ferrea*.

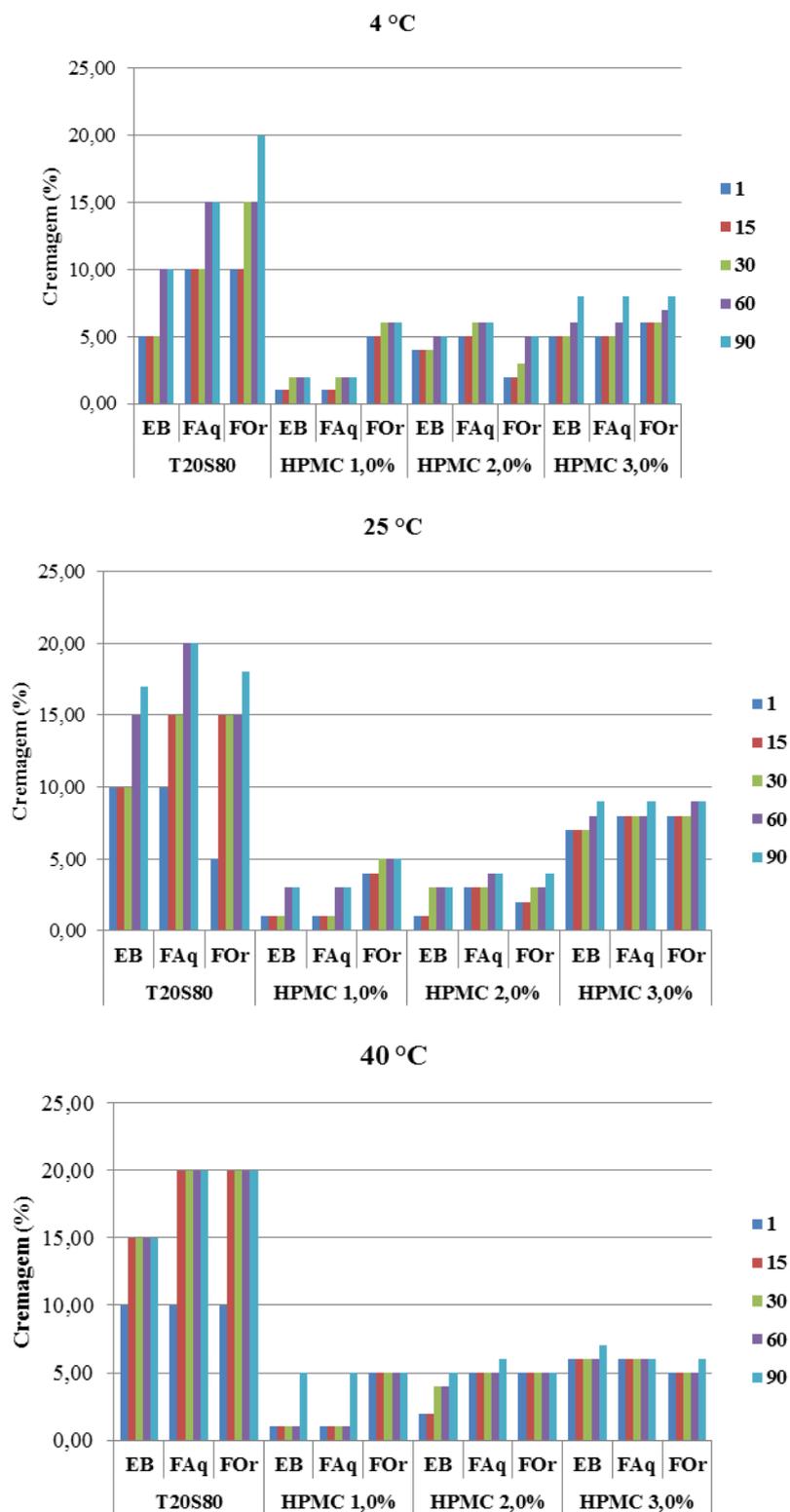


EB: Extrato Bruto; FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; T20S80: Tween 20, Span 80

Fonte: Próprio Autor.

A estabilidade acelerada das emulsões contendo os derivados dos frutos de *L. ferrea* foi estudada durante 90 dias sob condições diferentes de temperatura (4, 25 e 40 °C). As emulsões estocadas a 4 °C apresentaram-se mais estáveis durante os 90 dias, quando comparadas com as emulsões estocadas a 40 °C. Isso pode ser devido ao fato de estarem armazenadas a baixa temperatura e, conseqüentemente, há menor colisão entre as gotículas do sistema. Além disso, foi observado que as emulsões que possuem tensoativos na composição apresentaram-se com aspecto heterogêneo e uma formação de camada inferior clara com 90 dias de análise. Os resultados de índice de cremagem estão apresentados na figura 12.

Figura 12 - Índice de cremagem em diferentes condições de armazenagem para emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de *L. ferrea*.



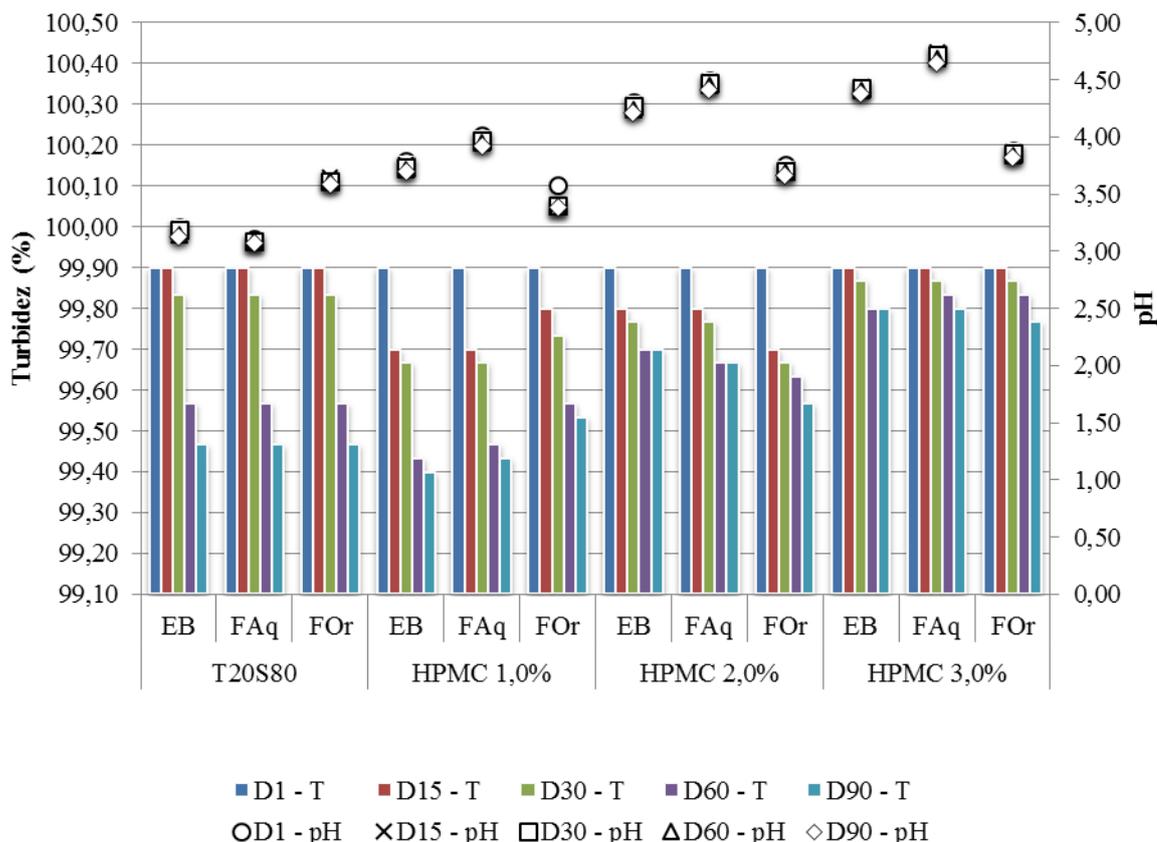
EB: Extrato Bruto; FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; T20S80: Tween 20, Span 80
 Fonte: Próprio Autor.

Ainda sob o ponto de vista da avaliação da estabilidade da dispersão de gotículas, a turbidez das emulsões foi determinada através da mensuração da transmitância em espectrofotômetro (UV-1240, Shimadzu®). Os dados indicaram elevado grau de dispersão das emulsões, as quais não apresentaram grandes alterações durante o período de análise (Figura 13). Entretanto, as emulsões estabilizadas com HPMC apresentaram tendência a maior homogeneidade na turbidez, mesmo depois de 90 dias. Comportamento que pode ter sido decorrente da estruturação do veículo pela rede polimérica do estabilizante.

Considerando que os derivados vegetais encontram-se distribuídos na fase externa do sistema, a variação da composição do ativo (extrato bruto ou fração) foi o principal responsável pela variação no pH das emulsões. Enquanto nos sistemas estabilizados por tensoativos não houve diferença entre os componentes aquosos (extrato bruto e fração), em todos os sistemas a incorporação da fração aquosa ocasionou um leve aumento no pH. Ademais, os sistemas estabilizados por HPMC ofereceram um curioso aumento de pH em função da concentração do polímero. A interação entre polifenóis e ésteres de celulose tal como metilcelulose e hidroxipropilcelulose é dependente da massa molecular do polímero, do número de grupos galoi no polifenol e sua respectiva hidrofobicidade, o que pode resultar na formação de complexos e até agregados (PATEL; NIJSSE; VELIKOV, 2011). Portanto, os efeitos da composição da fase aquosa (estrutura e concentração de polifenóis) e das características físico-químicas do polímero (concentração, grau de substituição, massa molecular, etc), merecem maior grau de detalhamento em estudos futuros com o propósito de esclarecer possíveis interações favoráveis/desfavoráveis à preparação e estabilização de sistemas emulsionados contendo derivados vegetais. Neste contexto, os dados demonstraram ainda que a incorporação da fração orgânica (FOr) não causou modificações importantes no pH dos sistemas, apresentando resposta semelhante independente do sistema estabilizante empregado ou da concentração do polímero na formulação.

Considerando que a medida dos valores de pH é uma das ferramentas mais empregadas para avaliar a ocorrência de fenômenos de instabilidade em sistema emulsionados, decorrente de eventual ocorrência de degradação ou desestruturação dos sistemas de tensoativos; os resultados encontrados neste estudo indicam que as formulações foram sistemas estáveis e sem modificações importantes no parâmetro de pH mesmo após 90 dias de armazenamento (FERREIRA et al., 2010; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012; LONNI et al., 2015).

Figura 13 - Resultados para as determinações de turbidez (barras) e pH (linhas) durante estudo de estabilidade (1 a 90 dias) de emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de *L. ferrea*.



EB: Extrato Bruto; FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; T20S80: Tween 20, Span 80.

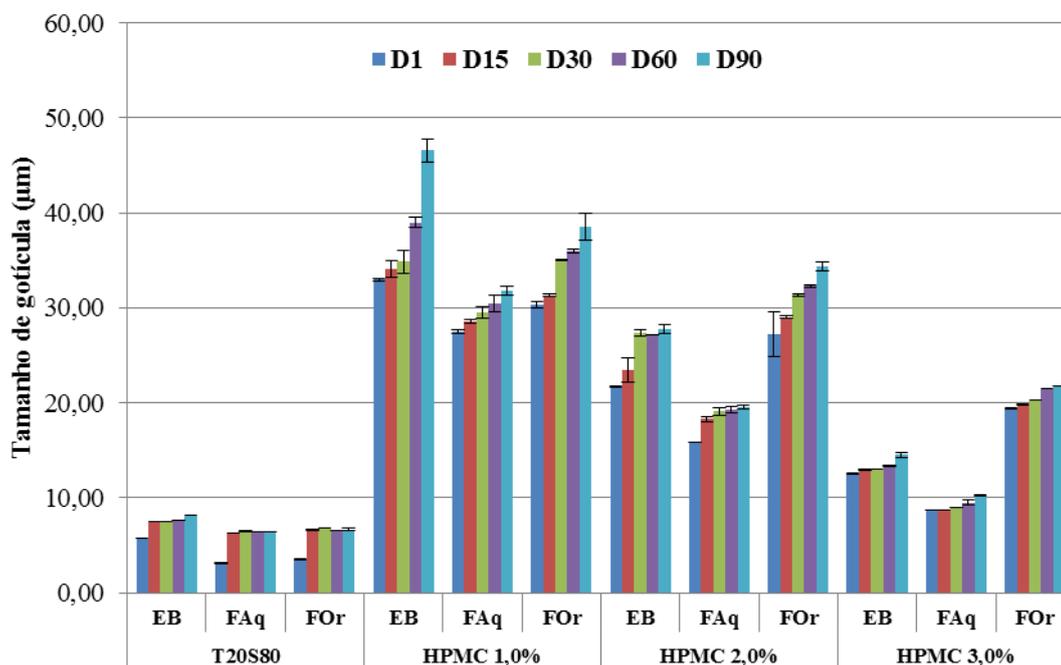
Fonte: Próprio Autor.

O tamanho médio de gotícula determinado durante o ensaio de estabilidade das emulsões contendo os derivados dos frutos de *L. ferrea* estão apresentados na figura 14.

As emulsões estabilizadas por tensoativos não apresentaram mudança significativa entre os dias 15, 30, 60 e 90. Com tamanho menor de gota a probabilidade de haver algum mecanismo de desestabilização do sistema é reduzida.

Os sistemas estabilizados com HPMC apresentaram diminuição no tamanho das gotículas em função do aumento do percentual de HPMC. Além disso, observou-se um aumento no tamanho de gotícula em todos esses sistemas com o decorrer dos dias de análise. De acordo com Duffus e colaboradores (2016), gotículas menores são produzidas com o aumento na concentração de partículas, apesar disso a estabilidade das gotículas não é afetada pela concentração.

Figura 14 - Avaliação do diâmetro médio de gotícula para emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de *L. ferrea*, submetidas a estudo de estabilidade.



E

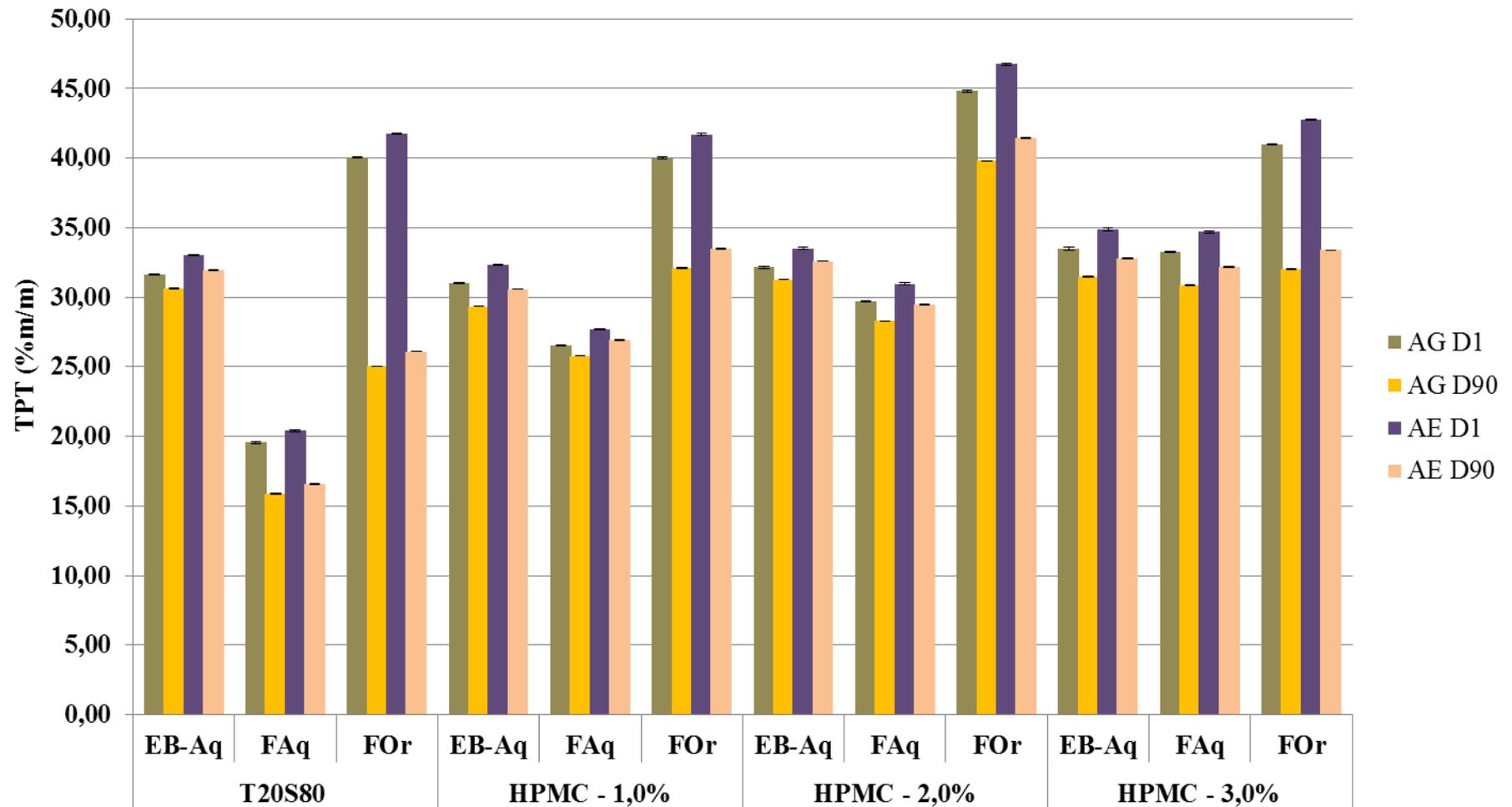
B: Extrato Bruto; FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; T20S80: Tween 20, Span 80.

Fonte: Próprio Autor.

Os teores de polifenóis totais (UV-Vis) e de ácido gálico e ácido elágico (CLAE-DAD) foram avaliados durante os dias de análise (1 a 90 dias) e os resultados encontrados para os dias 1 e 90 estão nas figuras 15 e 16, respectivamente.

O teor inicial de polifenóis, obtidos por UV-Vis, permaneceu entre 19,57 e 44,83 %m/m e na faixa de 20,41 a 46,74 %m/m, calculados como ácido gálico e ácido elágico, respectivamente. Foi observada uma diferença significativa no teor de polifenóis totais entre os dias 1 e 90 da análise de estabilidade dos sistemas. Os sistemas obtidos com tensoativo, conforme observado na análise visual, apresentaram aspecto heterogêneo e uma formação de camada inferior clara no dia 90. Além disso, as formulações que possuem maior quantidade de HPMC (3,0%) podem ter sofrido influência da interação entre os polifenóis e os componentes da formulação (PATEL; NIJSSE; VELIKOV; 2011). Os mesmos resultados de decréscimo foram observados nas análises dos sistemas por CLAE-DAD durante o ensaio de estabilidade.

Figura 15 - Teor de polifenóis totais por UV-Vis para emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de *L. ferrea*, submetidas a estudo de estabilidade (dias 1 e 90).

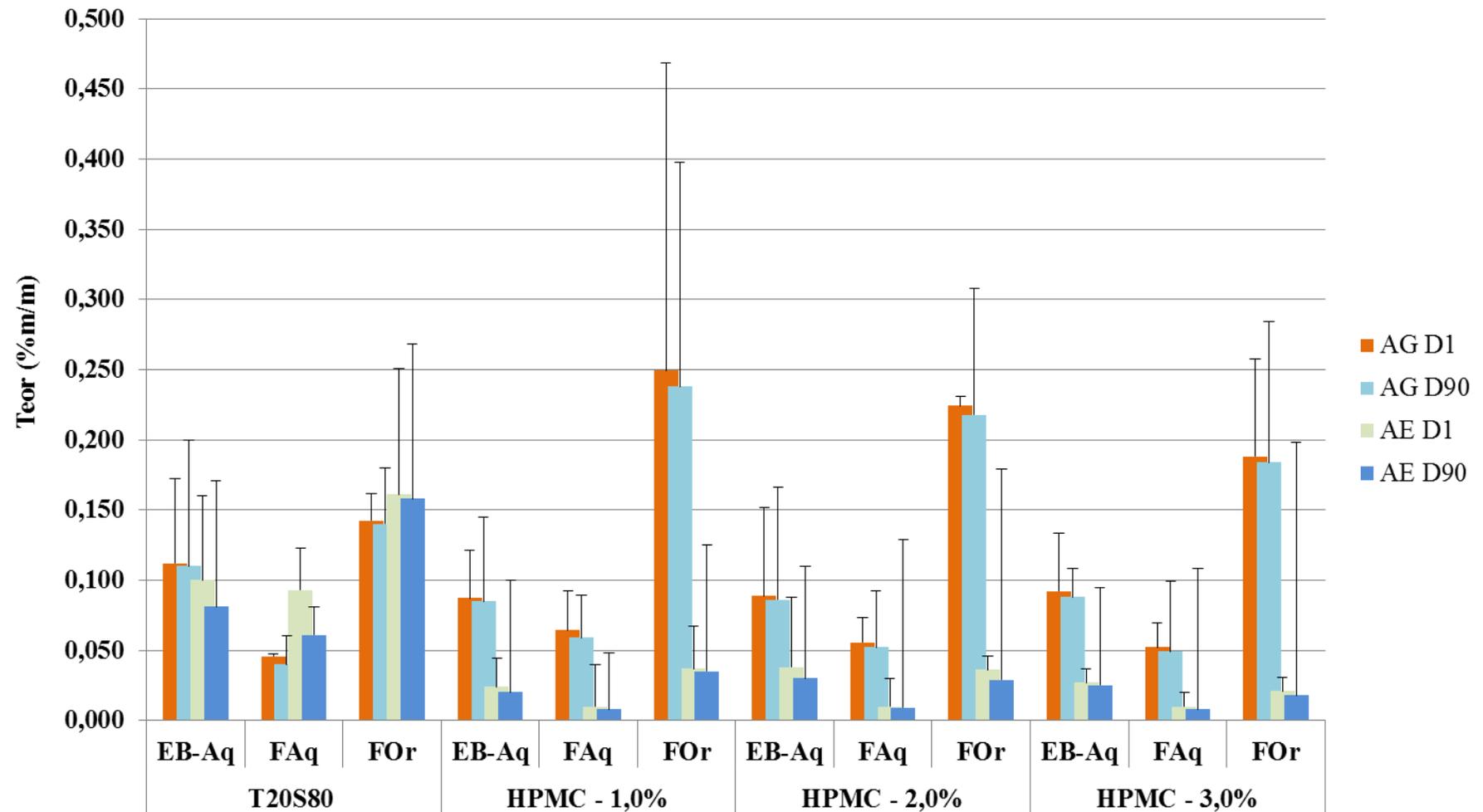


EB: Extrato Bruto; FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; T20S80: Tween 20, Span 80.

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (desvio padrão relativo %).

Fonte: Próprio Autor.

Figura 16 - Teor de ácido gálico e ácido elágico por CLAE-DAD para emulsões preparadas com o extrato bruto (EB) e frações (FAq, FOr) dos frutos de *L. ferrea*, submetidas a estudo de estabilidade (dias 1 e 90).



EB: Extrato Bruto; FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; T20S80: Tween 20, Span 80.

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão.

Fonte: Próprio Autor.

O comportamento reológico das emulsões foi avaliado com o auxílio de um reômetro modular. Os sistemas foram investigados quanto à dependência da viscosidade em diferentes taxas de cisalhamento (*shear rate*). Os ensaios foram realizados sob temperatura ambiente (25 ± 1 °C), num total de 30 determinações com intervalos de 5 segundos. A figura 15 mostra as curvas de viscosidade das emulsões obtidas com tensoativo e com HPMC a 3%.

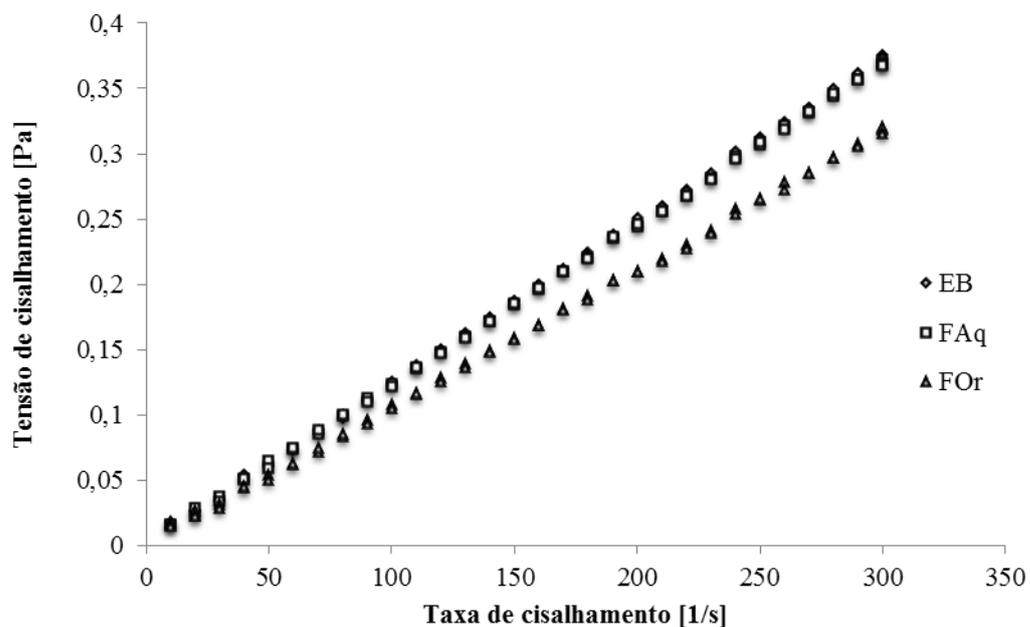
A análise da viscosidade é importante, pois de acordo com a lei de Stokes, a separação de fases entre dois líquidos imiscíveis depende do diâmetro das gotículas e é inversamente proporcional a viscosidade do sistema. Logo, a medida é bastante utilizada para determinar a consistência ou fluidez adequada, indicando a estabilidade do produto com o tempo. Dessa forma, associado ao tamanho das gotículas de óleo que estão presentes no sistema, quanto menor o diâmetro, menor a velocidade de sedimentação e maior será a estabilidade do produto (LIU; TANG, 2011; XAVIER-JÚNIOR et al., 2012).

Os sistemas apresentaram relação entre a viscosidade e a taxa de cisalhamento, característica de materiais Newtonianos. A reta observada nos gráficos de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento confirma a característica dos materiais.

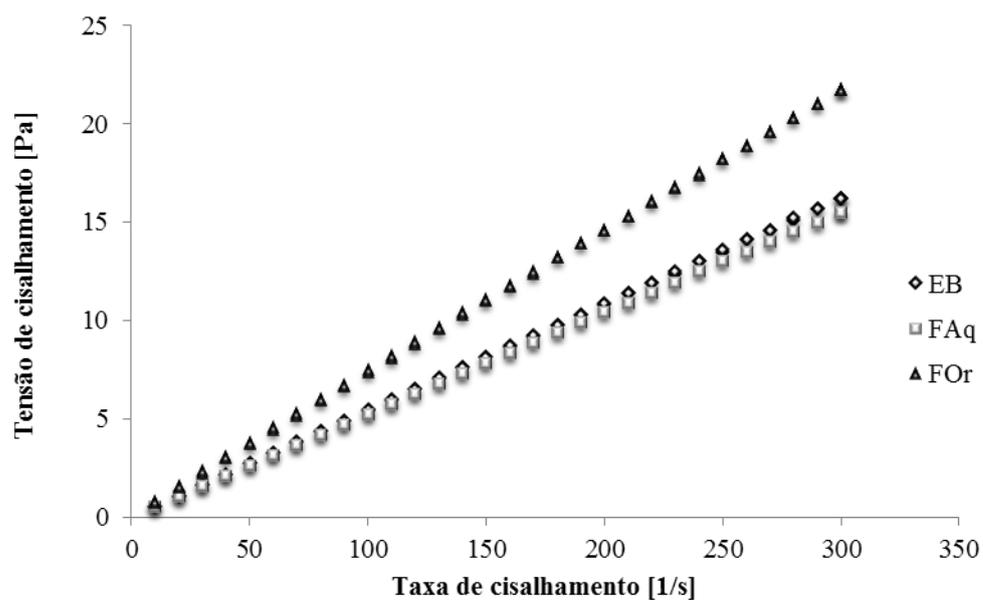
Uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento foi observado para as emulsões fabricadas com a mistura de tensoativos. Naturalmente, as emulsões preparadas com HPMC como agente estabilizante apresentaram maior viscosidade e menor deformação no início da análise, quando comparadas com as emulsões que contêm tensoativos. Os dados mostram que os sistemas apresentam perfis semelhantes de redução da viscosidade como aumento da força de cisalhamento, resultante da reorganização das macromoléculas de HPMC após o início da movimentação do sistema. Ademais, os sistemas não sofrem reodestruição após a retirada da aplicação de força, reforçando a hipótese de reestruturação observada após agitação das amostras oriundas do ensaio de centrifugação.

Pouca modificação pôde ser observada após 90 dias de armazenamento, tanto na viscosidade das emulsões quanto nos perfis das curvas. Atenção especial deve ser dada ao fenômeno de “Pickering” típico para emulsões estabilizadas sem tensoativos. A partir de um determinado momento ocorre a aglomeração frouxa da fase interna exigindo a aplicação de alguma energia para que os sistemas sejam reestruturados homoganeamente. Considerando que a ação de redispersão pode ser responsável pela desestruturação do sistema, as emulsões foram deixadas em repouso por pelo menos 2 horas para realização da análise (Figura 17).

Figura 17 - Tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento. Sistemas com tensoativo (A) e com HPMC (B).



A



B

EB: Extrato Bruto; FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose; T20S80: Tween 20, Span 80.
 Fonte: Próprio Autor.

6.3.3 Ensaio de liberação *in vitro*

No ensaio de liberação *in vitro*, o ácido gálico foi usado como marcador químico no estudo uma vez que este composto está presente em um teor mais elevado e devido a solubilidade do ácido elágico.

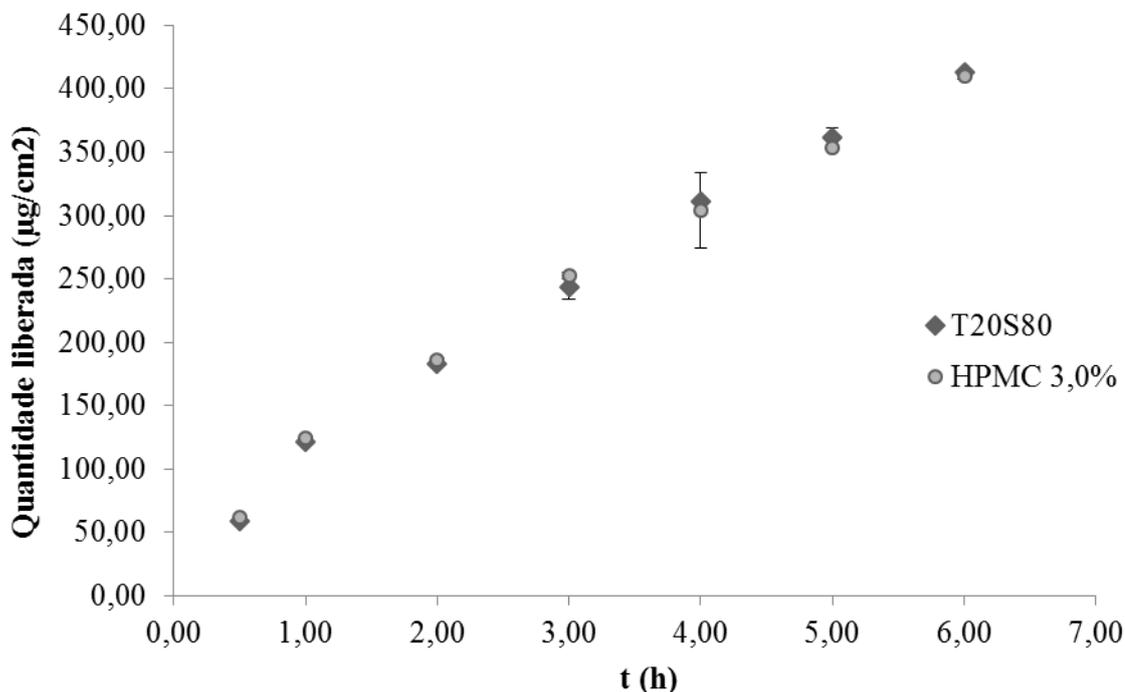
Os polifenóis apresentam-se como antioxidantes naturais, e dessa forma sua aplicação tópica pode ser útil para a terapia de doenças da pele ou para a prevenção de fotoenvelhecimento. Estudos como o de Casagrande et al. (2007), Kitagawa et al., (2011), Zillich et al., (2013; 2015), tem confirmado esta hipótese.

Assim, o perfil de liberação do ativo de uma formulação é uma ferramenta útil no controle e qualidade da atividade de desenvolvimento de produtos tópicos, cosméticos ou farmacêuticos, tais como as emulsões, pois irá permitir determinar um modelo de liberação da(s) substância(s) ativa(s).

Hung et al. (2008), Kitagawa et al., (2011), Zillich e colaboradores (2013) indicaram que a quantidade de óleo contida em uma emulsão influencia diretamente o perfil de liberação dos polifenóis do sistema, quanto maior a quantidade de óleo utilizado menor ou mais lenta será a liberação do ativo. Dessa forma, emulsões com baixo teor de óleo acarretam em taxas de liberação mais elevadas com relação aos compostos fenólicos. Conseqüentemente, em formulações que apresentam maior quantidade de água na composição promove melhora na taxa de liberação das substâncias ativas.

Através da observação do perfil de liberação do ativo, nas formulações obtidas com tensoativo e com HPMC, é possível verificar a difusão do ativo a partir da emulsão. As curvas obtidas apresentaram-se lineares com o tempo e o experimento demonstrou que não há diferença entre a liberação da emulsão com tensoativo e com HPMC (Figura 18).

Figura 18 - Liberação *in vitro* dos sistemas contendo extrato bruto de *L. ferrea* obtidos com tensoativo (T20S80) e com HPMC 3,0%.



Fonte: Próprio Autor.

6.4 CONCLUSÕES

As formulações convencionais (com tensoativo) e do tipo Pickering (sem tensoativo) foram obtidas e caracterizadas com êxito durante 90 dias. A temperatura controlada de 40 ± 2 °C foi fundamental na obtenção das emulsões. Os parâmetros pH, teor de polifenóis totais, teor de ácido elágico e ácido gálico, caracteres macroscópicos, tamanho de gotícula e potencial zeta foram utilizados para caracterizar as emulsões obtidas. É possível inferir que as emulsões obtidas apresentaram estabilidade satisfatória durante 90 dias, quando estocadas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

No que pese a investigação do comportamento reológico, as emulsões que contêm hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) em sua composição apresentaram maior viscosidade e menor deformação, quando comparada com as emulsões que contêm tensoativos. Ademais, o perfil de liberação *in vitro* em célula de Franz demonstrou que as emulsões apresentaram comportamento semelhante.

Por fim, é possível concluir que a obtenção de emulsões do tipo Pickering foram obtidas de modo satisfatório e apresentaram maior estabilidade quando comparadas as emulsões convencionais.

REFERÊNCIAS

- ADHAM, A. N. Synergistic Effects between *Mentha Piperita*, *Mentha Longifolia* and *Ocimum Basilicum* on Different Bacterial Strains. **International Journal of Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 170-176, 2015.
- ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; NETO, M. A. S.; SILVA, R. G.; ARAÚJO JR, R. F. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 2014.
- AULTON, M. E. **Suspensões e Emulsões** in “Delineamento de Formas Farmacêuticas”. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BALOGH, T. S. **Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.
- BARTA, A.; DANIELS, R. Pharmacopoeial cellulose ethers as o/w emulsifiers I. Interfacial properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 40, p. 128-133, 1994.
- BERENDSEN, R.; GÜELL, C.; FERRANDO, M. Spray dried double emulsions containing procyanidin-rich extracts produced by premix membrane emulsification: Effect of interfacial composition. **Food Chemistry**, v. 178, p. 251–258, 2015.
- BIASI-GARBIN, R. P.; DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C. R.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. et al. Antifungal potential of plant species from brazilian *caatinga* against dermatophytes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 18, 2016.
- BIDONE, J.; ZORZI, G. K.; CARVALHO, E. L. S.; SIMÕES, C. M. O.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. et al. Incorporation of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts into topical nanoemulsions obtained by means of spontaneous emulsification procedure. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 421–429, 2014.
- BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006.
- BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, 2009.
- BRASIL, MS - Ministério da Saúde. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, maio de 2004**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>>. Acesso em: 14 de mar. de 2016.
- BRASIL, MS - Ministério da saúde. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso**. 2. ed. Brasília: Ministério da saúde, 2015. 96 p.

- BRUSCHI, M. L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. 2006. 318 f. Tese (Doutorado) – Faculdade Ciências de Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- CALIXTO JÚNIOR, J. T.; MORAIS, S. M.; MARTINS, C. G.; VIEIRA, L. G.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CARNEIRO, J. N. P. et al. Phytochemical Analysis and Modulation of Antibiotic Activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in Multiresistant Clinical Isolates of *Candida* Spp. **BioMed Research International**, Article ID 807670, 10 pages, 2015.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI, J. W. A.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183–190, 2007.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.
- DANILES, R. **Emulsionen**. In: Pflegekosmetik. Ed. Wolfgang Raab; Ursula Kindl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2012.
- DUFFUS, J. L.; NORTON, J. E.; SMITH, P.; NORTON, I. T.; SPYROPOULOS, F. A comparative study on the capacity of a range of food-grade particles to form stable O/W and W/O Pickering emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 473, p. 9–21, 2016.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5 edição. 2010.
- FARMACOPEIA EUROPEIA. 8th Edition. 2013.
- FAHR, A. **Voigt Pharmazeutische Technologie**. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2015.
- FASOLO, D.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Die Pharmazie (Berlin)**, v. 64, p. 1-5, 2009.
- FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; DE SOUZA, T. P.; OLIVEIRA, E. E.; EGITO, E. S. T.; SOARES, L. A. L. Development and evaluation of emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) oil. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1383–1390, 2010.
- FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; LANGASSNER, S. M. Z.; MELLO, J. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SOARES, L. A. L. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 40, p. 3008-3013, 2013.
- FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A Review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 2, p. 140-150, 2015.
- FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M. T. J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263-271, 2009.
- FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p.190-195, 1975.

- FRELICHOWSKA, J.; BOLZINGER, M-A.; CHEVALIER, Y. Pickering emulsions with bare sílica. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 343, p. 70–74, 2009.
- FRELICHOWSKA, J.; BOLZINGER, M-A.; CHEVALIER, Y. Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, p. 348–356, 2010.
- GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.
- HAN, Y. Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v.14, p. 733-738, 2007a.
- HAN, Y. Synergic Anticandidal Effect of Epigallocatechin-*O*-gallate Combined with Amphotericin B in a Murine Model of Disseminated Candidiasis and Its Anticandidal Mechanism. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p. 1693-1696, 2007b.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious disease. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652, 2008.
- HUNG, C. F.; LIN, Y. K.; HUANG, Z. R.; FANG, J. Y. Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 955–962, 2008.
- ICH. International conference on the harmonization of stability testing guidelines: **Stability testing of new drug substances and products**. Q1(R2). Committee for proprietary medicinal products. London: ICH, 2003.
- ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas**, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.
- JIANHUA, W.; HAI, W. Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*. **Journal of Medical Colleges of PLA**, v.24, p. 142-147, 2009.
- JIN, S-K.; HA, S-R.; HUR, S-J.; CHOI, J-S. Effect of Various Herbal Medicine Extracts on the Physico-chemical Properties of Emulsion-type Pork Sausage. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 3, n. 5, p. 290-296, 2015.
- JONES, D. S.; BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O.; GREMIÃO, M. P. D.; LARAB, E. H. G.; ANDREWS, G. P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 49–58, 2009.
- KHAN, B. A.; AKTAR, N.; KHAN, H.; BRAGA, V. A. Development, characterization and antioxidant activity of polysorbate based O/W emulsion containing polyphenols derived from

Hippophae rhamnoides and *Cassia fistula*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 763-773, 2013.

KITAGAWA, S.; YOSHII, K.; MORITA, S.; TERAOKA, R. Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 793–796, 2011.

LASS-FLÖRL, C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. **Drugs**, v. 71, p. 2405-2419, 2011.

LIU, F.; TANG, C.-H. Cold, gel-like whey protein emulsions by microfluidisation emulsification: Rheological properties and microstructures. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1641-1647, 2011.

LIMA, C. G.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; PIANNOVSKI, A. R.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M. et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 3, p. 239–245, 2008.

LONNI, A. A. S. G. **Desenvolvimento e caracterização de formulação de uso tópico contendo extrato padronizado de *Trichilia catigua* para fins cosmético**. Tese. Maringá. 2012. 120P.

LONNI, A. A. S. G; MUNHOZ, V. M.; LOPES, G. C.; LONGHINI, R.; BORGHI-PANGONI, F. B.; SANTOS, R. S. et al. Development and characterization of multiple emulsions for controlled release of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract. **Pharmaceutical Development and Technology**, p. 1–10, 2015.

LUNTER, D. J. **Filmbildende Emulsionen zur Retardierung der dermalen Wirkstoffpermeation**. Tese. Tübingen. 2012. 226p.

LUNTER, D.; DANIELS, R. New film forming emulsions containing Eudragit® NE and/or RS 30D for sustained dermal delivery of nonivamide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, p. 291-298, 2012.

MACEDO, J. P.; FERNANDES, L. L.; FORMIGA, F. R.; REIS, M. F.; JUNIOR, T. N.; SOARES, L. A. L. et al. Micro-emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. **AAPS Pharmscitech**, v. 7, n. 1, p. E146-E152, 2006.

MAHMOOD, T.; AKHTAR, N.; KHAN, B. A.; RASUL, A. Formulation and characterization of a green tea extract containing emulsion prepared with Abil®EM90 as a lipophilic surfactant. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 19, p. 1395-1399, 2012.

MASSON, D. S.; MORAIS, G. G.; MORAIS, J. M.; ANDRADE, F. F.; SANTOS, O. H.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA FILHO, P. A. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of o/w emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 463–468, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611-49, 2007.

MCCLEMENTS, D. J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 235–245, 2012.

MELZER, E.; KREUTER, J.; DANIELS, R. Ethylcellulose – A new type of emulsion stabilizer. **European Journal of Pharmaceutic and Biopharmaceutics**, v.56, n. 1, p. 23-27, 2003.

NEMITZ, M. C.; YATSU, F. K.; BIDONE, J.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L.; GARCIA, C. V. et al. A versatile, stability-indicating and high-throughput ultra-fast liquid chromatography method for the determination of isoflavone aglycones in soybeans, topical formulations, and permeation assays. **Talanta**, v. 134, p. 183–193, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, C. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. v.70, p. 461-477, 2007.

PANTELIC, I.; LUKIC, M.; MARKOVIC, B.; LUSIANA; HOFFMANN, C.; MÜLLER-GOYMANN, C. et al. Development of a prospective isopropyl alcohol-loaded pharmaceutical base using simultaneous in vitro/in vivo characterization methods of skin performance. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 7, p. 960-971, 2014.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. 3-13, 2012.

PATEL, A. R.; NIJSSE, J.; VELIKOV, K. P. Novel polymer–polyphenol beads for encapsulation and microreactor applications. **Soft Matter**, v. 7, p. 4294-4301, 2011.

PICKERING, S. U. Emulsions. **Journal of Chemistry Society**, v. 91, p. 2001–2021, 1907.

PINTADO, T.; RUIZ-CAPILLAS, C.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; CARMONA, P.; HERRERO, A. M. Oil-in-water emulsion gels stabilized with chia (*Salvia hispanica* L.) and cold gelling agents: Technological and infrared spectroscopic characterization. **Food Chemistry**, v. 185, p. 470-478, 2015.

RAHATE, A. R.; NAGAKAR, J. M. Emulsification of vegetable oils using a blend of nonionic Surfactants for cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 28, n. 7, p. 1077-1080, 2007

ROTTKE, M.; LUNTER, D.J.; DANIELS, R. *In vitro* studies on release and skin permeation of nonivamide from novel oil-in-oil-emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 260-266, 2014.

SCHULZ, M. B.; DANIELS, R. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 231-236, 2000.

SILVA, J. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; BORBA, V. F. C.; EGITO, E. S. T.; DE SANTANA, D. P. Use of pseudo-ternary phase diagrams as a tool to produce transdermal nanoemulsion. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 245-249, 2009.

SIMON, G. A.; MAIBACH, H. I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations – an overview. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 13, p. 229-234, 2000.

SONG, X.; PEI, Y.; QIAO, M.; MA, F.; REN, H.; ZHAO, Q. Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 256-263, 2015.

TIKEKAR, R. V.; PAN, Y.; NITIN, N. Fate of curcumin encapsulated in silica nanoparticle stabilized Pickering emulsion during storage and simulated digestion. **Food research international**, v. 51, n. 1, p. 370–377, 2013.

VIYUCH, J.; KLINTHONG, N.; SIRIPAISAL, W. Development of Oil-in-Water Emulsion Containing Tamarind Fruit Pulp Extract I. Physical Characteristics and Stability of Emulsion. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 29-49, 2003.

XAVIER-JÚNIOR, F. H.; SILVA, K. G. H.; FARIAS, I. E. G.; MORAIS, A. R. V.; ALENCAR, E. N.; ARAÚJO, I. B. et al. Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. **Journal of Drug Delivery and Science Technology**, v. 22, n. 4, p. 367-372, 2012.

ZILLICH, O. V.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; HASENKOPF, K.; EISNER, P.; KERSCHER, M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, p. 491–501, 2013.

ZILLICH, O. V.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; HASENKOPF, K.; EISNER, P.; KERSCHER, M. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, p. 455–464, 2015.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Review (Part I). **Phytomedicine**, v. 16, p. 97–110, 2009.

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

WOLLENWEBER, C.; OSCHMANN, R.; DANIELS, R. Hypromellose stabilisierte Emulsionen als Träger für homöopathische Urtinkturen. **Pharmazeutische Industrie**, v. 64, n. 1, p. 81-88, 2002.

YAN, C.; RESAU, J. H.; HEWETSON, J.; WEST, M.; RILL, W. L.; KENDE, M. Characterization and morphological analysis of proteinloaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique. **Journal of Controlled Release**, v. 32, p. 231-241, 1994.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, matérias primas (frutos) de *L. ferrea* foram caracterizadas quanto ao doseamento de polifenóis totais por UV-Vis, qualitativamente por CCD e CLAE-DAD, e quantitativamente por CLAE-DAD, sendo possível a obtenção de perfis químicos típicos dos frutos de jucá.

As metodologias para o doseamento de ácido gálico e ácido elágico por CLAE-DAD na matéria prima e extrato bruto aquoso dos frutos de *L. ferrea*, foram desenvolvidas e validadas com os requisitos mínimos aceitáveis estipulados pela RE 899/2003.

A obtenção e caracterização dos derivados dos frutos de *L. ferrea* (extratos brutos e frações) foram realizadas com êxito. Adicionalmente o teor das diversas amostras foi calculado por CLAE, sendo possível obter uma correlação preliminar entre os teores/picos encontrados com as intensidades/quantidades das bandas observadas nos cromatogramas de CCD-AE.

Com o auxílio de ferramentas quimiométricas o teor dos marcadores nos extratos brutos, obtidos por UV-Vis, MIR e NIR, utilizando CLAE-DAD como método de referência foram quantificados, a partir dos modelos de calibração multivariada desenvolvidos por PLS.

A viabilidade de incorporação do extrato bruto e frações dos frutos de *L. ferrea* foi alcançada, com a obtenção de sistemas convencionais (com tensoativo) e Pickering (sem tensoativo). Ademais os sistemas foram caracterizados quanto à estabilidade preliminar durante 90 dias, apresentando resultados satisfatórios. Por fim, o perfil de liberação *in vitro* em células de Franz demonstrou que as emulsões convencionais e Pickering apresentaram comportamento semelhante.

Com estes resultados será possível implantar duas linhas de pesquisa na área de produtos naturais (análise multivariada e tecnologia fitofarmacêutica com ênfase em semissólidos), ainda escassa no Estado.

Como propostas futuras sugerem-se: utilização das metodologias aqui desenvolvidas aliadas às técnicas quimiométrica aplicadas às frações enriquecidas obtidas neste estudo, além de estender a utilização das mesmas a outras espécies do Nordeste brasileiro que apresentem polifenóis em sua composição. Também se propõe a realização de estudo de estabilidade de longa duração com as emulsões obtidas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; AQIL, F. OWAIS, M. **Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs**. Weinheim: Wiley-VCH. 2006.

BALOGH, T. S. **Uso cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor**. 2011. 267p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1401-1406, 2006.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Departamento de atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso**. 2. ed. Brasília: Ministério da saúde, 96 p. 2015.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, p. 2125-2154, 2000.

CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics what you see is what you extract. **Phytochemical Analysis**, v. 25, p. 289–290, 2014.

DAOLIO, C.; BELTRAME, F. L.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, M. M. C. Classification of commercial catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 218-228, 2008.

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

EMA. European Medicines Agency. **Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products**. http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/2011_EMA_QUALITY_HERBAL_GUIDELINE.PDF; 2011.

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.

FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; DE SOUZA, T. P.; OLIVEIRA, E. E.; EGITO, E. S. T.; SOARES, L. A. L. Development and evaluation of emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) oil. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1383–1390, 2010.

FRELICHOWSKA, J.; BOLZINGER, M-A.; CHEVALIER, Y. Pickering emulsions with bare sílica. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 343, p. 70–74, 2009.

FRELICHOWSKA, J.; BOLZINGER, M-A.; CHEVALIER, Y. Effects of solid particle content on properties of o/w Pickering emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 351, p. 348–356, 2010.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 178-182, Abr./Jun. 2005

GAD, H. A.; EL-AHMADY, S. H.; ABOU-SHOERB, M. I.; AL-AZIZIA, M. M. Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. **Phytochemical Analysis**, v. 24, p. 1–24, 2013.

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

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.

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.

GOVINDARAGHAVAN, S.; SUCHER, N. J. Quality assessment of medicinal herbs and their extracts: Criteria and prerequisites for consistent safety and efficacy of herbal medicines. **Epilepsy & Behavior**, v. 52, p. 363–371, 2015.

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.

LI, B-Y.; HU, Y.; LIANG, Y-Z.; XIE, P-S.; DU, Y-P. Quality evaluation of fingerprints of herbal medicine with chromatographic data. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, n. 1, p. 69-77. 2004.

LILAND, K. H. Multivariate methods in metabolomics—from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 827–841, 2011.

MOK, D. K. W.; CHAU, F. T. Chemical information of Chinese medicines: A challenge to chemist. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, n. 1-2, p. 210-7, 2005.

OTTO, M. **Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**. 2. ed. Alemanha: Wiley-vch, 2007. 328 p.

RAHATE, A. R.; NAGAKAR, J. M. Emulsification of vegetable oils using a blend of nonionic Surfactants for cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 28, n. 7, p. 1077-1080, 2007.

RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; TONGKAO-ON, W.; KIMBLE, B.; QIAO, V. L.; BEILUN, L.; LI, K. M. et al. Multiple Chromatographic and Chemometric Methods for Quality Standardisation of Chinese Herbal Medicines. **World Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 99-106, 2010.

SCHULZ, M. B.; DANIELS, R. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 231-236, 2000.

SONG, X.; PEI, Y.; QIAO, M.; MA, F.; REN, H.; ZHAO, Q. Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 256-263, 2015.

STICHER, O.; HEILMANN, J.; ZÜNDORF, I. **HÄNSEL/STICHER: Pharmakognosie Phytopharmazie**. Auf. 10. Stuttgart: WVG, 2015.

TIAN, R. T.; XI, P. S.; LIU, H. P. Evaluation of traditional Chinese herbal medicine: Chaihu (*Bupleuri Radix*) by both high-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic fingerprint and chemometric analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2150–2155, 2009.

TYLER, V. E. Phytomedicines: back to the future. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1589-1592, 1999.

VIYOCH, J.; KLINTHONG, N.; SIRIPAISAL, W. Development of Oil-in-Water Emulsion Containing Tamarind Fruit Pulp Extract I. Physical Characteristics and Stability of Emulsion. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 29-49, 2003.

XAVIER-JÚNIOR, F. H.; SILVA, K. G. H.; FARIAS, I. E. G.; MORAIS, A. R. V.; ALENCAR, E. N.; ARAÚJO, I. B. et al. Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. **Journal of Drug Delivery and Science Technology**, v. 22, n. 4, p. 367-372, 2012.

ZHANG, L.; WONG, L. Y.; HE, Y.; WONG, I. C. Pharmacovigilance in China: current situation, successes and challenges. **Drug Safety**, v. 37, n. 10, p. 765-70, 2014.

ZANIN, J. L. B.; DE CARVALHO, B. A.; MARTINELLI, P. S.; DOS SANTOS, M. H.; LAGO, J. H.; SARTORELLI, P. et al. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, v. 17, p. 7887-7902, 2012.

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

WAGNER, H. M. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34-7, 2011.

WELSH, W. J.; LIN, W.; TERSIGNI, S. H.; COLLANTES, E.; DUTA, R.; CAREY, M. S. et al. Pharmaceutical fingerprinting: Evaluation of neural networks and chemometric techniques for distinguishing among same-product manufacturers. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 19, p. 3473–3482, 1996.

WOLFENDER, J.-L.; RUDAZ, S.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1056–1090, 2013.

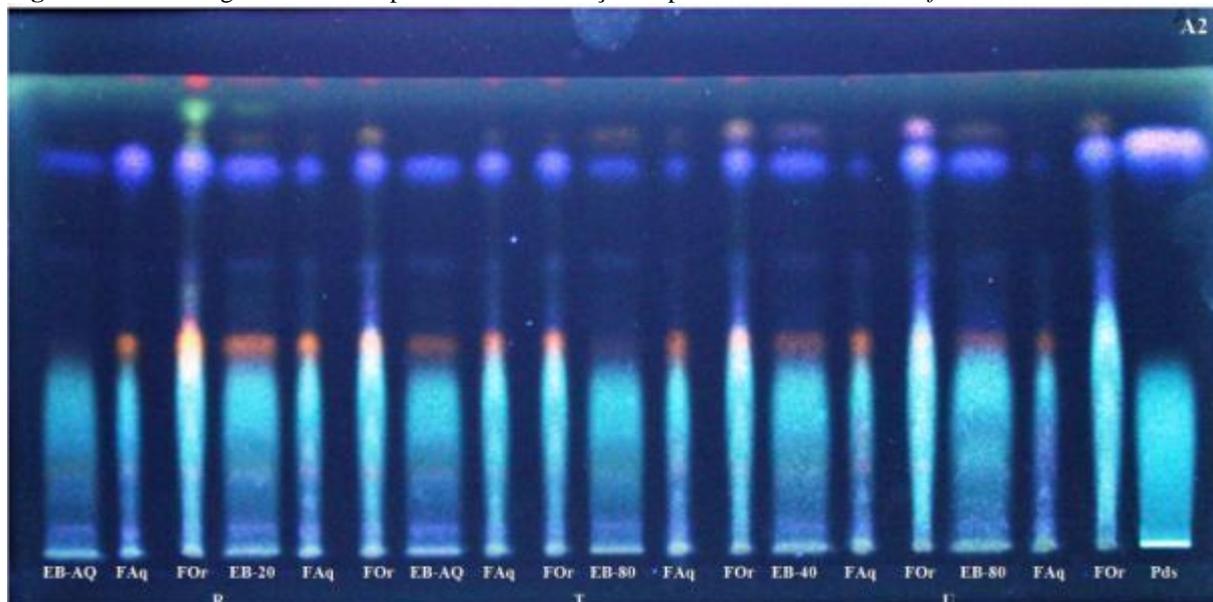
WOLFENDER, J-C.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136–164, 2015.

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

APÊNDICES

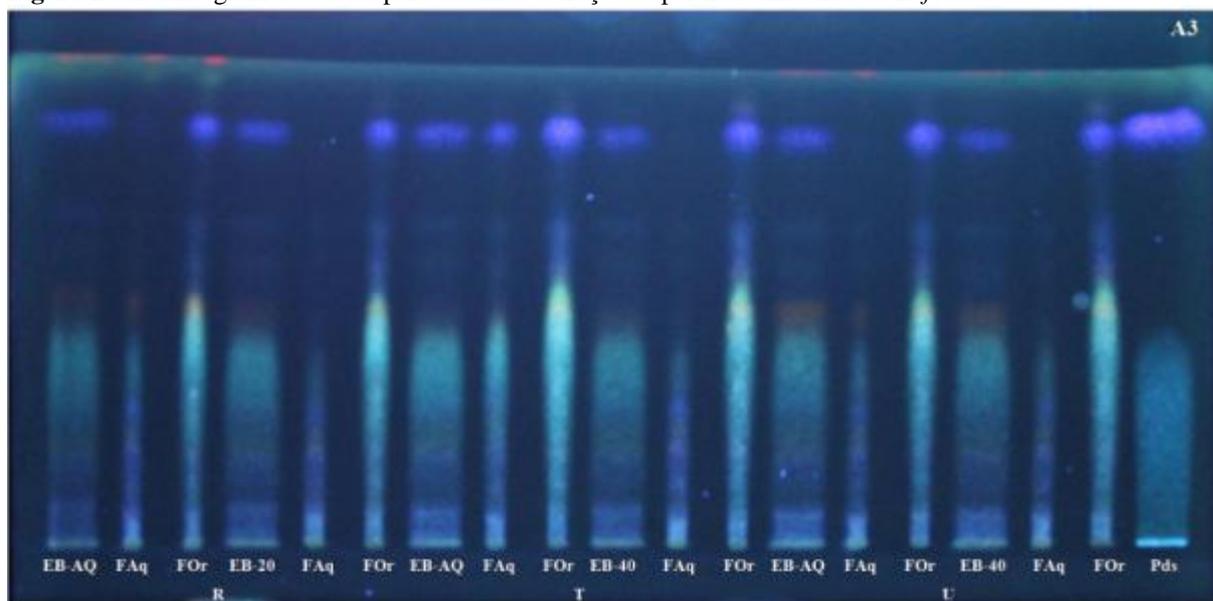
APÊNDICE A – CROMATOPLACAS DE CCD-AE PARA EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

Figura 1 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra2 de *L. ferrea*.



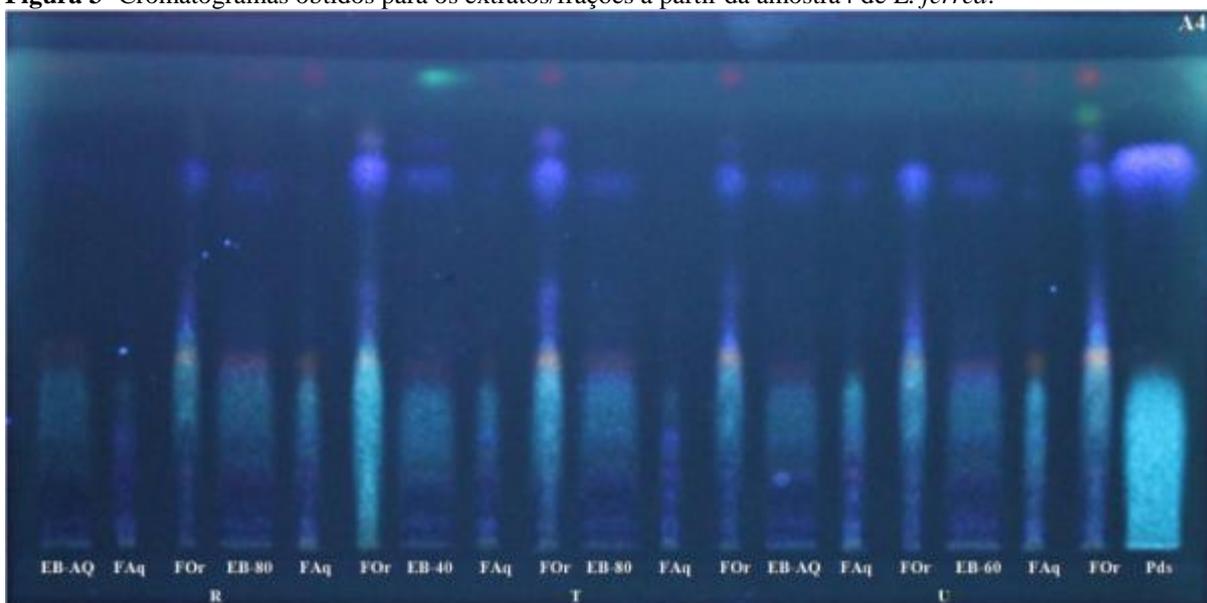
AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).
Fonte: Próprio Autor.

Figura 2 -Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra3 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).
Fonte: Próprio Autor.

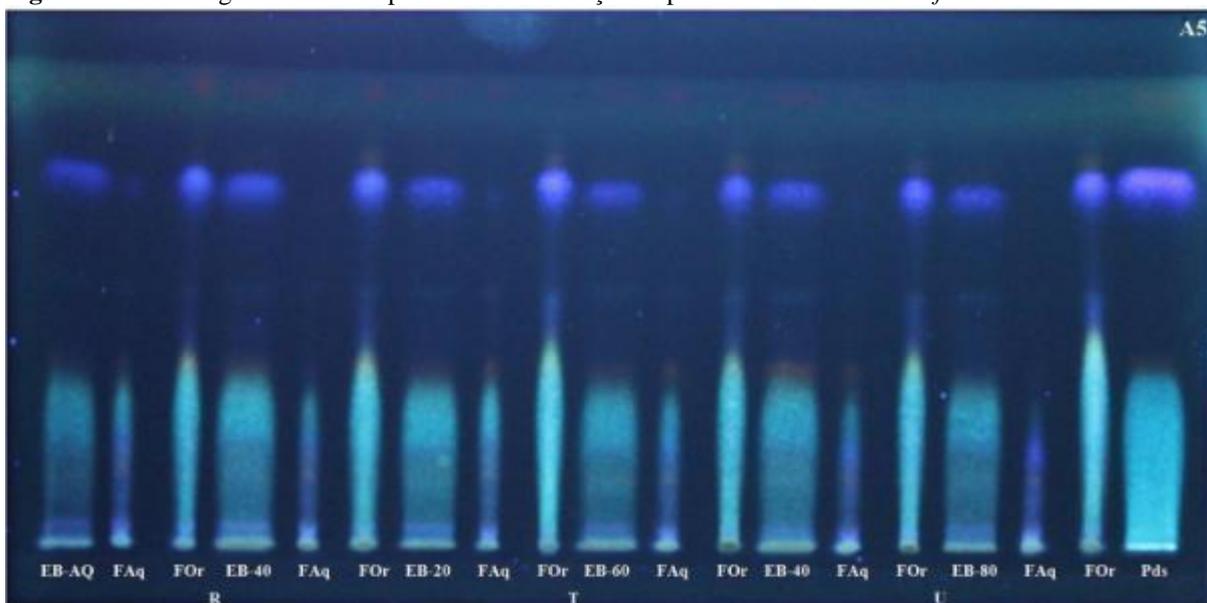
Figura 3 -Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra4 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

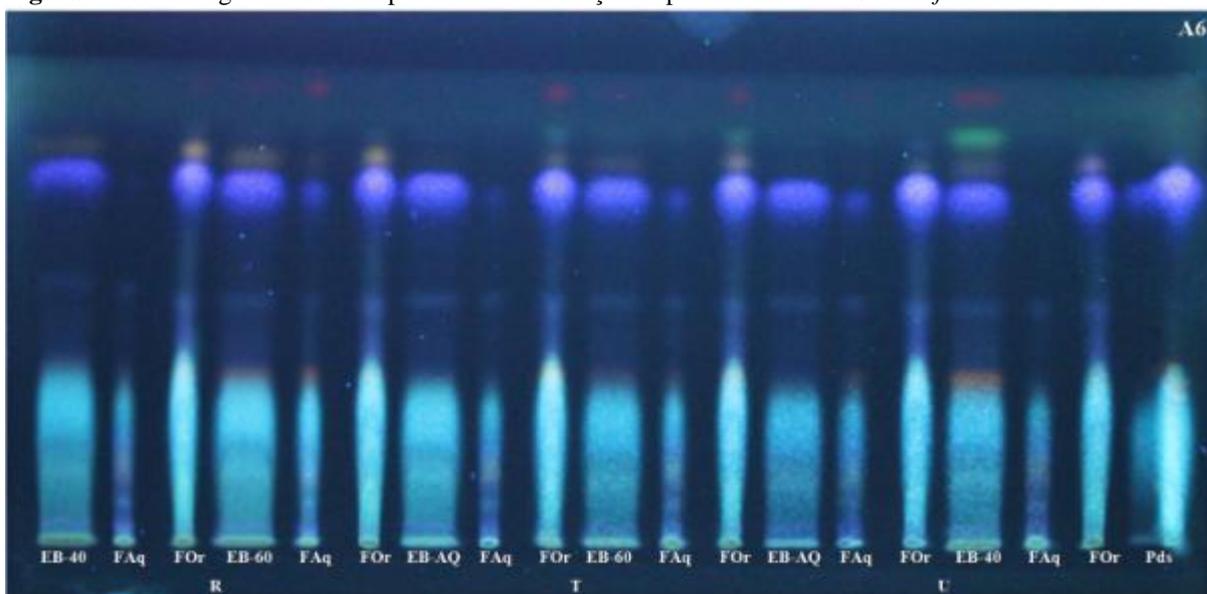
Figura 4 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 5 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

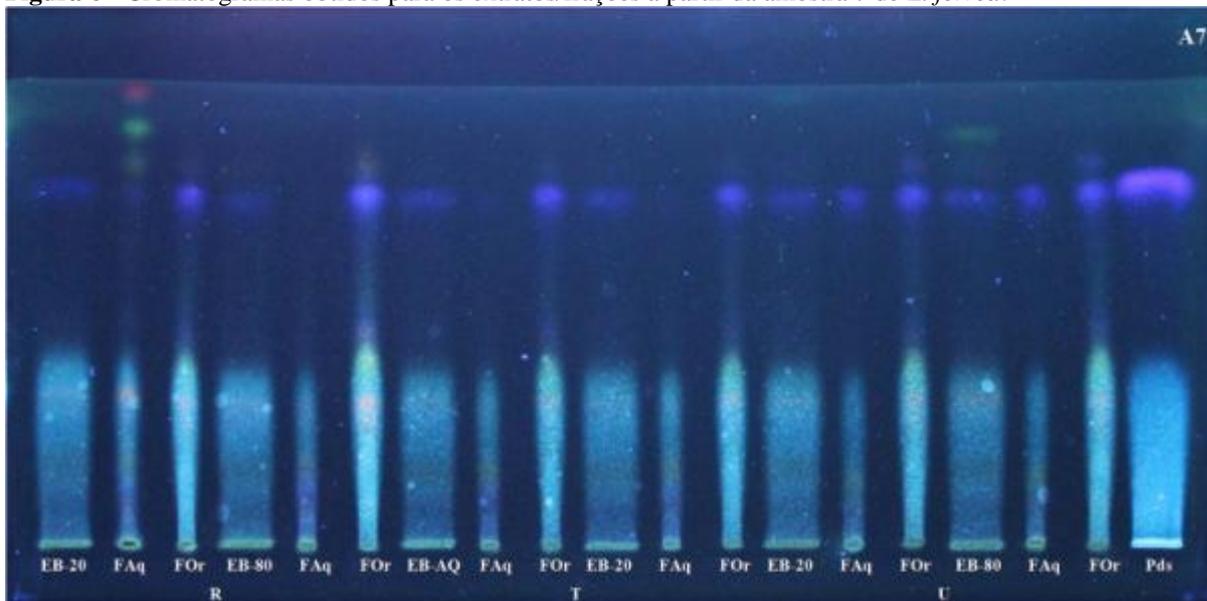
Figura 5 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 6 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

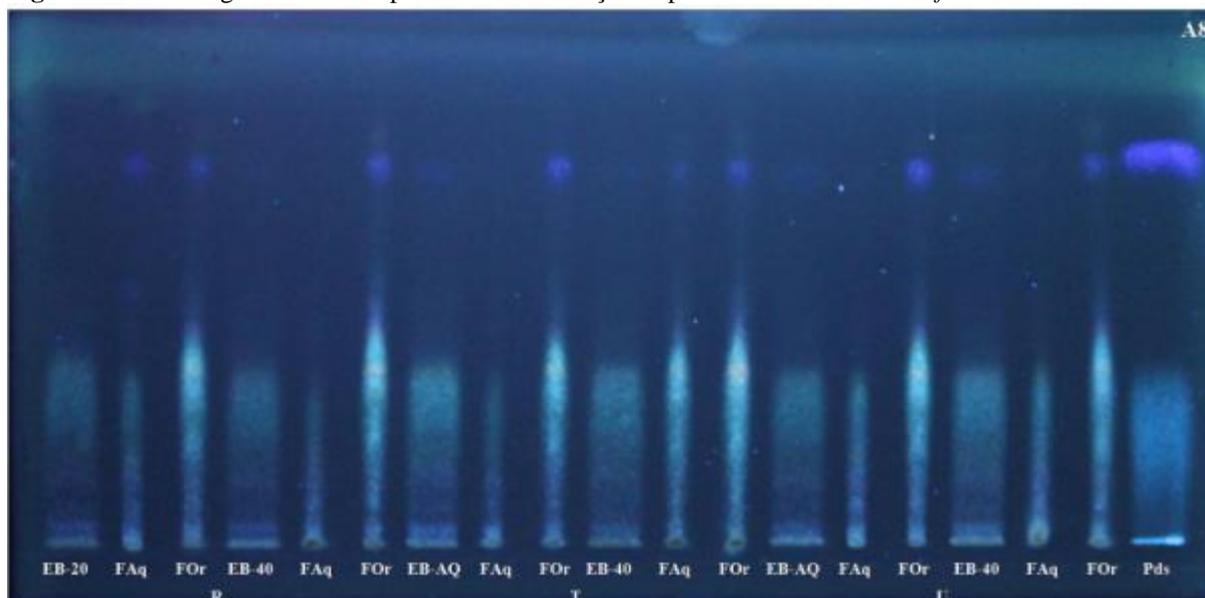
Figura 6 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 7 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

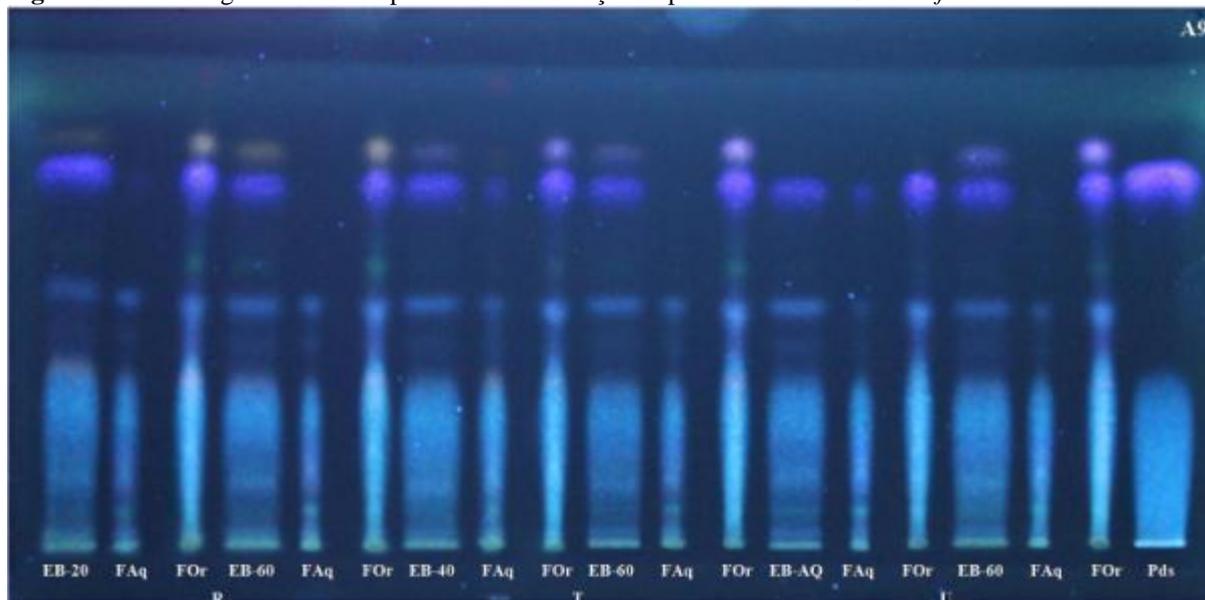
Figura 7 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 8 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

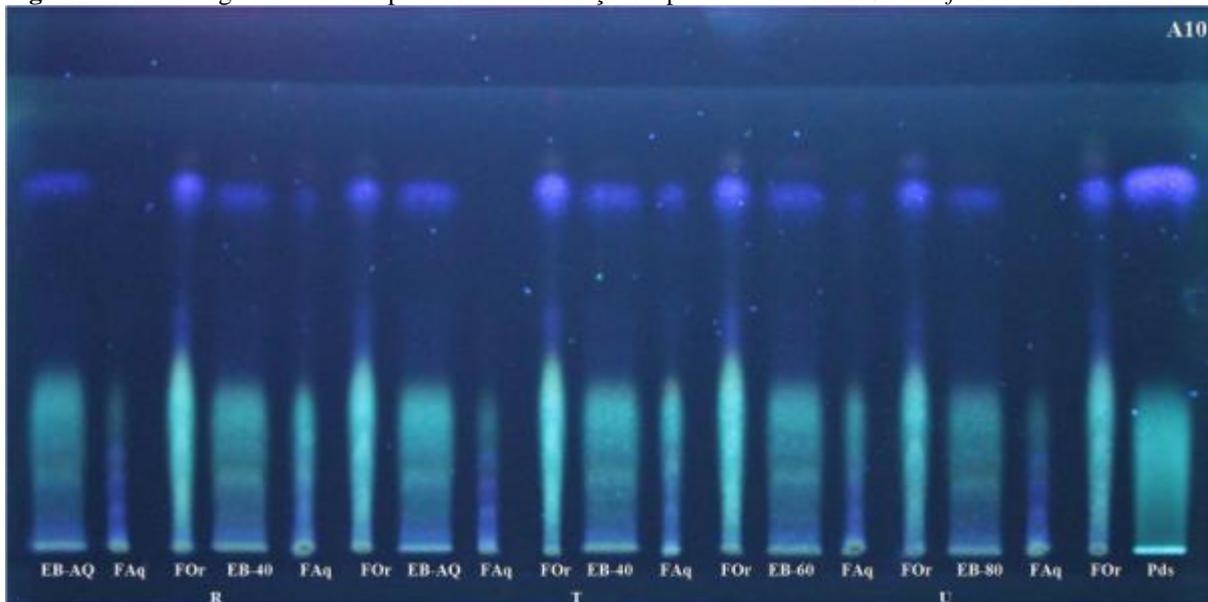
Figura 8 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 9 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

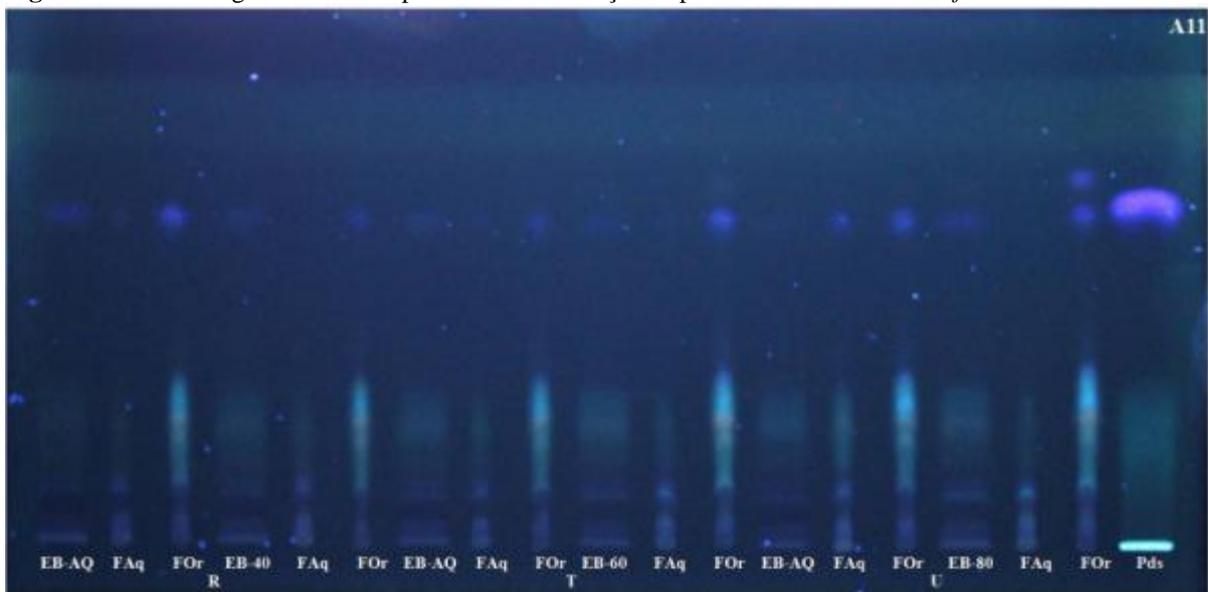
Figura 9 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 10 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

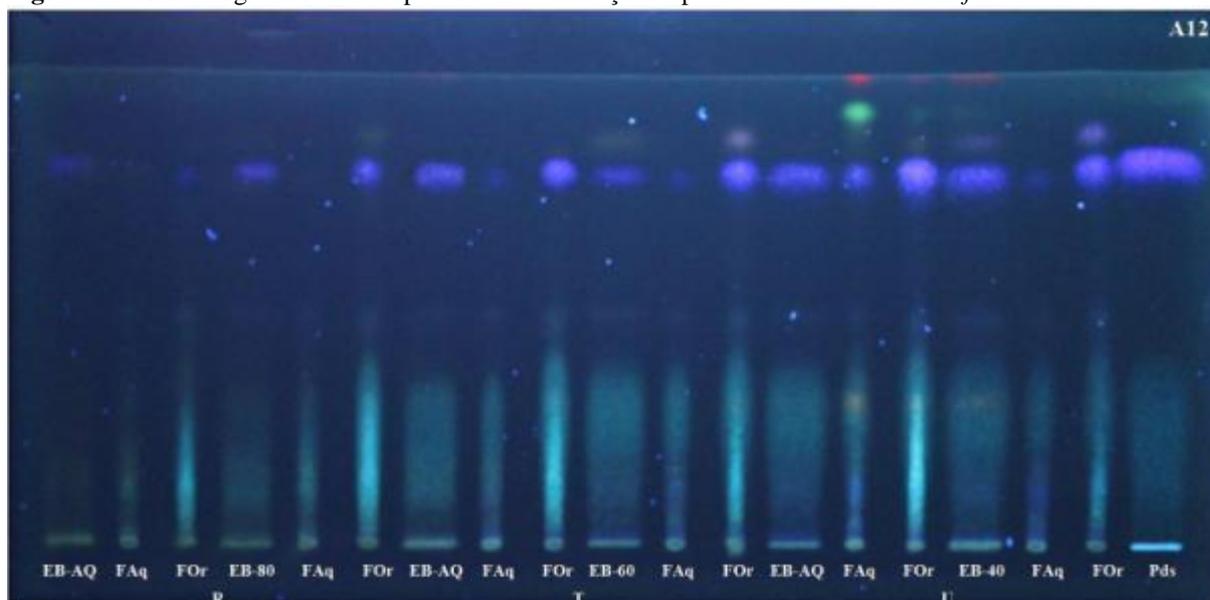
Figura 10 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 11 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

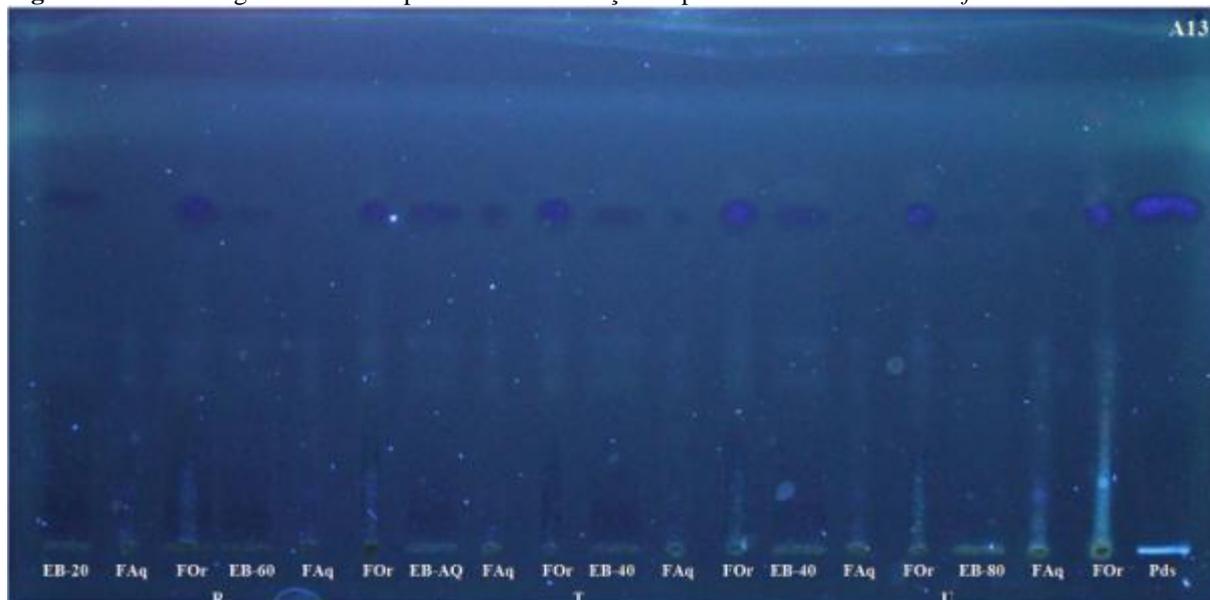
Figura 11 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 12 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

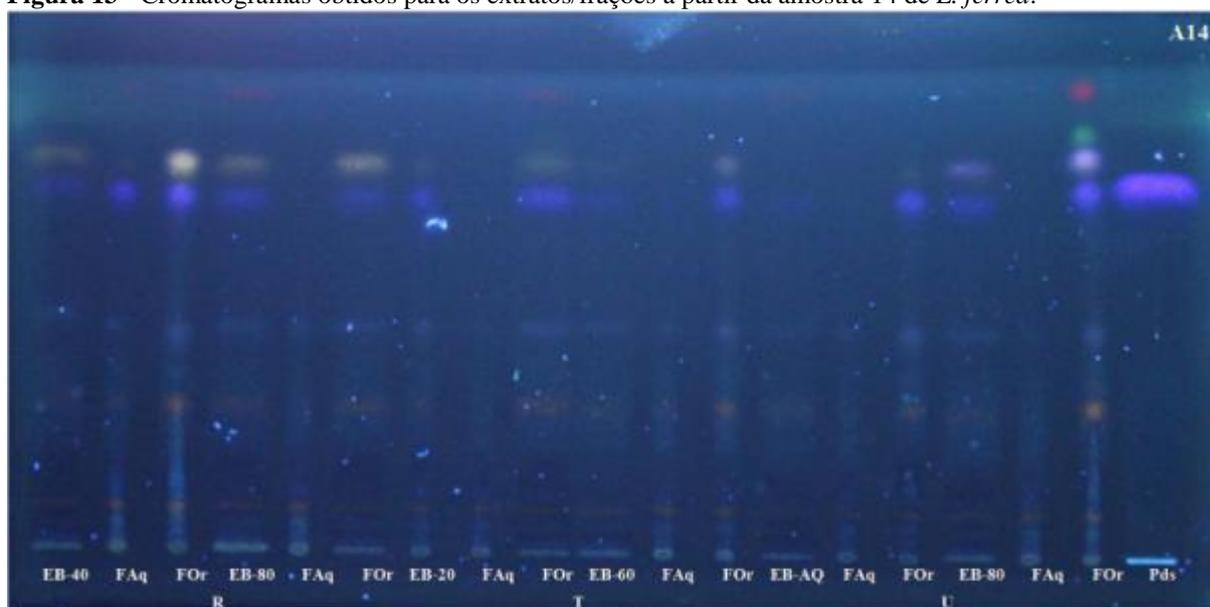
Figura 12 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 13 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).

Fonte: Próprio Autor.

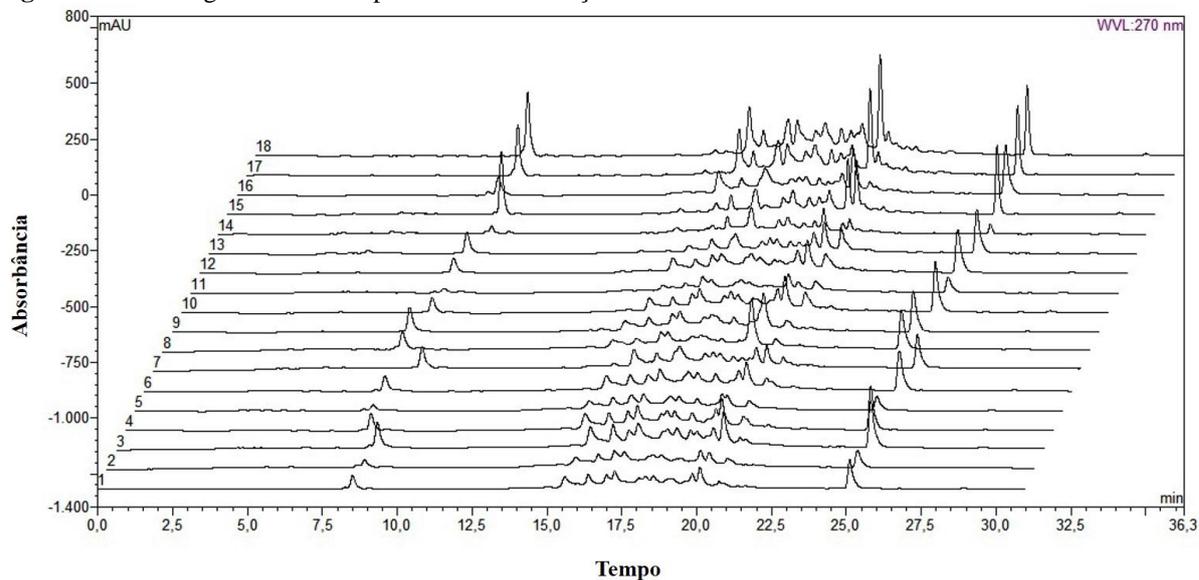
Figura 13 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações a partir da amostra 14 de *L. ferrea*.



AQ: Aquoso; 20, 40, 60 e 80: proporções de etanol (%); FAq: Fração Aquosa; FOr: Fração Orgânica; R: Refluxo; T: Turbólise; U: Ultrassom; Pds: Mix dos Padrões (ácido elágico e ácido gálico).
Fonte: Próprio Autor.

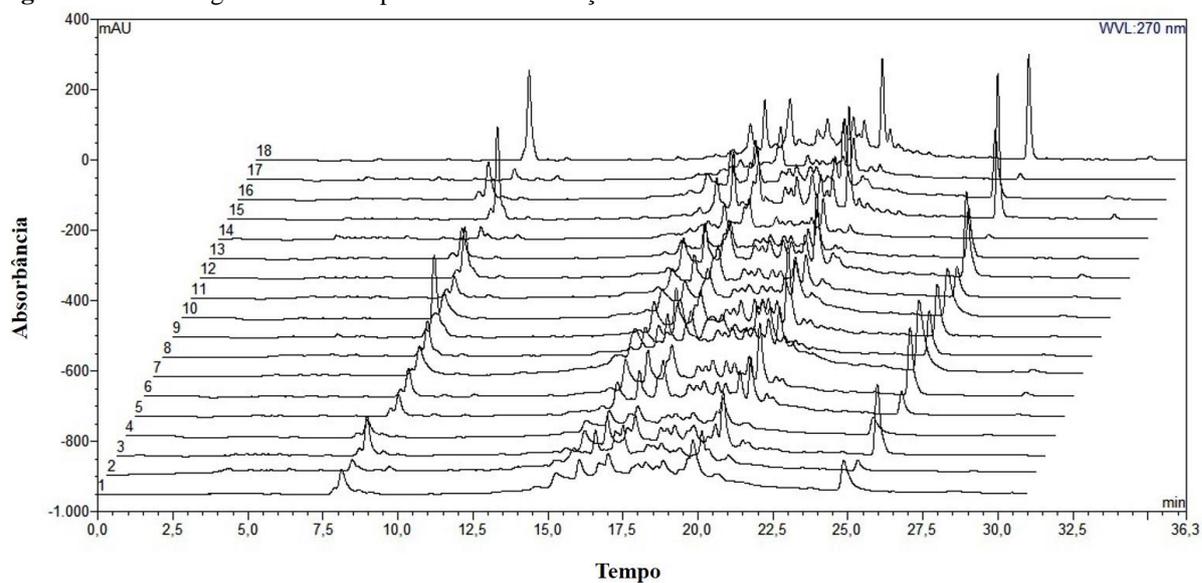
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES OBTIDOS POR CLAE-DAD

Figura 1 -Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 2.

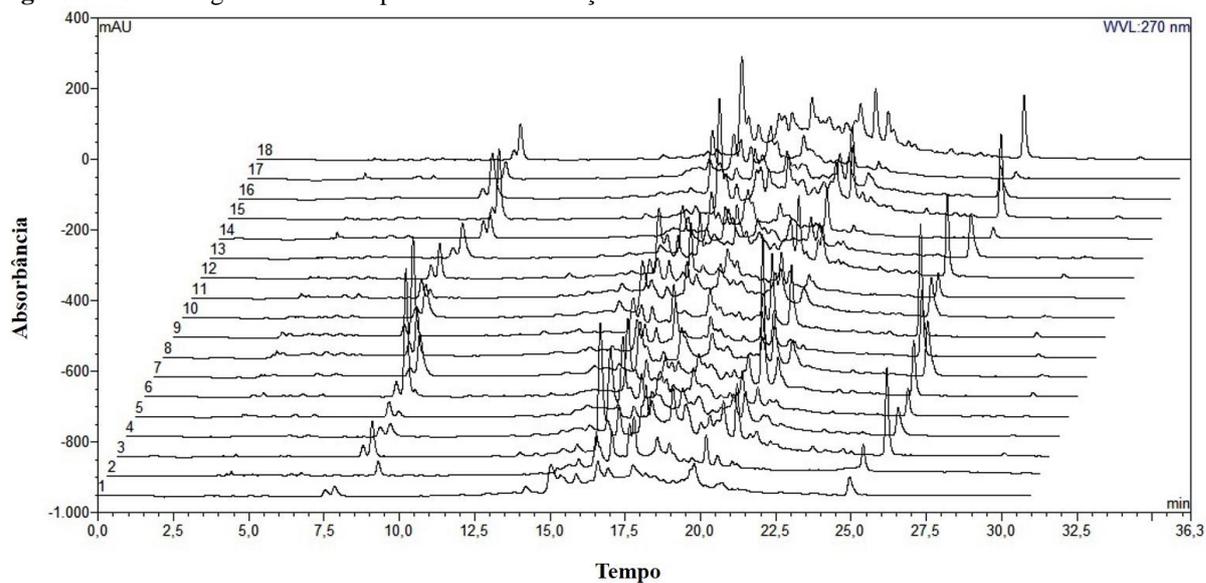


Fonte: Próprio autor.

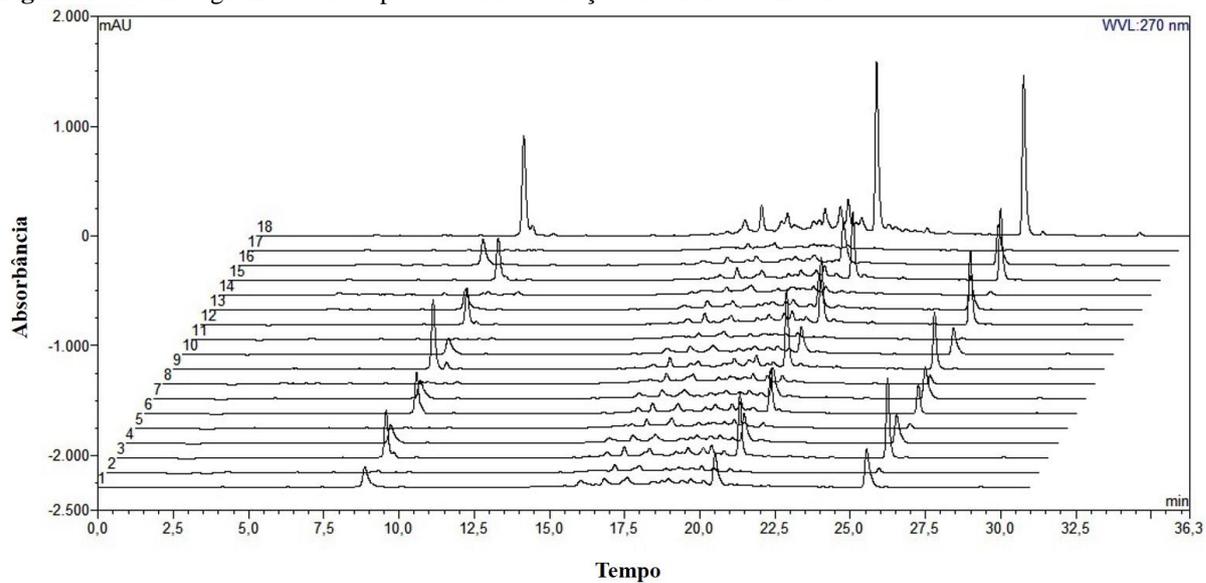
Figura 2 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 3.



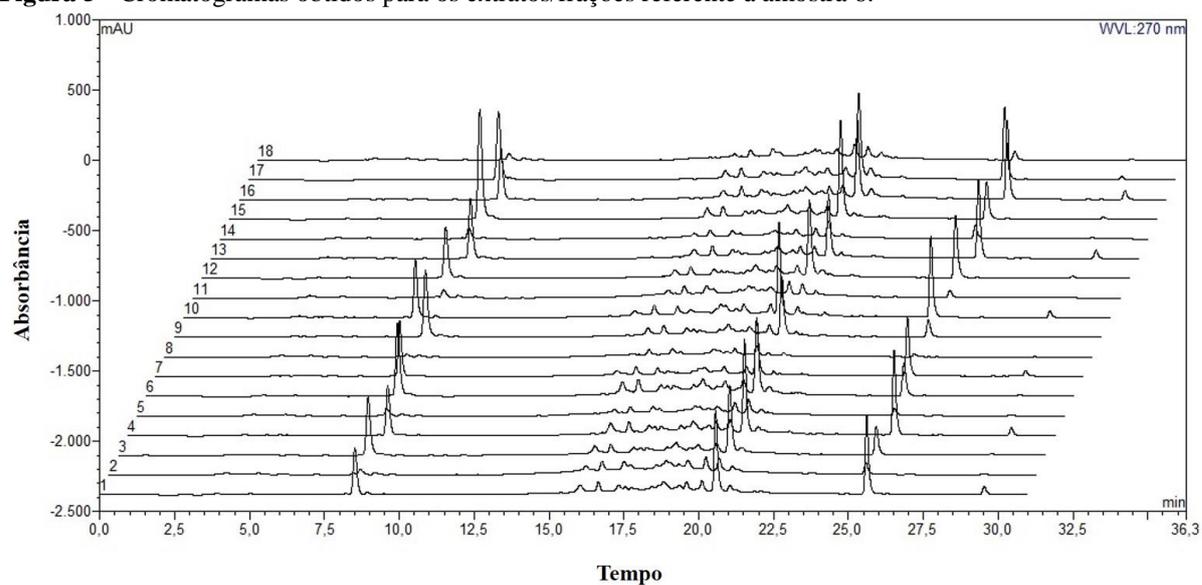
Fonte: Próprio autor.

Figura 3 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 4.

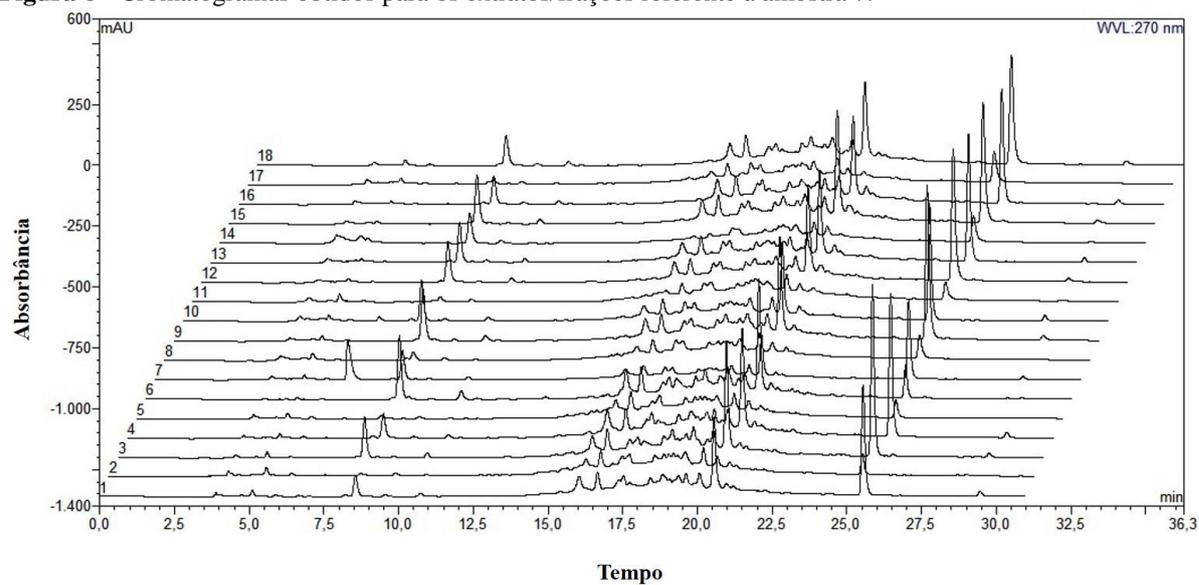
Fonte: Próprio autor.

Figura 4 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 5.

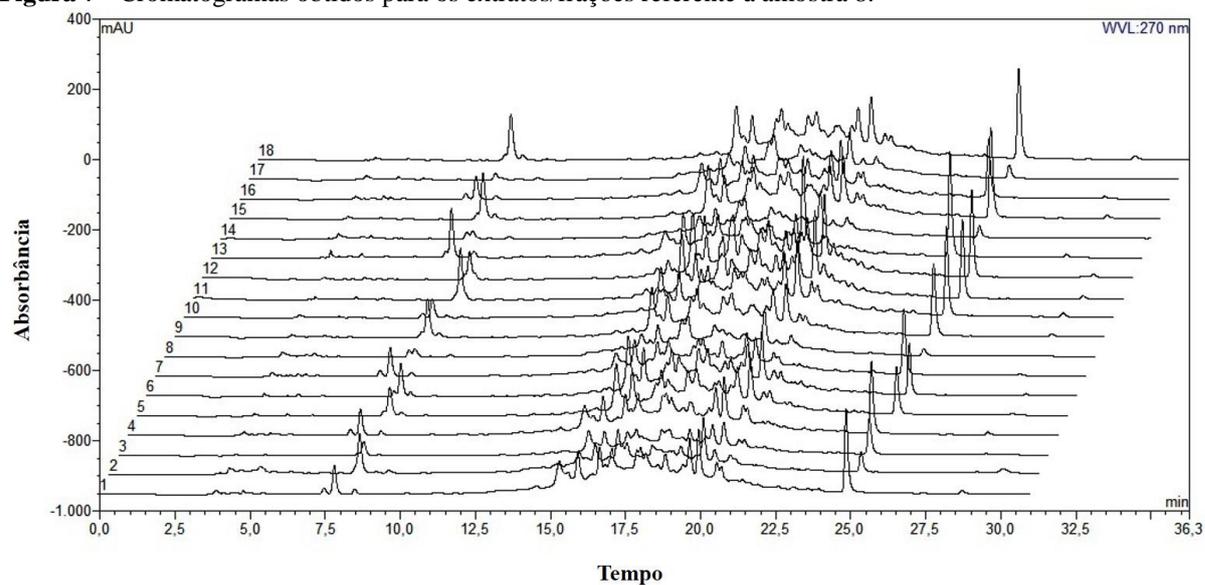
Fonte: Próprio autor.

Figura 5 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 6.

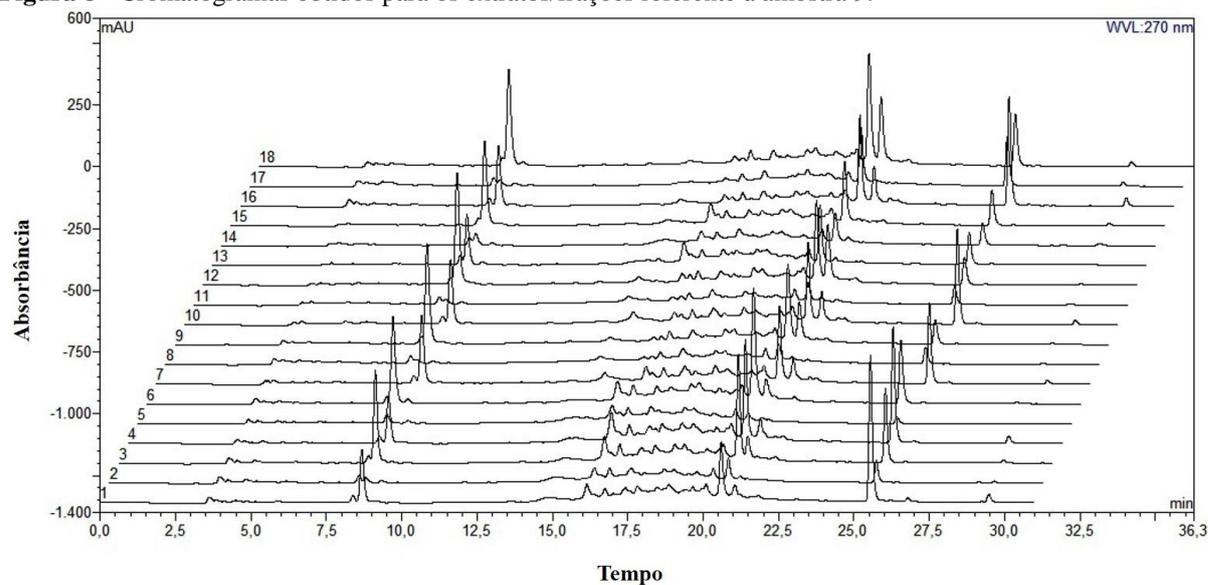
Fonte: Próprio autor.

Figura 6 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 7.

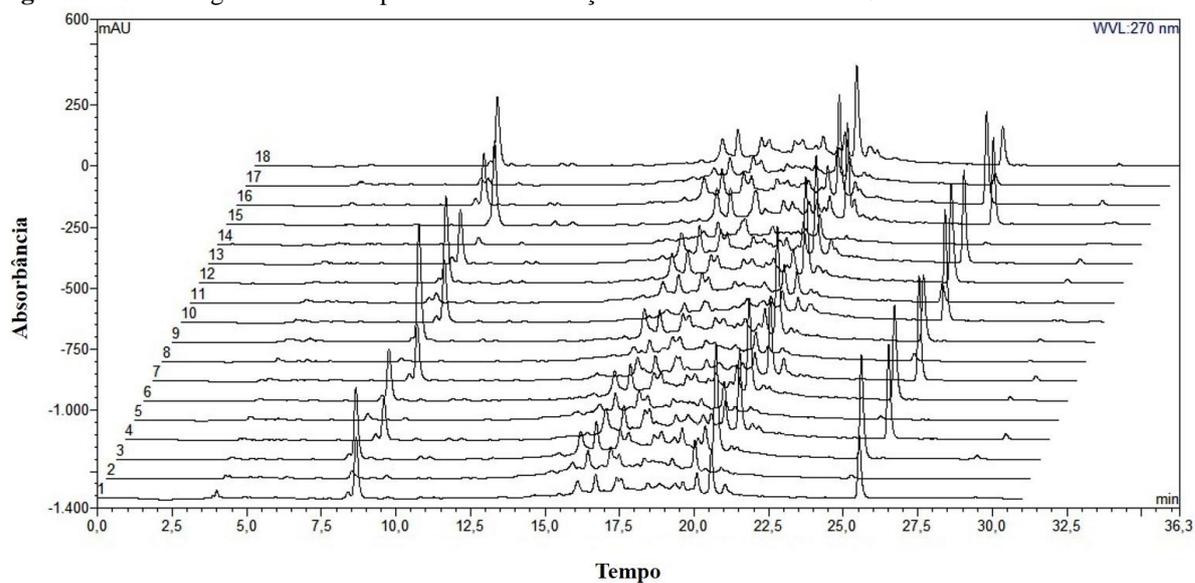
Fonte: Próprio autor.

Figura 7 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 8.

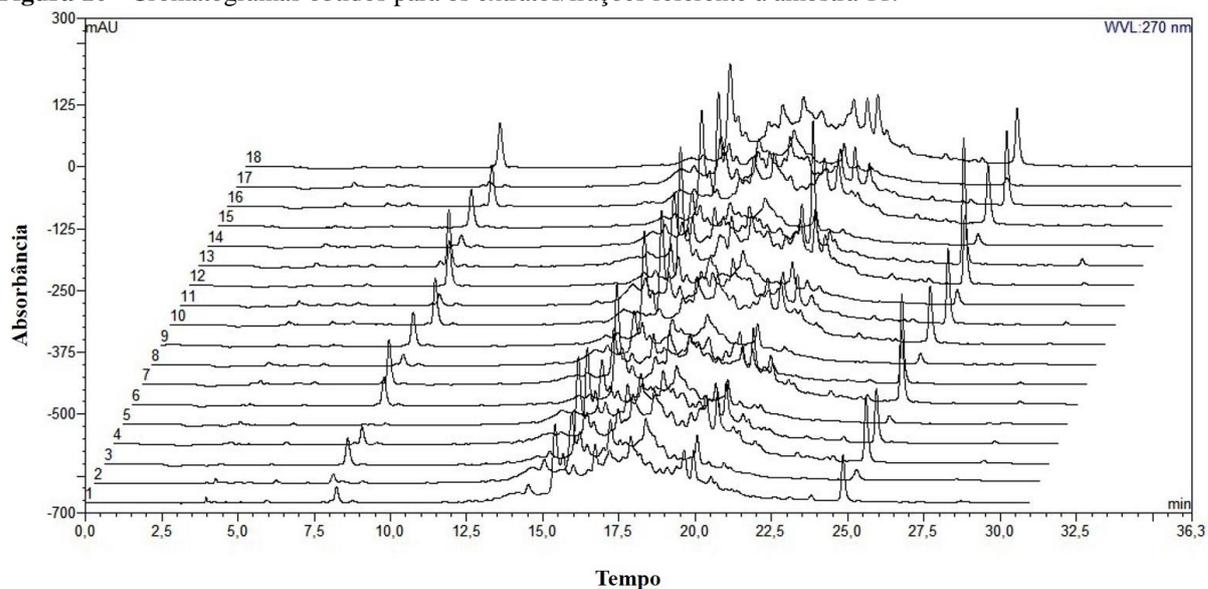
Fonte: Próprio autor.

Figura 8 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 9.

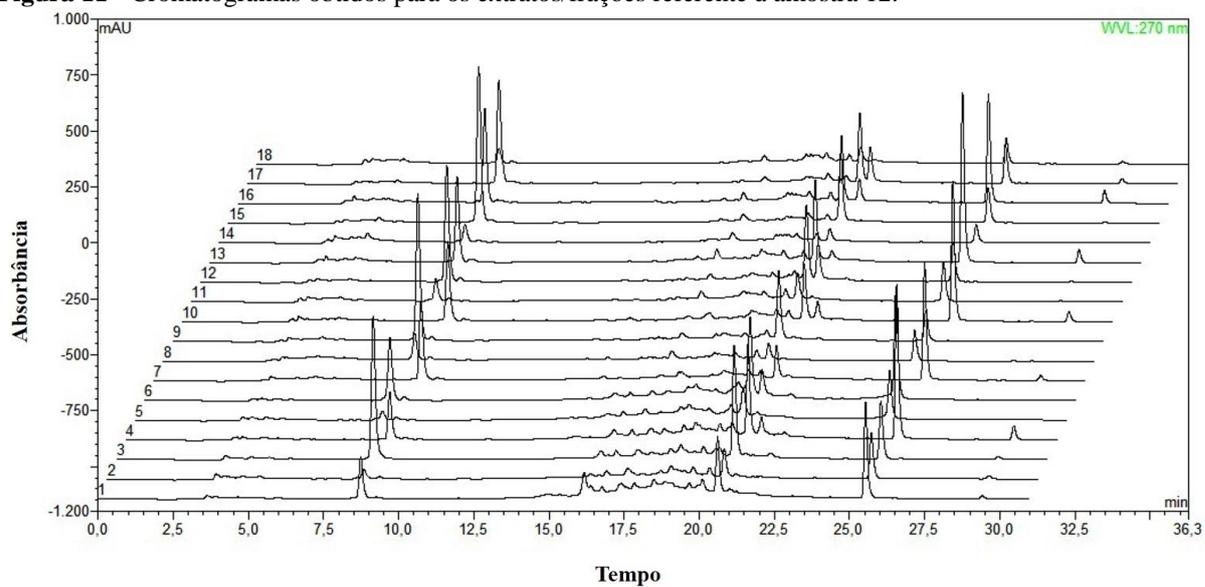
Fonte: Próprio autor.

Figura 9 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 10.

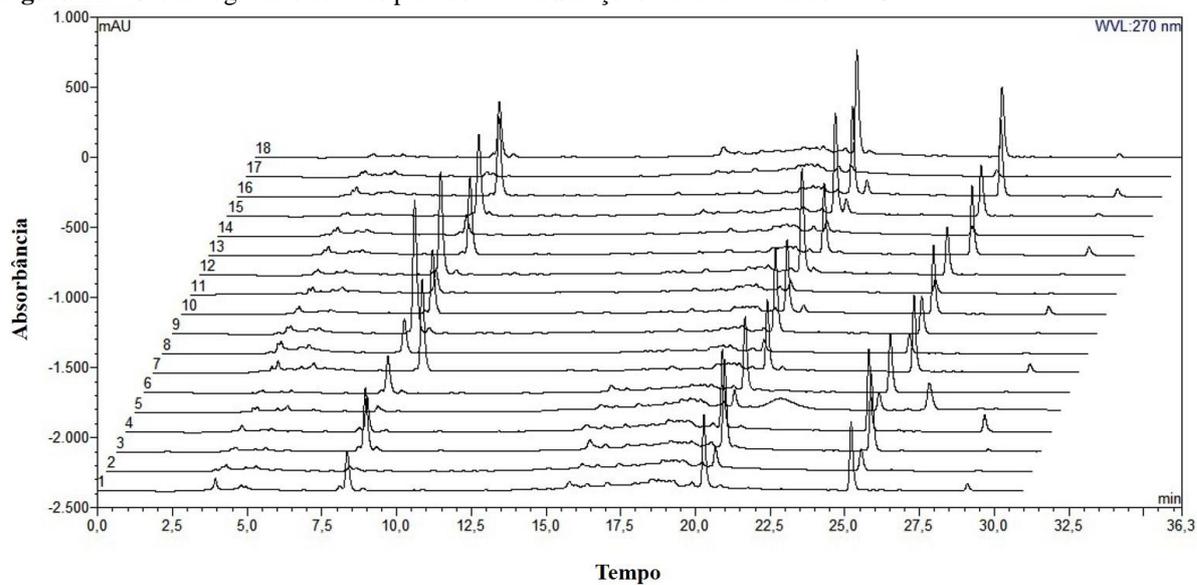
Fonte: Próprio autor.

Figura 10 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 11.

Fonte: Próprio autor.

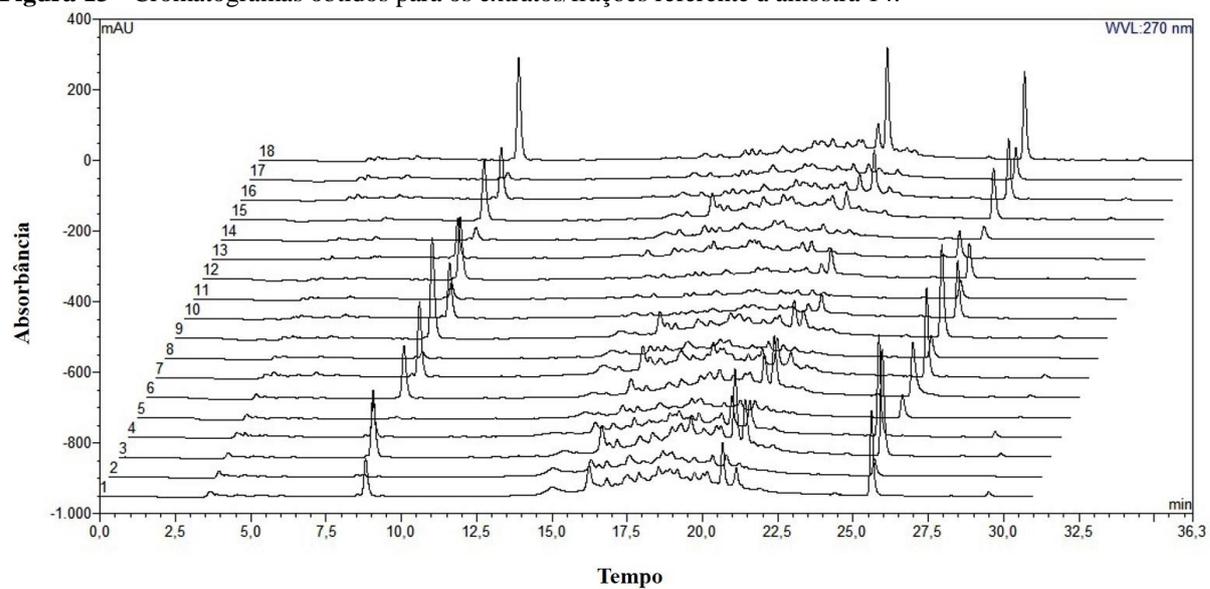
Figura 11 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 12.

Fonte: Próprio autor.

Figura 12 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 13.

Fonte: Próprio autor.

Figura 13 - Cromatogramas obtidos para os extratos/frações referente à amostra 14.



Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE C – ARTIGO 1

***Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: General aspects, Biological activities and Chemical composition**

Magda R.A. Ferreira^{1,2}, Luiz A.L. Soares^{1,2*}

¹Laboratory of Pharmacognosy, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife-PE

²Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife-PE,

Revista: Journal of Medicinal Plants Research

JCR: 0.879

Qualis CAPES: B3

Status: Publicado

Review

***Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition**

Magda Rhayanny Assunção Ferreira^{1,2} and Luiz Alberto Lira Soares^{1,2*}

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Av. Prof. Arthur de Sá - s/n, Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50740-521, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

Received 26 November, 2014; Accepted 27 January, 2015

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz is a medicinal plant widely known in Brazil as "jucá" or "pauferro" that belongs to the Fabaceae family. The species is native to Brazil and is mainly found in the North and Northeastern regions. It has been studied for its biological activities and chemical composition. Scientific literature has reported that this species contains different extracts and/or isolated compounds which have antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant and hypoglycemic properties, as well as others that are in popular use. The phytochemical literature reports on the presence of fatty acids, terpenoids, phenolic compounds and polysaccharides. However, further studies are necessary to find new bioactive molecules with biological relevance based on traditional medicine. The purpose of this review is to provide a broad and updated overview about the relevance of *Libidibia ferrea* species in regard to general aspects, traditional medicines, biological activities and chemical composition data.

Key words: *Libidibia ferrea*, medicinal properties, phytochemistry.

INTRODUCTION

The Genus *Libidibia* (Fabaceae family) includes 500 species of trees distributed worldwide. It is characterized by its content of polyphenols, terpenes and steroids, as well as polysaccharide substances, which are principally responsible for its biological properties (Zanin et al., 2012). The main species of this genus are native to Brazil, and are distributed in different regions all over the country (Flora do Brasil, 2014).

Several uses in traditional medicine are described for different parts (barks, fruits, leaves, seeds and stems). This species is one of 71 species of medicinal plants

included in the national list of medicinal plants of interest to the Brazilian Public Health System (Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde — RENISUS), due to its importance in public health and potential medicinal applications in Brazil (Brasil, 2009). In regard to the species *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*, the present work consists of a survey of the literature from several databases included original articles, books, sites and theses (Periodicos CAPES, PubMed, Science Direct, SciELO, SciFinder, Scopus and Web of Science)

*Corresponding author. E-mail: phtech@uol.com.br, lals@gmx.de Tel. +55 81 2126-8511; Fax: +55 81 2126-8510.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

APÊNDICE D – ARTIGO 2**Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* Martius****Magda R.A. Ferreira^{1,2}, Mônica T.M. Fernandes², Wliana A.V. da Silva², Isabelle C.F. Bezerra^{2,3}, Tatiane P. de Souza⁴, Maria F. Pimentel⁵, Luiz A.L. Soares^{1,2,3*}**

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife-PE, ²Laboratory of Pharmacognosy, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife-PE, ³Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife-PE, ⁴Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil, ⁵ Chemical Engineering Department, Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife-PE

Revista: Pharmacognosy Magazine

JCR: 1.256

Qualis CAPES: B2

Status: Publicado

Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds from Fruits of *Libidibia ferrea* Martius

Magda R. A. Ferreira^{1,2}, Mônica T. M. Fernandes¹, Wliana A. V. da Silva¹, Isabelle C. F. Bezerra^{1,3}, Tatiane P. de Souza⁴, Maria F. Pimentel⁵, Luiz A. L. Soares^{1,2,3}

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Pharmacognosy, Federal University of Pernambuco, ²Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, ³Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, ⁴Department of Drugs and Foods, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, ⁵Department of Chemical Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

Submitted: 18-08-2015

Revised: 28-09-2015

Published: 07-04-2016

ABSTRACT

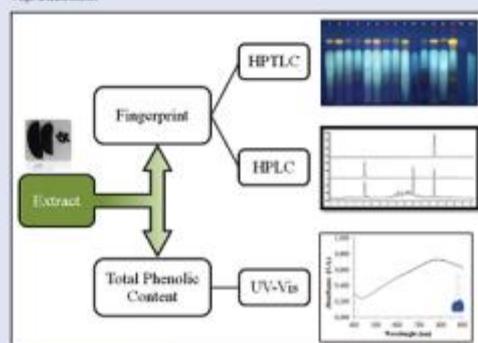
Background: *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae) is a tree which is native to Brazil, widely known as "Jucá", where its herbal derivatives are used in folk medicine with several therapeutic properties. The constituents, which have already been described in the fruit, are mainly hydrolysable tannins (gallic acid [GA] and ellagic acid [EA]). **Objective:** The aim of this study was to investigate the phenolic variability in the fruit of *L. ferrea* by ultraviolet/visible (UV/VIS) and chromatographic methods (high-performance liquid chromatography [HPLC]/high-performance thin layer chromatography [HPTLC]). **Materials and Methods:** Several samples were collected from different regions of Brazil and the qualitative (fingerprints by HPTLC and HPLC) and quantitative analysis (UV/VIS and HPLC) of polyphenols were performed. **Results:** The HPTLC and HPLC profiles allowed separation and identification of both major analytical markers: EA and GA. The chemical profiles were similar in a number of spots or peaks for the samples, but some differences could be observed in the intensity or area of the analytical markers for HPTLC or HPLC, respectively. Regarding the quantitative analysis, the polyphenolic content by UV/VIS ranged from 13.99 to 3286 g% expressed as GA or from 10.75 to 29.09 g% expressed as EA. The contents of EA and GA by liquid chromatography-reversed phase (LC-RP) method ranged from 0.57 to 2.68 g% and from 0.54 to 3.23 g%, respectively. **Conclusion:** The chemical profiles obtained by HPTLC or HPLC, as well as the quantitative analysis by spectrophotometry or LC-RP method, were suitable for discrimination of each herbal sample and can be used as tools for the comparative analysis of the fruits from *L. ferrea*.

Key words: *Libidibia ferrea*, high-performance liquid chromatography, high-performance thin layer chromatography, phenolics compounds, spectrophotometry

SUMMARY

- The polyphenols of fruits of *Libidibia ferrea* can be quantified by UV/VIS and HPLC.
- The HPLC method was able to detect the gallic and ellagic acids in several samples of fruits of *Libidibia ferrea*.

- The phenolic profiles of fruits from *Libidibia ferrea* by HPTLC and HPLC were reproducible.



Abbreviations used: HPTLC: high performance thin layer chromatography, HPLC: high performance liquid chromatography, UV-Vis: spectrophotometry

Correspondence:

Dr. Luiz A. L. Soares,
Department of Pharmaceutical Sciences,
Laboratory of Pharmacognosy,
Federal University of Pernambuco,
Av. Prof. Arthur de Sá, s/n,
Cidade Universitária, 50740-521,
Recife, PE, Brazil.
E-mail: lalu.ufpe@gmail.com
DOI: 10.4103/0973-1296.179665

Access this article online

Website: www.phcog.com

Quick Response Code:



INTRODUCTION

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz is a tree native to Brazil, which belongs to the family Fabaceae,^[1] it is widely distributed in the Northern and Northeastern regions,^[2] where it is popularly known as "Pau ferro" or "Jucá."^[3,4]

It has been reported that various parts of this species (bark, fruits, leaves, and seeds) are used in Brazilian folk medicine with several pharmacological properties. In this sense, several biological properties are reported for the fruits of *L. ferrea* [Figure 1]. The methanolic extract showed antifungal and antibacterial activities against oral pathogens,^[5] and the aqueous crude extract showed related antiulcer, anti-inflammatory, and analgesic effects.^[6,7] In addition, the aqueous infusion has been used by the population in the prevention of cancer.^[8] Moreover, the aqueous extract of the fruit presented antiviral properties of sulfated polysaccharide for herpes simplex virus

type-1 and poliovirus type-1,^[9] and extracts and polysaccharide fractions of pods demonstrated anti-inflammatory activity.^[10] Several authors attribute the activities to the polyphenols and polysaccharides, which are the main constituents of the aqueous extracts.^[9-11]

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: Ferreira MR, Fernandes MT, da Silva WA, Bezerra IC, de Souza TP, Pimentel MF, et al. Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* martius. Phcog Mag 0:0:0.