



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

**ANA KLARISSA SOARES GOMES**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA O  
DOSEAMENTO DE CUMARINAS NA ESPÉCIE *Amburana cearensis* (Fr.  
Allemão) A.C.Smith**

Recife

2020

ANA KLARISSA SOARES GOMES

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA O  
DOSEAMENTO DE CUMARINAS NA ESPÉCIE *Amburana cearensis* (Fr.  
Allemão) A.C.Smith**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Área de concentração:** Fármacos e Medicamentos.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**Coorientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Thiago Antônio de Souza Araújo

Recife

2020

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

G633o Gomes, Ana Klarissa Soares.

Otimização e validação de método espectrofotométrico para o doseamento de cumarinas na espécie *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C.Smith / Ana Klarissa Soares Gomes. – 2020.  
103 f.: il.; tab.; quad.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Desenho experimental. 2. Espectrofotometria. 3. Plantas medicinais. 4. *Amburana-de-cheiro* I. Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-075)

ANA KLARISSA SOARES GOMES

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA O  
DOSEAMENTO DE CUMARINAS NA ESPÉCIE *Amburana cearensis* (Fr.  
Allemão) A.C.Smith**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em ciências farmacêuticas.

Aprovada em: 20/02/2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Presidente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosali (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho (Examinador Externo)  
Unifavip

Dedico esse trabalho aos meus pais, Ana Soares e José Gomes, obrigada por toda dedicação e pelo apoio em todos os momentos da minha vida!

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me dado sabedoria e me mostrado todos os dias o quão infinita é sua misericórdia. Sem Ele, todo desafio superado e toda conquista alcançada seria impossível.

Aos meus pais, **Ana Soares** e **José Gomes**, que sempre acreditam no meu potencial e me apoiam em todos os momentos. Obrigada por todo amor, carinho e paciência. Essa conquista é nossa! Amo vocês até o infinito e além. Tudo o que sou devo a vocês.

As meus pais de criação, **Maria Soares** e **Manoel da Silva**, que agora moram no céu, mas que sei que estão felizes por eu ter conseguido chegar até aqui.

À minha orientadora, **Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim**, pela oportunidade de continuar no laboratório e de confiar no meu trabalho, desde a monitoria de química farmacêutica. Obrigada pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados.

À toda **família LAPRONAT**, por compartilhar comigo os momentos de ansiedade e por todo apoio, em especial à **Jenifer Oliveira**, que sempre tenta me acalmar e me ajuda a resolver qualquer problema, seja na falta de reagentes ou na falta de lanches!

À minha amiga nerd, **Patrícia Neri**, obrigada por ter dedicado seu tempo para me ajudar, por ter me ensinado estatística, por ter feitos vários tutoriais e áudios, para me ajudar nas aulas do estágio de docência e por ter funcionado como psicóloga em muitos momentos. Obrigada por tudo, você com certeza tem um futuro lindo e iluminado pela frente.

À minha amiga e aluna de iniciação científica, **Kivia Machado**, obrigada pelos momentos compartilhados nas bancadas do laboratório e fora dele também! Obrigada por ter me acompanhado, mesmo após o término do seu projeto, obrigada por toda ajuda.

Às minhas amigas que me acompanham sempre, **Ivani Ana**, **Juliana Moccock**, **Karol Pinheiro**, **Thuanny Etzler**, **Rafaela Lima**, **Bruna Moura** e **Fabiana Maria**.

## RESUMO

A utilização de plantas como medicamento é provavelmente tão antigo quanto o aparecimento do próprio homem. A preocupação com a cura de doenças sempre se fez presente ao longo da história da humanidade. Dentre os produtos oriundos do metabolismo secundário dos vegetais de interesse da indústria farmacêutica, pode-se destacar as cumarinas, devido principalmente às propriedades bioativas atribuídas a esse grupo de metabólitos. O presente trabalho teve como objetivo quantificar o teor de cumarinas presentes na espécie vegetal *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A. C. Smith. A coleta das cascas foi realizada em uma área de Caatinga do estado de Pernambuco, localizada na zona rural de Altinho. As amostras foram submetidas a três métodos extrativos com etanol 80% e o teor de cumarinas foi quantificado pelo método de acetato de chumbo. Foi realizado um planejamento fatorial  $3^2$  do extrato das cascas de *Amburana cearensis* obtido pelo método de ultrassom para obtenção de níveis altos de cumarinas. Os resultados obtidos mostraram que o método de quantificação do metabólito desejado é linear com  $R^2 > 0,99$ , no efeito matriz as retas apresentaram o mesmo coeficiente angular. Para a seletividade, a varredura realizada em 200-400nm, região em que as cumarinas absorvem, a precisão por repetibilidade; teve desvios padrões inferiores a 5%, assim como a robustez. A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação com os volumes de 125 $\mu$ L, 500 $\mu$ L e 1000 $\mu$ L. Os resultados mostram uma recuperação de 116,58%, 112,54% e 93,32%, respectivamente. Com base nos resultados, todos os parâmetros estão dentro dos limites estabelecidos pela RDC 166/2017. A escolha do método para otimização da extração foi baseada na viabilidade econômica do mesmo, sendo escolhido o extrato das cascas obtido por ultrassom com um teor de  $46,86 \pm 2,93$  mg EC/g. No processo de planejamento, as variáveis que apresentaram influência na extração das cumarinas foram o teor alcoólico e tempo, enquanto que a proporção droga-solvente 1:20 g/mL foi mantida fixa, pois, proporcionou a obtenção de um teor considerável de cumarinas e foi estatisticamente significativa quando comparada às demais. A metodologia de superfície de resposta foi uma ferramenta útil para se obter a condição ótima de extração de cumarinas, sendo a mesma com um teor alcoólico de 99,8% de etanol, um tempo de extração de 40 minutos e uma proporção droga-solvente de 1:20 (g/mL). Os resultados encontrados mostram que o planejamento fatorial na realização de

experimentos fitoquímicos apresenta-se como um instrumento eficaz para a otimização da extração.

**Palavras-chave:** Desenho experimental. Espectrofotometria. Plantas Medicinais. Amburana-de-cheiro.

## ABSTRACT

The use of plants as a medicine is probably as old as the appearance of man himself. The concern with curing diseases has always been present throughout human history. Among the products from the secondary metabolism of vegetables of interest to the pharmaceutical industry, coumarins can be highlighted, mainly due to the bioactive properties attributed to this group of metabolites. The present study aimed to quantify the content of coumarins present in the vegetable species *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A. C. Smith. The peel collection was carried out in an area of Caatinga in the state of Pernambuco, located in the rural area of Altinho. The samples were submitted to three extractive methods with 80% ethanol and the coumarin content was quantified by the lead acetate method. A factorial design 3<sup>2</sup> of the extract of the barks of *Amburana cearensis* obtained by the ultrasound method was carried out to obtain high levels of coumarins. The results obtained showed that the method of quantification of the desired metabolite is linear with  $R^2 > 0.99$ , in the matrix effect the lines presented the same slope. For selectivity, the scan performed at 200-400nm, the region in which the coumarins absorb, the precision for repeatability; had standard deviations of less than 5%, as well as robustness. Accuracy was assessed using recovery tests with volumes of 125 $\mu$ L, 500 $\mu$ L and 1000 $\mu$ L. The results show a recovery of 116.58%, 112.54% and 93.32%, respectively. Based on the results, all parameters are within the limits established by RDC 166/2017. The choice of the method for optimization of the extraction was based on its economic viability, being chosen the extract of the shells obtained by ultrasound with a content of  $46.86 \pm 2.93$  mg EC / g. In the planning process, the variables that had an influence on the coumarin extraction were the alcohol content and time, while the drug-solvent ratio 1:20 g / mL was kept fixed, as it provided a considerable content of coumarins and was statistically significant when compared to the others. The response surface methodology was a useful tool to obtain the optimal coumarin extraction condition, with an alcohol content of 99.8% ethanol, an extraction time of 40 minutes and a drug-solvent ratio of 1:20 (g / ml). The results found show that the factorial design in the execution of phytochemical experiments is presented as an effective instrument for the optimization of the extraction.

**Keywords:** Experimental draw. Medicinal plants. Spectrophotometry. *Amburana*-of-smell.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Indivíduo adulto da espécie <i>Amburana cearensis</i> A.C.Smith na comunidade do Carão – Altinho – PE.....	23
Figura 2 –	Estrutura básica da cumarina.....	30
Figura 3 –	Via biossintética do ácido chiquímico ao ácido cinâmico...	30
Figura 4 –	Biossíntese do ácido o-cumarínico à cumarina.....	31
Figura 5 –	Representação do gráfico de superfície de resposta em perspectiva tridimensional e plantar.....	45
Figura 6 –	Caule de um exemplar de <i>Amburana cearensis</i> (à esquerda) e coleta das cascas de <i>Amburana cearensis</i> (à direita) .....	48

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Gráficos do efeito matriz e linearidade para os extratos de cascas de <i>Amburana cearensis</i> (Fr. Allemão) A.C.Smith.....	57
Gráfico 2 –	Plotagem de resíduos do gráfico 1 referente ao extrato de casca de <i>Amburana cearensis</i> + Padrão de cumarinas (1) .....	59
Gráfico 3 –	Plotagem de resíduos do gráfico 1 referente ao extrato de casca de <i>Amburana cearensis</i> + Padrão de cumarinas (2)..	59
Gráfico 4 –	Plotagem de resíduos do gráfico 1 referente ao extrato de casca de <i>Amburana cearensis</i> + Padrão de cumarinas (3)..	60
Gráfico 5 –	Plotagem de resíduos do gráfico 1, referente a linearidade, Padrão - cumarinas (1).....	60
Gráfico 6 –	Plotagem de resíduos do gráfico 1, referente a linearidade, Padrão - cumarinas (2).....	60
Gráfico 7 –	Plotagem de resíduos do gráfico 1, referente a linearidade, Padrão - cumarinas (3).....	61
Gráfico 8 –	Espectro de varredura de 200 a 400nm do padrão cumarinas.....	62
Gráfico 9 –	Espectro de varredura de 200 a 400nm do extrato hidroalcoólico de casca de <i>Amburana cearensis</i> .....	62
Gráfico 10 –	Influência dos diferentes tempos (minutos) na extração de cumarinas das cascas de <i>Amburana cearensis</i> .....	70
Gráfico 11 –	Influência dos diferentes percentuais hidroetanólicos na extração de cumarinas das cascas de <i>Amburana cearensis</i> .....	72
Gráfico 12 –	Influência das diferentes proporções droga – solvente (g/mL) na extração de cumarinas das cascas de <i>Amburana cearensis</i> .....	73

Gráfico 13 –	Diagrama de Pareto de efeitos padronizados na extração de cumarinas das cascas de <i>Amburana cearensis</i> (Fr. Allemão) A.C.Smith derivado de um planejamento fatorial $3^2$ .....	76
Gráfico 14–	Gráfico de superfície de resposta tridimensional da extração de cumarinas das cascas de <i>Amburana cearensis</i> (Fr. Allemão) A.C.Smith, derivado de um planejamento fatorial $3^2$ .....	78
Gráfico 15 –	Gráfico de superfície de resposta planar da extração de cumarinas das cascas de <i>Amburana cearensis</i> A.C.Smith, derivado de um planejamento fatorial $3^2$ .....	79

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Volumes do extrato de <i>Amburana cearensis</i> e do padrão utilizado para analisar o efeito matriz.....	51
Quadro 2 –	Volumes do padrão e valores do coeficiente de correlação e dos resíduos exigido pela RDC 166/2017.....	51
Quadro 3 –	Volumes do padrão utilizados para análise da precisão e valor do DPR exigido pela resolução vigente.....	52
Quadro 4 –	Volumes do padrão utilizados para análise do parâmetro e valores da taxa de recuperação e DPR requisitado pela resolução.....	53
Quadro 5 –	Condições para avaliação da robustez do método de Osório e Martins.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tipos de cumarinas e suas atividades farmacológicas.....	32
Tabela 2 –	Níveis das variáveis do planejamento $3^2$ para os extratos das cascas de <i>Amburana cearensis</i> por ultrassom.....	54
Tabela 3 –	Concentrações de extrato de casca de <i>Amburana cearensis</i> utilizadas para a validação.....	56
Tabela 4 –	Equações da reta dos gráficos do efeito matriz.....	58
Tabela 5 –	Equações da reta dos gráficos da linearidade.....	58
Tabela 6 –	Resultados da precisão por repetibilidade utilizando três volumes diferentes.....	64
Tabela 7 –	Resultados da precisão por repetibilidade utilizando três volumes diferentes.....	64
Tabela 8 –	Leitura em diferentes intervalos de tempo.....	65
Tabela 9 –	Valores de recuperação de cumarinas utilizando o método de Osório e Martins.....	65
Tabela 10 –	Teores (mg EC/g) de cumarinas expressos em média desvio padrão dos extratos obtidos das cascas de <i>Amburana cearensis</i> (Fr. Allemão) A.C.Smith por diferentes métodos extrativos.....	66
Tabela 11 –	Matriz do desenho experimental $3^2$ para determinação das condições ótimas na extração de cumarinas das cascas de <i>Amburana cearensis</i> A.C.Smith, sendo os teores expressos em média $\pm$ desvio padrão.....	75
Tabela 12 –	Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta, na extração de cumarinas das cascas de <i>Amburana cearensis</i> A.C.Smith, derivado de um planejamento fatorial $3^2$ .....	80

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS .....	18
1.1.1	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>18</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
2.1	FAMÍLIA FABACEAE.....	19
2.2	GÊNERO <i>Amburana</i> .....	21
2.3	ESPÉCIE <i>Amburana cearensis</i> .....	22
2.4	UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	25
2.5	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	27
2.6	CUMARINAS.....	29
2.7	MÉTODOS EXTRATIVOS.....	34
2.8	ESPECTROFOTOMETRIA (UV-VÍSEL) .....	39
2.9	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	40
2.10	PLANEJAMENTO FATORIAL.....	43
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>48</b>
3.1	AREA DE ESTUDO.....	48
3.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	48
3.3	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	49
3.4	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CUMARINAS.....	49
3.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE OSÓRIO E MARTINS.....	50
3.5.1	<b>Faixa de trabalho.....</b>	<b>50</b>
3.5.2	<b>Efeito matriz.....</b>	<b>50</b>
3.5.3	<b>Linearidade.....</b>	<b>51</b>
3.5.4	<b>Seletividade.....</b>	<b>52</b>
3.5.5	<b>Precisão.....</b>	<b>52</b>
3.5.6	<b>Robustez.....</b>	<b>53</b>
3.5.7	<b>Exatidão.....</b>	<b>53</b>

3.6	EXPERIMENTO DE FATOR ÚNICO.....	53
3.7	PLANEJAMENTO FATORIAL.....	54
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
4.1	FAIXA DE TRABALHO.....	56
4.2	EFEITO MATRIZ E LINEARIDADE.....	56
<b>4.2.1</b>	<b>Dispersão dos gráficos do efeito matriz e da linearidade.....</b>	<b>59</b>
4.3	SELETIVIDADE.....	61
4.4	PRECISÃO POR REPETIBILIDADE.....	63
4.5	ROBUSTEZ.....	64
4.6	EXATIDÃO.....	65
4.7	INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS EXTRATIVOS PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE CUMARINAS DAS CASCAS DE <i>Amburana cearensis</i> (Fr. Allemão) A.C.Smith.....	66
4.8	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE CUMARINAS DAS CASCAS DE <i>Amburana cearensis</i> (Fr. Allemão) A.C.Smith.....	69
<b>4.8.1</b>	<b>Planejamento de fator único.....</b>	<b>69</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Planejamento fatorial 3<sup>2</sup>.....</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais como profilaxia ou arsenal terapêutico para manutenção e recuperação da saúde ocorre desde os tempos antigos da civilização (ANDRADE et al., 2007). É uma das práticas mais utilizadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (ANDRADE, CARDOSO, BASTOS, 2007; FIRMO, 2011). Sendo assim, o conhecimento popular se mostra essencial na identificação de uma planta com grande potencial terapêutico (PEREIRA; CARDOSO 2012).

A atividade farmacológica das plantas medicinais está diretamente relacionada aos metabólitos secundários, os quais podem ser de diversas classes como alcaloides, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, quinonas, taninos, saponinas e terpenos (CARDOSO et al., 2010). Os compostos apresentam uma diversidade de ações que está relacionada à variabilidade química, ou seja, nos organismos vegetais ocorrem interações metabólicas e ambientais que possibilitam a produção de novas moléculas (MOLINARI, 2009).

As substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas podem vir a se tornar ou servir de base para síntese de novos fármacos. Além disso, acredita-se que esses compostos sejam importantes tanto para as plantas como para os seres humanos, uma vez que apresenta algumas propriedades biológicas. As cumarinas destacam-se devido às diversas bioatividades que possuem, tais como: atividade antimicrobiana, imunossupressora, anti-HIV, atividades anti-inflamatórias, antitrombóticas e vasodilatadoras e citostáticas (MONTAGNER, 2007).

As cumarinas são provenientes do metabolismo da fenilalanina (KUSTER; ROCHA, 2003) e isoladas principalmente de plantas verdes, mas podem ser produzidas também por microorganismos, como fungos e bactérias (HOULT & PAYÁ, 1996; MONTAGNER, 2007). Podem ser classificadas como cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas (MURRAY, 1978; BRUNETON, 1995; MONTAGNER, 2007).), a cumarina *per se* é o núcleo básico de todos os outros derivados e é resultante da fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona (COSTA, 1994; MONTAGNER, 2007).

Esse metabólito secundário é o principal componente fitoquímico da espécie *Amburana cearensis* A.C. Smith, estando presente principalmente na casca do caule

dessa espécie. Os componentes fenólicos também foram detectados na triagem fitoquímica dessa planta (PEREIRA, 2010). *A. cearensis* é conhecida popularmente como amburana, amburana-de-cheiro, imburana-cheirosa, cumaru, cumaru-de-cheiro, imburana-brava, dentre outros. É típica de ambiente tropical semi-árido, pertence à divisão Magnoliophyta (Angiospermae), à classe das Magnoliopsida (Dicotyledonae) à ordem Fabales e à Família Fabaceae (Leguminosae – Papilionoideae) (PEREIRA, 2010).

Devido à importância farmacológica das cumarinas, são cada vez mais comuns estudos que visem obter esse composto secundário das espécies vegetais, sendo a extração a etapa mais importante da pesquisa, pois, pode interferir nas investigações qualitativas ou quantitativas e influenciar na qualidade final de produtos fitoterápicos (AZMIR et al., 2013). A obtenção dos extratos pode sofrer interferência de vários fatores como temperatura, tempo de extração, solvente, tamanho das partículas, parte da planta utilizada e do método extrativo escolhido (AZMIR et al., 2013).

Os métodos extrativos são o ponto-chave nos estudos com planejamento fatorial, pois, com um número menor de experimentos é possível avaliar e otimizar as condições de extração, além de determinar a influência de uma ou mais variáveis e evidenciar as interações entre os parâmetros que afetam o processo (SOUZA et al., 2009). A utilização do planejamento fatorial para extrair componentes químicos de uma matriz vegetal pode possibilitar a economia de tempo e de investimento financeiro (SILVA et al., 2006).

Partindo desse pressuposto, o presente estudo visa validar um método espectrofotométrico para quantificar as cumarinas de maneira mais precisa, uma vez que essa técnica é muito utilizada como ferramenta analítica, sobretudo pela robustez e baixo custo (ABADI et al., 2012) e realizar uma análise multivariada visando otimizar um processo extrativo para melhorar a extração desse metabólito utilizando as cascas de *Amburana cearensis*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivos Gerais

Validar e otimizar um método espectrofotométrico para o doseamento de cumarinas na espécie *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C. Smith.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos por três métodos extrativos: maceração, micro-ondas e ultrassom;
- Validar um método de quantificação de cumarinas das cascas da espécie *Amburana cearensis*.
- Otimizar um método extrativo para cumarinas das cascas da espécie *Amburana cearensis*;
- Realizar o planejamento fatorial do melhor método extrativo para cumarinas das cascas da espécie *Amburana cearensis*;
- Obter extratos das cascas de *Amburana cearensis* ricos em cumarinas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae, também conhecida por Leguminosae, é considerada uma das três maiores famílias de angiospermas do mundo. É constituída por cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies que são divididas em 3 subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae, Papilionoideae (LEWIS et al., 2005; SILVA et al., 2013). Os exemplares estão distribuídos em diferentes regiões do globo, tendo distribuição cosmopolita e nos mais diferentes climas (SILVA et al., 2013). É a maior família botânica do Brasil com 2.826 espécies, destas 1.524 são consideradas endêmicas, distribuídas em 222 gêneros (LIMA, 2000; GOMES et al., 2017).

Embora as subfamílias sejam consideradas distintas por alguns autores, há indícios de que Caesalpinioideae é parafilética, uma vez que os gêneros desse grupo possuem traços filogenéticos parecidos com os das outras famílias (DOYLE et al., 2000; WOJCIECHOWSKI et al., 2004; BRUNEAU et al., 2008; HARTEMANN & RODRIGUES, 2014). Os representantes da Mimosoideae apresentam um clado bastante característico, com exceção do gênero *Dinizia* da tribo Mimoseae que tem mais semelhanças com as Caesalpinioideae do grupo *Peltophorum* (LUCKOW et al., 2003; WOJCIECHOWSKI et al., 2004).

Das três subfamílias, a Papilionoideae é a mais diversa e monofilética, sendo representada por cerca de 13.800 espécies, 483 gêneros e por 28 tribos (LEWIS et al., 2005). Muitos pesquisadores nos últimos anos, tem se empenhando em compreender as relações filogenéticas e a taxonomia das Leguminosae, entretanto, alguns grupos como as tribos basais das Papilionoideae ainda são pouco compreendidos (DOYLE et al., 1997; PENNINGTON et al., 2001; WOJCIECHOWSKI et al., 2004).

No entanto, alguns estudos florísticos e taxonômicos mostram que as leguminosas apresentam grande diversificação e podem apresentar-se como ervas anuais ou perenes, prostadas, difusas, trepadeiras, lianas, arbustos, subarbustos, árvores de pequeno, médio e grande porte, e até plantas aquáticas (LEWIS, 1987; GOMES et al., 2017). O caule é variado, enquanto que as folhas podem ser são

compostas alternas espiraladas, com pulvino, estípulas, estipelas, pecíolos, nectários ou glândulas e gavinhas (LEWIS et al., 2005).

As flores são completas, reunidas em 4 a 5 inflorescências, e hermafroditas, com gineceu unicarpelar e súpero, o androceu é gamostêmone podendo ser oligo ou diplo, a corola é gamopétala, actino ou zigimorfa (LEWIS et al., 2005). Os frutos são tipo legumes, mas podem apresentar algumas variações, podendo apresentar-se como: folículo, lomento, sâmara, drupa, bacóide (LEWIS et al., 2005.).

Os indivíduos dessa espécie possuem importância econômica, uma vez que são usados em indústrias alimentícias (feijão, lentilha, ervilha), as leguminosas são lembradas como alimentos básicos e são fontes de importantes nutrientes (LEWIS et al., 2005). São usadas nas indústrias madeireiras para construções e marcenaria (pau-ferro, angico) e podem ser aplicadas em ornamentações (flamboyant, corticeira, mulungus). Algumas são produtoras de fibras e outras espécies são oleaginosas (amendoim, soja) (LEWIS et al., 2005).

Além de terem uso bastante difundido na culinária, as espécies da família Leguminosae, possuem importância ecológica, pois, são capazes de transformar oxigênio gasoso em sais capazes de produzir proteínas em virtude da presença de bactérias que vivem em suas raízes (LAIOLA et al., 2010). Devido a esse potencial, vários exemplares podem ser utilizados em reflorestamento (Canafístula), na recuperação de solos (Catingueira), na decomposição do solo (Catanduva) e na recomposição florestal de áreas danificadas (MAIA, 2004; LAIOLA et al., 2010).

Apesar do grande avanço da medicina e da síntese de novos fármacos, os recursos naturais ainda hoje contribuem para a manutenção da saúde e alívio das enfermidades em países em desenvolvimento (FIRMO, 2011; SOUZA, FELFILI, 2006). Estudos fitoquímicos e farmacológicos mostram que alguns gêneros dessa família apresentam uma composição química rica em flavonoides, terpenóides, lactonas, taninos, quinonas, glicosídeos esteroidais, cumarinas e ácidos orgânicos (LÓPEZ; SANTOS, 2015). Esses compostos são oriundos do metabolismo secundário vegetal, possuem estrutura química complexa e efeitos biológicos significantes (BERG; LUBERT, 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Espécies representantes do grupo das Leguminosas são usadas no tratamento de enfermidades, pois, possuem ações farmacológicas podendo ser usadas como hipoglicemiante (pata de vaca), diuréticas, purgativas, antidiarreicas, hepatoprotetora,

anti-inflamatórias, antidepressivas e no tratamento da colite (BATISTI et al., 2012; LÓPEZ; SANTOS, 2015).

## 2.2 GÊNERO *Amburana*

O gênero *Amburana* foi descrito primeiramente pelo botânico brasileiro Freire Allemão (1864), após análise da descrição feita por Ruiz e Pavon (1974) sobre a gramínea *Torresia cearensis*, típica da Venezuela (SELEME, 2014). Posteriormente, Schwacke e Taubert (1894) propuseram o gênero *Amburana* na espécie conhecida como *Amburana claudii*. Ducke (1935) identificou a espécie *A. acreana* com algumas diferenças na taxonomia e na distribuição geográfica em relação à *Torresia cearensis* (DUCKE, 1935; SELEME, 2014). Por fim, o professor A.C. Smith (1940) sugeriu que *Amburana cearensis* fosse considerada sinônimo para *Torresia cearensis* Freire Allemão e *Amburana claudii* Schwacke e Taubert.

Os trabalhos referentes a esse gênero não fornecem informações suficientes que levem à total identificação das espécies desse grupo. Macbride (1943), em um estudo realizado no Peru, sugeriu *Amburana acreana* (Ducke) como uma variedade de *Amburana cearensis* (SELEME, 2014). Enquanto Bernardi concordou com a descrição feita por Smith (1984) em seus trabalhos sobre as famílias botânicas existentes no Paraguai e demonstrou dados sobre a ecologia, a utilização e localização geográfica da espécie. Em 1952, Burkart descreveu e ilustrou *A. cearensis* em sua pesquisa sobre as leguminosas argentinas, além de fazer menção a outras espécies do gênero.

Devido a heterogeneidade morfológica dos seus representantes, o gênero *Amburana* já foi membro de diferentes tribos e subfamílias, Schwacke & Taubert (1984) consideraram que esse clado pertencia a tribo Amherstieae em Caesalpinoideae (ENGLER & PLANT, 1984; SELEME, 2014). No entanto, Harms analisou a espécie e sugeriu que esse grupo tem características próximas a da tribo Sophoreae (ENGLER & PLANT, 1987). Entretanto, Polhill (1981) em seu estudo taxonômico realizado sobre a tribo polifilética Sophoreae na Bahia, encontrou 25 espécies e 10 gêneros, dentre eles o gênero *Amburana*, especificamente no grupo *Myroxylon*. É considerado também pertencente as tribos Dalbergieae, Dipterygeae (DOYLE et al., 1997; IRELAND et al., 2000; PENNINGTON et al., 2001; MANSANO et al., 2004a; SELEME, 2014; WOJCIECHOWSKI et al., 2004).

A árvore filogenética do clado amburana é composto pelos gêneros *Amburana*, *Myroxylon*, *Myrospermum* Jacq., *Myrocarpus* Allemão, *Cordyla* Lour., *Mildbraediendron* Harms e *Dussia* Krug & Urb, é considerado parente do clado Dipterygeae que engloba *Dipteryx*, *Pterodon*, *Taralea* e *Monopteryx* (CARDOSO, 2012; SELEME, 2014).

As três espécies dessa classe encontram-se distribuídas em diferentes países do subcontinente sul-americano, sendo encontradas no Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Peru (SELEME, 2014). Em solos Brasileiros, os exemplares estão presentes desde da caatinga até regiões subtropicais secas e subtropicais inundadas ou até mesmo em áreas próximas aos vales de rios (LEWIS et al., 2005). A classificação dos táxons dos representantes do gênero amburana apresentam características parecidas e por isso não são completamente reconhecidos (SELEME, 2014).

### 2.3 ESPÉCIE *Amburana cearensis*

A amburana é uma espécie nativa do bioma Caatinga e semiárido do Nordeste brasileiro, essa região é marcada por condições climáticas extremas, com prolongados períodos de seca, *Amburana Cearensis* é resistente aos estresses provocados pelo calor e apresenta boa adaptação ao clima (PEREIRA, 2010).

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro com uma biodiversidade significativa, no entanto, pouco estudada, mas é intimamente associada a uma herança de diversidade cultural (ALBUQUERQUE et al., 2007). É composta por uma vegetação xerófila, formada por plantas decíduas que ocupam mais de 50% da região nordeste do Brasil (aproximadamente 800.000 km<sup>2</sup>), cerca de 10% do território nacional. Esse patrimônio biológico possui uma alta diversidade de exemplares vegetais e cultural, incluindo várias espécies endêmicas de plantas com alto potencial terapêutico (ARAÚJO et al., 2007).

*Amburana cearensis* (Freire Allemão) A.C. Smith é conhecida popularmente por cerejeira, amburana, amburana-de-cheiro, angelim, baru, cabocla e imburana-cheirosa, cerejeira-rajada, cumaré, cumaru, cumaru-de-cheiro, imburana-brava (PEREIRA, 2010). Trata-se de uma árvore que possui caule ereto e que pode chegar a ter 10 metros de altura na Caatinga e cerca de 20 metros na Zona da mata (LORENZI, 1992; SELEME, 2014), conforme pode ser observado na imagem abaixo.

Figura 1 – Espécie *Amburana cearensis* na comunidade do Carão – Altinho –PE.



Fonte: Autoria própria.

Apresenta casca de cor castanha e lisa, suas folhas podem ter de 7-25cm comprimento, o pecíolo pode variar de 9-17mm, possui de 7-15 folíolos alternos de 3-6 x 2,5-3cm ovais com base arredondada, ápice obtuso ou retuso, face adaxial glabra e face abaxial glabra a pubescente com nervação impressa (SELEME, 2014).

As inflorescências variam de 2-5cm, o pedúnculo de 1,5-3cm de comprimento, enquanto que as flores chegam a ter 1,5 cm e podem se apresentar como um estandarte branco ou em tons róseos ou amarelo claro (SELEME, 2014). O seríceo tem 5-6 x 5-6mm de comprimento, ápice marginado base cordada, unguícula com cerca de 1mm de comprimento, bractéolas ovais alongadas, pilosas, com cálice campanulado e truncado, o ovário é glabro e tem 4 x 1mm de comprimento a estípite apresenta-se aderida ao hipanto (SELEME, 2014). O fruto é um legume preto, linear-oblongo com 5-7 x 0,6-1 cm comprimento, com endocarpo membranoso, com 1 a 2 sementes exalbuminosa com formato elíptico, textura lenhosa e coloração marmoreada, localizadas na porção distal do fruto (SELEME, 2014).

Além de ter um importante papel no bioma da caatinga nordestina, *Amburana cearensis* é conhecida também por suas qualidades madeireiras, podendo ser empregada em moveis finos, esculturas e marcenaria de modo geral (SELEME, 2014). É empregada na fabricação de dornas (CATÃO et al., 2011), utilizadas no envelhecimento e no armazenamento de cachaça artesanal, tornando-a mais suave e agradável (ALCARDE et al., 2010; DULTRA, 2016). A espécie é utilizada pela população no tratamento de enfermidades, suas raízes cascas e sementes são utilizadas no combate e na prevenção de doenças, principalmente em remédios caseiros feitos para o alívio de problemas do sistema respiratório e atividade anti-inflamatória (DULTRA, 2016).

Por ser bastante utilizada popularmente para o tratamento de diversas enfermidades, a espécie é classificada por vários autores na categoria medicinal (PEREIRA, 2010). As cascas do caule e as sementes de *Amburana cearensis*, por exemplo, são utilizadas no tratamento da gripe, tosse, dores de cabeça, dores musculares, sinusite (PEREIRA, 2010). Agra e colaboradores (2007) citaram algumas propriedades para espécie, como atividade laxativa, antidiarreica, expectorante, podendo também ser usada para tratar problemas menstruais, doenças do estômago, asma e coqueluches, doenças hepáticas e inflamações na próstata e no ovário.

Foram ainda comprovadas atividades analgésica, broncodilatadora, e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das cascas da espécie (LEAL et al., 2006). São usadas também como antiespasmódicas e para o tratamento de doenças reumáticas (BRAGA, 1976; TIGRE, 1968), tendo uma versão comercializada chamada de xarope de cumaru, quando feita manualmente é chamado de “lambedor”

Apesar da importância desempenhada por essa espécie em vários âmbitos, desde ambiental até fins medicinais, a exploração vem sendo feita de maneira extrativista, provocando degradação ambiental e diminuindo o número de exemplares dessa espécie vegetal (CAMPOS et al., 2013). Tais problemas ocorrem devido à falta de estudos e pesquisas que promovam a conservação e a manutenção de *Amburana cearensis* (DUTRA, 2016). A promoção de projetos que visem melhores condições de propagação de espécies da caatinga é de suma importância (DUTRA, 2016).

## 2.4 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas para fins medicinais é uma prática antiga, mas que persiste até os tempos atuais, seja em cidades pobres ou grandes regiões metropolitanas e acaba aguçando, de maneira indireta, o interesse dos pesquisadores sobre áreas como botânica, farmacologia e fitoquímica (MACIEL et al., 2002).

Mesmo com o grande avanço da medicina e da síntese de novos fármacos, os recursos naturais ainda hoje contribuem para a manutenção da saúde e alívio das enfermidades em países em desenvolvimento (FIRMO, 2011; SOUZA, FELFILI, 2006). Dentre os principais motivos para o uso disseminado desses recursos estão a facilidade de obtenção e a tradição do uso de plantas com propriedades terapêuticas (FIRMO, 2011; VEIGA JUNIOR, PINTO, 2005).

A biodiversidade e o potencial econômico da flora brasileira, foram descritos em diversos trabalhos, relatando a riqueza em espécies produtoras de frutos, resinas, óleos, gomas, aromas, e, principalmente, o potencial medicinal (JACOBSON et al., 2005). Tendo em vista a grande diversidade de espécies do Brasil e seu repertório subutilizado de plantas com potencial terapêutico, há um enorme interesse de pesquisadores e da indústria farmacêutica na inserção de fitoterápicos na terapêutica (ARAÚJO et al., 2007). A população brasileira também possui uma longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas (DUTRA et al., 2016).

As plantas utilizadas na medicina tradicional estão sendo cada vez mais alvo de estudos por serem possíveis fontes de compostos com atividades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, poder de redução da fragilidade e permeabilidade capilares; inibição da destruição do colágeno e da agregação plaquetária (MENDES et al., 2011; PEREIRA, CARDOSO, 2012). Por esse motivo a fitoterapia evoluiu desse modo o conhecimento sobre o poder curativo das plantas não pode mais ser considerado apenas como tradição de um povo, mas sim como ciência que merece ser estudada, aperfeiçoada e aplicada por diversas culturas (TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA; 2006). Apesar das drogas sintéticas ainda representarem a maioria dos medicamentos utilizados pela população, os fitoterápicos também têm conseguido espaço cada vez maior (GRAMS, 1999; TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA; 2006).

O termo fitoterapia é dado à terapêutica que utiliza os medicamentos cujos constituintes ativos são plantas ou derivados vegetais e que possuem sua origem no conhecimento e uso popular (BRASIL, 2012a). A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, regulamentada pelo decreto nº 5.813 de 22 de junho (BRASIL, 2006) recomenda a popularização do uso de plantas medicinais e fitoterapia na atenção primária, desde que seja comprovada a eficácia e a segurança e que as práticas de conservação da biodiversidade medicinal sejam cumpridas (BERBEL, 2012; BESSA et al., 2013).

O mercado de fitoterápicos e plantas medicinais na conjuntura atual traz a proposta de inovação terapêutica em saúde baseando-se de forma racional na vasta flora brasileira. Pode ainda servir como alternativa terapêutica a usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (HASENCLEVER et al., 2017). De fato, em 2012 foi criado o Plano Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), programa do Ministério da Saúde que procura, entre suas diretrizes: disponibilizar gratuitamente fitoterápicos no SUS, incentivar a pesquisa e o desenvolvimento de novos fitoterápicos a partir da biodiversidade brasileira, e capacitar profissionais de saúde no âmbito da fitoterapia e uso das plantas medicinais (BRASIL, 2006). Esse tipo de incentivo é essencial para que os estudos etnobotânicos sejam aprofundados, levando ao aumento do acervo de plantas medicinais (FIRMO et al., 2011).

No Brasil, o mercado de fitoterápicos representa apenas 5% de todo o consumo de medicamentos, representando cerca de 400 milhões de dólares por ano, no entanto, nos últimos anos a utilização desses medicamentos foi duas vezes maior em relação a drogas sintéticas disponíveis no mercado (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006; LEITE; BRANCO, 2010; SCREMIN et al., 2016). Nos EUA, os fitoterápicos movimentam aproximadamente quatro bilhões de dólares por ano, contudo os fitoterápicos são registrados e comercializados como suplementos alimentares, não tendo, portanto, um controle de qualidade adequado (RATES, 2001; SCREMIN, 2016). A Alemanha considera os fitoterápicos como medicamentos e lideram o mercado internacional com vendas de aproximadamente 2,5 bilhões de dólares (BELLO; MONTANHA, SCHENKEL, 2002).

A implantação das Políticas de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Brasil (2012), assim como suas diretrizes e regulamentações foi o estímulo necessário para os avanços nas pesquisas com espécies vegetais e para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (MONTEIRO et al., 2012). Tais políticas também

estimularam o uso da fitoterapia em programas de saúde pública, o que tornou necessário a realização de estudos multidisciplinares que englobou profissionais de várias áreas, sendo o farmacêutico o profissional com participação mais significativa, ampliando desta forma, o conhecimento acerca das plantas medicinais (MONTEIRO et al., 2012; SCREMIN, 2016).

No entanto, embora tenham seu uso disseminado na “medicina popular” é importante verificar alguns dos compostos produzidos pelas plantas, pois podem apresentar toxicidade e, o metabolismo vegetal também pode gerar componentes tóxicos (SANTOS, 2011), que podem ser danosos à saúde humana. Embora haja poucos relatos com relação ao uso dos fitoterápicos e os efeitos colaterais relacionados a dose utilizada (SANTOS, 2011).

De acordo com Calixto (2000), a maioria desses efeitos estão relacionados ao processo de produção dos mesmos e a problemas, tais como, falta de identificação do material vegetal ou até mesmo adulterações desses produtos. Por isso, assim ocorre com os produtos sintéticos, o controle de qualidade do material vegetal, por meio de técnicas adequadas, é de suma importância (MOSCHEN et al., 2013).

## 2.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas possuem um grande potencial biossintético (SOUZA et al., 2018), os compostos provenientes do metabolismo secundário vegetal são de estrutura química e rota biossintética complexa e possuem efeitos biológicos significantes e diferentemente dos metabólitos primários (glicose, por exemplo) que são essenciais para o crescimento do vegetal, normalmente são produzidos em pequenas quantidades (BERG, LUBERT, 2008; PEREIRA, CARDOSO, 2012). No entanto, a síntese de tais compostos pode ser influenciada por alguns fatores, como: clima, tipo de solo, características climáticas de uma determinada região e pela época de coleta (BRUM, 2012).

Por serem produzidos, muitas vezes em poucos grupos de vegetais, é de suma importância iniciar o estudo de uma espécie utilizada pela população, através de uma investigação fitoquímica, principalmente quando não se dispõe de muitos estudos químicos sobre a espécie vegetal, identificando quais são os grupos de metabólitos secundários relevantes (BESSA et al., 2013) e que podem ser usados como marcadores químicos das plantas medicinais em processo de domesticação (BESSA

et al., 2013; LEITE, 2009) e na qualidade da planta medicinal (BESSA et al., 2013; BRAGA, 2009).

Os metabólitos secundários ampliam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, representam uma coevolução das plantas, uma vez que são responsáveis por diversas atividades adaptativas biológicas como, por exemplo, propriedades antibióticas, antifúngicas e até mesmo antivirais para defender as plantas de agentes patógenos (BRUM, 2012). Também apresentam atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas (BRUM, 2012; FUMAGALI, 2008), atuam na defesa contra herbívoros, promovem proteção contra raios UV, atraem animais que realizam a polinização e a dispersão de sementes (BRUM, 2012).

São classificados de acordo com a rota biossintética (HARBONE, 1999; FUMAGALI, 2008), as principais classes de metabólitos secundários são: flavonoides, taninos, cumarinas, alcaloides, antraquinonas, óleos essenciais e as saponinas (SIMÕES et al., 2000). Devido a diversidade e funções de compostos oriundos do metabolismo dos vegetais, têm se aumentado o interesse de cientistas e de empresas de diversos ramos que consideram essas substâncias promissoras, como: a indústria farmacêutica, alimentar, agrônômica e de perfumaria (BRUM, 2012; RHODES, 1994).

Por conta das propriedades biológicas desempenhadas por esses compostos, as plantas são usadas na medicina popular para auxiliar no tratamento de doenças. No entanto, o uso de espécies vegetais exige o conhecimento prévio dos metabólitos secundários, para a avaliação das potencialidades terapêuticas de tais compostos dotados de ação farmacológica (KARAM et al., 2013). Apesar das ações benéficas das plantas, é importante verificar que alguns de seus compostos podem apresentar toxicidade e o metabolismo vegetal também pode gerar componentes com esta atividade (SANTOS, 2011).

Para se obter mais conhecimentos sobre a composição química de uma planta é importante a realização de um estudo fitoquímico preliminar para prever quais classes de metabólitos secundários estão presentes em uma determinada espécie e facilitar a preparação tradicional de “medicamentos caseiros” (BRUM 2012; SIMÕES et al., 2010). Além de guiar estudos de isolamentos, de bioprospecção, estudos farmacológicos e etnobotânicos (BRAGA 2009; BESSA, 2013). Essas pesquisas contribuem ainda para a verificação da toxicidade e dos possíveis efeitos colaterais que podem ser causados pelo uso de plantas com propriedades medicinais, e

desfazer a ideia de que tudo que é “natural” não faz mal e pode ser usado indiscriminadamente (BESSA, 2013).

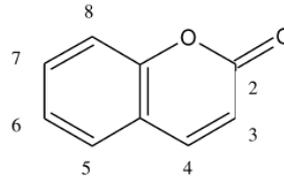
## 2.6 CUMARINAS

O nome dessa classe de composto vegetal é derivado da espécie *Coumarouna odorata* (atualmente *Dipteryx odorata*), conhecida popularmente como cumaru ou fava tonka, da qual o membro mais simples dessa classe de compostos, a cumarina básica (benzopirano-2-ona), foi extraída pela primeira vez por Vogel em 1820 (BORGES et al., 2005). Na última década, as cumarinas surgiram como compostos mobilizadores de ferro secretados pelas raízes das plantas e auxiliam na absorção de ferro de solos carentes deste metal. Além de seu papel na captação de ferro, as cumarinas têm sido extensivamente estudadas por seu potencial para combater infecções em plantas e animais (STRINGLIS; DE JONGE; PIETERSE, 2019).

As cumarinas estão presentes em algumas espécies pertencentes a distintas famílias botânicas, muito comuns na região Nordeste do Brasil (LEAL et al., 2000). No entanto, estão distribuídas predominantemente em angiospermas, onde as estruturas mais simples são comumente encontradas (SIMÕES, 2010). São encontradas naturalmente em famílias de plantas como *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae* e *Solanaceae* (SMYTH et al., 2009).

As cumarinas, constituem um grupo de metabólitos que está despertando interesse, por parte da indústria farmacêutica, por possuírem atividades farmacológicas, dentre elas atividade antidepressiva (MONTAGNER, 2007; SINGH et al., 1992), hepatoprotetora (MONTAGNER, 2007; OKAMOTO et al., 2001; PARK et al., 2004), anti-inflamatória (IVANOVSKA et al., 1994), além de apresentarem baixa toxicidade (HOULT; PAYÁ, 1996). Elas são provenientes do metabolismo da fenilalanina (KUSTER; ROCHA, 2003), tendo como precursores o ácido cinâmico (Figura 2). São isoladas principalmente em plantas verdes, mas podem ser produzidas também por microrganismos, como fungos e bactérias (HOULT & PAYÁ, 1996; MONTAGNER, 2007).

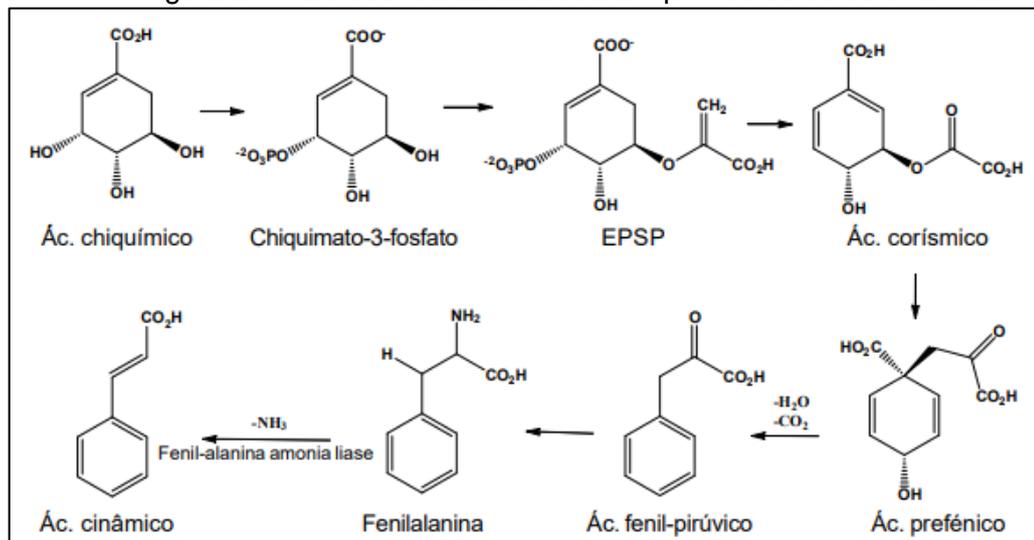
Figura 2 - Estrutura básica da cumarina



Fonte: Witaicenis et al., (2014).

São originadas da via do ácido chiquímico (Figura 3), formado pela condensação de dois subprodutos oriundos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato (CZELUSNIAK et al., 2012). A junção do ácido chiquímico com uma molécula de fosfoenolpiruvato dá origem ao ácido corísmico, ou corismato, dando continuidade à via (CZELUSNIAK et al., 2012). A partir do ácido corísmico, há a formação de aminoácidos aromáticos, precursores de alcaloides, como triptofano, fenilalanina e tirosina. A fenilalanina sofre ação da Fenil-alanina amônia liase (PAL), que retira uma amônia da fenilalanina, dando origem ao ácido cinâmico, que por sua vez origina o ácido o-cumárico (CZELUSNIAK et al., 2012).

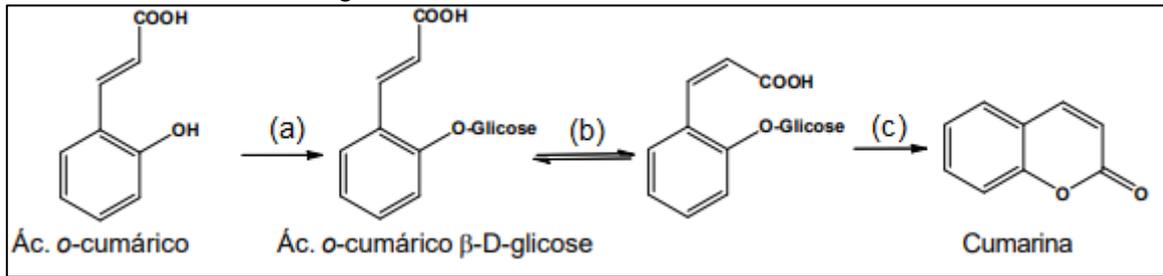
Figura 3 - Via biossintética do ácido chiquímico ao ácido cinâmico.



Fonte: Czelusniak et al., (2012).

O ácido o-cumárico (Figura 4) sofre glicosilação (a) e isomerização cis/trans (b), de fundamental importância no processo de lactonização (c) e formação final da cumarina (CZELUSNIAK et al., 2012).

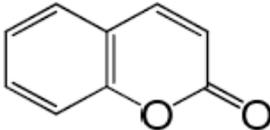
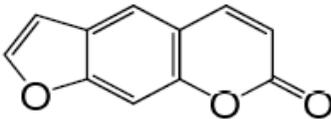
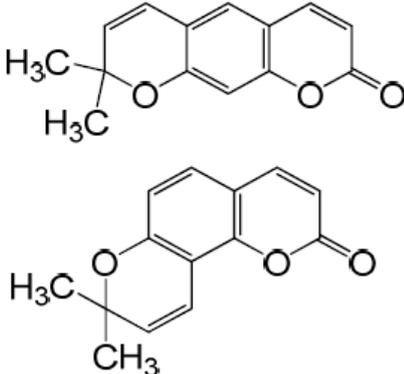
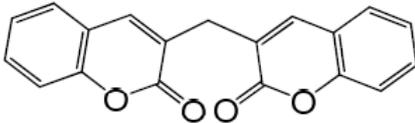
Figura 4 - Biossíntese do ácido o-cumárico à cumarina.



Fonte: Adaptado de Czelusniak et al., (2012).

Esse grupo de metabólitos apresentam estruturas variáveis devido aos diferentes tipos de substituição em sua estrutura básica, que influencia diretamente na sua atividade biológica (KOSTOVA et al., 2011). Baseados nos diferentes substituintes no núcleo das cumarinas (Tabela 1), estas são classificadas em quatro tipos: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, e outras cumarinas (cumarinas diméricas, como dicumarol e cromonas). Furanocumarinas e piranocumarinas ainda podem ser divididas em tipo linear e angular (SIMÕES, 2010; XU et al., 2015).

Tabela 1 - Tipos de cumarinas e suas atividades farmacológicas.

Tipo de Cumarina	Estrutura Química	Exemplos	Atividade Farmacológica
Cumarinas simples		Amnoresinol Novobiocina Cumermicina	Anti-inflamatório Antibiótico Antifúngico
Furanocumarinas		Psoraleno Imperatorina	Anti-TB Anti-inflamatório
Piranocumarinas		Grandivitina Calanolida	Antibiótico Antiviral
Outras cumarinas		Dicumarol	Anticoagulante

Fonte: Adaptado de Xu et al., (2015).

A cumarina *per se* é o núcleo básico de todos os outros derivados e é resultante da fusão dos anéis benzeno e 1,2-pironas, apesar de essa ser a representante mais simples, as cumarinas apresentam uma diversidade estrutural significativa que pode influenciar a sua atividade biológica. Alguns estudos destacaram-se por avaliar atividades farmacológicas de derivados cumarínicos sintetizados ou isolados de plantas (COSTA, 1994).

As atividades bioquímicas e terapêuticas atribuídas as cumarinas dependem de seus padrões de substituição que podem resultar em isômeros naturais conhecidos

como cromonas (5H-1-benzopiran-5-onas) (VAZ; MOREIRA, 2006). Assim como outros produtos do metabolismo vegetal, as cumarinas são importantes na defesa das plantas frente a microrganismos como fungos, bactérias e vírus, tendo maior concentração em condições de infecção, dificultando a propagação dos microrganismos, sendo por esse motivo consideradas fitoalexinas (MONTAGNER, 2007; PINTO et al., 2002).

Várias cumarinas naturais como umbelliferona, escopoletina, visnadina, marmina e esculetina demonstraram potente atividade anti-inflamatória através de vários mecanismos, exercendo sua ação em vários alvos, como Interleucina 6 (IL-6), Ciclooxigenase 2 (COX-2), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) e outros sinalizadores pró-inflamatórios (GROVER; JACHAK, 2015; REVANKAR et al., 2017)

Estudos de atividade hepatoprotetora foram realizados por Bilgin e colaboradores (2011) estudaram os efeitos protetores da cumarinas e seus derivados contra a hepatotoxicidade em ratos induzida pelo tetracloreto de carbono no qual os derivados cumarínicos, escoparone e esculetina, foram os únicos que apresentam uma atividade hepatoprotetora.

Entre os produtos do metabolismo que apresentam atividade citotóxica, as cumarinas demonstram ser uma fonte explorável de novas moléculas antitumorais (KOSTOVA, 2005; MONTAGNER, 2007), em decorrência da atividade imunomodulatória que apresentam e a ação direta nas células malignas (MONTAGNER, 2007; ZANBLINGER et al., 1994).

Alguns estudos com compostos oriundos de cumarinas foram relatados como inibidores de colinesterases, trazendo à tona discussões e novas estratégias para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer (DA) (FALLARERO et al., 2008; ZHOU et al., 2008; MATOS et al., 2012). Isto se torna palpável, uma vez que, alguns medicamentos para a doença de Alzheimer são fundamentados na teoria da “hipótese colinérgica”, cujo principal objetivo é o aumento da concentração de Acetilcolina (ACh) – em déficit em pacientes com DA - na fenda sináptica pela inibição das colinesterases (MARTOCCHIA; FALASCHI, 2008; SOUZA et al., 2016).

Napolitano e auxiliares (2004) descreveram a atividade leishmanicida para o composto sintético 7-geraniloxicumarina – chamado *aurapten* - que inibe o crescimento do parasita, atuando contra formas promastigotas de *Leishmania major*.

A atividade sequestradora de radicais livres de cumarinas foi relatada no trabalho de Torres et al., (2006), o qual analisou a ação antioxidante de oito cumarinas pelo método de captura do DPPH (1,1-difenil-2- picrilhidrazil), obtendo resultados significativos. Esses estudos mostram a importância farmacológica das cumarinas, por esse motivo é importante isolar e estudar esse metabólito secundário.

## 2.7 MÉTODOS EXTRATIVOS

A busca de produtos oriundos dos extratos obtidos de partes dos vegetais que sejam seguros e de boa qualidade está se tornando cada vez mais comum, por esse motivo tem se intensificado as pesquisas científicas na área de produtos naturais que visam a obtenção de produtos de baixo custo atrelados a preservação e ao desenvolvimento sustentável (DIOUF; STEVANOVIC; BOUTIN, 2009). Além disso, outro ponto que está contribuindo para a realização de mais estudos por pesquisadores brasileiros é o potencial da biodiversidade brasileira (PINTO et al., 2002). No entanto, por estarem presentes em concentrações baixas nos vegetais e por serem sensíveis é importante utilizar métodos extrativos eficientes que preservem a estrutura química dos metabólitos secundários (HELDMAIER, 2009; MOLNAR et al., 2017).

Em vista disso, a química analítica atual foca na procura de formas mais rápidas, simples e menos onerosas para obtenção de marcadores com potencial farmacológico (BAJEROVÁ et al., 2014). Nos últimos anos, ocorreram alguns avanços tecnológicos nas técnicas de caracterização de amostras vegetais como o surgimento e a utilização aparelhos cromatográficos e espectrométricos na área de produtos naturais. Porém, fatores importantes podem influenciar no direcionamento dos estudos, entre eles, estão o pré-tratamento das amostras e otimização dos processos (BAJEROVÁ et al., 2014). Pesquisas mostram que pode ocorrer diferenças na composição química de extratos obtidos por métodos diferentes, alterando desse modo, a composição final do produto (AGATONOVIC-KUSTRIN E LOESCHER 2013).

Para a extração de produtos vegetais, deve-se levar em consideração as características da matéria vegetal, a secagem e o tamanho das partículas após o processo de pulverização, o método extrativo a ser empregado, líquido extrator que será utilizado no processo, uma vez que esses fatores envolvidos no pré-tratamento podem influenciar na qualidade final do produto (CHOZE, 2004. DO et al., 2014). Dentre essas, a extração é a etapa mais importante para os procedimentos analíticos

posteriores (PIETRZAK; NOWAK; OLECH, 2013), uma vez que sua eficiência está atrelada ao método utilizado e suas condições (MARTINS et al., 2013; DO et al., 2014). Em alguns casos, é preciso a utilização de mais de um método para determinação do perfil fitoquímico de uma espécie (MARTINS et al., 2013) para a obtenção de um maior rendimento e uma melhor qualidade nos compostos almejados (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007).

O processo de extração visa retirar compostos dos tecidos vegetais de uma forma seletiva, o método é selecionado a partir da parte da planta utilizada no estudo e leva-se em consideração algumas características da amostra como umidade, sensibilidade a altas temperaturas (SONAGLIO et al., 2004). Além das características citadas anteriormente, deve-se levar em consideração que a capacidade de penetração dos solventes está relacionada com a consistência dos tecidos que constituem o material a extrair, ou seja, quanto mais rígido for o material menor deverá ser a sua granulometria (CHOZE, 2004).

O tamanho das partículas é sem dúvidas um dos fatores mais relevantes, pois irá determinar a superfície de contato entre a droga vegetal e o sistema de solventes escolhidos (ALVES et al., 2010), quanto menor for a superfície de contato mais eficiente será a extração, no entanto, o tamanho deve ser padronizado, uma vez que pós com granulometria muito reduzida pode acarretar dificuldades na extração (SEVERO et al., 2013). A parte utilizada do material vegetal, o tempo de extração, a temperatura, a pressão, percentual de umidade, sistema de agitação, solventes escolhidos e a acidez do meio são alguns fatores que podem influenciar no teor de composto obtidos (CHLOPICKA et al., 2013; MARTINS et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016a).

A temperatura é outro ponto determinante na extração podendo influenciar na solubilidade, na viscosidade e na pressão de vapor (BOONKIRD; PHISALAPHONG; PHISALAPHONG, 2008). A elevação desse fator até certo ponto traz pontos favoráveis ao processo, pois, permite um maior contato entre o solvente e o pó do material vegetal (RAJABI et al., 2014) e quando aliada a um sistema de agitação pode diminuir o tempo de extração do método (FÔNSECA, 2005). No entanto, é preciso considerar que alguns metabólitos secundários são termossensíveis e o aumento excessivo desse fator pode provocar alterações nas estruturas químicas dos mesmos (OLIVEIRA et al., 2016a).

O tempo de contato e a relação droga vegetal e solvente são fatores que exercem influência no processo extrativo, em teoria quanto maior for o tempo de extração maior será a quantidade de compostos secundários obtidos (CHUA, 2013). No entanto, um período prolongado de extração pode acarretar a perda de alguns metabólitos importantes em devido a condições desfavoráveis durante o processo de obtenção de extratos (BAJEROVÁ et al., 2014). A quantidade de solvente utilizada pode afetar no rendimento, pois, o aumento do volume do líquido extrator tende a aumentar o contato com o material vegetal e conseqüentemente, elevar o rendimento (ALMEIDA, 2019). Porém, é importante verificar essa relação droga: solvente, para evitar o desperdício de solvente e elevação nos custos (PREDESCU et al., 2016; WANG et al., 2016).

O líquido extrator pode influir na transferência de elétrons e átomos de hidrogênio durante o contato com a droga vegetal, sendo de grande importância na extração dos compostos desejados (OLIVEIRA et al., 2016a). Além disso, outros pontos relacionados ao solvente devem ser levados em consideração, como: o risco de manuseio, custo, estabilidade dos metabólitos extraídos, disponibilidade e toxicidade (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004). A escolha dos solventes depende dos conhecimentos químicos relacionados com o pH e a polaridade dos metabólitos secundários.

O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível, a depender das substâncias ou do grupo de compostos pretendidos, a polaridade do líquido extrator é fator determinante na obtenção dos metabólitos que se deseja extrair (ALMEIDA, 2019). Logo, um solvente com polaridade próxima ao dos compostos desejados tende a aumentar a eficiência do método extrativo (CHUA, 2013). Nas análises fitoquímicas em que não se sabe a composição química do material submetido ao estudo, deve-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com líquidos extratores de polaridade crescente, obtendo-se desse modo, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente (SIMÕES et al., 2000; CHOZE, 2004).

A composição química das plantas é muito complexa e frequentemente ocorre a extração simultânea de vários tipos de substâncias, biologicamente ativas ou não, desejadas ou não, por isso o líquido extrator e o método de extração devem ser levados em consideração (COSTA, 2000; CHOZE, 2004).

A escolha do método extrativo a ser empregado tem papel importante no rendimento dos estudos realizados com plantas medicinais, antes de escolher o método é sempre importante levar em consideração as vantagens e limitações do mesmo, os custos do processo que será empregado, os compostos a serem extraídos e a estabilidade dos mesmos e os extratos que se deseja obter (ALMEIDA, 2019). Apesar de existirem diferentes métodos, todos têm como objetivo melhorar a seletividade, extrair os metabólitos secundários do material vegetal, aumentar o rendimento dos compostos desejados, ser robusto e reprodutivo, independente da matriz vegetal submetida ao processo (AZMIR et al., 2013).

Os processos extrativos são classificados quanto ao uso em métodos tradicionais e modernos. No primeiro grupo, estão a extração por Soxhlet, a maceração, a infusão, a percolação, a decocção e a turbólise (OLIVEIRA et al., 2016a). No segundo, enquadram-se extração por micro-ondas, extração assistida por ultrassom, extração em fluido supercrítico, extração em contracorrente e a extração em leite fluidizado (PIETRZAK; NOWAK; OLECH, 2013).

A maceração é a técnica extrativa tradicional mais utilizada, na qual a matéria-prima vegetal é colocada em recipiente fechado, por um período de tempo determinado (horas ou dias), sem renovação do líquido extrator. Em seguida, ocorre a retirada do extrato para uma remaceração, ou seja, repete-se o procedimento utilizando o mesmo material vegetal, renovando-se apenas o solvente (SIMÕES et al., 2000; CHOZE, 2004). O contato do material vegetal com o solvente extrator pode ser estático ou sob agitação (ALMEIDA, 2019), na segunda condição ocorre uma facilidade na obtenção dos metabólitos, uma vez que ocorrem dois processos fundamentais: aumento da difusão e remoção do solvente concentrado próximo à amostra, promovendo uma renovação do solvente em contato com a mesma (AZMIR et al., 2013).

Trata-se de um processo não seletivo que se baseia no equilíbrio entre o solvente e a droga, e pode ser influenciado por fatores que podem estar ligados a droga, como tamanho de partícula, umidade e quantidade, assim como por fatores que podem estar a escolha do líquido extrator (CHOZE, 2004). O equilíbrio depende do tamanho da partícula e do grau de intumescimento das células, da polaridade do solvente e da viscosidade do mesmo (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1996; MELECCHI, 2005).

As desvantagens dessa técnica estão a lentidão para obter as substâncias, impossibilidade de extrair todos os metabólitos ativos da planta, possibilidade de contaminações, principalmente quando o solvente usado tem uma grande quantidade de água (MELECCHI, 2005) e a grande quantidade de solvente utilizado (PIETRZAK; NOWAK; OLECH, 2013; DO et al., 2014).

A maceração é escolhida quando os princípios ativos podem ser degradados pelo calor ou até mesmo pelo ar, ou quando são solúveis em temperatura ambiente em um solvente que não seja volátil (MIRANDA, et al., 2001, MELECCHI, 2005). Além disso, este tipo de técnica mostra-se com valor reduzido diante de outras, mesmo as modernas (VIEIRA et al., 2013a), uma vez que requer baixo gasto de energia e não necessita de aparelhos sofisticados, com mão de obra especializada e alto custo de manutenção.

Na extração assistida por ultrassom correntes de alta frequência, maiores que 20kHz (ONISZCZUK; PODGÓRSKI, 2015) promovem a fragmentação das membranas celulares do material vegetal, tornando mais fácil a obtenção dos constituintes bioativos (HUIE, 2002). As ondas sonoras geradas pelo aparelho de ultrassom promovem o fenômeno chamado de cavitação que se caracteriza pela formação de bolhas, ocorrendo conversão da energia cinética em calor para o aquecimento do conteúdo da bolha e facilitando a dissolução dos compostos bioativos da amostra vegetal para o solvente extrator devido a ruptura da parede celular (AZMIR et al., 2013; ONISZCZUK; PODGÓRSKI, 2015).

Essa técnica de extração, considerada moderna, promove um aumento considerável da interface entre o solvente e a amostra com conseqüente elevação da transferência de energia através da membrana celular (RAJABI et al., 2014). Além disso, tem como vantagens: extração seletiva, partida e reposta rápidas, redução no tamanho do equipamento e no número de etapas do processo (CHEMAT et al., 2008).

Alguns fatores podem afetar a eficiência da extração por ultrassom, como: grau de moagem do material vegetal, o solvente escolhido, a dimensão das partículas da amostra, o tempo e a frequência de sonicação também podem afetar o processo (AZMIR et al., 2013). Como desvantagens deste método, tem-se o uso de energia; necessidade de averiguar a temperatura no processo; pode requerer longo tempo e/ou quantidade de solvente, além de ter um certo grau de ruído (WANG et al., 2016).

A extração assistida por micro-ondas também pode ser utilizada para extrair metabólitos solúveis em um fluido por meio ondas eletromagnéticas com faixa de

frequência de 300MHz a 300GHz (PARÉ et al., 1994). A energia eletromagnética absorvida pela amostra é transformada em calor após mecanismos de condução iônica e rotação de dipolo (JAIN, 2009). A difusão dos metabólitos bioativos ocorre devido ao rápido aumento da temperatura, da pressão interna, da difusão do solvente através da amostra e a liberação destes para o solvente (ALMEIDA, 2019).

Este método promove um rápido aquecimento para extração dos metabólitos, reduz o volume de solvente orgânico utilizado, sendo por isso considerado uma técnica verde e aumenta os rendimentos obtidos quando comparado com os métodos convencionais (CRAVOTTOA et al., 2008; DONG et al., 2014; YEDHU KRISHNAN; RAJAN, 2016). Por outro lado, o aumento da temperatura e da pressão podem provocar a degradação de produtos termossensíveis ou do próprio material vegetal (FILLY et al., 2014), além de gastar energia e exigir aparelhagem específica. Vale ressaltar que o uso dessa técnica irá depender da composição e da quantidade do solvente, da temperatura de extração e das características da amostra vegetal submetida ao processo (HUIE, 2002).

Vários procedimentos podem ser utilizados para a obtenção de extratos de plantas, visando isolar compostos, no entanto, um bom método de extração deve ser simples, seguro, reproduzível, de baixo custo e adequado para aplicações industriais (CHOZE, 2014).

## 2.8 ESPECTROFOTOMETRIA (UV- VÍSÍVEL)

A espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta visível (UV-vísivel) é uma das técnicas analíticas mais valiosas que pode ser empregado para a quantificação de metabólitos secundários em extratos de espécies vegetais. O princípio dessa técnica consiste na absorção e/ou na emissão de energia eletromagnética nas regiões do espectro eletromagnético pelos elétrons, átomos ou moléculas de uma amostra (ROCHA; TEIXEIRA, 2004). A interação que ocorre entre a matéria que pode estar no estado líquido, sólido ou gasoso pode ser detectada e quantificada.

As análises são feitas em um aparelho chamado espectrofotômetro, são utilizadas para tanto cubetas de quartzo, para essa região do espectro, de 1cm e a varredura ocorre na velocidade de 8,3 nm s<sup>-1</sup> ("middle") (PASCHOAL et al., 2003). Os picos máximos de absorção da amostra,  $\lambda_{max}$ , podem ser identificados utilizando os recursos do software do espectrofotômetro (PASCHOAL et al., 2003).

A espectrofotometria está fundamentada na lei de Lambert-Beer que é a base matemática para relacionar a absorção da radiação por uma amostra nas diferentes regiões do espectro: ultravioleta, visível e infravermelho. A lei nos diz quantitativamente como a grandeza da absorção ( $I_0$ ) /absorbância ( $I$ ) depende da concentração de moléculas ( $c$ ), da extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção ( $b$ ) e da absorvidade molar ( $\epsilon$ ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente (PASCHOAL et al., 2003). Logo, quanto maior for o caminho, mais a radiação irá interagir com as espécies presentes, mais irá absorver.

$$\text{Fórmula: } \mathbf{A = \log (I_0/I) = \epsilon bc}$$

Trata-se de uma técnica de vasta aplicação nos laboratórios de pesquisa e de controle de qualidade, uma vez que permite quantificar classes de compostos químicos. Além de se destacar por ser um método simples, rápido, robusto, de custo relativamente baixo e com aparelho de fácil manipulação (ABADI et al., 2012).

## 2.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Por meio da validação é possível obter indícios de que o método utilizado emite resultados confiáveis e seguros (CASS, 2009). Esse processo engloba uma série de procedimentos que objetivam afirmar a credibilidade no uso rotineiro dos dados obtidos e a capacidade analítica da metodologia empregada (CASS, 2009). Para se obter respostas que comprovem a veracidade do método, é importante o uso de ferramentas estatísticas (COSTA, 2012).

De acordo com a Resolução 166/2017, a validação demonstra por meio de uma avaliação sistemática se uma dada metodologia é capaz fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2017). Dessa forma, a validação permite que a execução do processo analítico siga os parâmetros estabelecidos pelas legislações vigentes, além de assegurar que os métodos sejam reproduzíveis em diferentes laboratórios, de forma precisa e exata, obedecendo os limites de confiança (VERZA, 2006).

A análise e o controle de qualidade do material vegetal, por meio de técnicas adequadas, é de suma importância para a padronização dos princípios ativos, por isso é importante a aplicação de métodos analíticos (MOSCHEN et al., 2013). Um novo método pode ser proposto e validado, desde que cumpra as exigências dos órgãos regulamentadores a fim de garantir resultados confiáveis (BRASIL, 2010; BATISTA et al., 2011). A padronização de suas preparações promoverá o aumento da confiabilidade, aceitação (CARDOSO; BAUAB; VARANDA, 2015) e segurança de uso desse tipo de produto (WHO, 2009; POSADZKI et al., 2013).

Devido à complexidade química dos constituintes de um extrato vegetal e a variabilidade na qualidade dos compostos vegetais de uma espécie, as análises de controle de qualidade em produtos oriundos de plantas medicinais tornam-se dispendiosas (KLEIN et al., 2010). Diante das dificuldades encontradas para realizar a quantificação de todos os metabólitos secundários nessas matrizes têm se optado por escolher uma substância marcadora, se estiver presente em quantidades adequadas no extrato, os demais metabólitos também são considerados igualmente representados (KLEIN et al., 2010).

Para a determinação ou quantificação de um composto secundário ou um grupo de compostos em uma dada espécie vegetal, pode-se utilizar alguns métodos analíticos, dentre eles: cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (HPTLC), cromatografia gasosa e espectrofotometria no UV-VIS (KLEIN et al., 2009; MARQUES et al., 2012).

De acordo com a RDC 166 de 25 de julho de 2017 vigente da ANVISA, para atestar a eficiência dos métodos na rotina laboratorial, alguns parâmetros são exigidos processos extrativos que visem quantificar componentes oriundos do metabolismo secundário, são eles:

- **Seletividade:** Deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. Na análise quantitativa e em ensaios limite, a seletividade deve ser demonstrada por meio da comprovação de que a resposta analítica se deve ao analito analisado, sem interferência do líquido diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação. Enquanto que em testes qualitativos deve ser demonstrada a

capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas parecidas que podem estar presentes (BRASIL, 2017).

- **Linearidade:** Refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada (BRASIL, 2017). Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico, a equação da reta de regressão de  $y$  em  $x$  estimada pelo método dos mínimos quadrados, que descreve essa relação conhecida como curva de calibração (BRASIL, 2017; RIBEIRO et al., 2008). O critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação  $R^2$  deve ser 0,99 (BRASIL, 2017). Este parâmetro deve ser analisado, através da medição da amostra preparada de maneira independente em diferentes concentrações, construindo uma curva de calibração, a RDC 116/17 recomendadas no mínimo cinco concentrações diferentes.
  
- **Efeito Matriz:** Deve ser estabelecido por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito. O paralelismo entre as retas do padrão e do extrato indica ausência de interferência dos constituintes da matriz (BRASIL, 2017).
  
- **Faixa de trabalho:** A faixa de trabalho pode ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependente da aplicação pretendida (BRASIL, 2017).
  
- **Precisão:** A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de ensaios de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, conforme o método analítico a ser validado (BRASIL, 2017). É considerada em três níveis, repetibilidade: contempla a fidelidade dos resultados realizados nas mesmas condições operacionais, aplicadas em um curto intervalo de tempo. Enquanto que precisão intermediária: expressa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, porém realizados em dias diferentes. Para esta análise é recomenda-se no mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2017). A precisão de reprodutibilidade avalia a precisão do método quando este é executado em laboratórios diferentes (BRASIL, 2017). Para a análise desse parâmetro deve-se utilizar, no mínimo, nove determinações, desde que contemplem o intervalo linear do método analítico, ou seja,

3 três concentrações diferentes: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível ou seis réplicas a 100% da concentração do padrão do teste.

- **Exatidão:** Expressa a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em estudo em relação a um valor verdadeiro. Deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações num intervalo linear da metodologia, ou seja, em três concentrações, baixa, média e alta, em triplicata para cada concentração (BRASIL, 2017). No entanto, para cada tipo de amostra, deve ser utilizada a abordagem mais adequada, de acordo com o método submetido ao estudo.
  
- **Robustez:** É definida como a sensibilidade de um método frente a pequenas variações nas condições experimentais. Os testes de robustez, em geral, servem para indicar os parâmetros que podem afetar, significativamente, a resposta do método estudado. Por meio da robustez é possível dimensionar o problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório (BRASIL, 2017; RIBEIRO et al., 2008).

## 2.10 PLANEJAMENTO FATORIAL

O planejamento fatorial é uma estratégia utilizada para aprimorar a organização de sistemas industriais e processos (MIGLIATO et al., 2011). É a ferramenta mais indicada quando se deseja avaliar a influência de duas ou mais variáveis. Novas metodologias estão sendo desenvolvidas por pesquisadores de diferentes áreas com o intuito de possibilitar a organização dos experimentos e possibilitar uma análise estatística mais concisa dos resultados obtidos (FERNANDES et al., 2016). As técnicas de planejamento fatorial podem ser aplicadas em diferentes áreas e permitem reduzir os custos do processo, aumentar o valor agregado e a desenvolver novos produtos (FERNANDES et al., 2016).

A aplicação desse método em experimentos pode ser classificada em dois tipos: o univariado, também chamado de fator único e o multivariado ou planejamento fatorial. No primeiro, cada fator é otimizado por vez, ou seja, as demais variáveis são mantidas constantes, enquanto que apenas um dos fatores varia dentro do intervalo escolhido no processo (FERREIRA et al., 2003; PELOI et al., 2016). Entre as vantagens, pode-se mencionar a simplicidade do método, a facilidade na obtenção

dos resultados e a melhoria no direcionamento para o planejamento fatorial. No entanto, requer uma maior quantidade de experimentos e tempo, além de não considerar as interações que as variáveis podem ter sobre a resposta a ser otimizada (FERREIRA et al., 2003; PELOI et al., 2016).

É importante ressaltar que nem todos os fatores possuem a mesma influência na resposta, ou seja, uns podem apresentar alta influência enquanto que outros podem não ter efeito significativo, sendo descartados em estudos mais complexos (ANTONY, 2003).

A rotina de planejamento experimental deve ser encarada como um processo dinâmico, ao longo do qual os pressupostos são revistos e aperfeiçoados (FERNANDES et al., 2016). O número de experimentos necessários, neste tipo de estudo, é representado por  $N^k$ , onde  $k$  é o número de variáveis e  $N$  o número de níveis, sendo os estudos  $2k$ , os mais comuns (CUNICO et al., 2013). Dois fatores são importantes para o entendimento do planejamento, são eles: as variáveis que estão relacionadas ao tipo de método que será utilizado e os níveis que podem ser: elevado, central e baixo (+1; 0 e -1, respectivamente). Tais parâmetros são normalmente obtidos por meios dos ensaios preliminares de fator único (FAROOQ et al., 2017).

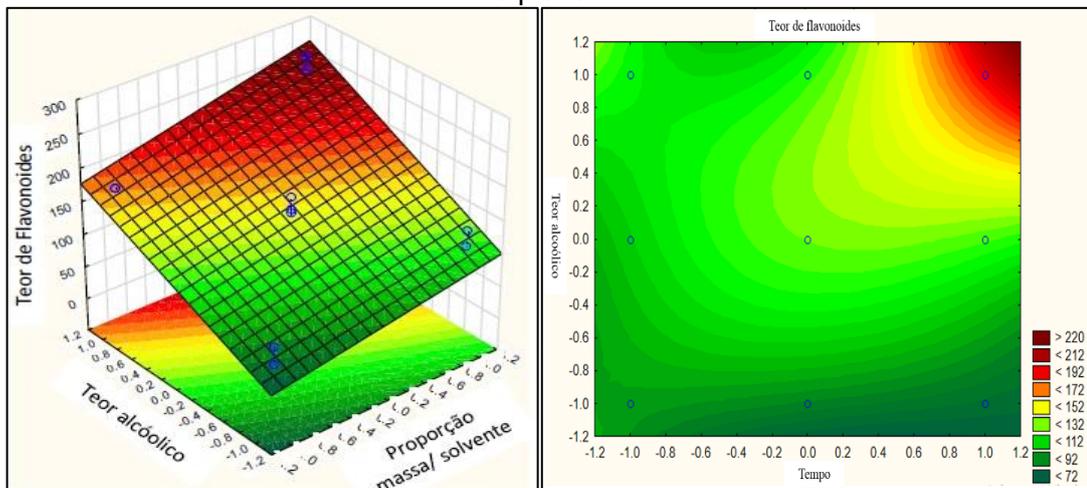
Por meio do planejamento multivariado de experimentos é possível obter uma percepção total e sistemática dos resultados, pois as eventuais interações entre as variáveis podem ser avaliadas, devido a variação de todos os fatores presentes no processo (CUNICO et al., 2013; NALAWADE; GAJJAR, 2016). Isto leva a um menor número de experimentos a serem realizados, menor tempo demandado e identificação do erro experimental, porém a análise dos resultados obtidos é mais complexa, sendo necessário a utilização de programas computacionais para interpretação dos mesmos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; COSTA-MACHADO; BASTOS; DE FREITAS, 2013; GEYIKCI, 2016). Entre os programas utilizados para este tipo de planejamento, tem-se o Statistica®, produzido pela STATSOFT® que fornece um amplo conjunto de técnicas para análise, gestão e visualização de bases de dados e "Data Mining" (Mineração de dados) (OGLIARI; PACHECO, 2011).

O conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas utilizadas para otimização de ensaios de planejamento fatorial é a metodologia de superfície de resposta (figura 5), a aplicação desse método vem crescendo exponencialmente e é utilizada em uma diversidade de áreas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Neste estudo, a primeira etapa consiste em identificar a função matemática que represente a

variação da resposta em função da variação dos fatores relevantes, onde a primeira função utilizada são polinômios de primeira ordem (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). No entanto, são os polinômios de segunda ordem que melhor descrevem modelos que maximizam ou minimizam respostas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). O objetivo principal da experiência é selecionar ou *filtrar* alguns dos efeitos principais importantes versus os menos importantes.

A adequação do modelo é avaliada pela análise de variância (ANOVA), onde a significância estatística da equação de regressão pode ser observada a partir dos valores de "F", e o valores da significância de cada variável pelo valor de "p" (SAMAD; ZAINOL, 2017). Além disso, a análise de ANOVA possibilita ajustar os valores do  $R^1$ : indica a proximidade dos dados obtidos para da linha de regressão, e os valores de  $R^2$ : leva em consideração o número de variáveis utilizadas (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Figura 5 - Representação do gráfico de superfície de resposta em perspectiva tridimensional e planar.



Fonte: Neri, (2016); Almeida, (2019).

Devido a complexidade dos processos metabólitos das espécies vegetais e o método extrativo utilizado para obter os compostos ativos faz com que sejam necessárias abordagens estatísticas a fim de obter resultados com o objetivo de melhorar uma técnica, produto ou processo (MABOOD et al., 2017). A otimização de um processo analítico para quantificação requer ajuste das variáveis implicadas no sistema, uma vez que vários fatores podem interferir como natureza da amostra, tamanho das partículas, proporção droga:solvente, agitação, temperatura, tempo

(TEÓFILO; FERREIRA, 2006; COSTA-MACHADO; BASTOS; DE FREITAS, 2013; HELENO et al., 2014).

Cada método apresenta suas próprias variáveis (MEDOUNI-ADRAR et al., 2015), porém independente da técnica escolhida o objetivo é analisar quais fatores são mais importantes na extração total dos compostos desejados e evitar que os mesmos sejam modificados quimicamente, buscando uma pontencialização da atividade biológica (CUJIC et al., 2016; WONG et al., 2015).

Estudos envolvendo planejamento fatorial com espécies vegetais medicinais estão sendo realizados com o intuito de obter extratos otimizados de grupos de metabólitos secundários específicos (WONG et al., 2015). Como a pesquisa realizada por Peli e colaboradores (2016), verificou a composição química dos extratos aquosos e etanólicos de *Verbena minutiflora* e em seguida otimizou-se um método extrativo para a obtenção de flavonoides, onde analisou-se a influência do volume de ácido, tempo de aquecimento, tipo de ácido e concentração de hexametilenotetramina; e para extratos com maior atividade antioxidante, as variáveis analisadas foram: pH, extração líquido, método e tempo de extração. Através dos resultados do planejamento constatou-se que o melhor método de extração para a capacidade antioxidante foi o que usou vórtex, por 35 min, com água: etanol 50:50, com pH=1, obtendo  $0,1899 \pm 5, 8.10^{-3}$  mmol. Para as dosagens de flavonoides totais as variáveis significantes foram: tipo de volume de ácido.

O estudo de Grosso e colaboradores (2014), que analisaram a influência da proporção de metanol, do tempo de extração e da temperatura utilizada na técnica extrativa e a proporção massa: solvente sobre os teores de compostos fenólicos nos extratos de partes aéreas de *Chelidonium majus*. Concluíram que o teor de metanol e a proporção massa: solvente foram os mais significativos na extração dos compostos analisados. Enquanto que a pesquisa desenvolvida por Xie e colaboradores (2015) avaliou a influência de três variáveis (temperatura, tipo de solvente e proporção droga-solvente) no rendimento de flavonoides das folhas de *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja e a capacidade antioxidante dos extratos obtidos.

Além das variáveis mencionadas acima, a idade da planta é outro fator que pode influenciar no teor de metabólitos, foi verificado por Upadhya, Pai e Hedge (2015) uma maior concentração de compostos fenólicos nas folhas de *Achyranthes aspera* com 120 dias de idade extraídos pelo método de micro-ondas por 5 minutos de extração, em relação ao método de Ultrassom, parte da planta (casca e raiz), idade

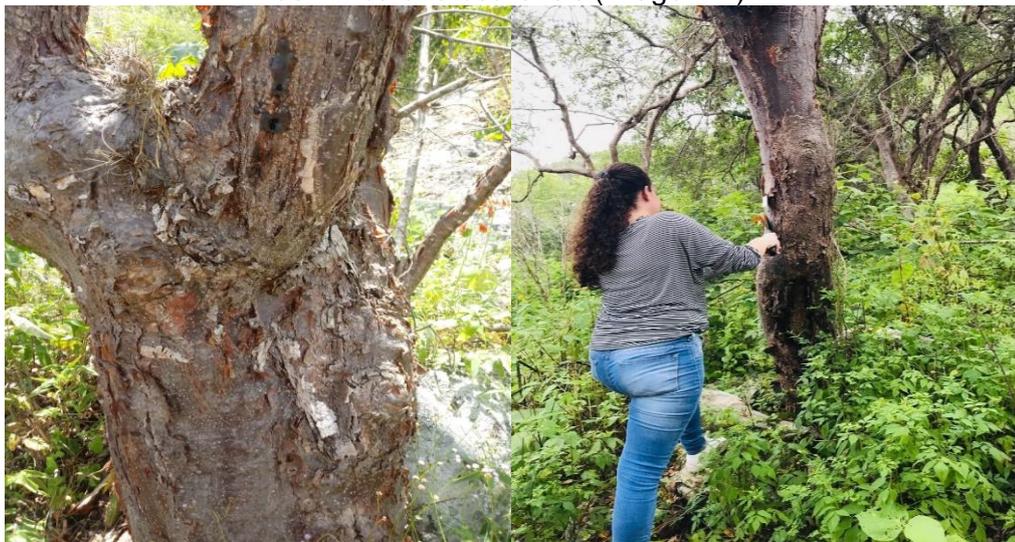
(60 dias) e tempo de obtenção do extrato (5, 15 e 30 minutos). Os resultados desses estudos mostraram que o planejamento fatorial é uma importante ferramenta para a otimização de extração de componentes químicos em produtos naturais.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

A coleta de *Amburana cearensis* (PEUFR 50486) foi realizada em uma área de Caatinga do Estado de Pernambuco, na comunidade do Carão (08°35'13,5"S e 36°05'34,6"W), localizada na zona rural de Altinho, município do agreste central Pernambucano, distante 163,1 km do Recife, com uma área de 454,486 km<sup>2</sup> e clima semi-árido quente (ARAÚJO et al., 2008). Este município tem como limites ao norte, Caruaru e São Caetano, ao sul Ibirajuba, Panelas e Cupira, a leste Agrestina e a oeste com Cachoeirinha (CONDEPE/FIDEM, 2017).

Figura 6 - Caule de um exemplar de *Amburana cearensis* (imagem A) e coleta das cascas de *Amburana cearensis* (imagem B).



Fonte: Autoria própria.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após a coleta, a amostra vegetal foi devidamente identificada, e todo material foi submetido ao processo de secagem, à temperatura ambiente, durante 12 dias. Em seguida, a casca de *A. cearensis* foi triturada em moinho vertical de facas tipo Wyllie (ADAMO 40) e padronizada em tamises (granulometria 20 Mesh). Posteriormente, foram pesados 15g da amostra pulverizada e adicionados 150 mL de etanol/água em uma relação 1:10 v/v, submetendo-a a um processo de maceração por 48h. Após

filtração, o líquido extrator foi renovado três vezes, totalizando 4 macerações, de mesmo tempo. Por fim, o extrato foi submetido à rotaevaporação sob pressão reduzida, à temperatura de  $40 \pm 5^\circ \text{C}$ , até total secura. Após secura total, o extrato foi utilizado no processo de validação do método espectrofotométrico (ARAÚJO et al., 2008).

### 3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As amostras de cascas foram submetidas a três diferentes métodos extrativos: maceração, ultrassom e microondas; utilizando como solvente solução hidroetanólica a 80% e na proporção 1:10 ( $\text{g/mL}^{-1}$ ). As amostras vegetais foram submetidas a três macerações, com renovação do solvente a cada 48h. Foi utilizado o ultrassom Unique® modelo UltraCleaner 1400A para obtenção dos extratos, com duração de 60 minutos e aquecimento fixo ( $60 \pm 5^\circ \text{C}$ ). Na extração assistida por microondas, a determinação da potência e do tempo de extração foi dependente da fórmula física que relaciona a quantidade de calor com potência ( $Q = m \times c \times \Delta T$ ) a fim de obter a temperatura de ebulição do solvente utilizado.

Os extratos foram obtidos utilizando um micro-ondas Panasonic Piccolo®, 60% da potência, durante 1 minuto para as cascas. Os extratos provenientes dos três métodos foram filtrados e submetidos à evaporação sob pressão reduzida, à temperatura de  $40 \pm 5^\circ \text{C}$ , até total secura.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CUMARINAS

O ensaio descrito por Osório e Martins (2004) com adaptações foi utilizado para quantificar o conteúdo de cumarinas. Foi transferido 0.5 mL do extrato diluído ( $10 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) para tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de água destilada e 500  $\mu\text{L}$  da solução de acetato de chumbo. Agitou-se a amostra e, em seguida, foram adicionados 7 mL de água destilada. Desta solução, 2 mL foram transferidos para novos tubos de ensaio e adicionados 8 mL da solução de ácido clorídrico.

As amostras permaneceram por 30 minutos, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medida a 320 nm contra um branco preparado com água destilada.

A curva de calibração (alíquotas de 10, 25, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi preparada com uma solução padrão de 1,2-benzopirona e todos os demais reagentes citados anteriormente para os extratos, aferindo-se o volume final para 10 mL com água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata e as concentrações finais de cumarina ficaram entre 0,4-20,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O teor de cumarinas totais foi expresso como miligramas equivalente de cumarina por grama de extrato (mg EC/g).

### 3.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE OSÓRIO E MARTINS (2004)

A validação foi realizada de acordo com a Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que dispõe o guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção. Esse procedimento tem como objetivo assegurar que o método é capaz de atender aos requisitos específicos para seu uso pretendido ao realizar análise qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa do metabólito secundário presente na espécie vegetal submetida ao estudo. O método espectrofotométrico submetido ao processo de validação deve atender às exigências analíticas, como: seletividade, faixa de trabalho, linearidade, precisão, exatidão e robustez, adequados à análise e que assegurem a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2017).

#### 3.5.1 Faixa de trabalho

Na faixa de trabalho, segundo a RDC 166/2017, o volume utilizado no método de quantificação submetido à validação (ponto 4.4 da metodologia) no centro e estabelecer dois valores abaixo e dois valores acima deste para iniciar o processo. Com base na resolução, a faixa de trabalho utilizada foi: 1,25mg/mL, 2,5 mg/mL, 5mg/mL, 7,5 mg/mL e 10 mg/mL.

#### 3.5.2 Efeito Matriz

Deve ser estabelecido através da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR (substância química de referência) do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito. Foram utilizados cinco volumes diferentes do extrato de casca de *A. cearensis*,

posteriormente as amostras foram contaminadas com 500 µL do padrão (conforme mostrado no quadro 5) e em seguida foi realizado o método de Osório e Martins (2004).

Quadro 1 - Volumes do extrato de *Amburana cearensis* e do padrão utilizado para analisar o efeito matriz.

Volumes do Extrato	Volume do Padrão 500µL
1,25 mg/mL	Resíduos Tender à zero.
2,50 mg/mL	
5 mg/mL	
7,5 mg/mL	
10 mg/mL	

Fonte: Autoria própria.

### 3.5.3 Linearidade

Para a análise desse parâmetro, foram utilizados cinco volumes diferentes do padrão de cumarinas (Quadro 1) em triplicata, conforme requerido pela RDC 166/2017. Para a obtenção da curva de calibração, da equação da reta e do coeficiente de correlação linear, posteriormente foi realizado o teste de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Quadro 2 - Volumes do padrão e valores do coeficiente de correlação e dos resíduos exigido pela RDC 166/2017.

Volumes do Padrão	Coeficiente de Correlação $R^2 > 0,99$
1,25 mg/mL	Resíduos Tender à zero.
2,5 mg/mL	
5 mg/mL	
7,5 mg/mL	
10 mg/mL	

Fonte: Autoria própria.

### 3.5.4 Seletividade

A seletividade mede a capacidade do método analítico de detectar ou quantificar o analito de interesse, de forma objetiva, acompanhado de componentes que podem aparecer na amostra. Para avaliar a especificidade do método de Osório e Martins (2004) foi realizada a varredura de uma solução do padrão e de uma solução de extrato de cascas de *Amburana cearensis* na região do ultravioleta cujo comprimento de onda varia de 200 – 400nm.

### 3.5.5 Precisão

Para determinar a precisão, a legislação recomenda no mínimo nove determinações, contemplando toda a faixa de calibração, ou seja, três volumes: baixo, médio e alta, com três réplicas em cada nível ou seis réplicas a 100% da concentração do teste individualmente preparadas como critério para repetibilidade.

Quadro 3 - Volumes do padrão utilizados para análise da precisão e valor do DPR exigido pela resolução vigente.

Volumes do Padrão	Desvio Padrão Relativo < 5%
1,25 mg/mL	
5 mg/mL	
10 mg/mL	

Fonte: Autoria própria.

### 3.5.5 Robustez

A robustez pode ser aferida modificando-se os parâmetros analíticos e comparando sua precisão obtida em cada determinação (RIBEIRO et al., 2008). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária indica na RDC nº 166/2017 uma lista de parâmetros que sejam relevantes para o resultado, de acordo com características do método a ser utilizado, como espectrofotometria, cromatografia líquida e cromatografia gasosa (BRASIL, 2017). No entanto, para avaliar a robustez do método de Osório e Martins (2004) foram avaliados a influência das seguintes condições (Quadro 4) tempo de leitura: 15, 30 e 45 minutos e diferentes marcas de acetato de chumbo: êxodo científica e química moderna.

Quadro 4 - Condições para avaliação da robustez do método de Osório de Martins (2004):

Espectrofotometria	Tempo de Leitura
	Diferentes fabricantes de Acetato de Chumbo

### 3.5.7 Exatidão

Para medir a exatidão do método de quantificação de cumarinas analisado no presente trabalho, foram utilizados três volumes do padrão: baixo, médio e um alto em triplicata, em seguida foi adicionado 500 $\mu$ L do extrato de casca de *Amburana cearensis*. Por fim, analisou-se o valor de recuperação das cumarinas e o desvio padrão relativo (< 5%), conforme solicitado pela resolução vigente.

Quadro 5 - Volumes do padrão utilizados para análise do parâmetro e valores da taxa de recuperação e DPR requisitado pela resolução.

Volumes do Padrão	% de recuperação 80 - 120%
1,25 mg/mL	Desvio Padrão Relativo < 5%
5 mg/mL	
10 mg/mL	

Fonte: Autoria própria.

## 3.6 EXPERIMENTO DE FATOR ÚNICO

As influências das variáveis tempo, teor alcoólico e proporção droga vegetal: solvente, utilizadas na extração de cumarinas, foram avaliadas através de experimentos de fator único, variando cada parâmetro por vez pelo método extrativo de ultrassom das cascas de *A. cearensis*. Todos os pontos observados nas variações foram utilizados com base na literatura para extração de compostos fenólicos de uma maneira geral ou de grupos específicos dos mesmos.

Para a variável tempo, foram utilizados diferentes tempos no ultrassom: 20, 40, 60, 90 e 120 minutos, mantendo os dois outros parâmetros com teor alcoólico de 80% (etanol: água) e proporção droga-solvente de 1:10 (g/mL<sup>-1</sup>). No teste seguinte, houve variação da proporção droga-solvente com proporções de 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 e 1:30

(g/mL), com tempo de 60 minutos e grau alcoólico de 80% (etanol/água). No último experimento, foi variado o fator teor alcoólico com valores de 50, 60, 70, 80, e 90% de etanol. Foram pesados 15 gramas de amostras em todos os experimentos.

### 3.7 PLANEJAMENTO FATORIAL

A partir dos experimentos de fator único foi possível verificar a influência dos três diferentes métodos extrativos sobre o teor de cumarinas, no entanto, dentre os três métodos, a extração por ultrassom, destacou-se. Para selecionar as melhores condições de extração de cumarinas em extratos de cascas de *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C.Smith foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para realizar um planejamento fatorial. Para isso, foi realizado um planejamento  $3^2$  (2 variáveis, em 3 níveis de variação) aumentado de 2 pontos centrais para avaliação do efeito do tempo de extração e teor alcoólico do solvente (variáveis independentes), bem como das suas interações sobre o rendimento extrativo das cumarinas (variável dependente).

O teste foi realizado de maneira randomizada e a Tabela 2 apresenta os valores utilizados em cada nível estudado, selecionados com base nos experimentos de fator único com as cascas de *Amburana cearensis*. O tratamento estatístico foi elaborado utilizando o software STATISTICA® e foram obtidos os efeitos padronizados (diagramas de Pareto) e as análises estatísticas (Superfície de Resposta) para avaliação dos resultados.

Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram filtrados e submetidos à evaporação sob pressão reduzida, à temperatura de  $40 \pm 5^\circ \text{C}$ , até total secura. Posteriormente, realizou-se a quantificação de cumarinas dos extratos submetidos ao estudo.

Tabela 2 - Níveis das variáveis do planejamento  $3^2$  para os extratos das cascas de *Amburana cearensis* por ultrassom.

Variável	-1 (Inferior)	0 (Ponto Central)	+1 (Superior)
Tempo (minutos)	20	40	60
EtOH/H <sub>2</sub> O (%)	80	90	99,5

Fonte: Aatoria própria.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises da validação foram feitas através do Microsoft Excel® (2010), usando o teste de regressão linear juntamente com o método dos mínimos quadrados. Em alguns parâmetros, foi necessário utilizar o teste de ANOVA seguido do teste de Tukey.

A distribuição dos resultados obtidos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Foram realizadas análises de variância ANOVA, um critério, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de  $p < 0,05$  para as análises de robustez e  $p < 0,01$  para o planejamento fatorial. O programa BioEstat 5.3 foi utilizado para realização das análises estatísticas, exceto para o planejamento fatorial, onde o tratamento estatístico foi elaborado pelo software Statistica®.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A validação teve como objetivo mostrar que o método é capaz de atender às necessidades pretendidas para realizar análise quantitativa das cumarinas presentes nos extratos das cascas de *A. cearensis*. Consiste em demonstrar que a metodologia analítica é estável, reprodutível e flexível, além de assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos ao final do experimento.

### 4.1 FAIXA DE TRABALHO

Tabela 3 - Concentrações de extrato de casca de *Amburana cearensis* utilizadas para a validação.

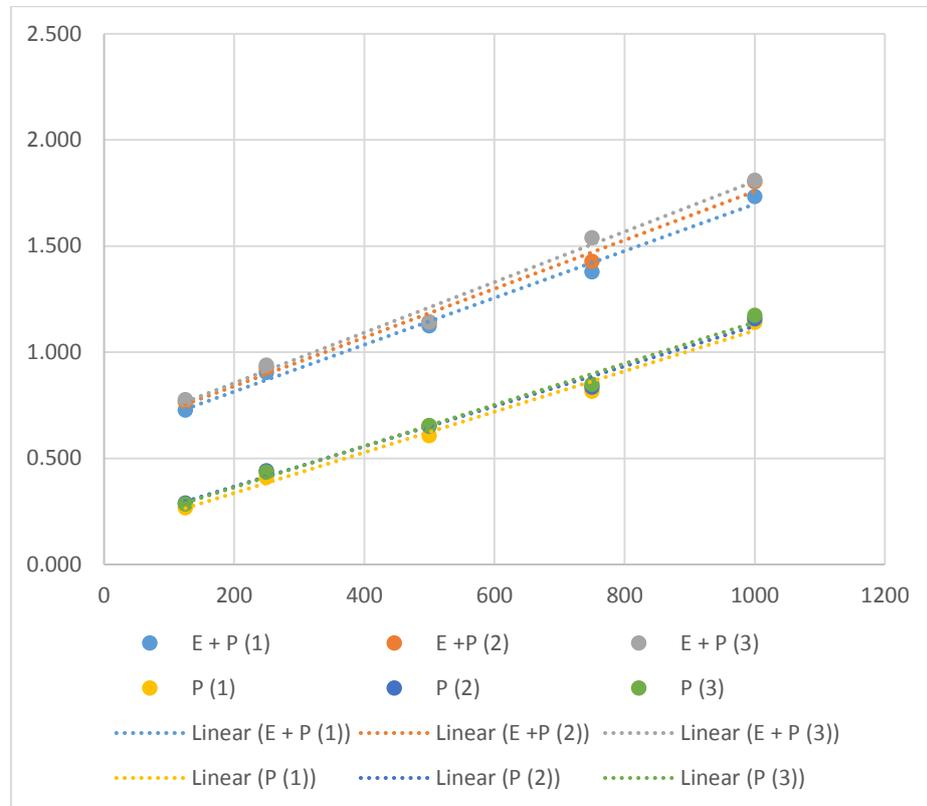
<b>Concentrações do Extrato</b>				
<b>1,25 mg/mL</b>	<b>2,5 mg/mL</b>	<b>5 mg/mL</b>	<b>7,50 mg/mL</b>	<b>10 mg/mL</b>

\*A concentração usualmente utilizada no método de Osório e Martins está centralizada, conforme a RDC 166/2017. Fonte: Autoria própria.

### 4.2 EFEITO MATRIZ E LINEARIDADE

Na figura 1, estão as curvas referentes ao efeito matriz e a linearidade, respectivamente. É possível observar que os valores do  $R^2$  estão em conformidade com a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017).

Gráfico 1 – Gráficos do Efeito matriz e Linearidade para os extratos de casca de *Amburana cearensis*.



E + P = Extrato de *A. cearensis* mais Padrão de cumarinas; P = Padrão de cumarinas. Fonte: Autoria própria.

O efeito matriz é determinado pela curva de calibração construída com a solução química de referência (SQR) em solvente e sua amostra fortificada (BRASIL, 2017). Na figura 1, é possível verificar que há um paralelismo entre curvas do analito em solvente e a amostra fortificada com o analito, mostrando que não houve interferência dos constituintes da matriz. Além disso, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para as três amostras foram  $< 0.99$ .

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) sugere o quanto a variação total é geral em relação aos elementos que integram os pares analisados. Observa-se a variação do  $r^2$  é de 0 – 1, logo, quanto mais perto de 1, maior será a regressão. Assim, os valores apontados nos quadros 1 e 2 estão próximos da reta de regressão, considerada pelo modelo de regressão linear, para o efeito matriz e para linearidade, respectivamente.

A curva de linearidade para as cascas de *A. cearensis* foi construída utilizando 5 concentrações diferentes do extrato hidroetanólico da espécie: 1,25 a 10 mg/mL. O teste foi realizado em triplicata conforme solicitado pela RDC 166/2017. A equação de

regressão linear obtida a partir do teste foram:  $y = 0.001x + 0.145$ , para P (1);  $y = 0.001x + 0.1669$ , para P (2) e  $y = 0.001x + 0.1685$  para P (3), conforme pode ser observado no quadro 1. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) das três equações foi  $< 0,99$ . Deste modo, pode-se considerar linear dentro da faixa de concentrações utilizadas, como preconizado pela RDC 166/2017.

Tabela 4 - Equações da reta dos gráficos Do Efeito Matriz:

<b>E + P (1)</b>	$y = 0.0011x + 0.5935$ $R^2 = 0.9923$
<b>E + P (2)</b>	$y = 0.0011x + 0.6106$ $R^2 = 0.9903$
<b>E + P (3)</b>	$y = 0.0012x + 0.6168$ $R^2 = 0.9911$

Tabela 5 - Equações da reta dos gráficos da Linearidade:

<b>P (1)</b>	$y = 0.001x + 0.145$ $R^2 = 0,9902$
<b>P (2)</b>	$y = 0.0009x + 0.1783$ $R^2 = 0,9903$
<b>P (3)</b>	$y = 0.001x + 0.1685$ $R^2 = 0,9916$

Os dados obtidos para linearidade no presente trabalho estão em conformidade com os encontrados para os extratos da casca da espécie *Libidibia ferrea*, pertencente à mesma família da *A. cearensis*, foram  $R^2 = 0,9952$  e equação da reta  $y = 0,0003x + 0,7742$  (SANTOS, 2016). Portanto, os procedimentos realizados para ambas espécies apresentaram adequação aos parâmetros de validação estabelecidos pela respectiva resolução vigente.

#### 4.2.1 Resíduos dos gráficos do Efeito Matriz e da Linearidade

Na regressão linear, é necessária a verificação de hipótese, visto que o teste é baseado nessas suposições. No caso, o modelo mais comum para verificar se houve violação de tais suposições é chamado de análises de resíduos. As figuras 2, 3 e 4 são referentes aos resíduos do efeito matriz, enquanto que nas figuras 5, 6 e 7 estão plotados os resíduos da linearidade.

Gráfico 2 - Plotagem de resíduos do gráfico 1 referente ao extrato de casca de *A. cearensis* + Padrão de cumarinas (1).

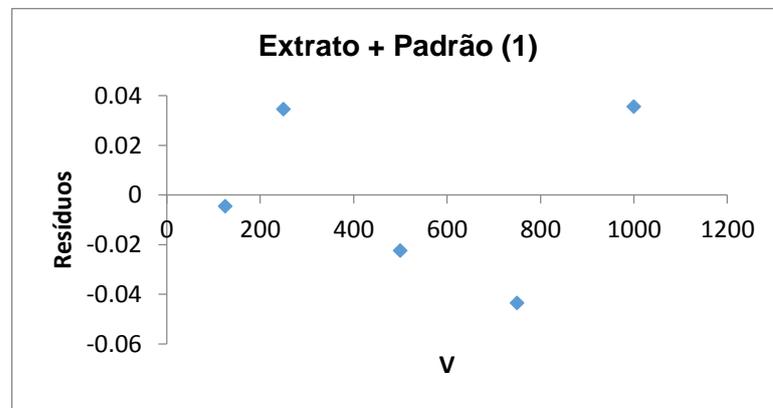


Gráfico 3 - Plotagem de resíduos do gráfico 1 referente ao extrato de *A. cearensis* + Padrão de cumarinas (2).

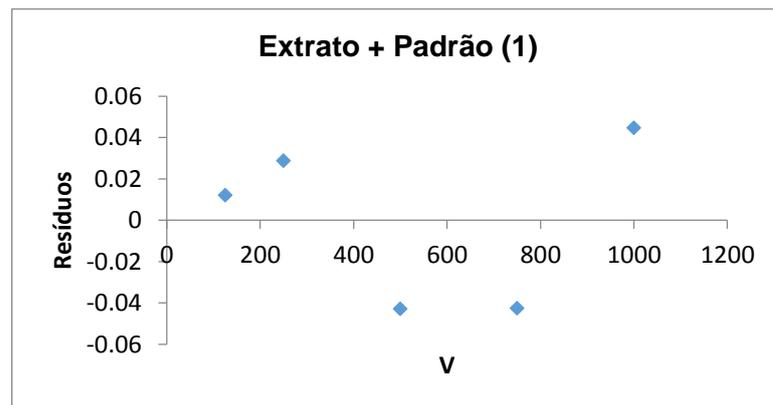


Gráfico 4 - Plotagem de resíduos do gráfico 1, referentes ao extrato de *A. cearensis* + Padrão de cumarinas (3).

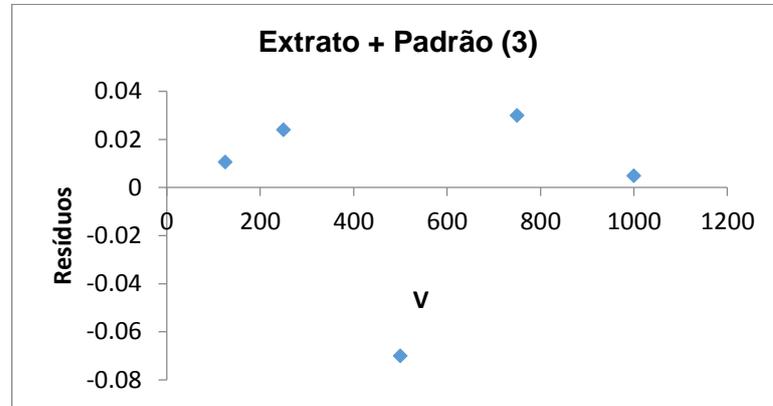


Gráfico 5 - Plotagem de resíduos do gráfico 1, referente a linearidade, Padrão - cumarinas (1).

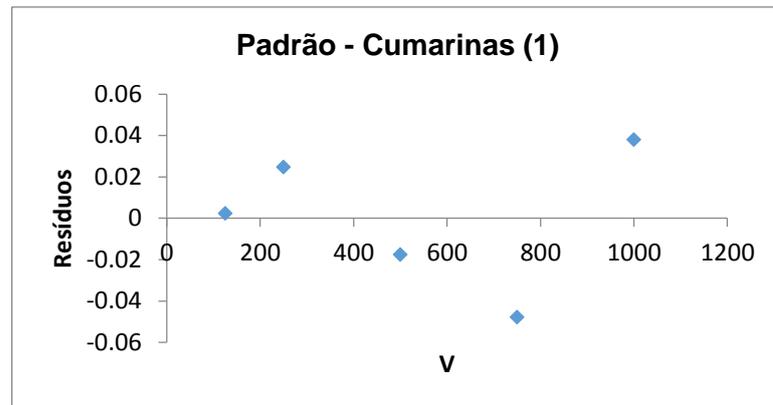


Gráfico 6 - Plotagem de resíduos do gráfico 1, referente a linearidade, Padrão de cumarinas (2).

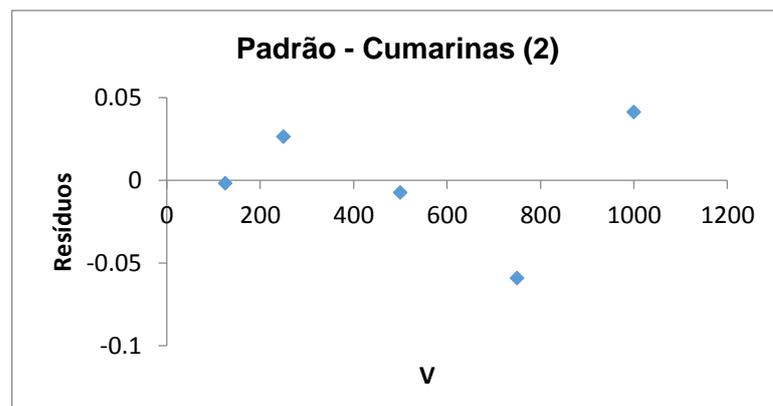
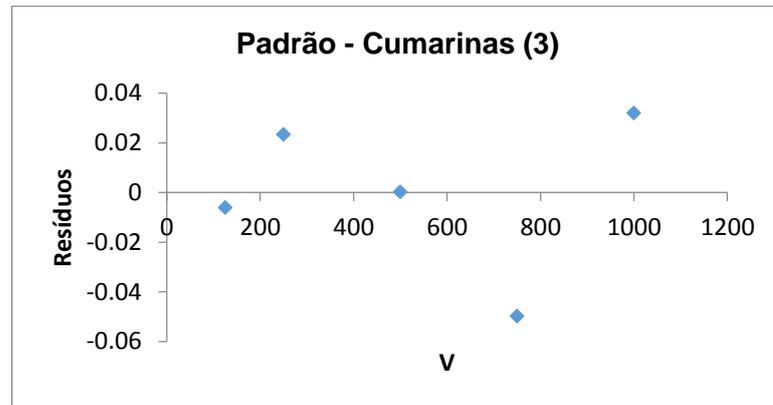


Gráfico 7 - Plotagem de resíduos do gráfico 1, referente a linearidade, Padrão de cumarinas (3).



Nos gráficos residuais de efeito matriz (E+P (1); E+P (2); E+P (3)), que foram obtidos por meio do teste de regressão linear do Excel, pode-se observar uma distribuição aleatória dos resíduos em volta da reta  $x=0$ , tendo uma dispersão constante, o que indica que não há violações sérias de homocedasticidade (variação constante dos erros), independente dos números de acidentes ser alto ou baixo, estão distribuídos entre -2 e 2, um comportamento esperado para distribuição de erros. O mesmo pode ser observado nos gráficos de resíduos de linearidade (P (1); P (2); P (3)). Os resíduos estão distribuídos ao longo das diferentes concentrações de extrato que foram utilizadas 0,125 a 1  $\mu\text{g/mL}$ .

O método utilizado no presente estudo mostrou-se homocedástico, assim como a metodologia utilizada por Silva (2019) para obtenção de forma farmacêutica sólida à base de *Syzygium cumini*, uma vez que os resíduos em ambos os trabalhos tendem a zero.

#### 4.3 SELETIVIDADE

Para a seletividade, a varredura foi realizada na região de absorção da radiação do ultravioleta (200 a 350 nm) (PASCHOA et al., 2003), no entanto, no presente trabalho a varredura foi realizada até 400nm. Como o padrão de cumarinas e o extrato de cascas de *Amburana cearensis* absorvem na região do ultravioleta do espectro

(UV- visível), como pode-se observar nos gráficos 8 e 9, o método de Osório e Martins pode ser considerado seletivo para cumarinas, conforme é solicitado pela RDC.

Gráfico 8 - Espectro de varredura de 200 a 400nm do padrão cumarinas.

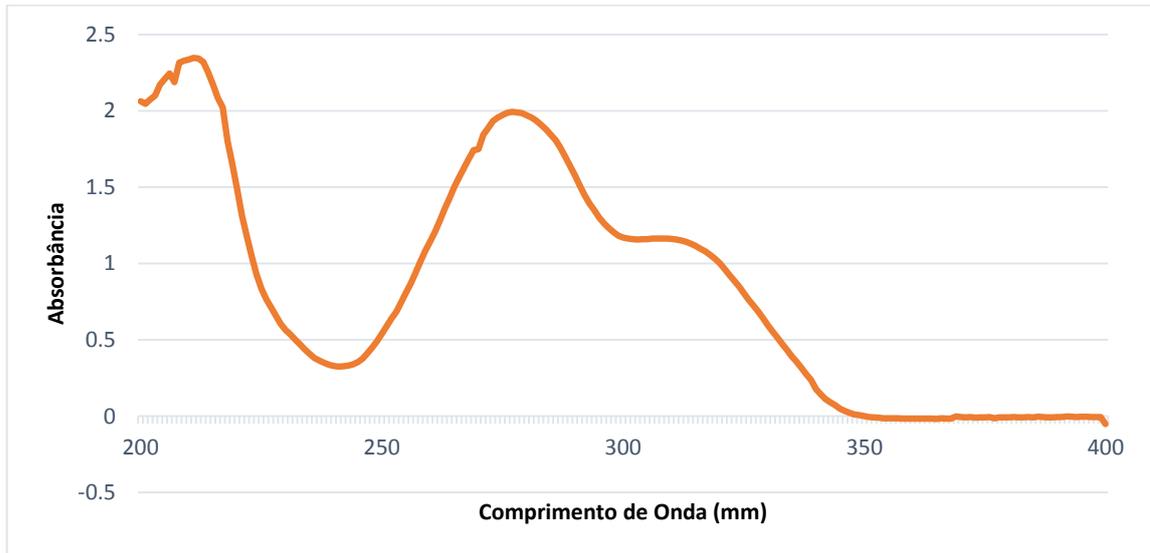
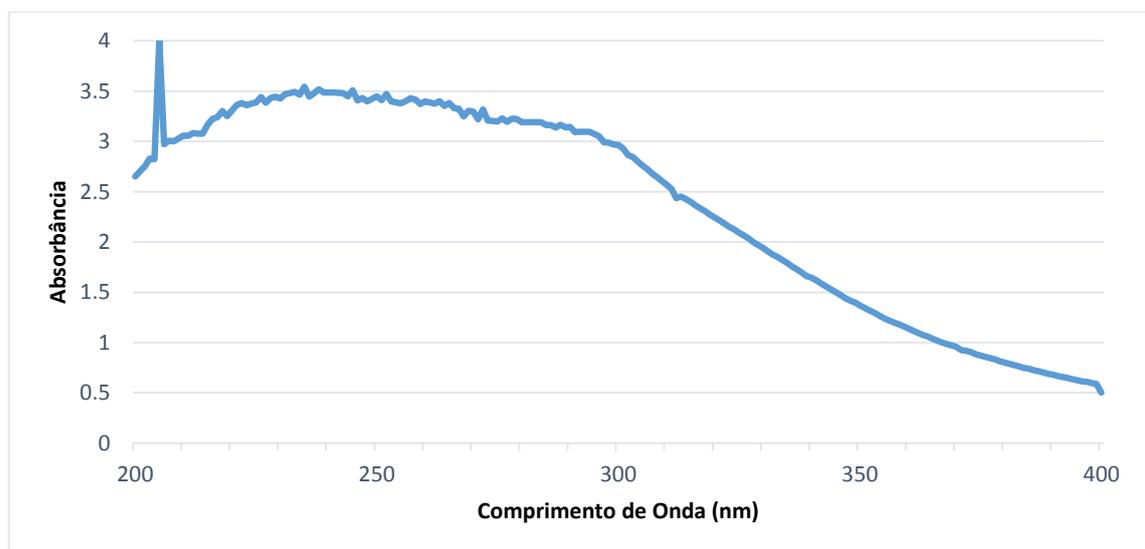


Gráfico 9 - Espectro de varredura de 200 a 400nm do extrato hidroalcoólico de casca de *Amburana cearensis*.



O padrão de cumarinas teve seus maiores picos de no comprimento de onda entre 258 à 320nm, nessa região a absorção manteve-se em torno de 1, porém o pico máximo foi em 278nm. O que corrobora com a varredura realizada por Rodrigues

(2005) na região do UV observou-se que o pico máximo de absorção das cumarinas foi de 274nm para a amostra alcoólica e de 278nm para a amostra aquosa.

Na pesquisa de Amaral et al., (2009), a solução do padrão de cumarinas teve maior absorção em 275,4nm, sendo esse comprimento de onda utilizado para determinar o teor de cumarinas em xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas.

Enquanto que o trabalho realizado por Silva e colaboradores (2008) demonstrou que o método espectrofotométrico é uma alternativa exata e precisa à CLAE para quantificação de cumarinas em xarope de *Milkania glomerata* Sprengel. O comprimento de onda adequado para o doseamento desse metabólito foi em 320nm. O metabólito secundário de interesse, mostrou absorção dentro dessa faixa comum até 320nm, esse comprimento foi utilizado no método de quantificação de cumarinas, pois, o mesmo é preconizado no método de Osório e Martins (2004).

De acordo com Bruneton (1991), as cumarinas possuem espectro ultravioleta característico, devido à natureza e disposição dos substituintes químicos, o que facilita a sua identificação e o desenvolvimento de técnicas analíticas espectrofotométricas para a sua quantificação.

#### 4.4 PRECISÃO POR REPETIBILIDADE

A tabela 6, mostra os resultados alcançados por meio de testes de precisão intracorrída (repetibilidade) onde analisou-se soluções de cumarinas nos extratos das cascas de *Amburana cearensis*, utilizando os volumes de 125  $\mu$ L, 500 $\mu$ L e 1000 $\mu$ L/ml, sob mesmas condições de operação, mesmo analista e mesmo instrumentação em uma única corrida analítica. Neste ensaio, os desvios padrões relativos (DPR%) foram inferiores a 5%. Assim, pode-se considerar o método espectrofotométrico preciso para quantificar cumarinas na espécie analisada.

Tabela 6 - Resultados da precisão por repetibilidade utilizando três volumes diferentes.

Volume	125µL	500µL	1000µL
1	0.727	1.123	1.733
2	0.766	1.141	1.802
3	0.776	1.141	1.810
Média	0.756	1.135	1.782
<b>Desvpad</b>	0.025891	0.010392	0.042336
<b>DPR (%)</b>	3.42	0.91	2.37

Desvpad = Desvio padrão. DPR% = Desvio padrão relativo. Fonte: Autoria própria.

Outra espécie da família Fabaceae apresentou resultados conformes para a precisão por repetibilidade no trabalho realizado por Peixoto Sobrinho e colaboradores em (2008), os valores da precisão também ficaram dentro do especificado pela legislação em vigor e comprovam os resultados obtidos são confiáveis.

#### 4.5 ROBUSTEZ

Para a robustez foram analisadas alterações nos parâmetros seguintes: diferentes marcas de acetato de chumbo e tempo de leitura. Todos os procedimentos do teste foram realizados utilizando os seguintes volumes de extrato. Nas tabelas 5 e 6 são apresentados os resultados da robustez obtidos através da análise dos parâmetros dos diferentes fabricantes de reagentes (Acetato de Chumbo) e tempo de leitura, respectivamente. É possível observar que os valores DPR foram menores que 5% o que mostra que o método é robusto nas condições apresentadas, conforme a legislação da RCD 166/2017 (BRASIL, 2017).

Tabela 7 - Análise com acetato de Chumbo de dois fabricantes diferentes.

<b>Interferente analisado: Marcas diferentes do Acetato de Chumbo</b>	<b>Teor de cumarina (mg EC/g)</b>
Marca 1 (Química Moderna)	11,16 ± 0,33 a (2,94%)
Marca 2 (Êxodo Científica)	10,26 ± 0,15 a (1,46%)

Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey),  $p < 0,05$ . Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 - Leitura em diferentes intervalos de tempo.

Interferente analisado: tempo de leitura	Teor de cumarina (mg EC/g)
15 min	11,22 ± 0,25 a (2,24%)
30 min	11,24 ± 0,06 a (0,49%)
45 min	11,51 ± 0,08 a (0,67%)

Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey),  $p < 0,05$ . Fonte: Autoria própria.

Na pesquisa realizada por Santos (2016), os dados de robustez para a espécie *Libidibia ferrea*, onde os parâmetros submetidos a análise foram fluxo e pH da fase móvel, encontram-se no mesmo patamar do estudo presente, com desvios padrões relativos baixos, indicando que os métodos aplicados são robustos e que estão abaixo dos limites estabelecidos  $< 5\%$ .

#### 4.6 EXATIDÃO

Tabela 9 - Valores de recuperação de cumarinas utilizando o método de Osório e Martins.

Volume	E+P (1)	E+P (2)	E+P (3)	Média	C calc	Exatidão	Desvpad	DPR%
125 $\mu$ L	0.780	0.766	0.776	0.774	146	116.58	0.005	0.76
500 $\mu$ L	1.281	1.275	1.200	1.252	563	112.54	0.036	2.94
1000 $\mu$ L	1.699	1.642	1.689	1.677	933	93.32	0.024	1.48

Desvpad = Desvio padrão. DPR% = Desvio padrão relativo. Fonte: Autoria própria.

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, onde foram adicionadas quantidades conhecidas da solução padrão as amostras. Os valores obtidos da recuperação foram calculados a partir da razão das concentrações médias do experimento sobre a concentrações teóricas estabelecidas experimentalmente. Na tabela (colocar número na tabela) estão os resultados do parâmetro da exatidão. Na

exatidão foram feitas 9 determinações, com os volumes de 125µL, 500µL e 1000µL (baixa, média e alta) e com três réplicas em cada nível. Os resultados mostram uma recuperação de 116.58%, 112.54% e 93.32%, respectivamente. Assim, é possível constatar que os métodos empregados na casca de *Amburana cearensis* são considerados exatos pois estão dentro dos limites de 80% a 120% indicados pela RCD 166/2017 (BRASIL, 2017).

Valores semelhantes foram encontrados por Peixoto Sobrinho (2008) para os extratos de *Bauhinia cheilantha*, espécie pertencente a subfamília Caesalpiniaceae, onde o valor de recuperação foi de aproximadamente 98,36% atestando a eficiência do procedimento escolhido conforme limites preconizados pelos compêndios oficiais.

#### 4.7 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS EXTRATIVOS PARA OBTENÇÃO DE CUMARINAS DAS CASCAS de *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C.Smith

Para quantificação de cumarinas nos extratos hidroalcoólicos de cascas de *A. cearensis* foram utilizados três métodos extrativos: maceração, ultrassom e micro-ondas. Os teores desse grupo de metabólitos secundários foram avaliados e os resultados obtidos nos doseamentos são apresentados na tabela 9. Os valores expressos são referentes a média das replicatas, acompanhados do desvio padrão em mg EC/g equivalentes de 1,2-benzopirona.

Tabela 10 - Teores (mg EC/g) de cumarinas, expressos em média  $\pm$  desvio padrão, dos extratos obtidos de cascas de *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C.Smith por diferentes métodos extrativos.

Métodos Extrativos	<i>Amburana cearensis</i>
	CUM (mg EC/g)
Maceração	39,99 $\pm$ 5,31 a
Micro-ondas	39,40 $\pm$ 0,62 a
Ultrassom	46,86 $\pm$ 2,93 b

CUM = cumarinas. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (um critério) seguido do teste de Tukey  $p < 0,01$ . Fonte: Autoria própria.

Ao observar a tabela é possível constatar que a maceração e o micro-ondas foram os métodos extrativos que obtiveram um menor teor de cumarinas quando comparados ao método de ultrassom. A extração assistida por ultrassom foi escolhida para o planejamento fatorial por possibilitar a extração de um maior teor de cumarinas cerca de 46,86 mg EC/g e por ser estatisticamente diferente dos demais métodos. A

maceração apesar de ser uma técnica tradicional e bastante utilizada, apresenta como desvantagens um período de tempo prolongado para a extração (MEREGALLI, 2007), uso excessivo de líquido extrator, além do risco de contaminação (MELECCHI, 2005; PIETRZAK; NOWAK; OLECH, 2013; DO et al., 2014).

Um estudo feito por Lourenço (2018) comparou a atividade antimicrobiana de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) obtidos por maceração e ultrassom, constatou que esse último método possibilitou uma extração mais eficaz de metabolitos secundários e uma maior ação perante o micro-organismo utilizado no estudo. A média dos halos de inibição do extrato alcoólico produzido pela técnica de ultrassom foi de 0,93cm frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, enquanto a média da maceração foi de apenas 0,7 cm.

A extração de cumarinas pelo método de micro-ondas apresentou um teor considerável cerca de  $39,40 \pm 0,62$  mg EC/g, porém, um pouco inferior ao do ultrassom. Para obter bons resultados com essa técnica extrativa é preciso levar em consideração alguns fatores como: potência do aparelho, natureza do solvente, tempo de extração, condição da amostra vegetal e a proporção entre o sólido e o líquido extrator (RIBEIRO, 2018).

Na extração assistida por micro-ondas, a energia eletromagnética é transformada em calor e aumenta a temperatura interna das células da matriz em decorrência do aquecimento e da evaporação da umidade presente, promovendo o aumento da pressão interna e rompimento de membranas (CHEN; ZU; YANG; 2015; BENDJERSI et al., 2016; LIEW et al., 2016). Porém, elevadas temperaturas e alta potência podem ocasionar perda na degradação de compostos voláteis (WANG; WELLER, 2006; CHEMAT; CRAVOTTO, 2013). Hashemi-Moghaddam e colaboradores (2013) avaliaram a utilização de potências de 300, 500, 700 e 900 W por um período de 10 e 20 minutos para extrair óleo essencial de *Eucalyptus microtheca*, constataram uma redução de monoterpenos do óleo nas potências de 700 e 900 W no tempo de 20 minutos.

Além disso, a obtenção de extratos por meio desse método requer uma aparelhagem específica, um consumo de energia considerável e um estudo referente aprofundado em relação ao comportamento dos solventes perante as ondas eletromagnéticas, como: constante dielétrica e fatores de dissipação (RIBEIRO, 2018).

A análise dos extratos obtidos por meio dos diferentes processos extrativos, indicou a presença de cumarinas, no entanto, a extração assistida por ultrassom apresentou um maior teor de cumarinas, possibilitando a obtenção de  $46,08 \pm 5,53$  mg EC/g. De acordo com a pesquisa realizada por Rajabi e colaboradores (2013), a sonicação pode aumentar consideravelmente a superfície de contato entre o solvente e a amostra aquosa, o que provoca aumento da transferência de metabólitos para o líquido extrator.

Essa técnica de extração era empregada em banho de limpeza, porém, devido as suas características particulares, começou a ser utilizada na esterilização de materiais, homogeneização de soluções, soldagem, emulsificação, desgaseificação, na obtenção de compostos presentes em espécies vegetais (FREITAS, 2007; LUZ, 1998; BARBOZA e SERRA, 1992) e na extração de óleo de sementes de uva (FREITAS, 2007). Alguns autores acreditam que o ultrassom pode inclusive ser um método alternativo de extração ao Soxhlet, uma vez que tem apresentado capacidade equivalente ou até superior a esse processo convencional (EICEMAN et al., 1980; BLANCO et al., 1992; ESCRIVÁ et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2016).

Ao que se refere à obtenção de extratos vegetais, o ultrassom possibilita a dilatação e hidratação do material da planta e provoca um alargamento dos poros da parede celular, melhorando a intumescência, a razão de transferência de massa ocasionando quebra da parede celular (OLIVEIRA et al., 2016). Provocando aumento da eficiência e/ou redução do tempo de extração, além do aumento na penetração do solvente (TOMA et al., 2001; JACQUES, 2005). Além disso, a extração assistida por ultrassom oferece uma gama de benefícios em relação ao rendimento, a produtividade e a seletividade, além de redução do uso de solventes químicos (CHEMART e KHAN, 2011).

Segundo Chua (2013), a temperatura é outro fator importante na extração assistida por ultrassom, pois, aumenta a difusividade, a solubilidade e a pressão de vapor (BOONKIRD; PHISALAPHONG; PHISALAPHONG, 2008). Além de diminuir a viscosidade do meio e a tensão superficial do líquido extrator, possibilitando uma extração mais eficiente dos metabólitos secundários com consequente aumento no rendimento do método (DAI; MUMPER, 2010; OLIVEIRA et al., 2016a).

O colapso das bolhas cavitacionais é outro parâmetro que pode influenciar em uma melhor extração dos compostos. Na pesquisa realizada por Boonkird, Phisalaphong e Phisalaphong (2008) constatou-se a influência dos efeitos da

cavitação na extração por ultrassom, sendo observado um melhor resultado e uma maior intensidade à 45 °C e não à 60 °C, nesse ponto a formação de cavidades reduziu para quase zero. Acredita-se que em temperaturas mais elevadas o aumento na pressão de vapor provoca redução na intensidade do colapso das bolhas, em virtude de uma menor diferença entre a pressão interna e externa, fazendo com que em temperaturas mais baixas o colapso das bolhas seja mais eficiente com consequente aumento da extração (HEMWIMOL; PAVASAN; SHOTIPRUK, 2006).

#### 4.8 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE CUMARINAS DAS CASCAS DE *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C. Smith.

As cumarinas foram escolhidas por serem o principal constituinte fitoquímico da espécie *Amburana cearensis* A.C. Smith, estando presentes na casca do caule (PEREIRA, 2010). A esse grupo de metabólitos foi atribuído as principais atividades farmacológicas da Imburana-de-cheiro, de acordo com testes realizados com a substância pura (CANUTO & SILVEIRA, 2006).

O processo de otimização da extração de cumarinas das cascas de *A. cearensis* foi realizado em duas etapas com finalidades distintas. A primeira etapa consistiu em um experimento de fator único a fim de avaliar a influência única das variáveis testadas na extração, além de definir os três níveis a serem utilizados na segunda etapa (planejamento fatorial 3<sup>n</sup>). Esta última com o intuito de avaliar a influência quando da variação de mais de uma variável, definindo o ponto de melhor extração deste metabólito secundário.

##### 4.8.1 Experimento de Fator Único

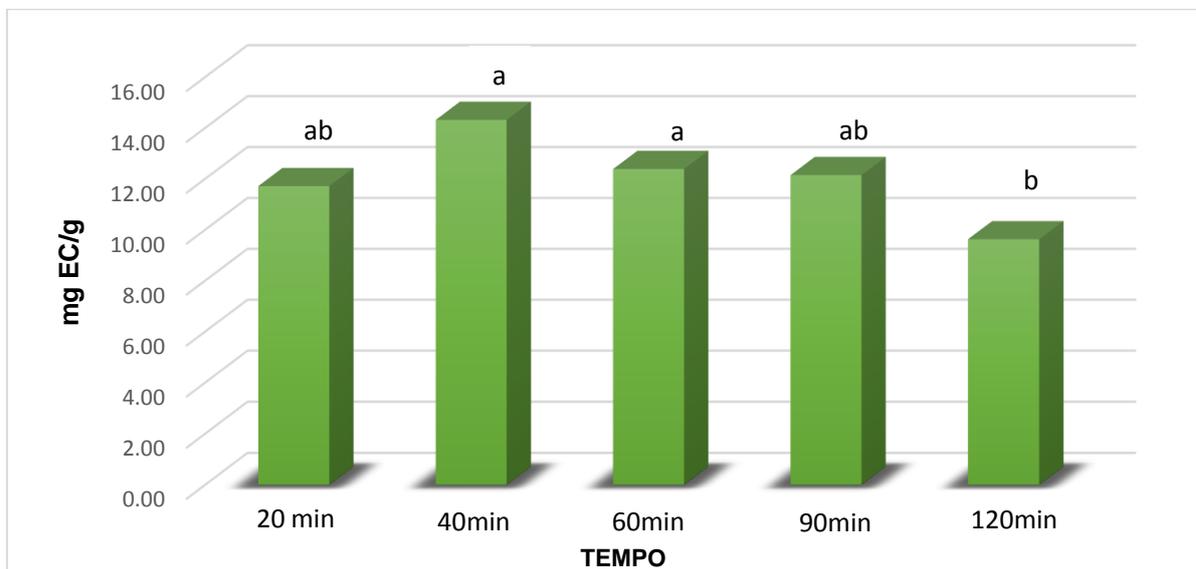
O método extrativo por ultrassom foi escolhido para ser feito o planejamento fatorial, pois, destacou-se entre os demais, além disso apresenta como vantagem em relação a maceração o baixo consumo de solvente e uma reprodução mais rápida dos ensaios (CHEMAT et al., 2011). A influência do tempo na extração das cumarinas das cascas de *A. cearensis* está representada no gráfico 10, sendo os valores de flavonoides expressos por mg EC/g com suas respectivas médias  $\pm$  desvio padrão.

Os tempos de extração foram escolhidos baseados em dados encontrados na literatura, sendo utilizados: 20, 40, 60, 90 e 120 minutos (MUNIZ-MARQUÊS; et al.,

2013; SAHIN, SALIN, 2013). Enquanto as outras variáveis permaneceram constantes (proporção droga-solvente 1:10 g/mL e teor alcoólico 80% etanol-água).

Conforme pode ser observado no gráfico 10, com 40 minutos de extração houve um maior teor de cumarinas com valor de  $14,32 \pm 2,81$  mg EC/g de extrato. A sonicação em 60 minutos também apresentou um teor satisfatório, quando comparado aos demais, com valor de  $12,39 \pm 1,60$  mg EC/g de extrato. Com isso, o tempo de extração de 40 minutos foi escolhido como ponto central para o planejamento fatorial e o de 60 minutos como tempo máximo.

Gráfico 10 - Influência dos diferentes tempos (minutos) na extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis*.



Letras iguais indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey),  $p < 0,01$ .  
Fonte: Autoria própria.

Em teoria, maiores tempos de extração apresentam melhores rendimentos (CHUA, 2013), no entanto, a obtenção de extratos é um processo físico baseado na solubilidade dos metabólitos secundários (WANG et al., 2016), estando diretamente relacionado com a taxa de difusão e pressão osmótica nos solventes (CHUA, 2013). O tempo ideal encontrado no presente trabalho (40 minutos) corrobora com a pesquisa de Neri (2016), onde o tempo de 45 minutos por decocção mostrou eficiência na extração de cumarinas tanto para as cascas como para as folhas de *Maytenus rigida* (MART).

A extração assistida por ultrassom tem recebido destaque por melhorar a eficiência na extração de compostos bioativos, pois, possibilita obter elevadas taxas

de metabólitos em menores tempos (SHIRSATH, SONAWANE, GOGATE, 2012; KHAN et al., 2010). A formação de cavidades geradas pelo ultrassom produz diversos efeitos na matéria-prima vegetal, além de promover a agitação do solvente no sistema e gerar turbulência, auxiliando no aumento da transferência de massa (JADHAV et al., 2010). Para Paniwnyketal (2001), a alta eficiência da extração assistida por ultrassom deve-se as ondas ultrassônicas geradas nesse processo extrativo.

De acordo com Corbin e colaboradores (2015), as cavitações acústicas produzidas durante o método de ultrassom colaboram para a penetração do líquido extrator nas paredes celulares da matriz vegetal, permitindo que o conteúdo intracelular seja liberado de forma eficiente e a agitação do solvente aumentará a área de contato entre o solvente e os compostos alvos, possibilitando uma maior penetração do solvente na matriz da amostra.

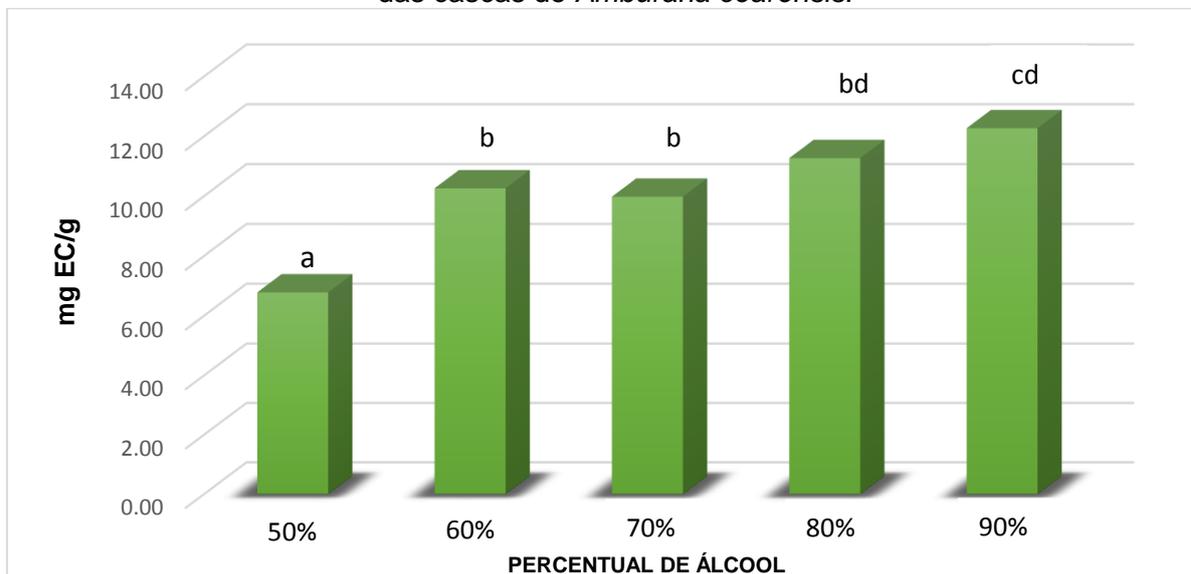
Outro fator que pode influenciar na obtenção de cumarinas é o solvente, sendo o teor alcoólico um ponto de grande importância, pois, influencia diretamente no rendimento final da extração. Modificações no percentual de etanol podem afetar na extração de compostos menos ou mais polares (MUÑIZ-MÁRQUEZ et al., 2013). O gráfico 11, mostra a diferentes percentuais de álcool e os respectivos teores de cumarinas obtidos da casca de *Amburana cearensis*.

Como pode ser observado no gráfico 11, a extração de cumarinas foi maior quando a proporção álcool: água foi de 90%, obtendo um teor de 12,27 mg EC/g de extrato e sendo estatisticamente diferente dos demais percentuais alcoólicos avaliados, por isso, foi escolhido como ponto central do planejamento. Diferentemente da influência do tempo de extração, com esta variável houve um aumento crescente do teor do metabólito desejado à medida que aumentava o teor alcoólico, sendo observado um menor teor no percentual de 50%, com valor absoluto de 6,78 mg EC/g.

De acordo estudos encontrados na literatura, misturas de água em solventes orgânicos são mais efetivas na extração dos compostos, visto que além de aumentar a polaridade do sistema por ser o solvente mais polar, favorecem o intumescimento das células vegetais e a entrada do solvente orgânico na matriz vegetal com consequente aumento de eficiência do processo extrativo (BOONKIRD; PHISALAPHONG; PHISALAPHONG, 2008; CHUA, 2013; MUÑIZ-MÁRQUEZ et al., 2013). Porém, os maiores teores de cumarinas foram encontrados nas concentrações que apresentavam um menor percentual de água, como nos teores de 80% e 90%.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com a pesquisa feita por Silva e auxiliares (2008), onde os maiores teores de cumarinas foram encontrados em solventes de média polaridade, como hexano, acetato de etila, etanol e acetona, justificando o fato desse metabólito está mais presente nos extratos com um maior percentual de álcool. Outros estudos sugerem não apenas estes líquidos extratores, mas outros como diclorometano e butanol para extração de cumarinas, indicando que a polaridade ótima do solvente para a obtenção desses metabólitos é intermediária (CELEGHINI, YARIAKE, LANÇAS, 2007; LANÇAS et al., 1997).

Gráfico 11 - Influência dos diferentes percentuais hidroetanólicos na extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis*.



Letras iguais indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey),  $p < 0,01$ .  
Fonte: Autoria própria.

Na pesquisa realizada por Neri (2016) o planejamento fatorial  $2^3$  realizado para obtenção de compostos fenólicos e cumarinas da espécie *Maytenus rigida* (MART), o teor alcoólico foi um parâmetro relevante para a extração das cumarinas, sendo o percentual de 92,8% o que possibilitou melhores valores desse metabólito pelo método extrativo de decocção.

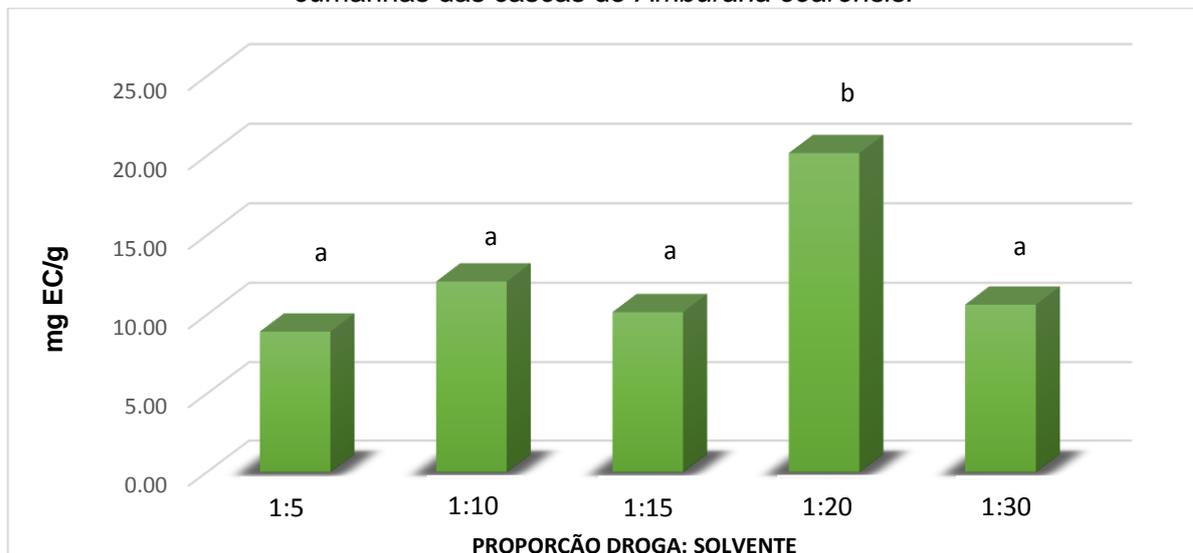
No presente estudo avaliou-se também a interferência da razão droga: solvente na extração de compostos bioativos, pois, por ser um processo físico, quantidades maiores do líquido extrator tende a aumentar o contato entre os compostos e o solvente, levando a uma extração mais efetiva (WANG et al., 2016). Com isso, a última

variável testada, quanto sua influência sob a extração de cumarinas nas cascas de *A. cearensis*, foi a proporção droga-solvente (Gráfico 12).

Ao analisar o gráfico 12 é possível inferir que a proporção 1:20 (g/mL) foi a que obteve o melhor valor absoluto na extração de cumarinas das cascas de *A. cearensis* com  $20,16 \pm 1,81$  mg EC/g. apresentando diferença estatisticamente significativa das demais proporções. Nessas proporções não ocorreu alterações na taxa de difusidade, pode ter ocorrido uma saturação do solvente, principalmente, na primeira razão, onde houve um rendimento de extração bem abaixo das demais.

Esses dados corroboram com o estudo realizado por Wang e colaboradores (2016) no qual foi possível observar que os extratos metanólicos de diferentes espécies obtiveram maiores teores de metabólitos na razão de 1:20. Em duas das espécies submetidas ao estudo, a elevação ou diminuição da razão, provocou um decréscimo dos teores, mostrando a influência da proporção no aumento da extração dos compostos. Enquanto em uma das espécies, as três primeiras proporções não apresentaram aumento significativo dos teores com posterior decréscimo do conteúdo quando aumentada a razão, demonstrando a não influência desta variável no aumento dos teores.

Gráfico 12 - Influência das diferentes proporções droga – solvente (g/mL) na extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis*.



Letras iguais indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey),  $p < 0,01$ . Fonte: Autoria própria.

No estudo conduzido por Predescu e colaboradores (2016) foi avaliada a interferência da proporção droga-solvente para obtenção de compostos fenólicos dos

frutos de três espécies (*Rosa canina*, *Hippophae rhamnoides* e *Crataegus monogyna*) obtidos por maceração, ultrassom e soxhlet, sendo observado elevação dos teores quando houve aumento da quantidade de solvente de 1:5 para 1:10 (g/mL) porém, neste estudo só foram utilizadas duas proporções a fim de demonstrar a influência desse parâmetro.

No presente estudo é possível observar que os teores aumentaram e decaíram entre as proporções utilizadas, porém, na razão 1:20 houve uma maior extração de cumarinas provavelmente devido ao aumento da quantidade de solvente, pois, a chance de moléculas alvo entrarem em contato com o solvente também aumenta, além disso a cavitação gerada pelo ultrassom auxilia o processo de extrato. A mesma foi mantida no planejamento fatorial, utilizando o valor fixo de 1:20 (g/mL) para a etapa seguinte, ficando com duas variáveis independentes (teor alcoólico e tempo de extração) e com três níveis (-1; 0; +1), caracterizando assim um desenho experimental  $3^2$ .

#### 4.8.2 Planejamento Fatorial $3^2$

Por meio dos resultados obtidos no planejamento de fator único, realizou-se uma análise dos efeitos das duas variáveis independentes: tempo de extração e teor hidroalcoólico sobre a extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis*, obtendo desse modo um planejamento  $3^2$  com o ponto central realizado em triplicata e 11 ensaios e os respectivos teores do composto secundário desejado.

A matriz do desenho experimental; contendo ensaios, as variáveis independentes, seus níveis e os teores de cumarinas obtidos; está representada na Tabela 10. Conforme pode ser visto na tabela 10, os níveis selecionados para o teor alcoólico de etanol foram 80; 90 e 99,8%, enquanto que para variável tempo foram utilizados os pontos 20, 40 e 60 minutos de extração no ultrassom, sendo mantida fixa a proporção droga-solvente em 1:20 (g/mL), uma vez que este parâmetro apresentou influência na extração do metabólito desejado nos experimentos preliminares.

Tabela 11 - Matriz do desenho experimental 3<sup>2</sup> para determinação das condições ótimas na extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis* A.C.Smith, sendo os teores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Ensaio	Níveis (Codificados)		Níveis (Valores)		Variável Resposta
	Teor EtOH (%)	Tempo (Minutos)	Teor EtOH (%)	Tempo (Minutos)	Cumarinas (mg EC/g)
1	-1	-1	80%	20	7,71 $\pm$ 3,71a
2	-1	0	80%	40	6,17 $\pm$ 1,24a
3	-1	+1	80%	20	7,27 $\pm$ 1,25 a
4	0	-1	90%	20	11,05 $\pm$ 2,15 b
5*	0	0	90%	40	9,15 $\pm$ 2,77 b
6	0	+1	90%	60	9,84 $\pm$ 2,77 b
7	+1	-1	99,8%	20	17 $\pm$ 2,06 c
8	+1	0	99,8%	40	17,99 $\pm$ 1,38 c
9	+1	+1	99,8%	60	16 $\pm$ 0,76 c
10*	0	0	90%	40	10,43 $\pm$ 0,40 b
11*	0	0	90%	40	11,22 $\pm$ 3,94 b

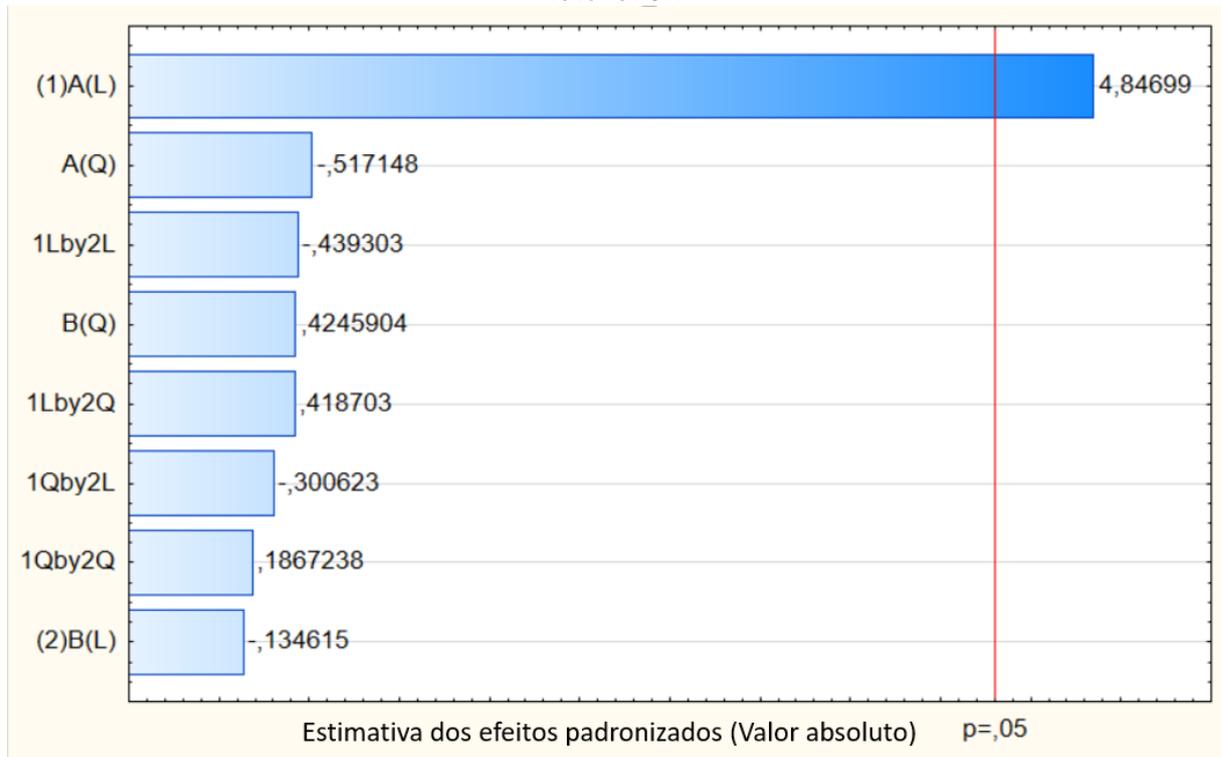
EtOH = Etanol, \* = ponto central em triplicata. Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey),  $p < 0.01$ . Fonte: Autoria própria.

Ao observar a tabela 10, é possível constatar que o teor alcoólico de 99,8% de etanol e o tempo de 40 minutos no ultrassom (ensaio 8) foram as variáveis que possibilitaram uma melhor extração de cumarinas das cascas de *A. cearensis*, apresentando um teor de 17,99  $\pm$  1,38 mg EC/g. Os resultados obtidos foram analisados também através do Diagrama de Pareto e do Gráfico de Superfície de Resposta tridimensional e planar, apresentados na Figura 7, Figura 8 e Figura 9, respectivamente, com a finalidade de avaliar mais adequadamente a influência das variáveis, individualmente e as suas interações, na extração das cumarinas.

Ao analisar o diagrama é possível inferir que o fator tempo promove um efeito negativo na extração das cumarinas dos extratos das cascas de *Amburana cearensis*, de modo que a elevação ao quadrado do tempo contribuiu para uma menor extração do metabólito, como é possível observar através do diagrama de Pareto, em que é

possível notar que tanto as interações lineares como as quadráticas do tempo não aumentaram o teor de cumarinas, pois, não ultrapassaram a linha vermelha.

Gráfico 13 - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados, na extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C.Smith, derivado de um planejamento fatorial  $3^2$ .



A = Teor alcoólico, B = Tempo, L = Interação linear; Q = Interação quadrática. \* A linha vermelha vertical indica o ponto que os efeitos estimados foram estatisticamente significativos ( $p = 0,05$ ). Fonte: Autoria própria.

O Diagrama de Pareto (Figura 7) indica que nas condições estudadas, o aumento do teor alcoólico e suas interações lineares e quadráticas, exerceram uma influência positiva na extração das cumarinas, sendo o teor alcoólico a variável mais significativa estatisticamente, ou seja, a que mais contribuiu na extração do metabólito. Isto pode ser comprovado, a partir da observação da linha vermelha vertical presente no diagrama, onde está o valor mínimo para que uma variável seja considerada estatisticamente significativa no processo de planejamento (MARQUES, 2011), além de evidenciar o efeito mais relevante, seja positiva ou negativamente e sendo diretamente proporcional, ou seja, quanto maior a barra à direita da linha, maior é a sensibilidade do método ao fator analisado e/ou suas respectivas interações (SAMAD; ZAINOL, 2017).

Além disso, em determinados tempos de extração houve uma queda no teor de cumarinas nos extratos, levantando a hipótese de que poderia estar ocorrendo degradação desses compostos em decorrência da sonicação. Esse fato corrobora com os resultados encontrados no trabalho realizado por Rodrigues (2005), onde uma elevação no tempo de extração por ultrassom observou-se uma degradação das cumarinas ao longo do experimento. A equação que correlaciona o teor de cumarinas com as variáveis independentes avaliadas está representada abaixo (Equação 2).

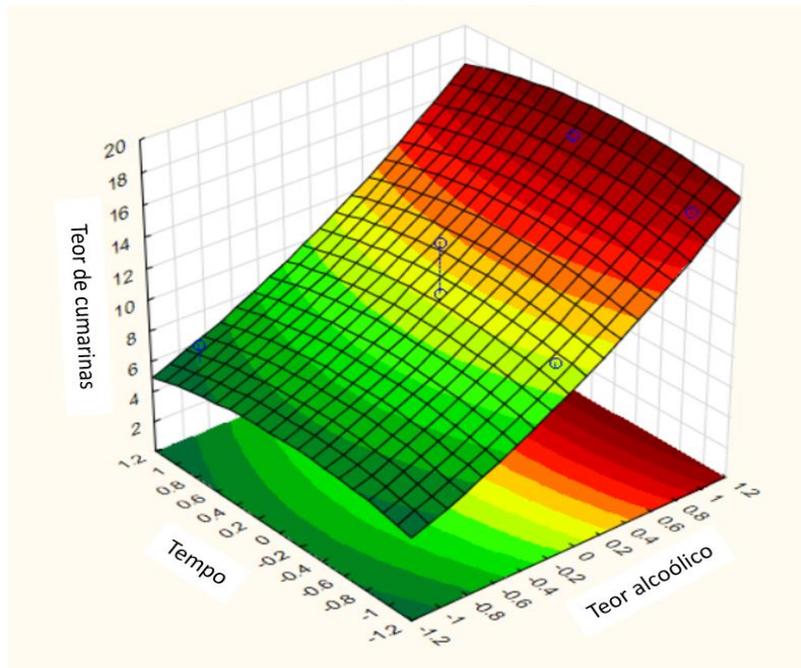
Equação 1: Equação de correlação entre as variáveis independentes e a extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis* A.C. Smith, derivado de um planejamento fatorial 3<sup>2</sup>.

$$TC = 11,467 + 5,27x + 0,82 x^2 - 0,14y - 0,82y^2 + 0$$

Onde: TC= Teor de cumarinas; X = Teor alcoólico e Y = Tempo.

Corroborando com os resultados obtidos pelo Diagrama de Pareto, os gráficos de superfície de resposta (Figuras 8 e 9) possibilitaram um melhor dimensionamento da influência das variáveis no processo extrativo das cumarinas, visto que neste tipo de metodologia, é possível ter uma visão sobre os efeitos linear e/ou quadrático do modelo e das interações das variáveis estudadas (FAROOQ et al., 2017).

Gráfico 14 - Gráfico de superfície de resposta tridimensional da extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis* A.C. Smith, derivado de um planejamento fatorial  $3^2$ .

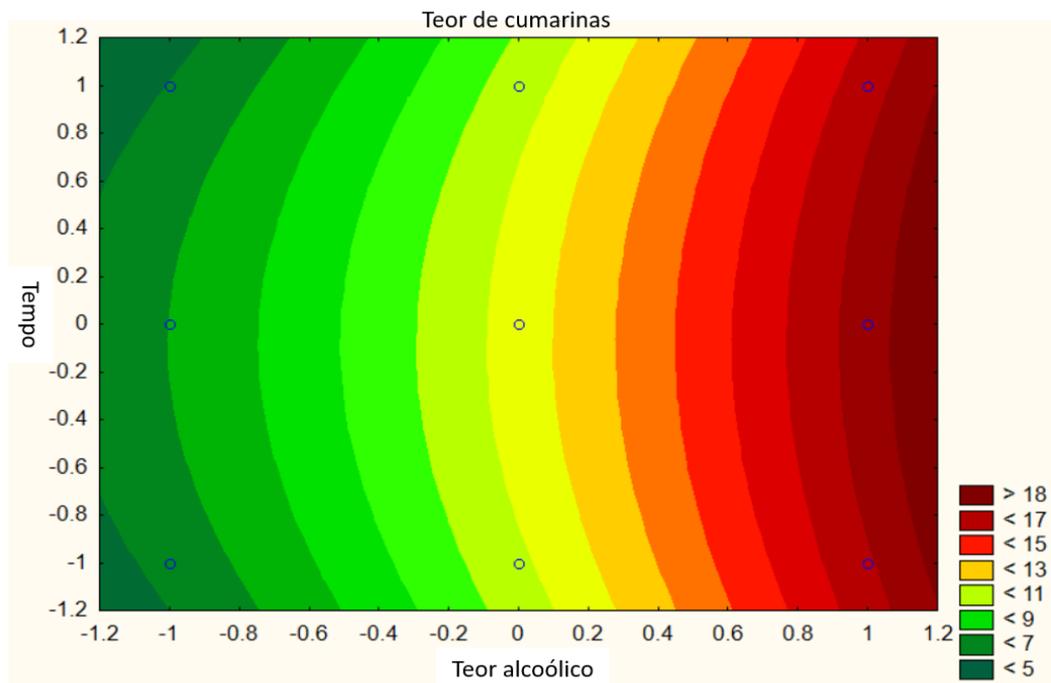


Fonte: Autoria própria.

Além disso, a técnica de superfícies de resposta foi utilizada para analisar a influência das interações entre dois parâmetros de modo a identificar a máxima e mínima resposta sobre o teor de cumarinas. A figura 8 mostra que à medida em que se aumenta o teor alcoólico, maior é o teor de cumarinas obtido, e o que o inverso ocorre com a variável tempo. As áreas de máxima resposta da superfície estão representadas em vermelho, enquanto as verdes estão associadas aos níveis de parâmetros que apresentaram os menores valores para a variável considerada (SILVA, 2014).

Portanto, ao observar o gráfico 9, é possível comprovar o efeito positivo da variável teor alcoólico na extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis*. Enquanto os menores teores do metabólito foram encontrados à medida que o teor alcoólico foi sendo reduzido e o tempo de extração foi aumentado

Gráfico 15 - Gráfico de Superfície Resposta planar da extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis* A.C. Smith, derivado de um planejamento fatorial  $3^2$ .



Fonte: Autoria própria.

Uma explicação para a alta sensibilidade das cumarinas ao teor alcoólico é que concentrações maiores de etanol provocam uma queda na constante dielétrica do líquido extrator, favorecendo a uma elevação da solubilidade de metabólitos de média polaridade (MEDEIROS; KANIS, 2010). Desta forma, o percentual de etanol favoreceu maiores níveis desse composto secundário nos extratos devido, principalmente, ao caráter apolar das cumarinas (KUSTER; ROCHA, 2004).

Os dados obtidos no presente estudo corroboram com os resultados encontrados por Chernichiarro (2012), onde altos teores de cumarinas foram detectados nos extratos de acetona, acetato de etila e etanólico, que apresentou um percentual em torno de 30,3% na extração por soxhlet, comprovando, portanto, que esse metabólito apresenta polaridade intermediária.

Os resultados para a avaliação da significância (F) do modelo experimental encontram-se na Tabela 8, ao analisar os dados é possível verificar que a variável teor álcool alcoólico, principalmente a sua interação linear (Teor EtOH (%) (L)), mostrou exercer uma grande influência na obtenção de cumarinas, apresentando valor maior que a interação quadrática na soma dos quadrados (SS) e no teste de

significância (F), além de apresentar um  $p < 0,05$ . Tais dados comprovam os resultados obtidos no diagrama de Pareto (figura 7), uma vez que os valores mostrados no diagrama são oriundos da raiz quadrada dos valores de F (ANOVA), apresentando nas barras do diagrama a influência das variáveis e suas interações (SAMAD; ZAINOL, 2017).

Tabela 12 - Análise de variância para o modelo quadrático de superfície de resposta, na extração de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C.Smith, derivado de um planejamento fatorial  $3^2$ .

Fator/Interação	SS	GL	MS	F	p
(1) Teor EtOH (%) (L)	166,4852	1	166,4852	23,49332	0,040027
(1) Teor EtOH (%) (Q)	1,8952	1	1,8952	0,26744	0,656563
(2) Tempo (minutos) (L)	0,1284	1	0,1284	0,01812	0,905241
(2) Tempo (minutos) (Q)	1,2575	1	1,2575	0,18028	0,712449
1L x 2L	1,3676	1	1,3676	0,19299	0,703349
1L x 2Q	1,2423	1	1,2423	0,17531	0,716313
1Q x 2L	0,6404	1	0,6404	0,09037	0,792074
1Q x 2Q	0,2471	1	0,2471	0,03487	0,869102
Erro	14,1370	2	7,0865	-	-
Total SS	186,1913	10	-	-	-

L = Interação linear; Q = Interação quadrática; EtOH = Etanol; SS = Soma dos Quadrados; GL = Grau de Liberdade; MS = Média dos Quadrados;  $p < 0,05$  = significativo conforme ANOVA. Fonte: Autoria própria.

Os valores de  $R^2$  dos coeficientes de regressão  $R^2$  e R ajustado são fatores que comprovam a adequação do modelo experimental, desde que estejam próximos a 1, indicando que o desenho experimental é conveniente, devido ao alto grau de correlação entre os valores observados e previstos (MEDOUNI-ADRAR et al., 2015; NAYAK et al., 2015; RHAZI et al., 2015; NALAWADE; GAJJAR, 2016). De acordo com Karazhiyan, Razavi & Phillips (2011) um alto valor de  $R^2$  nem sempre indica que o modelo de regressão é totalmente sólido, para esses autores, um valor maior que 80% é considerável satisfatório para um desenho de planejamento fatorial.

No presente estudo, o valor de  $R^2$  para as cumarinas foi igual a 0,9613 enquanto que o R ajustado foi igual a 0,9241; tais coeficientes apresentaram valores

próximos, comprovando que o planejamento  $3^2$  mostrou-se adequado. Segundo Dahmoune e colaboradores (2015) em um bom modelo estatístico os valores desses coeficientes de regressão devem ser próximos, desse modo indicam que o modelo experimental é confiável e reproduzível.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na validação do método de Osório e Martins para o doseamento de cumarinas em extratos de casca de *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C. Smith mostraram que o procedimento analítico atende as exigências estabelecidas pela RDC 166/2017. Deste modo, garantem os requisitos mínimos de qualidade e estabilidade para que possam ser utilizadas em estudos posteriores. Esta avaliação é imprescindível, uma vez que contribui para a autenticidade da espécie estudada e permite delinear os posteriores estudos farmacológicos.

No presente trabalho foi estabelecido um procedimento aprimorado e otimizado para a obtenção de cumarinas das cascas de *Amburana cearensis* (Fr. Allemão) A.C. Smith. A partir dos resultados do delineamento experimental, a condição mais favorável para extrair cumarinas da espécie objeto de estudo pelo método de ultrassom foi um teor alcoólico de 99,8%, um tempo de 40 minutos e uma proporção droga - solvente de 1:20g/mL.

Para os extratos obtidos das cascas a influência do teor alcoólico e sua interação quadrática foram estatisticamente significativas e mais relevantes para a extração do metabolito desejado. Os resultados encontrados demonstram que o uso de planejamento fatorial na realização de experimentos fitoquímicos apresenta-se como um instrumento eficaz para a otimização da extração de cumarinas.

Os bons resultados obtidos na validação e planejamento fatorial dos extratos desse exemplar do Caatinga brasileira, evidencia que as cumarinas são os marcadores químicos para essa planta. Mostrando são essenciais para a validação de plantas medicinais, para o uso medicinal popular e para o controle de qualidade dos fitoterápicos, o que permite um controle farmacognóstico da espécie *A. cearensis*.

## REFERÊNCIAS

- ABADI, M. D. M.; ASHRAF, N.; CHAMSAZ, M.; SHEMIRANI, F. An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV–Vis spectrophotometry. **Talanta**, v. 99, p. 1-12, 2012.
- ALBUQUERQUE, B.R.; PRIETO, M.A.; BARREIRO, M.F.; RODRIGUES, A.; CURRAN, T.P.; BARROSA, L.; FERREIRA, I.C.F.R. Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 404-415, 2016.
- ALBUQUERQUE, U.P. 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.
- ANDRADE, Bruno de Almeida. **Otimização do método extrativo e desenvolvimento de nova formulação fotoprotetora a base de *Erythrina velutina* Willd.** 2019. 220f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.
- ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 464-471, 2007.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; LOESCHER, C.M. Qualitative and quantitative high performance thin layer chromatography analysis of *Calendula officinalis* using high resolution plate imaging and artificial neural network data modelling. **Analytica Chimica Acta**, v. 789, p. 103-108, 2013.
- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p.114-140, 2007.
- ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A.; BELLUCO, A. E. S. Aspectos da composição química e aceitação sensorial da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de diferentes madeiras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.2, p.226-232, 2010.
- ALVES, M.S.M.; MENDES, P.C.; VIEIRA, J.G.P.; OZELA, E.F.; BARBOSA, W.L.R.; SILVA JÚNIOR, J.O.C. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 215-221, 2010.
- AMARAL, M.P.H. et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2B, p.607-611, 2009.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.

ANTONY, J. **Design of experiments for engineers and scientists**. Oxford: Butterworth-Heinemann. p. 152, 2003.

ARAÚJO, E. L.; CASTRO, C. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Dynamics of Brazilian caatinga—A review concerning the plants, environment and people. **Functional Ecosystems and communities**, v. 1, n. 1, p. 15-28, 2007.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v.117, p. 426-436, 2013.

BAJEROVÁ, P.; ADAM, M.; BAJER, T.; VENTURA, K. Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 835-844, 2014.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultrassom (I): Influência do Ultrassom na Química. **Química Nova**, v.15, p.302-316, 1992.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, L.S.-; BURNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. 2 Ed. Campinas, São Paulo. Editora\_ UNICAMP, 1996.

BATISTA, A. N. L.; COLOMBO, R.; PASCOLI, I. C.; TELES, H. L; SILVA, G. H.; BOMFIM, G. C. C.; BURGOS, R. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; REIMBERG, M. C. H. Development and validation of a HPLC 121 method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 402-406, 2011.

BATTISTI, C.; GARLET, T.M.B.; ESSI, L.; HORBACH, R.K.; ANDRADE, A.; BADKE, A.A. Plantas medicinais utilizadas no Município de Palmeiras das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.11, n.3, p.338-348, jul-set, 2013.

BELLO, C. M.; MONTANHA, J. A.; SCHENKEL, E. P. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, pp. 75-83, jul/nov. 2002.

BENDJERSI, F. *et al.* Phytochemical composition of the Algerian *Laurus nobilis* L. leaves extracts obtained by solvent-free microwave extraction and Investigation of their antioxidant activity. **Journal of Essential Oil Research**, v.28, n.3, p. 202-210, 2016.

BERBEL, Danilo Brancalhão. **A comunicação das ciências nas campanhas de saúde online: um estudo de caso do Portal da Saúde**. São Paulo. 300f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Tecnologia e Sociedade). – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2012.

BERG, J. M. T. e LUBERT, J. **Bioquímica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.545.

BERNARDI, L. Contribución a la dendrologia Paraguaya: primera parte: Apocynaceae, Bombacaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae, Mimosoideae, Caesalpinioideae, Papilionatae. **Boissiera**, v. 35, p. 273-276, 1984.

BESSA, N.G.F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n.4, supl. I, p.692-707, Botucatu, 2013.

BILGIN, H.M. et al. Protective effects of coumarin and coumarin derivatives against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 4, p. 325-330. 2011.

BLANCO, C. G.; PRADO, J. G.; GUILLEN, M. D.; BORREGO, A. G. Preliminary results of extraction experiments in an oil shale. **Organic Geochemistry**, v.18, p.313, 1992.

BOONKIRD, S.; PHISALAPHONG, C.; PHISALAPHONG, M. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab- and pilot-plant scale. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 1075-1079, 2008.

BORGES, F; ROLEIRA, F.; MILHAZES, N.; SANTANA, L.; URIARTE, E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 887-916, 2005.

BRAGA, F.C de. Pesquisa Fitoquímica. In: Leite, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009, p.328.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 3 ed. Fortaleza: ESAM, 1976, p.510.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Dispõe o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução-RE nº 899, 29 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos**. Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

BRUM, S. S.; et al. Esterificação de ácidos graxos utilizando zircônia sulfatada e compósitos carvão ativado/zircônia sulfatada como catalisadores. **Química Nova**, v. 34, n.9, p. 1511-1516, 2011.

BRUNEAU, A.; MERCURE, M.; LEWIS, G.P. & HERENDEEN, P.S. Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes. **Botany**, v. 86, p.697-718, 2008.

Bruneton J 1991. **Elementos de fitoquímica y farmacognosia**. Zaragoza: Acribia.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. 2.ed. Paris: Technique e Documentation Lavoisier, 1995. Bibliografia: p. 229-240.

BURKART, A. Las Leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas. **Acme Agency**, p.569, 1952, Buenos Aires.

BRASIL. RE nº 14 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. DOU de 05/04/2010.

BUSTAMANTE, J. et al. Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 137, p. 598-605, 2016.

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, n.2, p.179-189, 2000.

CAMPOS, V. C. A.; LIMA-BRITO, A.; GUTIERREZ, I. E. M.; SANTANA, J. R. F.; SOUZA, A. V. V. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.4, p.639-644, 2013.

CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Química nova**, v. 29, n.6, p.1241-1243, 2006.

CARDOSO, C.R.P.; BAUAB, T.M.; VARANDA, E.A. Controle de Qualidade e Avaliação da Atividade Farmacológica do Extrato de *Byrsonima Intermedia* e da Amentoflavona. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 3, p. 35-42, 2015.

CARDOSO, D.; QUEIROZ, L.P.; PENNINGTON, R.T.; Lima, H.C.; FONTY, E.; WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M. 2012. Revisiting the phylogeny of papilionoid legumes: new insights from comprehensively sampled early-branching lineages. **American Journal of Botany**, v. 99, n.12, p 1–23, 2012.

CARDOSO, F. L. et al. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 35-40, 2010.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos estratégias e validação**. São Carlos. Editora Edufscar, 2009.

- CATÃO, C. G.; PAES, J. B.; GOMES, J. P.; ARAÚJO, G. T. Qualidade da madeira de cinco espécies florestais para o envelhecimento da cachaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.15, n.7, p.741–47, 2011.
- CELEGHINI, R.M.S.; YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M. Otimização das condições de extração hidroalcoólica das furanocumarinas de *Dorstenia brasilienses* Lam. por maceração com ultrassom e análise quantitativa por CLAE/UV e fluorescência. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.2, p.61-66, 2007.
- CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G. Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice. New York: Springer, 2013.
- CHEMAT, F.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 2011.
- CHEMAT, F., TOMAO, V., & VIROT, M., 2008. In: Otles, S. (Ed.), Handbook of Food Analysis Instruments. Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis. CRC Press, pp. 85–94.
- CHEN, F.; ZU, Y.; YANG, L. A novel approach for isolation of essential oil from fresh leaves of *Magnolia sieboldii* using microwave assisted simultaneous distillation and extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 154, p. 271-280, 2015.
- CHUA, L.S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 805-817, 2013.
- CHLOPICKA, J.; DOBROWOLSKA-IWANEK, J.; WOZNIAKIEWICZ, M.; ZAGRODZKI, P. Optimization of Conditions for Organic Acid Extraction from Edible Plant Material as Applied to Radish Sprouts. **Food Analytical Methods**, v. 1, p. 1-5, 2013.
- CHOZE, Rafael. **Técnicas de separação e identificação empregadas na análise de produtos naturais de plantas**. 2004. 40f. Monografia (Trabalho de conclusão no curso de química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- CZELUSNIAK, K.E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.
- CORBIN, C.; FIDEL, T.; LECLERC, E. A; BARAKZOY, E.; SAGOT, N.; FALGUIÉRES, A.; RENOARD, S.; BLONDEAU, J. P.; FERROUD, C.; DOUSSOT, J.; LAINÉ, E.; HANO, C. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. **Ultrason Sonochem**, v. 26, p. 176-185, 2015.
- CÔRREA, Allan Jonathan Chernichiarro. **Análise comparativa de atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos brutos e frações do rizoma de *Alpinia zerumbet* (PERS.) B.L. BURT & R.M.S.M com três cumarinas sintéticas**. 2012. 131f. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

COSTA, Anne Caroline de Oliveira. **Caracterização e quantificação de marcadores químicos do extrato hidroetanólico das folhas de *Kalanchoe Brasiliensis cambes***. 2012, 122f. Dissertação (Mestrado). Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal- RN, 2012.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. Bibliografia: p. 591-592.

COSTA, A.F., **Farmacognosia**, 3ª ed., Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2000.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. Bibliografia: p. 591-592.

COSTA-MACHADO, A.R.M.; BASTOS, J.K.; DE FREITAS, L.A.P. Dynamic maceration of *Copaifera langsdorffii* leaves: a technological study using fractional factorial design. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 79-85, 2013.

CRAVOTTOA, G.; BOFFAA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P., AVOGADRO, M.; CINTASC, P., 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, n.5, p. 898–902, 2008.

CUJIC, N.; ŠAVIKIN, K.; JANKOVIC, T.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D.; ZDUNIC, G.; IBRIC, S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food Chemistry**, v. 194, p. 135-142, 2016.

CUNICO, M.M.; AUER, C.G.; CUNICO, M.W.M.; MIGUEL, O.G.; PERALTA-ZAMORA, P.A.; SANQUETTA, C.R. Avaliação do real potencial inibidor de extratos etanólicos de *Ottonia martiana* sobre *Cylindrocladium spathulatum* e *Botrytis cinerea*. **Floresta**, v. 43, n. 2, p. 225-230, 2013.

DAHMOUNE, F.; NAYAK, B.; MOUSSI, K.; REMINI, H.; MADANI, K. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 166, p. 585-595, 2015.

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

DIOUF, P.N.; STEVANOVIC, T.; BOUTIN, Y. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 297-303, 2009.

DO, Q.D.; ANGKAWIJAYA, A.E.; TRAN-NGUYEN, P.L.; HUYNH, L.H.; SOETAREDJO, F.E.; ISMADJI, S.; JU, Y. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of food and drug analysis**, v. 22, p. 296-302, 2014.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista española de Quimioterapia*, v. 16, n. 4, p. 385-393, 2003.

DONG, Z.; GU, F.; XU, F.; WANG, Q. Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. **Food Chemistry**, v. 149, p. 54-61, 2014.

DOYLE J.J., DOYLE J.L.; BALLENGER J.A.; DICKSON E.E; KAJITA, T.; OHASHI, H. 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcl* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, v.84, p. 541–554, 1997.

DOYLE, J. J., CHAPPILL, J. A., BAILEY, C. D. & KAJITA. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcl* sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P. S. & BRUNEAU, A. (Eds.). *Advances in legume systematics, Part 9*. Kew: **Royal Botanic Gardens**, p. 151–163, 2000.

DUCKE A. 1935. *Archivos do Instituto de Biologia Vegetal Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 1: 205.

DULTRA, T.R.; MASSAD, M.D.; SARMENTO, M.F.Q.; MATOS, P.S.; OLIVEIRA, J.C. Crescimento de mudas de umburana (*Amburana cearensis*) em resposta a adubação com nitrogênio e fosforo. **Agropecuária científica no Semi-árido**, v.11, n.4, p.42-52, 2015.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EICEMAN, G. A.; VIAU, A. C.; KARASEK, F. W. Ultrasonic extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and other organic compounds from fly ash from municipal incinerators. **Analitic Chemistry**, v.52, p.1492, 1980.

ENGLER, H.G.A. & PRANTL, K.A.E. 1894. **Natürlichen Pflanzenfamilien**, v.3, n.3, p.387, 1984.

ENGLER, H.G.A. & PRANTL, K.A.E. **Natürlichen Pflanzenfamilien**, v.3, n.3, p.199, 1897.

ESCRIVÁ, C.; VIANA, E.; MOLTÓ, J. C.; PICÓ, Y.; MANES, J. Comparison of four methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates. **Journal of Chromatography A**, v.676, p.375, 1994.

FALLARERO, A.; OINONEN, P.; GUPTA, S.; BLOM, P.; GALKIN, A.; MOHAN, C. G., VUORELA, P. M. Inhibition of acetylcholinesterase by coumarins: The case of coumarin 106. **Pharmacological Research**, v. 58, n. 3-4, p. 215-221, 2008.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO,

J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 10, p. 229-245.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, **Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Parte I – Métodos Gerais**. IV Edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1996.

FAROOQ, S.; SAEED, A.; SHARIF, M.; HUSSAIN, J.; MABOOD, F.; IFTEKHAR, M. Process optimization studies of crystal violet dye adsorption on novel, mixed metal Ni<sub>0.5</sub>Co<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ferrosinél nanoparticles using factorial design. **Journal of Water Process Engineering**, v. 16, p. 132-141, 2017.

FERREIRA, S.L.C.; DOS SANTOS, W.N.L.; BEZERRA, M.A.; LEMOS, V.A.; BOSQUE-SENDRA, J.M. Use of factorial design and Doehlert matrix for multivariate optimization of an on-line preconcentration system for lead determination by flame atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 443-449, 2003.

FERNANDES, G.A.; DOS SANTOS, M.A.; DOS SANTOS, N.L.; LOPES, T.J. Use of experimental design techniques in the obtainment of charcoal from pine nut (*Araucaria angustifolia*) for the adsorption of methylene blue dye. **Science & Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 105-111, 2016.

FILLY, A.; FERNANDEZ, X.; MINUTI, M.; VISINONI, F.; CRAVOTTO, G.; CHEMAT F. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale. **Food Chemistry**, v. 150, p. 193-198, 2014.

FIRMO, W.C.A. et al. Contexto histórico, uso popular, e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos Pesquisa**, São Luís, v. 18, n. especial, p. 90-95, 2011.

FÔNSECA, S.G.C. A extração. In: FÔNSECA, S.G.C. **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. Departamento de Farmácia – UFC, 2005. p. 9-24.

FREITAS, Lisiane dos Santos. **Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos**. 2007. 205 f. Tese de Doutorado (Programa de pós-graduação em química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.627-641, outubro/dezembro, 2008.

GEYIKCI, F. Factorial design analysis for adsorption of Indigo Carmine onto Montmorillonite-Evaluation of the kinetics and equilibrium data. **Progress in Organic Coatings**, v. 98, p. 28-34, 2016.

GOLMAKANI, M. T. et al. Enrichment of citral isomers in diferente microwave assisted extraction of essential oil from fresh and dried lemon verbena (*Aloysia citriodora*) leaves. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2017.

GOMES, G.S.; SILVA, G.S.; CONCEIÇÃO, G.M. Diversidade de leguminosas no Cerrado do Município de São João do Sóter, Maranhão, Brasil. **Agrarian Academy**, v. 4, n.7, p. 167, 2017.

GRAMS, W.F.M.P. **Plantas medicinais de uso popular em cinco distritos da ilha de Santa Catarina** – Florianópolis, SC [dissertação]. Curitiba (PR): Setor de Ciências Biológicas da UFPR, 1999.

GROSSO, C. et al. Box-Behnken factorial design to obtain a phenolic-rich extract from the aerial parts of *Chelidonium majus* L. **Talanta**, v. 130, n. 1, p. 128-136, 2014.

GROVER, J.; JACHAK, S. M. Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. **RSC Advances**, v. 5, n. 49, p. 38892-38905, 2015.

HARBONE, J.B. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). *Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products*. London: Imperial College, p.1-25, 1999.

HARTMANN, L.S.; RODRIGUES, R.S. Morfologia de plântulas de *Martiodendron excelsum* e sua relevância sistemática em Dialiinae (Leguminosae, “Caesalpinioideae”). **Rodriguesia**, v.65, n. 3, p.577-586, 2014.

HASHEMI-MOGHADDAM, H. et al. Microwave accelerated distillation of essential oils from the leaves of *Eucalyptus microtheca*: optimization and comparison with conventional hydrodistillation. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 5423-5427, 2013.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; REIS COSTA, C.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2559-2569, 2017.

HELENO, F.F.; DE QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A.; DE OLIVEIRA, A.F. Otimização, validação e aplicação de método para determinação da concentração residual de difenoconazol em morangos após múltiplas aplicações. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 153-157, 2014.

HELDMAIER, M.; BEYER, KOSCHITZKE, J.; STAHL-BISKUP, E. Oil extracts of herbal drugs--optimisation of the extraction parameters. **Pharmazie**, v.64, n.6, p.403-6, Junho, 2009.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J.A.; IBANEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 67-83, 2013.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**, Bristol, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

HEMWIMOL, S.; PAVASAN, P.; SHOTIPRUK, A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 543–548, 2006.

HUIE, C.V. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 23-30, 2002.

IRELAND, H.E. PENNINGTON, R.T. & PRESTON, J. 2000. Molecular systematics of the tribe Swartzieae. *In* P. S. Herendeen & A. Bruneau (eds.), *Advances in Legume Systematics*, n.9, p. 217–231. Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.

IVANOVSKA, N.; et al. Effect of some Hydroxycoumarins on Complement-Mediated Hemolysis in Human Serum. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 16, n.8, p. 557-562, 1994.

JACQUES, Rosângela Assis. **Caracterização química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. 2005. 139 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2005.

JACOBSON, T. K. B. et al. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 3, p. 163-169, 2005.

JADHAV, D.; REKHA, B. N.; GOGATE, P. R.; RATHOD, V. K. Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 4, p. 421–426, 2009.

JAIN, T. Microwave assisted extraction for phytoconstituents – an overview. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v.2, n. 1, p. 19–25, 2009.

KARAM, T.K. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Campinas, v. 15, n.2, p.280-286, 2013.

KARAZHIYAN, H.; RAZAVI, S.M.; PHILLIPS, G.O. Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 915–920, 2011.

KHAN, M. K.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXER, A. S.; DANGLES, O.; CHEMAT, F. Ultrasonnd-assisted extraction of polyphenols (flavonone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 851-858, 2010.

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

KOSTOVA, I. et al. Cytotoxic activity of new cerium (III) complexes of bis-coumarins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 1246-1254. 2005.

KOSTOVA, I.; BHATIA, S.; GRIGOROV, P.; BALKANSKY, S.; PARMAR, V.; PRASAD, A.; SASO, L. Coumarins as antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 25, p. 3929-3951, 2011.

- KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, Cromonas e Xantonomas. In: SIMÕES, C. O.S.; et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003. Bibliografia: p. 537-556.
- LAIOLA, M.I.B.; PATERNO, G.B.C.; DINIZ, J.A.; CALADO, J.F.; OLIVEIRA, A.C.P. Leguminosas e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso – RN. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, 2010.
- LANÇAS, F.M. et al. Novas aplicações de sistemas SFE “HOME MADE”. I Plantas Medicinais Brasileiras. **Food Science and technology (Campinas)**, v.17, n.4, 1997.
- LEAL, L. K. A. M.; et al. **Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea**. Life Sciences, Elmsford, v. 79, p. 98-104, 2006.
- LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p. 151-159, 2000.
- LEITE, J.P.V. Química dos produtos naturais: Uma abordagem Biosintética. In: Leite, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009, p.328.
- LEITE, T. C. C.; BRANCO, A. Análise das bulas de medicamentos à base de *Ginkgo biloba* L. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 31, n. 1, p. 83- 87, ago/mar. 2010.
- LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Royal Botanic Gardens**, Kew. p. 369, 1987.
- LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens**. Kew. p. 577, 2005.
- LIMA, H. C. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica – uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Rio de Janeiro**. 2000. 151p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.
- LIEW, S. Q. *et al.* Sequential ultrasound-microwave assisted acid extraction (UMAE) of pectin from pomelo peels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 426-435, 2016.
- LÓPEZ, R.E.S.; SANTOS, B.C. *Bauhinia fornicata* (Fabaceae). **Revista Fitos**, v.9, n.3, p.161-252, Jul-Set, 2015.
- LOURENÇO, J.F.S.; ESTEVES, M.H.S.; VARGAS, A.M.P.; FRANCO, A.J.; DINIZ R.S. Comparação entre métodos de maceração e ultrassom por meio da atividade antibacteriana do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista científica univçosa**, v.10, n.1, p.1037-1042, 2018.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Ed. Plantarium, p. 352, 1992.
- LUCKOW, L. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In: Klitgaard BB, Bruneau A (eds) **Advances in**

**Legume Systematics 10, High Level Systematics.** Royal Botanic Gardens, UK, pp 197- 220, 2003.

MABOOD, F.; GILANI, S.A.; HUSSAIN, J. et al. New design of experiment combined with UV–Vis spectroscopy for extraction and estimation of polyphenols from Basil seeds, Red seeds, Sesame seeds and Ajwan seeds. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 178, p. 14-18, 2017.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. 1. ed. São Paulo: D & Z Computação Gráfica e Editora, 2004. 413 p.

MACBRIDE, J.F. Flora of Peru. Family Leguminosae. Field Museum of Natural History, **Botanical Series**, v.13, p. 243-244, 1943.

MANSANO, V. F.; BRITTRICH, V.; TOZZI, A.M.G.A.; SOUZA, A.P. Composition of the *Lecointea clade* (Leguminosae, Papilionoideae, Swartzieae), a 28 re-evaluation based on combined evidence from morphology and molecular data. **Taxon**, v. 53, n.4, p. 1007-1018, 2000a.

MARCIEL et al. Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MARQUES, Graziella Silvestre. **Desenvolvimento e avaliação de metodologias analíticas para quantificação de flavonoides totais e canferitrina em folhas de *Bauhinia forficata* Link.** 2011. 128f. Dissertação (Mestrado acadêmico em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2011.

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

MARTINS, F.S.; BORGES, L.L.; PAULA, J.R.; CONCEIÇÃO, E.C. Impact of different extraction methods on the quality of *Dipteryx alata* extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 3, p. 521-526, 2013.

MARTOCCHIA, A.; FALASCHI, P. Current strategies of therapy in Alzheimer's disease. **Open Neuropsychopharmacol Journal**, v. 1, p. 19-23, 2008.

MATOS, M. J. et al. Focusing on new monoamine oxidase inhibitors: differently substituted coumarins as an interesting scaffold. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 12, n. 20, p. 2210-2239, 2012.

MEDEIROS, J.; KANIS, L.A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 96-802, 2010.

MEDOUNI-ADRAR, S.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; CADOT, Y.; MEDOUNI-HAROUNE, L.; DAHMOUNE, F.; MAKHOUKHE, A.; MADANI, K. Optimization of the

recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 123-132, 2015.

MELECCHI, Maria Inês Soares. **Caracterização química de extrato de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração**. 197 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MENDES, L.P.M. et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.121-125, 2011.

MEREGALLI, Monalise Marcante. Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos da casca do araçá vermelho (*Psidium cattleianum* sabine). 2017. 76f. Mestrado (Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos). Uri Campus Erechim, Rio Grande do Sul, 2007.

MIGLIATO, K. F. et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011.

MIRANDA, M.; CUELLAR, A. **Farmacognosia y Productos Naturales**. Primeira Edición. La Habana – Cuba. Editorial Félix Varela, p. 60, 2001.

MOLINARI, G. Natural Products in Drug Discovery: Present Status and perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology – Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 655, p. 13-27, 2009.

MOLNAR, M.; MENDESEVIC, N.; SUBARIC, D.; BANJARI, I; JOKIC, S. Comparison of various techniques for the extraction of umbelliferone and herniarin in *Matricaria chamomilla* processing fractions. **Chemistry Central Journal**, v.11, n.78, 2017.

MONTAGNER, Cristina. **Atividade antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas), e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas**. 125f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MONTEIRO, A. G. C. C., et al. *Pfaffia paniculata* K.: relato de experiência sobre o ensino de fitoterapia na graduação em enfermagem. **Revista de Enfermagem**, v. 8, n. 8, p. 256-264, 2012.

MOSCHEN, R.C.; PEREIRA, C.C.; OLIVEIRA, J.P.; PRADO, A.R. Controle de Qualidade das Folhas de *Ginkgo biloba* L. Comercializadas para Decocção e Infusão. **Sapientia**, v. 1, n. 12, p. 45-49, 2013.

MUÑIZ-MÁRQUEZ, D.B.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G.C.; WONG-PAZ, J.E.; BELMARES-CERDA, R.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C.N. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1149-1154, 2013.

MURRAY, R.D.H. **Naturally Occurring Plant Coumarins**. New York: Springer Verlag/Wien, 1978. Bibliografia: p. 200-209.

MURRAY, R. D. H. **Natural Product Reports**. p. 591-618, 1989.

NALAWADE, P.B.; GAJJAR, A.K. Microencapsulation of lutein extracted from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) using full factorial design. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 33, p. 75-87, 2016.

NAPOLITANO, H. B. et al. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 37, n. 12, p. 1847-1852, 2004.

NAYAK, B.; DAHMOUNE, F.; MOUSSI, K.; REMINI, H.; DAIRI, S.; AOUN, O.; KHODIR, M. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. **Food Chemistry**, v.187, p. 507-516, 2015.

NERI, Patrícia Maria da Silva. **Extração de compostos fenólicos de *Maytenus rigida* Mart. (Bom-nome): Planejamento Fatorial e Atividade Antimicrobiana**. 2016.72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

OGLIARI, P.J.; PACHECO, J.A. **Análise estatística usando o Statistica® 6.0**. Florianópolis: 2011. Guia de utilização do software Statistica® 6.0 - Universidade Federal de Santa Catarina.

OKAMOTO, T.; et al. Inhibition of Concanavalin A-Induced Mice Hepatitis by Coumarin Derivatives. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, p. 95-97, 2001.

OLIVEIRA, R.S.; ROCHA, J.S.; PINHEIRO, K.H.; MENDONÇA. M.P.; BARÃO. C.E. Aplicação do processo de ultrassom na extração de catequinas nos resíduos de chá verde. **Brazilian Journal of Food Research**, v.7, n.3, p.29-40, 2016.

OLIVEIRA, V.B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C.F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por claudação de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n.1, p. 230-239, 2016a.

ONISZCZUK, A.; PODGÓRSKI, R. Influence of different extraction methods on the quantification of selected flavonoids and phenolic acids from *Tilia cordata* inflorescence. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 509-514, 2015.

OSÓRIO, A.C.; MARTINS, J.L.S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 40, n.4 p.481-486, 2004.

PANIWNYK, L.; BEAUFOY, E.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J. The extraction of rutin from flowers buds of *Sophora japonica*. **Ultrasonic sonochem**, v.8, n.3, p. 299-301, 2001.

PARK, E. J.; et al. An Isocoumarin with Hepatoprotective Activity in Hep G2 and Primary Hepatocytes from *Agrimonia pilosa*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 9, p. 944- 946, 2004.

PARE, J.J.R.; BELANGER, J.M.R.; STAFFORD, S.S. Microwave-assisted process (MAP™): a new tool for the analytical laboratory. **Analytical Chemistry**, v. 13, n.4, p. 176–184, 1994.

PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W.A.; PRADO, M.R.D.; VILELA, A.P.O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n.1, 2003.

PELOI, K.E.; BOVO, F.; MESSIAS-REASON, I.J.; PEREZ, E. Utilização de planejamento fatorial para a determinação da capacidade antioxidante e doseamento de flavonoides totais em *Verbena minutiflora* Briq. ex Moldenke (gervai). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2016.

PENNINGTON, R.T; LAVIN M.; IRELAND. H.; KLITGAARD, B.B.; PRESTON, J. Phylogenetic relationships of basal papilionoid legumes based upon sequences of the chloroplast trnL intron. **Systematic Botany**, v. 26, p. 537–566, 2001.

PEREIRA, Érica Patrícia Lima. Marcadores bioquímicos da atividade antioxidante em sementes de *Amburana cearensis* (Freire Allemão) A.C. Smith submetidas a estresse hídrico. Salvador, BH: UFB, 2010. 38p. (Dissertação –Mestrado – Processos interativos em dos órgãos e sistemas). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

PEREIRA, R.J; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p. 146-15, 2012.

PEIXOTO-SOBRINHO, T.J.S. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n. 4, p.683-689, 2008.

PIETRZAK, W.; NOWAK, R.; OLECH, M. Effect of extraction method on phenolic content and antioxidant activity of mistletoe extracts from *Viscum album* subsp. *abietis*. **Chemical Papers**, v. 1, p. 1-7, 2013.

PINTO, A.C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.; STIRTONS, C.H. 1981. Evolution and Systematics of the Leguminosae. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.). *Advances in Legume Systematics 1*. Royal Botanic Gardens, Kew, Pp. 1-26.

POSADZKI, P.; WATSON, L.; ERNST, E. Contamination and adulteration of herbal medicinal products (HMPs): an overview of systematic reviews. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, p. 295-307, 2013.

PREDESCU, N.C.; PAPUC, C.; NICORESCU, V.; GAJAILA, I.; GORAN, G.V.; PETCU, C.D.; STEFAN, G. The Influence of Solid-to-Solvent Ratio and Extraction

Method on Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Properties of Some Ethanolic Plant Extracts. **Revista de Chimie**, v. 67, n. 10, p. 1922-1927, 2016.

RAJABI, M.; HAJI-ESFANDIARI, S.; BARFI, B.; GHANBARI, H. Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic-liquid dispersive liquid-phase microextraction method for simultaneous determination of anethole, estragole, and *para*-anisaldehyde in different plant extracts and human urine: a comparative study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 1, p. 1-5, 2014.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

RHAZI, N.; HANNACHE, H.; OUMAM, M.; SESBOU, A.; CHARRIER, B.; PIZZI, A.; CHARRIER-EL BOUHTOURY, F. Green extraction process of tannins obtained from Moroccan *Acacia mollissima* barks by microwave: Modeling and optimization of the process using the response surface methodology RSM. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 21, p. 1-17, 2015.

REVANKAR, H. M. et al. Coumarins scaffolds as COX inhibitors. **Bioorganic chemistry**, v. 71, p. 146-159, 2017.

RIBEIRO, Leticia Gouveia. **Extração assistida por micro-ondas de óleo essencial de folhas de Eucalypto (*Eucalyptus urophylla* x *Globulus*)**. 2018. 118p. (Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em engenharia química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.; MORANO, S.C.; SIVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: um a nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v.31, n.1, p.164-171, 2008.

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

RODHES, R.A.W. The hollowing out of the state the changing nature of the public servisse, 1994.

RODRIGUES, Rafaella da Fonseca. **Extração de cumarinas a partir da semente de emburana (*Torresea cearensis*) utilizando dióxido de carbono supercrítico**. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C.; QUIRANTES-PINÉ, R.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 246-254, 2015.

ROJAHN, C. A. **Productos Químicos y farmacêuticos**, 3 ed. Mexico: Editorial Atlante, 1956. Bibliografía: p. 1750-1758.

RUIZ & PAVÓN, S. Solanaceae. The generic Name. **Fieldiana Botany**, v.36, n.8, p.69, 15 de novembro de 1974.

SAMAD, K.A.; ZAINOL, N. The use of factorial design for ferulic acid production by co-culture. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 202-206, 2017.

SANTOS, Fracianne Oliveira. O. **Avaliação Antioxidante do Anacardium occidentale (Linn)**. Patos, PB: UFCG, 2011. 11 p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido) – Universidade Federal da Paraíba, Patos, 2011.

SANTOS, Hyalyne Bernadete. **Influência da sazonalidade nos perfis quali e quantitativo de polifenóis das cascas e folhas de Libidibia ferrea (Martin ex.Tul) L.P. Queiroz (JUCÁ)**. 2016. 86f. (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

SCHWACKE & TAUBERT. *Amburana*. In Engler & Prantl, 1894. Disponível em: <<http://www.irmng.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1279908>>. Acesso em: 08 de novembro de 2019.

SCREMIN, F.H.; MICHELS, H.C.; DEBIASE, J.Z.; FABRO, P.R. Indicação farmacêutica de fitoterápicos: Uma análise dos conceitos legais em relação à prática profissional. **Ciência & Cidadania**, v. 2, n.1, p. 57-73, 2016.

SELEME, Elidiane Priscila. **Amburana Schwacke & Taub. (Leguminosae, Papilionoideae) estudos taxonômicos e sistemáticos**. 2014.118f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-graduação do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro). Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, p.108, 2014.

SEVERO, A.A.L.; DE SOUZA, T.P.; ROLIM, L.A.; SOBRINHO, J.L.S.; DE MEDEIROS, F.P.M.; ROLIM NETO, P.J. Otimização das condições de extração de senosídeos por soluções hidroetanólicas das folhas de *Senna alexandrina* MILL empregando planejamento fatorial. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 603-609, 2013.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – a review of current status. **Chemical Engineering and Process**, v. 53, p. 10-23, 2012.

SILVA, Caio César de Andrade Rodrigues. **Obtenção de forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de Syzygium cumini (L.) skeels como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos**. 2019. 153f. Dissertação (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SILVA, C.; GARCIA, V.A.S.; FRANCISCATO, L.M.S.S. Extração assistida por ultrassom de compostos bioativos das cascas de Lichia (*Litchi chinensis* Sonn.). **Revista ciências exatas e naturais**, v. 18, n.1, 2016.

SILVA, C.R. et al. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengrel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.594-599, outubro/dezembro, 2008.

SILVA, J.A.; et al. Influência das Variáveis Nitrogênio, Fósforo e Brix na Produção dos Metabólitos Secundários Contaminantes Totais da Fermentação Alcoólica. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 695-698, 2006.

SILVA, L.N.; LOCATELLI, A.P.C.; ESSI, L. Leguminosas campestres da Universidade Federal de Santa Maria, *campus* Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.11, n.1, p.256-262, Porto Alegre, abr/junho de 2013.

SILVA, Maria do Socorro Bezerra da. **Planejamento experimental para a análise de parâmetros utilizados na injeção de polímeros em reservatório de Petróleo**. 2014.150f. Dissertação (Mestrado em ciência e engenharia de petróleo). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2ª edição, Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2010.

SMITH, A.C. Notes on the genus *Amburana* Schwacke & Taub. (*Torresea* Allem.). **Tropical Woods**, v. 62, p. 28-3, 1940.

SINGH, V.; et al. Coumarins Congeners as Antidepressants. **Arzneim-Forsch/Drug Research**, v. 42, p. 993-996, 1992.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 13, p.289-326.

SOUZA, C.D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Goiás, v. 20, n.1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, H. W.O.; SILVA, J.L.; NETO, M.S. A importância do profissional farmacêutico no combate à automedicação no Brasil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, p. 67-72, 2008.

SOUZA, J.C.; RESCAROLLI, C.L.S.; NUNEZ, C.V. Produção de Metabólitos Secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, v.12, n.3, p.269-280, Rio de Janeiro, 2018.

SOUZA, L. G.; RENNÓ, M. N.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Coumarins as cholinesterase inhibitors: a review. **Chemico-biological interactions**, v. 254, p. 11-23, 2016.

SOUZA, M. M. et al. Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, p. 192-200, 2009.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 200-208, 2007.

STRINGLIS, I. A.; DE JONGE, R.; PIETERSE, C. M. J. The Age of Coumarins in Plant–Microbe Interactions. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 7, p. 1405–1419, 2019.

STUBBERUD, K. P.; ASTROM, O. Separation of ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities by capillary electrophoresis: II Validation. **Journal of Chromatography A**, v. 826, p. 95-102, 1998.

SMYTH, T.; RAMACHANDRAN, V. N.; SMYTH, W. F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, p.421-426, 2009.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimioterapia II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TIGRE, C.B. Silvicultura para as matas xerófitas. Fortaleza: DNOCS, 1968, 2006.

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNYK, L.; MASON, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, p.137-142, 2001.

TOMAZZONI, M.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto e Contexto Enfermagem**. Florianópolis, v.15, n. 1, p. 115-121, 2006.

TORRES, R. et al. Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 984-987. 2006.

UPADHYA, V.; PAI, S.R.; HEGDE, H.V. Effect of method and time of extraction on total phenolic content in comparison with antioxidant activities in different parts of *Achyranthes aspera*. **Journal of King Saud University – Science**, v. 27, p. 204-208, 2015.

VAZ, A. P. A.; MOREIRA, J. H. A. Calêndula. Corumbá: EMBRAPA, 2006. 2p. (Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas).

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

VERZA, Simone Gasparin. **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona**. 2006. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação

em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

VIEIRA, D.; PADOANI, C.; SOARES, J.S.; ADRIANO, J.; CECHINEL FILHO, V.; SOUZA, M.M.; BRESOLIN, T.M.B.; COUTO, A.G. Development of hydroethanolic extract of *Ipomoea pes-caprae* using factorial design followed by antinociceptive and anti-inflammatory evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 72-78, 2013b.

VONGSAK, B.; SITHISARN, P.; MANGMOOL, S.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y.; GRITSANAPAN, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566-571, 2013.

XIE, J.; DONG, C.; NIE, S.; LI, F.; WANG, Z.; SHEN, M.; XIE, M. Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves. **Food Chemistry**, v. 186, p. 97-105, 2015.

YEDHU KRISHNAN, R.; RAJAN, K.S. Microwave assisted extraction of flavonoids from *Terminalia bellerica*: Study of kinetics and thermodynamics. **Separation and Purification Technology**, v. 157, p. 169-178, 2016.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, p. 300-312, 2006.

WANG, M.; BI, W.; HUANG, X.; CHEN, D.Y. Ball mill assisted rapid mechanochemical extraction method for natural products from plants. **Journal of Chromatography A**, v. 1, p. 2-29, 2016.

WITAICENIS, A. et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v. 21, n.3, p. 240-246, 2014

WOJCIECHOWSKI, M.F. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p.1846-1862, 2004.

WONG, W. H.; LEE, W.X.; RAMANAN, R.N.; TEE, L.H.; KONG, K.W.; GALANAKIS, C.M.; SUN, J.; PRASAD, K.N. Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 238-248, 2015.

WHO. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. World Health Organization: Geneva, 2009.

XU, Ling et al. **The Study on Biological and Pharmacological Activity of Coumarins**. 2015.

ZHOU, X.; WANG, X. B., WANG, T., KONG, L. Y. Design, synthesis, and acetylcholinesterase inhibitory activity of novel coumarin analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 17, p. 8011-8021, 2008.

ZLABINGER, G. J. et al. Mode of action of coumarin in immune cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, p. S17-S18, 1994.