



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

EWELYN CINTYA FELIPE DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DE
FLAVONOIDES EM MATRIZES VEGETAIS:
Eugenia uniflora L. e *Cinnamomum verum* J. Presl.**

Recife
2022

EWELYN CINTYA FELIPE DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DE
FLAVONOIDES EM MATRIZES VEGETAIS:
Eugenia uniflora L. e *Cinnamomum verum* J. Presl.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientador (a): Luiz Alberto Lira Soares

Coorientador (a): Magda Rhayanny Assunção Ferreira

Recife

2022

EWELYN CINTYA FELIPE DOS SANTOS

**“Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade de flavonoides
em matrizes vegetais: *Eugenia uniflora* L. e *Cinnamomum verum* J.
Presl ”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Aprovada em: 03/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno (Examinador Externo)
Universidade Estadual da Paraíba

*Dedico este trabalho a minha família, sem
vocês ele não seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo fôlego de vida, e pela permissão de realizar mais um sonho. Sem o seu auxílio, cuidado, provisão e amor eu não estaria aqui. Ao autor da vida dedico toda minha devoção, tudo que tenho, que sou e o que vier a ser. A Ele honra, glória e louvor pelos séculos dos séculos.

A meus pais, por toda dedicação durante toda minha trajetória de vida. Por me ensinarem a amar a Deus e a respeitar o meu próximo, por se esforçarem demais para que eu recebesse educação e através dela pudesse realizar esse sonho. Agradeço pela compreensão nos momentos em que estive ausente, pelo amor incondicional e por nunca deixarem de me apoiar em tudo. Agradeço também o cuidado diário, estampado em cada almoço, roupa lavada, quarto arrumado, café nas madrugadas, obrigada por proverem até mais do que precisei. Lhes amo eternamente.

A meus irmãos (aqui incluindo minha prima Juliana, que é como uma irmã para mim) por todas as caronas, pelo amor, pelo apoio e por sempre se fazerem presentes quando precisei. Agradeço também por me presentear com as alegrias da minha vida, meus sobrinhos Bernardo, Lavínia, João e Pedro. A tia ama muito vocês e agradece por me amarem e por alegrarem meus dias, mesmo aqueles dias em que não pude dar a atenção que vocês merecem por causa do trabalho.

Aos amigos muito obrigada principalmente por compreenderem minha correria e ausência, e, apesar disso, continuarem me apoiando e estando presentes quando precisei, sempre deixando claro o quanto acreditam em mim. Vocês deixam minha vida mais leve e feliz.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Sores, meu muito obrigada por me aceitar como orientanda desde a iniciação científica, por toda dedicação com o laboratório, provendo todo o necessário para o desenvolvimento da nossa pesquisa, além disso, proporcionando um ambiente de trabalho respeitoso e acolhedor. Obrigada por todo o ensinamento passado durante todos esses anos, o senhor é uma das pessoas mais inteligentes que conheço, e me sinto muito honrada e agradecida por poder aprender diariamente com o senhor.

A minha co-orientadora, Prof. Dra. Magda Rhayanny Assunção Ferreira, muito obrigada pela paciência, pelo auxílio e por toda dedicação. Agradeço imensamente a disponibilidade que sempre nos dispôs, corrigindo artigos, resumos, nos estimulando

a escrever, publicar, fazer sempre mais, e, além disso, ainda sendo apoio em questões pessoais, sempre muito compreensiva e solícita. Agradeço a ajuda diária, que foi essencial para que este trabalho fosse desenvolvido. Me sinto muito honrada em ser orientada por você e serei sempre grata.

A todos os integrantes do Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Fitoterápicos, o NUDATEF, meu muito obrigada por tudo. Eu tenho muito orgulho de fazer parte de uma equipe tão entrosada e dedicada quanto essa. Uma equipe que além de ótimos colegas de trabalho, se tornaram minha segunda família. Agradeço por me acolherem e entenderem meu jeitinho doce tal qual um picolé de limão, e por me ajudarem em todos os momentos que precisei. Trabalhar com vocês é muito fácil e prazeroso, o mestrado foi bem mais leve por causa de vocês.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco, a FACEPE, pela bolsa concedida, sem esse fomento provavelmente eu não conseguiria desempenhar este trabalho. Agradeço também a UFPE, por disponibilizar a estrutura em que este trabalho foi desenvolvido.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho, que também sempre foi um sonho pessoal, fosse realizado, meu mais sincero agradecimento. Eu tenho ciência de que sem a ajuda de cada um, eu não teria conseguido.

“Porque dEle, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.”

(BÍBLIA, 2011, Romanos 11. 36, p. 2145)

RESUMO

Eugenia uniflora L. e *Cinnamomum verum* J. Presl., são espécies ricas em flavonoides, amplamente utilizadas na medicina tradicional, que precisam ter sua qualidade e estabilidade atestadas para que estas e seus produtos sejam utilizados de forma segura e eficaz. Uma ferramenta útil na avaliação da estabilidade são os métodos indicativos de estabilidade, assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar métodos indicativos de estabilidade de flavonoides nas matrizes vegetais de *E. uniflora* e *C. verum*. As espécies foram coletadas, identificadas e caracterizadas, e técnicas estatísticas foram utilizadas na análise das melhores condições de extração. Foram obtidos extratos secos por aspensão (ESA), que foram caracterizados por cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os métodos foram validados e um estudo de degradação forçada, avaliando estresse hidrolítico ácido e básico, oxidativo, térmico e fotolítico, foi realizado nos ESA e no padrão miricitrina, para avaliar a capacidade indicativa de estabilidade dos métodos. As matérias primas vegetais se mostraram dentro dos limites de qualidade e as melhores condições de extração foram 5% de relação droga:solvente e etanol 80% como solvente extrator. A análise por CCD indicou 8 e 6 bandas características de flavonoides nos ESA de *E. uniflora* e de *C. verum*, respectivamente. A análise por CLAE revelou 4 flavonoides no ESA de *E. uniflora*, dentre eles a miricitrina ($2,92 \pm 0,02$ g%), e 5 flavonoides na matéria prima de *C. verum*, dentre eles a rutina ($0,070 \pm 0,001$ g%), que apresentou teor de $0,634 \pm 0,001$ g% no ESA. A degradação forçada do ESA de *E. uniflora* indicou maior sensibilidade da miricitrina nas condições de hidrólise, o mesmo foi observado para o padrão, porém este foi degradado mais intensamente em todas as condições, indicando que o composto isolado é mais sensível a degradação. A degradação forçada do ESA de *C. verum* indicou maior sensibilidade da rutina ao estresse hidrolítico, sendo mais estável nas outras condições. Os métodos foram validados com êxito, em conformidade com a legislação vigente (RDC 166/2017), demonstrando seletividade adequada aos flavonoides rutina e miricitrina, mesmo em meio a possíveis produtos de degradação. Conclui-se que os métodos validados podem ser utilizados como indicativos da estabilidade da miricitrina e da rutina nas matrizes vegetais de *E. uniflora* e *C. verum*, respectivamente.

Palavras-chave: pitangueira; canela; miricitrina; rutina; degradação; cromatografia.

ABSTRACT

Eugenia uniflora L. and *Cinnamomum verum* J. Presl. are species rich in flavonoids, widely used in traditional medicine, which need to have their quality and stability attested so that they and their products can be used safely and effectively. Indicative stability methods are a useful tool for assessing stability, so the aim of this study was to develop and validate indicative stability methods for flavonoids in the plant matrices of *E. uniflora* and *C. verum*. The species were collected, identified, and characterized, and statistical techniques were used to analyze the best extraction conditions. Spray-dried extracts (SDEs) were obtained and characterized by thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). The methods were validated and a forced degradation study, evaluating acidic and basic hydrolytic, oxidative, thermal and photolytic stress, was carried out on the SDEs and the myricitrin standard, to assess the methods' ability to indicate stability. The plant raw materials proved to be within quality limits and the best extraction conditions were 5% drug:solvent ratio and 80% ethanol as the extracting solvent. TLC analysis showed 8 and 6 bands characteristic of flavonoids in the SDE of *E. uniflora* and *C. verum*, respectively. HPLC analysis revealed 4 flavonoids in the SDE of *E. uniflora*, including myricitrin (2.92 ± 0.02 g%), and 5 flavonoids in the raw material of *C. verum*, including rutin (0.070 ± 0.001 g%), which had a content of 0.634 ± 0.001 g% in the SDE. Forced degradation of the SDE of *E. uniflora* indicated greater sensitivity of myricitrin in the hydrolysis conditions, the same was observed for the standard, but this was degraded more intensely in all conditions, indicating that the isolated compound is more sensitive to degradation. The forced degradation of the SDE of *C. verum* indicated greater sensitivity of rutin to hydrolytic stress, being more stable in the other conditions. The methods were successfully validated in accordance with current legislation (RDC 166/2017), demonstrating adequate selectivity for the flavonoids rutin and myricitrin, even in the presence of possible degradation products. It is concluded that the validated methods can be used to indicate the stability of myricitrin and rutin in the plant matrices of *E. uniflora* and *C. verum*, respectively.

Keywords: pitangueira; Cinnamom; myricitrin; rutin; degradation; chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Eugenia uniflora</i> L.	28
Figura 2 - <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl.	32
Figura 3 - Núcleo fundamental e subclasses dos flavonoides	36
Figura 4 - Estrutura química da Miricitrina.	37
Figura 5 - Estrutura química da Rutina.	39
Figura 6 - Gráfico de retenção e passagem e histograma de distribuição do pó das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> (A) e <i>Cinnamomum verum</i> (B).	61
Figura 7 - Perfil cromatográfico por CCD do extrato seco de <i>Eugenia uniflora</i> .	65
Figura 8 - Perfil cromatográfico por CCD do extrato seco de <i>C. verum</i> .	66
Figura 9 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>Eugenia uniflora</i> .	67
Figura 10 - Cromatograma do ESA de <i>C. verum</i> obtido com o método inicial.	68
Figura 11 - Cromatograma do ESA de <i>C. verum</i> obtido utilizando acetonitrila como fase B.	69
Figura 12 - Cromatograma do ESA de <i>C. verum</i> obtido a partir do método desenvolvido.	69
Figura 13 - Perfil cromatográfico por CLAE da MPV de <i>Cinnamomum verum</i> .	70
Figura 14 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>Cinnamomum verum</i> .	71
Figura 15 - Curva analítica média para o padrão miricitrina.	72
Figura 16 - Análise de seletividade na condição de estresse hidrolítico básico.	75
Figura 17 - Análise de seletividade na condição de estresse hidrolítico ácido.	76
Figura 18 - Análise de seletividade na condição de estresse oxidativo.	76
Figura 19 - Análise de seletividade na condição de estresse térmico.	77
Figura 20 - Análise de seletividade na condição de estresse fotolítico.	77
Figura 21 - Curvas analíticas para o padrão rutina (A) e para a matéria prima (B).	79
Figura 22 - Análise de seletividade do método para a rutina na matéria prima de <i>C. verum</i> .	80
Figura 23 - Gráfico de efeito matriz.	81
Figura 24 - Curva analítica do padrão rutina.	84
Figura 25 - Análise de seletividade na condição de estresse hidrolítico básico.	86
Figura 26 - Análise de seletividade na condição de estresse hidrolítico ácido.	87
Figura 27 - Análise de seletividade na condição de estresse oxidativo.	87
Figura 28 - Análise de seletividade na condição de estresse térmico.	87

Figura 29 - Análise de seletividade na condição de estresse fotolítico.	88
Figura 30 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>E. uniflora</i> e do ESA após degradação hidrolítica básica.	89
Figura 31 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>E. uniflora</i> e do ESA após degradação hidrolítica ácida.	90
Figura 32 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>E. uniflora</i> e do ESA após degradação oxidativa.	91
Figura 33 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>E. uniflora</i> e do ESA após degradação térmica seca.	92
Figura 34 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>E. uniflora</i> e do ESA após degradação fotolítica.	93
Figura 35 - Perfil cromatográfico por CLAE da Miricitrina e da Miricitrina após degradação hidrolítica básica.	94
Figura 36 - Perfil cromatográfico por CLAE da Miricitrina e da Miricitrina após degradação hidrolítica ácida.	95
Figura 37 - Perfil cromatográfico por CLAE da Miricitrina e da Miricitrina após degradação oxidativa.	96
Figura 38 - Perfil cromatográfico por CLAE da Miricitrina e da Miricitrina após degradação térmica.	97
Figura 39 - Perfil cromatográfico por CLAE da Miricitrina e da Miricitrina após degradação fotolítica.	98
Figura 40 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>C. verum</i> e do ESA após degradação hidrolítica básica.	99
Figura 41 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>C. verum</i> e do ESA após degradação hidrolítica ácida.	100
Figura 42 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>C. verum</i> e do ESA após degradação oxidativa.	101
Figura 43 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>C. verum</i> e do ESA após degradação térmica.	102
Figura 44 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de <i>C. verum</i> e do ESA após degradação fotolítica.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de flavonoides totais, resíduo seco, eficiência de extração e intervalos de confiança dos extratos obtidos com diferentes quantidades de droga vegetal de <i>E. uniflora</i> e <i>C. verum</i> .	64
Tabela 2 - Áreas obtidas para os picos da curva analítica de miricitrina.	72
Tabela 3 - Repetibilidade e precisão intermediária para miricitrina no ESA de <i>E. uniflora</i> .	74
Tabela 4 - Áreas obtidas para os picos da curva analítica do padrão rutina e da matéria prima.	78
Tabela 5 - Repetibilidade e precisão intermediária para rutina na matéria prima de <i>C. verum</i> .	82
Tabela 6 - Análise da robustez do método para análise do teor de rutina na matéria prima de <i>C. verum</i> .	83
Tabela 7 - Curva analítica do padrão rutina.	84
Tabela 8 - Repetibilidade e precisão intermediária para rutina no ESA de <i>C. verum</i> .	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI50	Concentração inibitória de 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CM	Concentração média
DAD	Detector de arranjo de diodos
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EE	Eficiência de Extração
ESA	Extrato Seco por Aspersão
FD	Fator de Diluição
FDA	<i>Food and drug administration</i>
ICH	<i>The International Council for Harmonisation</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IFAV	Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MIE	Método Indicativo de Estabilidade
MPV	Matéria-prima vegetal
OMS	Organização mundial da saúde
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R _f	Fator de Retenção
RS	Resíduo Seco
SE	Solução estoque
TFA	Ácido Trifluoroacético
TFT	Teor de Flavonoides Totais
t _R	Tempo de Retenção
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	QUALIDADE DE INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS VEGETAIS (IFAV)	20
3.2	MÉTODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE	21
3.2.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	22
3.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	23
3.3.1	Seletividade	24
3.3.2	Linearidade	24
3.3.3	Efeito Matriz	24
3.3.4	Precisão	24
3.3.5	Exatidão	25
3.3.6	Limite de Detecção	25
3.3.7	Limite de Quantificação	25
3.3.8	Robustez	26
3.4	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	26
3.5	<i>Eugenia uniflora</i> L.....	27
3.5.1	Aspectos gerais e botânicos	27
3.5.2	Atividades farmacológicas	28
3.5.3	Aspectos fitoquímicos	30
3.6	<i>Cinnamomum verum</i>	31
3.6.1	Aspectos Gerais e botânicos	31
3.6.2	Atividades farmacológicas	32
3.6.3	Aspectos fitoquímicos	34
3.7	FLAVONOIDES	35
3.7.1	Miricitrina	37
3.7.2	Rutina	38
4	METODOLOGIA	40

4.1	MATERIAL VEGETAL	40
4.1.1	Obtenção, identificação e tratamento do material vegetal	40
4.1.2	Caracterização dos materiais vegetais.....	40
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO	41
4.2.1	Avaliação da quantidade de droga vegetal	41
4.2.2	Obtenção dos extratos brutos.....	43
4.2.3	Secagem por aspersão	43
4.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	44
4.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	44
4.4.1	<i>Eugenia uniflora</i>	44
4.4.1.1	Preparo da amostra.....	44
4.4.1.2	Condições analíticas	45
4.4.2	<i>Cinnamomum verum</i>.....	45
4.4.2.1	Desenvolvimento do método	45
4.4.2.2	Análise da matéria-prima vegetal	49
4.4.2.3	Análise do ESA.....	49
4.5	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	49
4.5.1	<i>Eugenia uniflora</i>	50
4.5.2	Miricitrina	51
4.5.3	<i>Cinnamomum verum</i>.....	53
4.6	VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	54
4.6.1	<i>Eugenia uniflora</i>	54
4.6.2	<i>Cinamomum verum</i>.....	56
4.6.2.1	Validação para matéria-prima vegetal	56
4.6.2.2	Validação parcial para o ESA.....	58
5	RESULTADOS.....	61
5.1	MATERIAL VEGETAL	61
5.1.1	Caracterização do material vegetal.....	61
5.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO	63
5.2.1	Avaliação da quantidade de droga vegetal	63
5.2.2	Extração e secagem por aspersão.....	64
5.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	64
5.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	66
5.4.1	<i>Eugenia uniflora</i>	66

5.4.2	<i>Cinnamomum verum</i>	67
5.4.2.1	Desenvolvimento do método analítico.....	67
5.4.2.2	Análise da matéria prima vegetal	70
5.4.2.3	Análise do ESA.....	70
5.5	VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	71
5.5.1	<i>Eugenia uniflora</i>	71
5.5.2	<i>Cinnamomum verum</i>	77
5.5.2.1	Matéria prima vegetal	78
5.5.2.2	Extrato seco por aspersão.....	83
5.7	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	88
5.7.1	<i>Eugenia uniflora</i>	88
5.7.2	Miricitrina	93
5.7.3	<i>Cinnamomum verum</i>	98
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais e seus derivados têm sido utilizados há milênios na medicina tradicional. Há registros escritos de uso de plantas medicinais há mais de 5.000 anos, como a tabuinha de argila suméria, de 4.000 anos atrás, que registrava remédios de plantas para várias doenças, e o papiro de Ebers, datado de mais de 3.000 anos atrás, com descrição de centenas de outros remédios (Gu *et al.*, 2014; Karunamoorthi *et al.*, 2012; Liu, 2011).

Apesar do longo histórico de uso, a falta de padronização e qualidade de espécies vegetais constitui um dos principais desafios na implementação do uso de produtos derivados de plantas medicinais, pois, estes fatores estão diretamente ligados a eficácia e segurança destes produtos (Karunamoorthi *et al.*, 2012; Liu, 2011).

Grande parte do desafio da padronização e da qualidade de produtos de origem natural reside na alta complexidade química dessas matérias-primas vegetais. Além disso, elas possuem grande variabilidade, de origem endógena e exógena, fazendo com que a garantia da qualidade destes produtos seja mais complexa que para produtos de origem sintética (Liu, 2011; Soares; Farias, 2017).

A identificação de marcadores é uma das estratégias mais importantes no controle de qualidade de insumos farmacêuticos ativos vegetais (IFAV) e seus derivados. Estes marcadores podem ser clínicos, quando são os principais relacionados a atividade terapêutica; marcadores ativos, quando contribuem para a resposta biológica; marcadores analíticos, quando não há evidência de contribuição com o efeito terapêutico, mas são quimicamente relevantes; ou ainda marcadores negativos, quando apresentam algum risco aos usuários (Soares; Farias, 2017).

Para eleição e identificação destes marcadores, uma das técnicas mais empregadas é a cromatografia líquida de alta eficiência. Esta, constitui uma ferramenta muito eficaz em separar os compostos e desenvolver um perfil fitoquímico específico para cada espécie, chamado “*fingerprint*” ou impressão digital. A análise de “*fingerprints*” cromatográficos pode ser útil para analisar apenas um grupo de marcadores específicos, ou todo o conjunto de compostos presentes nas amostras (Tistaert; Dejaegher; Vander Heyden, 2011; Waksmundzka-Hajnos; Sherma, 2011).

Considerando que a manutenção do perfil fitoquímico e do teor dos marcadores no IFAV e seus derivados é imprescindível para a manutenção da qualidade, eficácia e segurança destes produtos, a análise da estabilidade destes durante toda a cadeia

de produção e distribuição é essencial (Shoyama, 2011). Neste sentido destacam-se os métodos indicativos de estabilidade, que são métodos analíticos quantitativos validados, capazes de mensurar com exatidão o teor do insumo farmacêutico ativo, produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem interferência de outros produtos de degradação, impurezas e excipientes (Anvisa, 2015b; 2019c).

Para atestar a seletividade destes métodos aos marcadores, mesmo na presença de seus produtos de degradação, se utiliza o estudo de degradação forçada, onde a amostra é submetida a condições de estresse como temperatura, hidrólise, umidade, oxidação e luz, e, posteriormente, é analisada nos métodos indicativos de estabilidade, tanto para atestar a seletividade destes, como para avaliar em que condições as substâncias são sensíveis a degradação. Dessa forma, cuidados podem ser tomados durante a produção e distribuição destes produtos a fim de manter sua qualidade (Baertschi; Alsante; Reed, 2011; Blessy *et al.*, 2014).

Os flavonoides são uma das principais classes de metabólitos secundários das plantas. São compostos fenólicos caracterizados por uma estrutura química que consiste em dois anéis de benzeno ligados por um anel pirano. Existem diversos relatos de propriedades biológicas relacionadas a esses metabólitos, incluindo as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, hepatoprotetora e antiviral, além de atuar na prevenção de doenças como câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes ou osteoporose (Barbosa *et al.*, 2020; Gullón *et al.*, 2017; Zhao; Yang; Xie, 2019).

Dentre as espécies de plantas medicinais que são ricas em flavonoides, pode-se destacar *Eugenia uniflora* L. e *Cinnamomum verum* J. Presl., duas espécies amplamente utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças (Fidelis *et al.*, 2022; Moura *et al.*, 2018; Sharma; Pathak, 2021; Wang *et al.*, 2020). Neste sentido, considerando a importância de *E. uniflora* e *C. verum* na medicina tradicional, a manutenção do perfil químico das espécies para sua qualidade, bem como a importância dos flavonoides nas propriedades biológicas relacionadas as espécies medicinais, faz-se necessário o aprofundamento do estudo sobre a estabilidade dos principais marcadores destas espécies, assim, este trabalho se justifica no preenchimento desta lacuna sobre o tema.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos indicativos de estabilidade de flavonoides nas matrizes vegetais de *Eugenia uniflora* L. e *Cinnamomum verum* J. Presl.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e caracterizar as matérias-primas vegetais de *E. uniflora* e *C. verum*;
- Obter extratos secos por aspensão a partir das folhas das espécies vegetais selecionadas;
- Desenvolver e avaliar as condições cromatográficas por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos padrões de flavonoides e nos derivados vegetais;
- Realizar o estudo de degradação forçada para os extratos secos por aspensão de *E. uniflora* e *C. verum*;
- Validar os métodos indicativos de estabilidade de flavonoides de *E. uniflora* e *C. verum* por CLAE-DAD.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 QUALIDADE DE INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS VEGETAIS (IFAV)

O insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) é definido como a matéria-prima ativa vegetal, podendo ser a droga ou derivado vegetal, que é utilizada no processo de fabricação de um medicamento fitoterápico (Anvisa, 2014). Esse tipo de matéria-prima oriunda de fontes naturais apresenta alta complexidade química, podendo apresentar variações qualitativas e quantitativas na sua composição química, provenientes de origem endógena ou exógena (Soares; Farias, 2017).

Devido à natureza complexa dos IFAVs, a manutenção da sua qualidade se torna um desafio maior que o encontrado para insumos farmacêuticos ativos sintéticos (Xie *et al.*, 2007). A qualidade por sua vez pode ser definida como a adequação de um determinado bem a uma finalidade específica, do ponto de vista farmacêutico, esta vai ser determinada pelas necessidades de uso de determinado produto, por suas propriedades químicas, físicas ou biológicas e ainda por seu processo de fabricação (Pandey *et al.*, 2019; Soares; Farias, 2017).

Para que a qualidade dos IFAVs seja atestada, é necessário um extenso processo de controle de qualidade, que geralmente envolve exames macro e microscópicos, análises físico-químicas, tais como pesquisa de material estranho, teor de umidade, teor de cinzas, teor de extrativos, determinação de índices de intumescimento, amargor e espuma e pesquisa de contaminantes. Além disso, outro passo importante no controle de qualidade de um IFAV envolve a pesquisa de constituintes químicos, empregando técnicas analíticas como cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, espectrofotometria, dentre outras (Liang; Xie; Chan, 2004; Soares; Farias, 2017).

Um dos principais desafios no controle de qualidade dos IFAVs está na busca e na avaliação das fontes de variabilidade de sua composição química (Soares; Farias, 2017). Um dos fatores que podem interferir variando e que é primordial na qualidade química dos IFAVs é a estabilidade, e, para o controle deste fator destacam-se os métodos indicativos de estabilidade (Gomes *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2022; Ratnatilaka Na Bhuket *et al.*, 2020).

3.2 MÉTODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE

Métodos indicativos de estabilidade (MIE) são definidos como métodos analíticos quantitativos validados, capazes de mensurar com exatidão o teor do insumo farmacêutico ativo (IFA), produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem interferência de outros produtos de degradação, impurezas e excipientes. Dessa forma, um MIE pode ser utilizado para quantificar a diminuição no teor do IFA no medicamento devido à degradação, e, dessa forma, detectar como a estabilidade das substâncias e dos medicamentos muda com o tempo (Anvisa, 2019c; Blessy *et al.*, 2014).

Moraes Do Carmo; Pereira e Gratieri (2018) e Bakshi e Singh (2002) classificam os MIE como método indicativo de estabilidade específico, quando é capaz de medir inequivocamente o IFA na presença de seus produtos de degradação, excipientes e adjuvantes da formulação, e método indicativo de estabilidade seletivo, quando é capaz de medir inequivocamente o IFA e todos os produtos de degradação na presença de excipientes e adjuvantes da formulação. O mesmo é definido no Guia 04 de 2015 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que afirma que um método pode ser indicativo de estabilidade somente para o teor do IFA, quando é capaz de quantificar um IFA em meio aos seus produtos de degradação, sem quantificar todos os produtos de degradação, podem ser indicativos de estabilidade quantificando somente os produtos de degradação mas não o IFA, ou ainda podem quantificar tanto o IFA quanto os produtos de degradação (Anvisa, 2015a).

Quando se trata de IFAV, só é obrigatória a quantificação e identificação dos produtos de degradação quando estes forem citados em monografias de compêndios oficiais ou quando houver descrição na literatura científica de produtos de degradação que apresentem relevante toxicidade ou que possam gerar ineficácia terapêutica (Anvisa, 2019c).

Bakshi e Singh (2002) propuseram algumas etapas primordiais no desenvolvimento do método indicativo de estabilidade. Inicialmente deve-se realizar um estudo crítico da estrutura do fármaco para avaliar as prováveis rotas de degradação, e coletar informações sobre suas propriedades físico-químicas. Deve-se realizar o estudo de degradação forçada, e, a partir da amostra degradada, realizar estudos preliminares de separação. O método deve ser desenvolvido e otimizado, e, se necessário, os produtos de degradação devem ser identificados e caracterizados.

Por fim, os autores indicam que o método deve ser validado. A técnica analítica mais empregada no desenvolvimento de MIE é a cromatografia líquida de alta eficiência (Blessy *et al.*, 2014).

3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas na análise qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos presentes em misturas complexas. O seu vasto emprego é devido a fatores como elevada exatidão e precisão, alta resolução, sensibilidade e especificidade, além de sua versatilidade (Bakshi; Singh, 2002; Pereira; Beltrame, 2015).

A instrumentação para esta técnica é totalmente automatizada, e inclui uma coluna, recipiente de fase móvel, bomba, injetor e detector. Este sistema é controlado por um programa computacional que registra os perfis cromatográficos e os picos individuais, incluindo dados como tempo de retenção, altura do pico, largura do pico, eficiência do sistema, fator de simetria do pico, número de pratos teóricos, dentre outros (Waksmundzka-Hajnos; Sherma, 2011).

A separação cromatográfica pode ser desenvolvida em modo normal, quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em modo reverso, quando a fase estacionária é menos polar que a fase móvel. A separação em modo reverso é a forma mais amplamente utilizada na análise de extratos vegetais, e estima-se que aproximadamente 80% de todas as separações cromatográficas são realizadas nesse modo. As colunas mais utilizadas são as de fases estacionárias não polares quimicamente ligadas, contendo principalmente cadeias de octadecilsilano (C18) e octasilano (C8). Nestes sistemas a fase móvel consiste comumente em misturas de água e modificadores orgânicos, os mais comuns sendo metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano (Pereira; Beltrame, 2015; Waksmundzka-Hajnos; Sherma, 2011).

O CLAE em fase reversa pode ser realizado por dois modos de eluição: isocrática, quando a fase móvel tem composição constante, ou gradiente, quando a composição da fase móvel é alterada durante o decorrer da corrida cromatográfica. A eluição gradiente é capaz de melhorar a eficiência da separação, principalmente quando é aplicada a misturas complexas onde os compostos diferem consideravelmente em polaridade (Waksmundzka-Hajnos; Sherma, 2011).

Devido à capacidade de alta resolução, sensibilidade e especificidade da CLAE, esta técnica ganhou popularidade nos estudos de estabilidade, e a maioria dos métodos indicativos de estabilidade são desenvolvidos a partir dela (Bakshi; Singh, 2002). Dessa forma, o Guia 04 de 2015 da Anvisa recomenda esta técnica de análise, com detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD), no desenvolvimento de MIE (Anvisa, 2015a). Este tipo de detector além de permitir o registro do espectro UV-Vis de cada composto, fornece a informação de pureza cromatográfica de cada pico, o que permite a avaliação de co-eluição (Bakshi; Singh, 2002; Singh *et al.*, 2012).

A detecção por DAD apresenta a limitação de não detectar ligações C-H, C-C e grupos C=C isolados, por esses não absorverem em regiões do espectro UV. Assim, a utilização de detector DAD se limita a compostos com ligações duplas conjugadas, ou seja, com grupos cromóforos, o que é o caso da maioria dos compostos de origem natural, principalmente os polifenóis (Pereira; Beltrame, 2015; Waksmundzka-Hajnos; Sherma, 2011).

3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de uma metodologia analítica visa demonstrar, por meio de uma avaliação experimental sistemática, que esta metodologia possui requisitos aceitáveis para cumprir seu propósito pretendido. Esta avaliação fornece a confiabilidade de que um método analítico fornecerá em todas as medições futuras, resultados confiáveis, precisos e reprodutíveis (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020; Raposo; Ibelli-Bianco, 2020).

Visando nortear a validação de metodologias analíticas, agências reguladoras ao redor do mundo publicaram diretrizes contendo os procedimentos necessários a fim de validar metodologias, como é o caso da Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2018), da Agência Europeia de Medicamentos (EMA, 2016), da agência reguladora dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2015) e do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH) (ICH, 2005).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 166 de 2017, publicada pela Anvisa, é utilizada na validação de metodologias analíticas. Nela, a validação é baseada nos parâmetros de seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (Anvisa, 2017b).

3.3.1 Seletividade

Um método analítico pode ser considerado seletivo quando é capaz de identificar ou quantificar, inequivocadamente, o analito de interesse mesmo na presença de outros compostos interferentes, como compostos da matriz, impurezas, produtos de degradação, dentre outros. A análise da seletividade é feita de acordo com o objetivo do método analítico, quando se trata de um método cromatográfico, pode ser confirmada através da análise de pureza do pico cromatográfico (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020).

3.3.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico é demonstrada quando este é capaz de produzir respostas analíticas diretamente, ou através de uma transformação matemática, proporcionais as diferentes concentrações de um analito em uma determinada faixa de concentração (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020). Segundo a RDC 166 de 2017 (Anvisa, 2017b), para que a linearidade seja estabelecida, deve-se utilizar pelo menos 5 concentrações, realizadas em triplicata, e esta deve ser avaliada através de gráfico das respostas em função da concentração do analito, gráfico de dispersão de resíduos, equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados, coeficiente de correlação (r), coeficiente de determinação (r^2) e significância do coeficiente angular.

3.3.3 Efeito Matriz

A análise do efeito matriz visa avaliar se há interferência dos constituintes da matriz na resposta analítica. Para isso, compara-se os coeficientes angulares das curvas de calibração do padrão e da amostra fortificada com o padrão. Quando as retas são paralelas, há a indicação de que os constituintes da matriz não causam alteração na resposta analítica (Anvisa, 2017b).

3.3.4 Precisão

A precisão de um método analítico diz respeito a proximidade de resultados de múltiplas análises da amostra preparada e analisada sob as mesmas condições. A proximidade destes resultados representa menor índice de erro aleatório, o que indica maior precisão do método (Marson *et al.*, 2020). Esta precisão é demonstrada nos ensaios de repetibilidade, precisão intermediária ou da reprodutibilidade. Sendo a repetibilidade avaliada por meio de, no mínimo, 9 determinações, que contemplem as concentrações baixa, média e alta, ou de 6 repetições a 100% da concentração da amostra. Na precisão intermediária a análise é realizada em dias diferentes por operadores diferentes e na reprodutibilidade as análises são realizadas em diferentes laboratórios. A precisão do método deve ser expressa por meio da dispersão dos resultados e cálculo do desvio padrão relativo (Anvisa, 2017b).

3.3.5 Exatidão

Na exatidão é demonstrada a capacidade do método em reproduzir respostas analíticas que representam os valores aceitos como verdadeiros. Para verificá-la se faz necessário, no mínimo, 9 determinações que contemplem o intervalo linear do método, nas concentrações baixa, média e alta. Quando o analito de interesse encontra-se em uma matriz complexa, como é o caso de extratos vegetais, recomenda-se o método de adição de quantidades conhecidas de padrão na solução amostra, e a partir da análise do teor desta amostra calcula-se o percentual de recuperação do analito (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020).

3.3.6 Limite de Detecção

A menor concentração de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, é denominada limite de detecção. Este limite pode ser determinado através de investigação visual, através da razão sinal-ruído e por meio de parâmetros da curva de calibração, sendo os dois últimos indicados para métodos instrumentais (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020).

3.3.7 Limite de Quantificação

Diferente do limite de detecção, o limite de quantificação diz respeito a menor concentração do analito na amostra que pode ser quantificada com adequada precisão e exatidão. Este limite pode ser estimado através da razão sinal-ruído ou de parâmetros da curva analítica (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020).

3.3.8 Robustez

Um método é considerado robusto quando é capaz de resistir a pequenas e deliberadas mudanças nas condições analíticas mantendo a precisão e exatidão. O objetivo principal ao avaliar este parâmetro é verificar a existência de alguma condição analítica crítica que precise ser monitorada para manutenção da confiabilidade dos resultados. Quando se trata de métodos cromatográficos, as condições analíticas verificadas podem ser a variação do pH e composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020).

3.4 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O ensaio de degradação forçada é definido como estudo que permite a geração de produtos de degradação de insumos farmacêuticos ativos por meio da exposição destes, ou de produtos acabados, a condições de estresse, como luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida e básica e oxidação, entre outras (Anvisa, 2015b; 2019c). Este estudo auxilia no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, e é a principal ferramenta usada para prever problemas de estabilidade, além disso, fornece informações sobre as possíveis rotas de degradação de um composto (Anvisa, 2015b; Baertschi; Alsante; Reed, 2011).

A degradação forçada possui alguns objetivos, como estabelecer a evidência de que um método analítico é indicativo de estabilidade, determinar as condições às quais o IFA ou medicamento é sensível, e assim determinar cuidados específicos durante toda cadeia de produção e distribuição. Além disso ainda é capaz de produzir um perfil de degradação do IFA ou medicamento e auxiliar na compreensão das suas propriedades químicas, rotas de degradação e na determinação de marcadores

específicos destas rotas de degradação, facilitando assim investigações de possíveis desvios da qualidade. (Anvisa, 2015a; Blessy *et al.*, 2014).

Os estudos de degradação forçada devem ser capazes de gerar degradação superior a 10% e inferior àquela que levaria à degradação completa (Anvisa, 2015b). No entanto, não há diretrizes regulatórias que descrevam detalhadamente como realizar este estudo, por isso, recomenda-se a realização de um estudo de degradação preliminar, e, para alcançar a faixa de degradação recomendada, deve-se variar os parâmetros do estudo, as alterações podem ser realizadas no tempo de exposição, na temperatura e na concentração ou magnitude do agente degradante (Anvisa, 2015a; Baertschi; Alsante; Reed, 2011).

É importante destacar que o perfil de degradação gerado a partir do estudo de degradação forçada é diferente do perfil de degradação real de uma amostra, neste estudo geralmente são gerados mais produtos de degradação do que o observado em estudos de estabilidade realizados sob condições normais de armazenamento. Dessa forma, o perfil de degradação gerado através do estudo de degradação forçada é chamado de perfil de degradação potencial (Anvisa, 2015a; Baertschi; Alsante; Reed, 2011).

Alguns fatores de estresse devem ser considerados para estudos de degradação forçada, são eles: hidrólise ácida e básica, degradação térmica, fotólise, oxidação e umidade (Anvisa, 2015b; Blessy *et al.*, 2014).

3.5 *Eugenia uniflora* L.

3.5.1 Aspectos gerais e botânicos

Eugenia uniflora L., conhecida popularmente no Brasil como pitangueira, é uma árvore ramificada, com folhagem persistente, sistema radicular profundo e que mede de 2 a 4 m (Fidelis *et al.*, 2022; Mazine *et al.*, 2020). A espécie pertence à família Myrtaceae, que no mundo compreende cerca de 130 gêneros e cerca de 5600 espécies e que no Brasil compreende cerca de 20 gêneros e 1030 espécies. Dentre os gêneros da família Myrtaceae, destaca-se o gênero *Eugenia*, que apresenta cerca de 1000 espécies distribuídas na América Central e do Sul, destas, estima-se que 350 são nativas do Brasil (Fidelis *et al.*, 2022; Figueiredo *et al.*, 2019).

Na medicina popular, há relatos de uso de infusões aquosas das folhas de *E. uniflora* no tratamento de hipertensão e como diurético desde o século 15. Além disso, a espécie também é empregada pela população no tratamento de distúrbios digestivos, como anti-inflamatório, antidiarreico, antifebril e como antirreumático (Moura *et al.*, 2018; Samy *et al.*, 2014; Sobeh *et al.*, 2019). Devido a seu alto potencial farmacológico, a espécie consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Único de Saúde – RENISUS (Brasil, 2009).

Quanto aos aspectos botânicos, as folhas de *E. uniflora* são simples, opostas, medem cerca de 4,5 a 6,2 cm de comprimento e 2,0 a 2,7 cm de largura, com formato ovalado a ovalado-lanceolado, e com coloração que varia de verde claro a verde escuro. Suas flores são hermafroditas, composta por 4 pétalas livres que crescem na base dos ramos e possuem coloração branca a creme. Seus frutos são conhecidos como pitanga, nome derivado do Tupi que significa vermelho, cor característica do fruto. Este tem formato globoso, em forma de bagas, com 8 a 10 sulcos longitudinais, com 1 a 2 sementes. Seu sabor é doce e ácido e possui um aroma intenso (Anvisa, 2019a; Fidelis *et al.*, 2022; Mazine *et al.*, 2020).

Figura 1 - *Eugenia uniflora* L.



Fonte: Autoria própria.

3.5.2 Atividades farmacológicas

Quanto a suas ações terapêuticas, diversos relatos na literatura científica atestam o potencial biológico de *E. uniflora*. A atividade antioxidante é uma das atividades mais relatada na literatura, esta foi avaliada para o extrato etanólico,

aquoso e CO₂ supercrítico das folhas (Martinez-Correa *et al.*, 2011), óleo das folhas (Figueiredo *et al.*, 2019; Victoria *et al.*, 2012), extrato metanólico e frações das folhas e sementes (Figueiroa *et al.*, 2013), extrato aquoso, etanólico, metanólico e acetona das folhas (Schumacher *et al.*, 2015), extrato etanólico das folhas (Da Cunha *et al.*, 2016; Sobral-Souza *et al.*, 2020) e extrato metanólico e frações das folhas (Sobeh *et al.*, 2019; Sobeh *et al.*, 2020). Os diferentes extratos demonstraram potente atividade antioxidante, que foi relacionada ao alto teor de fenólicos, principalmente flavonoides, da espécie.

Quanto a atividade anti-inflamatória, Candeia *et al.* (2022) observaram ação anti-inflamatória *in vivo* dos extratos e frações de *E. uniflora*, que foram eficazes em diminuir o número de leucócitos e neutrófilos na cavidade peritoneal e inibir o aumento do volume do edema de pata. Além disso, os autores ainda relataram resposta antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, no teste da placa quente e no teste da formalina. A administração de naloxana reverteu o efeito antinociceptivo da fração acetato de etila, indicando que os receptores opioides estão envolvidos no efeito antinociceptivo desta fração. Sobeh *et al.* (2019) também avaliaram a ação anti-inflamatória *in vivo* dos extratos e frações das folhas de *E. uniflora*, os resultados indicaram diminuição do edema de pata em ratos e diminuição da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal. Assim como no estudo desenvolvido por Candeia *et al.* (2022), os autores relataram propriedades antinociceptivas centrais e periféricas *in vivo*, através do método de contorções e do teste da placa quente, além de efeitos antipiréticos e atividade antidiabética. O extrato acetona:água (7:3) e as frações aquosa e acetato de etila das folhas de *E. uniflora* também apresentaram atividade anti-inflamatória *in vivo* no estudo desenvolvido por (Falcao *et al.*, 2018). Os extratos e frações foram eficientes em reduzir a migração de leucócitos e a atividade da mieloperoxidase, além disso, reduziram significativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Os autores ainda observaram efeito antioxidante e atividade analgésica periférica.

A atividade antimicrobiana do óleo das folhas foi avaliada por Victoria *et al.* (2012), o óleo apresentou atividade frente as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e contra os fungos *Candida lipolytica* e *Candida guilliermondii*. O óleo essencial das folhas também foi avaliado frente a cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853). Foi evidenciada uma atividade frente a *E.*

coli e *S. aureus*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 1024 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente (Pereira *et al.*, 2017).

A atividade antifúngica da espécie foi avaliada por Silva-Rocha *et al.* (2015) que avaliaram se o extrato acetona:água das folhas interferia nos fatores de virulência de 48 isolados clínicos de *Candida albicans*. O extrato foi capaz de inibir a formação de hifa em meio líquido e em meio sólido e prejudicou a produção de enzimas hidrolíticas. O óleo essencial das folhas foi testado frente a cepas padrão de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* e os resultados de concentração inibitória de 50% (CI₅₀) variaram de 1892,47 a 12491,80 µg/mL, além disso o óleo inibiu a transição morfológica de *C. albicans* e *C. tropicalis* (Dos Santos *et al.*, 2018). *E. uniflora* ainda foi testada quanto a sua capacidade de inibição da formação de biofilme de espécies de *Candida* isoladas da cavidade oral de pacientes transplantados renais. O extrato acetona:água das folhas foi eficaz em reduzir a formação de biofilme tanto para *Candida albicans* quanto para *Candida não-albicans* (Souza, L. B. F. C. *et al.*, 2018).

E. uniflora ainda teve sua capacidade antiparasitária demonstrada frente a *Trypanosoma cruzi* (Santos *et al.*, 2012) e *Leishmania amazonensis* (Rodrigues *et al.*, 2013). O extrato etanólico das folhas demonstrou CI₅₀ de 62,76 µg/mL frente a *T. cruzi*. Já frente a *L. amazonensis*, o óleo essencial das folhas apresentou CI₅₀ de 3,04 µg/mL contra promastigotas e CI₅₀ de 1,92 µg/mL contra amastigotas.

3.5.3 Aspectos fitoquímicos

As diversas atividades biológicas relatadas para a espécie estão diretamente relacionadas com a composição fitoquímica desta espécie. Metabólitos secundários como derivados antracênicos, saponinas, derivados cinâmicos, taninos, flavonoides, triterpenos e óleos voláteis foram descritos nos diversos farmacógenos de *E. uniflora*. Dentre estes, destacam-se os flavonoides, taninos e triterpenoides (Da Cunha *et al.*, 2016; Garmus *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2017).

Rattmann *et al.* (2012) relataram a presença de dois compostos majoritários nas folhas de *E. uniflora*, identificados como miricetina-ramnosídeo e quercetina-ramnosídeo. Além destes, foram identificados outros 9 flavonoides glicosilados de miricetina ou quercetina. Samy *et al.* (2014) isolaram oito compostos das folhas de *E. uniflora*, entre eles três flavonoides (miricitrina, miricetina 3-O-(4"-O-galoil)-αL-ramnopiranosídeo e miricetina 3-O-β-D-glicopiranosídeo).

O estudo realizado por Da Cunha *et al.* (2016) no extrato etanólico das folhas de *E. uniflora* revelou a presença de ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, cianidina, delphinidina 3-O-glicosídeo, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina, kaempferol e luteolina.

No estudo desenvolvido por De Souza *et al.* (2017) os flavonoides também foram os compostos mais presentes nas folhas de *E. uniflora*, representando 18 dos 24 compostos identificados, principalmente glicosídeos derivados de quercetina e miricetina. Um resultado semelhante foi descrito por Sobeh *et al.* (2020), onde dos 22 metabólitos secundários identificados, 15 eram glicosídeos de miricetina e quercetina.

Bezerra *et al.* (2018) identificaram nas folhas de *E. uniflora* compostos das classes dos flavonoides e taninos, dentre os quais estavam o ácido gálico, o ácido elágico e a miricitrina. Souza, J. A. L. *et al.* (2018) também relataram a presença de ácido gálico e miricitrina neste farmacógeno.

3.6 *Cinnamomum verum*

3.6.1 Aspectos Gerais e botânicos

Cinnamomum verum J. Presl., no Brasil popularmente conhecida como “Canela”, “Canela-do-Ceilão” ou “Canela-verdadeira”, é uma árvore tropical perene de tamanho moderado nativa do Sri Lanka (Barbosa *et al.*, 2020; Ravindran; Babu; Shylaja, 2003; Sharma; Pathak, 2021). A espécie pertence à família Lauraceae, seu gênero, *Cinnamomum*, compreende cerca de 250 espécies no mundo, e no Brasil é representado por cerca de 18 espécies. Dentre elas encontra-se *Cinnamomum verum* J. Presl., que possui alguns sinônimos, sendo o mais descrito *C. zeylanicum* Blume (Lauraceae, 2020; Ramazani *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

A canela tem sido utilizada em uma variedade de aplicações culinárias e medicinais há milhares de anos, tendo sido empregada na mumificação pelos egípcios. A utilização da espécie como especiaria se expandiu durante os séculos XVI e XVII, quando comerciantes portugueses levaram a especiaria do Sri Lanka para a Europa, e seus produtos são usados até os dias atuais nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Gulcin *et al.*, 2019; Sharma; Pathak, 2021; Williams *et al.*, 2015).

Na medicina tradicional *C. verum* tem sido empregada principalmente no tratamento de problemas gastrointestinais como diarreia, enjoo, vômito e cólicas, além

disso, também há relatos do seu uso no tratamento de dor de dente, como antidiabético, anti-inflamatório, no resfriado e como estimulante na medicina ayurvédica (Barbosa *et al.*, 2020; Hameed; Altameme; Mohammed, 2016; Pandey; Chandra, 2015; Sharma; Pathak, 2021).

Quanto aos aspectos botânicos, a árvore de *C. verum* pode medir até 16 m de altura, ela possui uma casca lisa marrom, que possui cheiro forte e sabor picante e ardente. Seus ramos são delgados e compridos, com folhas opostas ou sub-opostas, glabras em ambas as superfícies, ovais, elípticas a lanceoladas-ovais ou estreitamente elípticas, com 11 a 16 cm. As lâminas foliares possuem 3 nervos principais proeminentes em ambas as superfícies, e cor branca esverdeada abaxialmente e verde e brilhante adaxialmente. O pecíolo mede cerca de 10 a 20 mm e é ligeiramente côncavo. Suas flores são verde-amareladas pálidas e seu fruto possui formato elipsoide a oblongo-ovoide, é roxo escuro e mede até 12,5 mm de comprimento (Chakraborty *et al.*, 2015; Ravindran; Babu; Shylaja, 2003).

Figura 2 - *Cinnamomum verum* J. Presl.



Fonte: Autoria própria.

3.6.2 Atividades farmacológicas

Os extratos aquoso e etanólico dos galhos foliares de *C. verum* demonstraram atividade antinociceptiva *in vivo* nos testes de imersão de cauda e contorções, chegando a ser mais eficazes que o controle positivo em algumas situações. Os autores também relataram atividade antioxidante *in vitro* para os extratos (Pandey; Chandra, 2015). A atividade antioxidante das folhas também foi mencionada por Qadir

et al. (2018), no mesmo artigo os autores relataram atividade anti-inflamatória *in vivo* em modelo animal de artrite reumatoide. A atividade antioxidante das folhas de *C. verum* ainda foi avaliada por meio de 8 métodos bioanalíticos *in vitro*, os extratos de *C. verum* se mostraram como potentes antioxidantes nos resultados apresentados (Gulcin *et al.*, 2019).

O óleo essencial das cascas de *C. verum* foi avaliado frente a *E. coli* (J53R1), e apresentou atividade bactericida e efeito sinérgico com o antibiótico piperacilina (Yap *et al.*, 2015). No estudo desenvolvido por Lima *et al.* (2021) extrato e frações das folhas foram testados frente a isolados clínicos das bactérias gram-positivas *Bacillus megaterium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*, e das bactérias gram-negativas *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* e *Serratia marcescens*. As bactérias gram-positivas foram mais sensíveis ao extrato e frações, já as bactérias gram-negativas foram mais resistentes, porém, a combinação da fração acetato de etila com os antibióticos sintéticos ampicilina, azitromicina, ciprofloxacina ou gentamicina proporcionaram um efeito sinérgico contra cepas multirresistentes.

A atividade antibacteriana do óleo das folhas e flores de *C. verum* foi avaliada frente a *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. enteritidis*. Os óleos foram capazes de inibir o crescimento microbiano nas várias cepas bacterianas testadas, sendo o óleo essencial da folha mais potente que o óleo das flores. Os autores ainda relataram um significativo potencial larvicida para os óleos, e, da mesma forma que foi para atividade antibacteriana, o óleo das folhas foi mais potente que o óleo das flores (Narayanankutty *et al.*, 2021).

O óleo essencial das cascas e folhas de *C. verum* foram avaliados quanto a seu potencial de inibir o crescimento, formação de biofilme e expressão gênica em quatro cepas de *E. coli* enterohemorrágica. Os resultados demonstraram CIM que variaram de 0,0075 a 0,175 %, sendo o óleo da casca mais ativo com CIM de 0,0075% em todas as linhagens, já o óleo da folha demonstrou eficácia intermediária, com CIM de 0,175% (v/v) em quase todas as linhagens. Além disso, os óleos também foram capazes de afetar a infectividade das cepas pois foram úteis em inibir fatores de virulência (Scotti *et al.*, 2021).

O potencial antifúngico do óleo das folhas de *C. verum* foi avaliado por Wijesinghe *et al.* (2020), os autores estudaram a inibição do crescimento, adesão, formação de biofilme e da formação do tubo germinativo em espécies do gênero *Candida*. O óleo reduziu 50% a adesão inicial de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* nas concentrações de 1,0, > 2,0 e 0,34 mg/mL, respectivamente. A formação do tubo germinativo foi inibida numa faixa de concentração entre 0,5 e 1,0 mg/mL. As concentrações de inibição de 50% da formação de biofilmes foram \leq 0,35 mg/mL e a concentração de 1,0 mg/mL preveniu a progressão do biofilme de *Candida* spp. A análise dos fungos por microscópio eletrônico de varredura demonstrou danos na parede celular, encolhimentos celulares e diminuição da formação de hifas.

Azeredo *et al.* (2014) avaliaram a atividade do óleo das cascas frente a epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O óleo foi eficaz contra epimastigotas de *T. cruzi* com CI_{50} de 24,13 μ g/mL, Frente a tripomastigotas metacíclicos e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* o óleo apresentou valores de IC_{50} de 5,05 μ g/mL e 20 μ g/mL, respectivamente.

Bellassoued *et al.* (2019) estudaram a atividade antioxidante *in vitro* e os efeitos protetores *in vivo* na toxicidade hepática e renal induzida por tetracloreto de carbono do óleo essencial das cascas de *C. verum*. O tetracloreto de carbono induziu um aumento nos parâmetros bioquímicos séricos e desencadeou estresse oxidativo no fígado e nos rins. Os resultados demonstraram que o tratamento com o óleo (100 mg/kg) preveniu tanto a formação de lesões quanto a toxicidade hepática e renal.

3.6.3 Aspectos fitoquímicos

Em relação aos aspectos fitoquímicos, *C. verum* possui grande diversidade de metabólitos secundários, sendo relatados na literatura científica compostos dos grupos dos alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonoides, terpenos e esteróis, quinonas, triterpenóides, fenilpropanoides, e proantocianidinas, destacando-se os compostos fenólicos como flavonoides e proantocianidinas, e os fenilpropanoides (Mahmood *et al.*, 2021; Williams *et al.*, 2015).

A análise do extrato e frações das cascas de *C. verum* por cromatografia líquida demonstrou como composto majoritário o trans-cinamaldeído, com teor de 7,8 g%, além deste foram identificados o ácido cinâmico e vários dímeros e trímeros de proantocianidinas (Williams *et al.*, 2015).

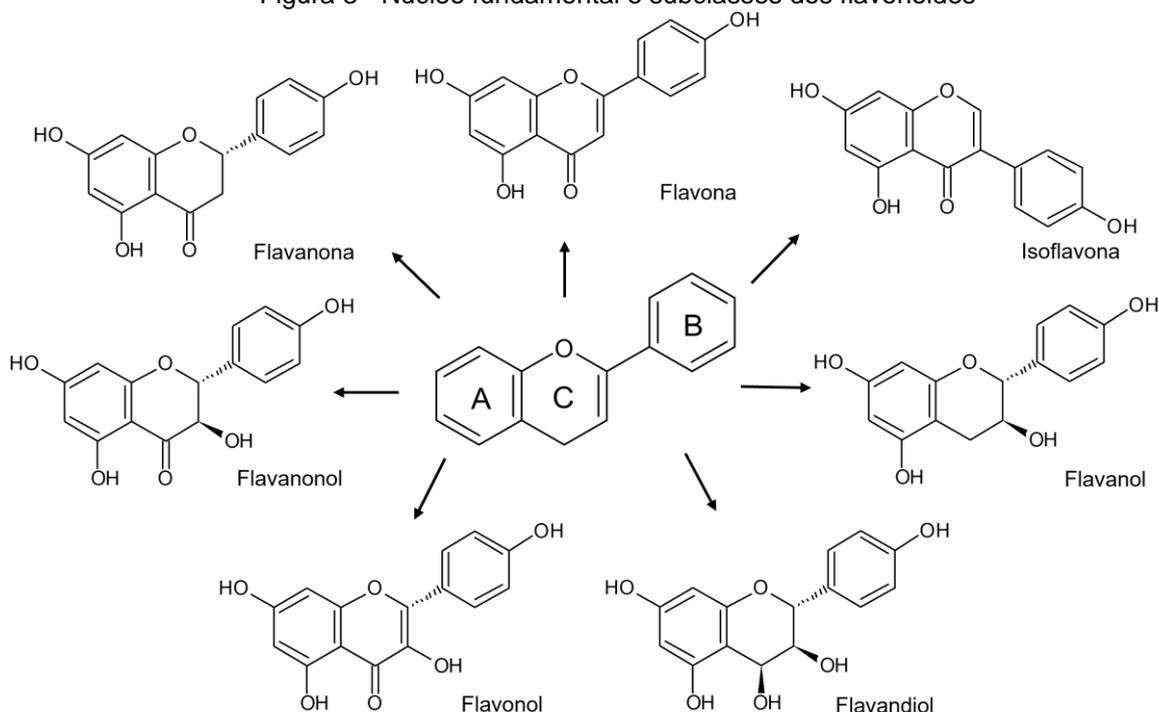
A análise dos fenólicos de extratos da casca de *C. verum* por cromatografia líquida evidenciou a presença de 25 compostos, e dentre eles estavam: ácido p-hidroxibenzóico, ácido p-cumárico, pirogalol, vanilina, ácido ferúlico e ácido cafeico (Gulcin *et al.*, 2019).

Lima *et al.* (2021) avaliaram o perfil fitoquímico das folhas de *C. verum* por cromatografia líquida, os resultados demonstraram a presença de derivados de catequinas e de 6 flavonoides, dentre eles a rutina.

3.7 FLAVONOIDES

Flavonoides são compostos fenólicos que fazem parte do metabolismo secundário de várias espécies de plantas medicinais. A sua biossíntese ocorre a partir das vias do ácido chiquímico e do acetato (Shen *et al.*, 2022). Quanto a sua estrutura, compostos deste grupo são formados em sua maioria por 15 átomos de carbono que juntos formam 3 anéis (C6-C3-C6), chamados de anéis A, B e C (Figura 3). De acordo com o estado de oxidação e grau de insaturação do anel heterocíclico central (anel C), os flavonoides podem ser classificados em algumas subclasses: Flavanona, Flavona, Isoflavona, Flavanonol, Flavanol, Flavandiol e Flavonol (Figura 3). Os sítios de grupamentos metil e hidroxila dos outros anéis podem possuir algumas outras modificações estruturais, como glicosilação e acilação. Quando possuem glicosilação são chamados de heterosídeos, que podem ser C-heterosídeos, quando o açúcar é ligado em um grupo metila, ou O-heterosídeos, quando o açúcar é ligado em uma hidroxila, quando não possuem glicosilação são chamados de agliconas ou geninas (Shen *et al.*, 2022; Zuanazzi; Montanha; Zucolotto, 2017).

Figura 3 - Núcleo fundamental e subclasses dos flavonoides



Fonte: Autoria própria.

Nas plantas, os flavonoides possuem variadas funções como coloração de flores e frutos, prevenção contra oxidação de gorduras, proteção contra raios UV, além de proteção contra bactérias e fungos (Shen *et al.*, 2022; Tuli, 2019). Quando ingeridos, estes compostos podem trazer diversos benefícios a saúde, como ação anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, antimutagênica, antienvhecimento, dentre outros (Shen *et al.*, 2022; Tuli, 2019; Zuanazzi; Montanha; Zucolotto, 2017).

Mesmo possuindo vários benefícios a saúde já estabelecidos, a biodisponibilidade dos flavonoides representa um desafio. Estes compostos em sua maioria apresentam baixa absorção e possuem instabilidade no pH gastrointestinal, onde são degradados ou tem suas estruturas modificadas (Kaushal; Singh; Singh Sangwan, 2022).

A determinação de flavonoides pode ser realizada por algumas técnicas analíticas, principalmente técnicas espectrofotométricas e técnicas cromatográficas. Quanto as técnicas espectrofotométricas, os flavonoides têm capacidade de absorver radiação ultravioleta, dessa forma, podem ser detectados diretamente por irradiação UV, ou após complexação com cloreto de alumínio, que desloca sua absorção para a região visível. No que diz respeito as técnicas cromatográficas, elas têm sido usadas sob diversas formas na determinação de flavonoides, como cromatografia em camada

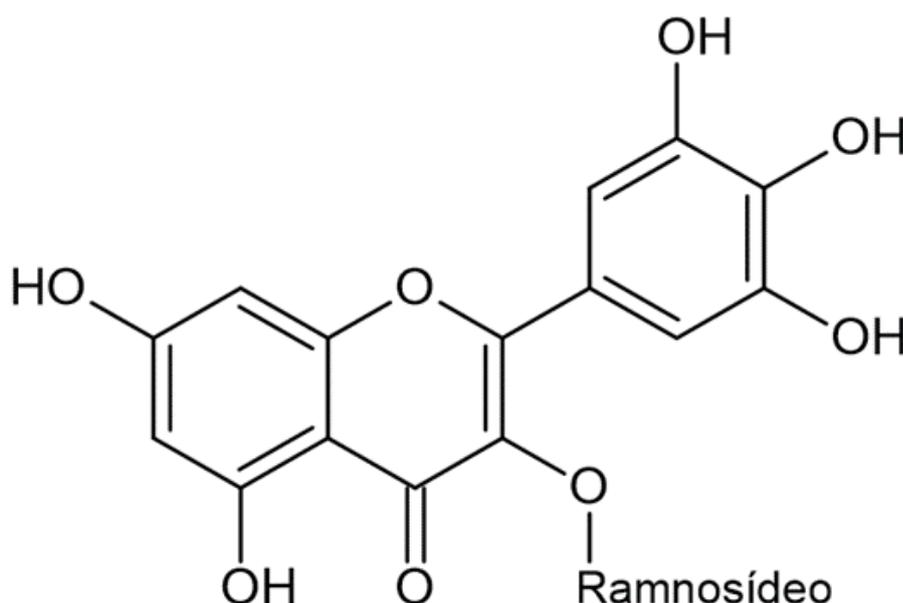
delgada, cromatografia em coluna, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência, sendo as duas últimas as mais sensíveis e seletivas (Sammani; Clavijo; Cerdà, 2021).

Considerando algumas vantagens dos flavonoides, como abundância no reino vegetal, sua especificidade em algumas espécies e sua facilidade de identificação e quantificação, estes compostos podem ser utilizados como marcadores taxonômicos de várias espécies (Zuanazzi; Montanha; Zucolotto, 2017). No caso das espécies *Eugenia uniflora* e *Cinnamomum verum*, ambas possuem flavonoides que podem ser utilizados como marcadores, miricitrina e rutina, respectivamente (Lima *et al.*, 2021; Rattmann *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2022; Sobeh *et al.*, 2019).

3.7.1 Miricitrina

A miricitrina é um flavonoide glicosilado, que faz parte da classe dos flavonóis. Além de miricitrina, este metabólito também é denominado miricetina-3-O-ramnosídeo (Domitrovic *et al.*, 2015; Hobbs *et al.*, 2015). Sua estrutura química é composta pela combinação do flavonol miricetina ligada a uma molécula de ramnosídeo na posição 3 do anel C (Figura 4) (Man *et al.*, 2019).

Figura 4 - Estrutura química da Miricitrina.



Fonte: Autoria própria.

Quanto as características físico-químicas, a miricitrina apresenta-se como um pó amarelo claro, com massa molar de 464,4 g/mol, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em água (NCBI). Sua baixa solubilidade em água compromete sua biodisponibilidade, e o composto geralmente é absorvido na forma de miricetina, após hidrólise do glicosídeo no intestino delgado (Hobbs *et al.*, 2015; Weng *et al.*, 2019).

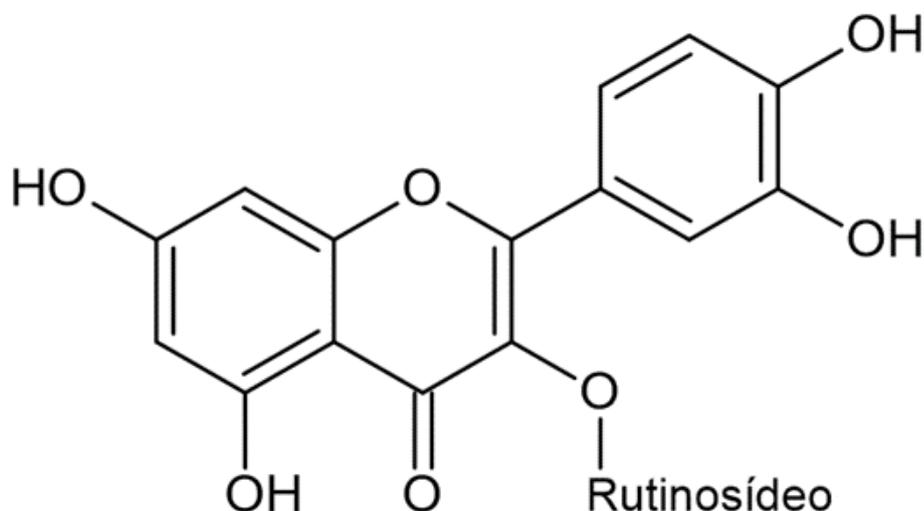
Uma série de atividades biológicas são relatadas na literatura para a miricitrina, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e hepatoprotetora (Domitrovic *et al.*, 2015), atividade cicatrizante (Elloumi *et al.*, 2022), efeito antitrombótico (He *et al.*, 2019), efeito protetor na osteoartrite (Yan *et al.*, 2020), atividade cardioprotetora (Qin *et al.*, 2015), dentre outras atividades.

3.7.2 Rutina

A rutina é um flavonoide glicosilado da classe dos flavonóis, também denominada rutosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo ou vitamina P, que é abundantemente encontrada em espécies medicinais (Ganeshpurkar; Saluja, 2017; Semwal *et al.*, 2021). O nome 'rutina' é derivado da espécie *Ruta graveolens* que possui o flavonoide em suas partes aéreas (Ganeshpurkar; Saluja, 2017; Mahood, 2021; Prasad; Prasad, 2019).

Quanto a sua estrutura química, a rutina é formada pelo flavonol quercetina ligado a um dissacarídeo, denominado rutinosídeo, formado por uma molécula de ramnose e uma molécula de glicose, na posição 3 do anel C (Figura 5) (Ganeshpurkar; Saluja, 2017; Ma *et al.*, 2022; Prasad; Prasad, 2019).

Figura 5 - Estrutura química da Rutina.



Fonte: Autoria própria.

Em relação as características físico-químicas, é um pó cristalino amarelo, com massa molar de 610,521 g/mol, ponto de fusão de 125 °C, pKa de 6,17 e solubilidade em água de 12,5 mg/100mL (Gullón *et al.*, 2017; Prasad; Prasad, 2019; Semwal *et al.*, 2021). Esta baixa solubilidade em água, somada a sua baixa estabilidade e limitada permeabilidade membranar, está associada com a baixa biodisponibilidade da rutina, que representa uma das principais desvantagens associadas a este metabólito secundário (Gullón *et al.*, 2017; Mel; Gunathilake; Fernando, 2020).

Alguns estudos têm associado uma série de atividades biológicas a rutina, como atividade gastroprotetora (Abdel-Raheem, 2010), atividade antinociceptiva (Selvaraj *et al.*, 2014), efeito hepatoprotetor (Khan; Khan; Sahreen, 2012), atividade antitumoral (Alonso-Castro; Dominguez; Garcia-Carranca, 2013), atividade antioxidante (Yang; Guo; Yuan, 2008), atividade anti-inflamatória (Torres-Rego *et al.*, 2016), dentre outras. Este potencial farmacológico foi associado aos quatro grupos hidroxila, bem como ao grupo glicosídico ligado na posição 3 do anel C (Semwal *et al.*, 2021).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Obtenção, identificação e tratamento do material vegetal

As folhas de *Eugenia uniflora* e *Cinnamomum verum* foram coletadas em Recife-PE, em janeiro de 2021, identificadas no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob números de registro 93732 e 93900, e cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen) sob os números A449575 e AFF07B4 respectivamente. Posteriormente, as amostras vegetais foram secas em estufa de ar circulante (Lucadema®) por 72 h a temperatura de 45 °C. As matérias-primas vegetais secas foram trituradas em moinho de facas (TE-680, Tecnal®) e caracterizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª ed (Anvisa, 2019b).

4.1.2 Caracterização dos materiais vegetais

Determinação da granulometria por tamisação

Foram pesados cerca de 25 g dos pós, que foram submetidos a passagem por tamises, previamente tarados, com aberturas de malha correspondentes a 850, 600, 425, 300, 250, 150 µm e a base. O processo ocorreu em tamisador (Tamisador Bertel®) por 15 minutos. Os tamises, com cada material vegetal, foram pesados e o tamanho médio das partículas foi determinado por meio da análise de histograma de distribuição e curvas de retenção e passagem. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação de matéria estranha

Através do processo de quarteamento, foram obtidos cerca de 5 g das drogas vegetais. O material estranho foi separado e pesado para determinação da porcentagem de matéria estranha presente em cada droga vegetal. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação de perca por dessecação

Cerca de 2 g das drogas vegetais foram pesadas em pratos de alumínio e levadas a balança de infravermelho (Série ID V.18, Marte®), as análises foram realizadas à $105 \pm 5^\circ\text{C}$, até que o resultado apresentasse uma variação menor que 0,02% por 30 segundos. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação de cinzas totais

Foram pesados cerca de 2 g das drogas vegetais, as amostras foram transferidas para cadinhos previamente dessecados e pesados. Os cadinhos foram levados à mufla onde foram submetidos ao seguinte gradiente de temperatura: 200°C por 30 minutos, 400°C por 1 h e 600°C por 1:30 h. Os cadinhos foram retirados e resfriados em estufa à 100°C por 15 min e em dessecador à temperatura ambiente por mais 15 min. Os cadinhos foram pesados e retornaram à mufla por mais 1 h à 600°C , após decorrido o tempo, foram resfriados da mesma forma, primeiro em estufa e depois em dessecador, e pesados. O procedimento foi novamente realizado até peso constante. As análises foram realizadas em triplicata e os cálculos de teor de cinzas para cada droga vegetal foram realizados segundo a fórmula abaixo:

$$CT = \frac{P2 - P1}{Pa} \times 100$$

Onde: CT = Teor de cinzas totais, P2 = peso do cadinho e amostra após incineração, P1 = peso do cadinho vazio e Pa = peso da amostra.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO

4.2.1 Avaliação da quantidade de droga vegetal

Foi realizada uma análise univariada da quantidade de droga vegetal para otimizar a extração de flavonoides por turbólise das espécies *E. uniflora* e *C. verum*. Foram utilizadas as quantidades de droga de 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, e 15,0 g, e 100 mL

de solvente. O solvente utilizado na extração foi etanol 80%, a escolha foi baseada nos estudos de Ramos *et al.* (2017) e Barbosa *et al.* (2020). A extração foi realizada por turbólise, realizando 4 ciclos de 30 seg de agitação e 4 min de repouso. Os extratos foram avaliados quanto ao teor de flavonoides totais (TFT), resíduo seco e eficiência de extração.

Teor de Flavonoides Totais

Na análise do TFT de *E. uniflora* foi utilizada uma alíquota de 0,2 mL para balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 3 mL de AlCl_3 5% e o volume do balão foi aferido com etanol 80%. A solução de compensação foi obtida sem adição do AlCl_3 . Após 20 minutos de reação, uma varredura (200–500 nm) foi realizada em espectrofotômetro (Evolution 60S, Thermo Scientific®). A escolha da concentração de AlCl_3 e do tempo de reação foi baseada no artigo de Ramos *et al.* (2017).

O TFT de *C. verum* foi analisado utilizando uma alíquota de 2 mL também para balão volumétrico de 25 mL, foram adicionados 3 mL de AlCl_3 2,5%, o volume foi aferido com etanol 80% e após 35 minutos de reação uma varredura (200–500 nm) foi realizada em espectrofotômetro (Evolution 60S, Thermo Scientific®). A solução de compensação foi obtida sem adição do AlCl_3 .

O TFT dos extratos foi calculado com base na fórmula:

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

Onde: A – Absorbância; FD – Fator de diluição; m – Massa usada no preparo do extrato e $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ - Absorbância específica da rutina (259,40).

Resíduo seco

O resíduo seco foi determinado em balança de infravermelho (Série ID – V.18, Marte®), à temperatura de 130 ± 2 °C. O resíduo foi expresso em percentual pela média das análises realizadas em triplicata para cada solução extrativa.

Eficiência de extração

A eficiência de extração foi expressa pela razão entre o TFT e o resíduo seco, de acordo com a equação abaixo:

$$EE = \text{TFT}/\text{RS}$$

Onde: EE – eficiência da extração; TFT – teor de flavonoides totais; RS – resíduo seco.

Análise estatística

Para a análise estatística, inicialmente foi encontrado o intervalo de confiança (95%, bilateral) para a média dos TFTs dos extratos com diferentes quantidades de droga vegetal de cada espécie vegetal. Determinou-se os TFTs dos extratos que estavam acima desse intervalo de confiança, e assim foi possível escolher qual quantidade de droga vegetal é ideal para a realização dos extratos.

4.2.2 Obtenção dos extratos brutos

Os extratos brutos das espécies, *E. uniflora* e *C. verum* foram obtidas pelo método de turbólise, realizando 4 ciclos de 30 seg de agitação e 4 min de repouso. A proporção droga/solvente, foi de 5% (m/v) e o etanol 80% foi utilizado como solvente extrator para ambas as espécies. As soluções extrativas foram concentradas em rotaevaporador (RV-10 Basic, IKA®) sob pressão reduzida à 40 °C, com a finalidade de eliminar o solvente orgânico.

4.2.3 Secagem por aspersão

Os extratos foram submetidos à secagem por aspersão em mini spray dryer (MSDi, Labmaq®) para obtenção dos extratos secos por aspersão (ESA). As condições de secagem foram 140 °C de temperatura de entrada e fluxo de 0,6 L/h, para *E. uniflora*, e, 0,4 L/h para *C. verum*. Para determinar o rendimento da secagem, o resíduo seco do extrato foi determinado em balança de infravermelho (Série ID V.18, Marte®), e as fórmulas abaixo foram utilizadas para o cálculo:

$$\text{Rendimento teórico (g)} = \frac{\text{Resíduo seco} \times \text{Quantidade de extrato seca (mL)}}{100}$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Peso do extrato seco (g)} \times 100}{\text{Rendimento teórico}}$$

4.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Os extratos secos foram submetidos à cromatografia em camada delgada com auxílio de sistema de aplicação semi-automático (Camag[®]), controlado por programa computacional (WinCats[®]). As soluções amostra foram preparadas na concentração de 3 mg/mL em metanol. Após aplicação, as placas foram eluídas em câmara apropriada, utilizando como fase móvel a mistura de acetato de etila: ácido fórmico: água na proporção de 90:5:5. Após secagem a temperatura ambiente, as placas foram derivatizadas utilizando NEU + PEG (difenilboriloxietilamina 1,0% (v/v) em metanol, seguida de solução etanólica de polietilenoglicol 4000 (5,0% v/v)), sendo observadas sob luz ultravioleta a 365 nm. As placas foram digitalizadas com auxílio de fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System[®] (Modelo 125, USA) com Software UVP[®] e câmera Canon[®] (Rebel T3, EOS 1100D).

4.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

4.4.1 *Eugenia uniflora*

Bezerra *et al.* (2018) desenvolveram um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para *E. uniflora*, os autores confirmaram a adequabilidade do método para análise da matéria prima vegetal, do extrato bruto e frações da espécie. Dessa forma, seguindo a metodologia proposta, a análise por CLAE foi realizada para o ESA obtido e está descrita abaixo.

4.4.1.1 Preparo da amostra

Inicialmente foram pesados 10 mg do ESA para balão volumétrico de 5 mL, os quais foram solubilizados com etanol 80% e levados à banho de ultrassom por 3 min para completa solubilização, obtendo-se assim uma solução inicial de 2 mg/mL. Desta solução inicial, foram transferidos 1,25 mL para balão volumétrico de 5 mL, e o volume foi ajustado com água, obtendo uma solução de 500 µg/mL. A solução resultante foi filtrada em membrana filtrante PVDF (0,45 µm) para posterior injeção.

4.4.1.2 Condições analíticas

A análise foi realizada em um sistema Ultimate 3000, Thermo Scientific®, equipado com um degaseificador, detector tipo DAD, um injetor automático com um loop de 20 µL e coluna Supelco® HS (C₁₈; 25 cm × 4,60 mm; 5 µm) equipada com uma pré-coluna de mesma composição. Os dados foram adquiridos com o software Chromeleon®. As fases móveis A e B foram água ultrapura (Purelab Classic UV, Elga®) e metanol grau HPLC (LiChrosolv®), respectivamente, acidificadas com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA), e o gradiente de eluição: 0 min: 10% B; 10 min: 25% B; 15 min: 40% B; 25 min: 75% B; 30 min: 75% B; 31 min: 10% B, utilizando 0,8 mL/min como fluxo, com volume de injeção da amostra de 20 µL e detecção nos comprimentos de onda de 210, 254, 270 e 340 nm.

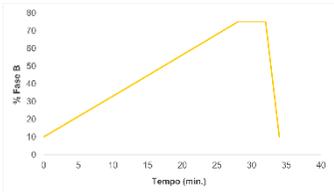
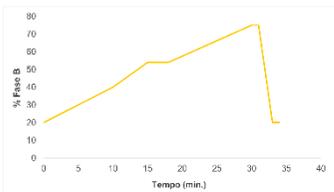
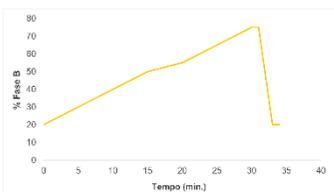
4.4.2 *Cinnamomum verum*

4.4.2.1 Desenvolvimento do método

A fim de avaliar a composição fitoquímica da matéria prima vegetal de *C. verum*, bem como analisar o ESA obtido a partir desta matéria prima, um método analítico por CLAE-DAD foi desenvolvido. O desenvolvimento foi realizado em um sistema Ultimate 3000, Thermo Scientific®, equipado com um degaseificador, detector tipo DAD, um injetor automático com um loop de 20 µL e coluna Supelco® HS (C₁₈; 25 cm × 4,60 mm; 5 µm) equipada com uma pré-coluna de mesma composição. Os dados foram adquiridos com o software Chromeleon®. As fases móveis testadas foram água (A), metanol (B) e acetonitrila (B), acidificadas ou não com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA), os diferentes gradientes testados estão descritos no quadro 1. Os fluxos testados variaram de 0,7 a 0,9 mL/min, e o volume de injeção foi fixado em 20 µL.

Quadro 1 - Gradientes de eluição e fases móveis testadas no desenvolvimento do método analítico por CLAE para análise dos produtos de *C. verum*.

Método	Fases Móveis	Gradiente	Gradiente
1	Água 0,05% TFA (A) e Metanol (B)	0 min: 20% B; 10 min: 40% B; 30 min: 75% B; 31 min: 75% B; 33 min: 20% B; 34 min: 20% B	
2	Água 0,05% TFA (A) e Metanol 0,05% TFA (B)	0 min: 20% B; 10 min: 40% B; 30 min: 75% B; 31 min: 75% B; 33 min: 20% B; 34 min: 20% B	
3		0 min: 10% B; 13 min: 40% B; 30 min: 75% B; 32 min: 75% B; 36 min: 10% B	
4		0 min: 10% B; 13 min: 40% B; 30 min: 65% B; 34 min: 75% B; 36 min: 10% B	
5		0 min: 10% B; 13 min: 40% B; 30 min: 65% B; 32 min: 75% B; 34 min: 75% B; 36 min: 10% B	

6		0 min: 10% B; 13 min: 40% B; 28 min: 75% B; 32 min: 75% B; 34 min: 10% B	
7		0 min: 10% B; 13 min: 45% B; 30 min: 65% B; 32 min: 75% B; 34 min: 75% B; 36 min: 10% B	
8		0 min: 10% B; 13 min: 40% B; 28 min: 60% B; 32 min: 75% B; 36 min: 10% B	
9		0 min: 20% B; 10 min: 40% B; 15 min: 54% B; 18 min: 54%B 30 min: 75% B; 31 min: 75% B; 33 min: 20% B; 34 min: 20% B	
10		0 min: 20% B; 10 min: 40% B; 15 min: 50% B; 20 min: 55%B 30 min: 75% B; 31 min: 75% B; 33 min: 20% B; 34 min: 20% B	

11	Água 0,05% TFA (A) e Acetonitrila 0,05% TFA (B)	0 min: 30% B; 10 min: 40% B; 18 min: 50% B; 20 min: 54%B 30 min: 75% B; 31 min: 75% B; 33 min: 30% B; 34 min: 30% B	
12		0 min: 20% B; 5 min: 30% B; 10 min: 40% B; 18 min: 50% B; 20 min: 54% B; 30 min: 75% B; 31 min: 75% B; 33 min: 20% B; 34 min: 20% B	
13		0 min: 10% B; 15 min: 30% B; 20 min: 40% B; 32 min: 75% B; 36 min: 10% B	
14		0 min: 10% B; 15 min: 30% B; 20 min: 40% B; 32 min: 75% B; 36 min: 10% B	
15		0 min: 10% B; 15 min: 30% B; 20 min: 40% B; 35 min: 75% B; 38 min: 10% B	

Fonte: Autoria própria.

O método escolhido para análise dos produtos de *C. verum* foi o método de número 15, utilizando um fluxo de 0,9 mL/min e detecção nos comprimentos de onda de 210, 254, 270 e 350 nm.

4.4.2.2 Análise da matéria-prima vegetal

A matéria-prima vegetal foi extraída de acordo com a metodologia proposta por Barbosa *et al.* (2020), utilizando 0,75 g e etanol 80%. Inicialmente a MPV foi pesada e transferida para balão de fundo redondo de 125 mL, adicionados 30 mL de solvente ao balão, que foi submetido à extração sob refluxo em banho-maria à 85 ± 3 °C por 30 min. O extrato foi filtrado para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de algodão. Ao final, o algodão e resíduo da filtração foram devolvidos para o balão de fundo redondo e adicionados 30 mL de solvente para nova extração por mais 15 minutos. O processo foi repetido mais uma vez, e, ao final o balão volumétrico foi aferido com o líquido extrator, constituindo a solução extrativa da MPV.

O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador (RV-10 Basic, IKA®) sob pressão reduzida à 40 °C, com a finalidade de eliminar o solvente orgânico. O volume foi reestabelecido com água destilada. Da solução resultante, 3 mL foram transferidos para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi ajustado com água ultrapura. A solução foi filtrada em membrana filtrante NYLON (0,45 µm) para posterior injeção.

4.4.2.3 Análise do ESA

Inicialmente foram pesados 20 mg do ESA para balão volumétrico de 10 mL, os quais foram solubilizados com água ultrapura e levados à banho de ultrassom por 3 min para completa solubilização, obtendo-se assim uma solução 2 mg/mL. Foram transferidos 2,5 mL desta solução para balão volumétrico de 5 mL, o volume foi ajustado com metanol 50%. A solução foi filtrada em membrana filtrante NYLON (0,45 µm) para posterior injeção.

4.5 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

As condições gerais para o estudo de degradação forçada foram escolhidas com base nos guias do ICH (ICH e em resoluções da Anvisa (Anvisa, 2015b; 2019c),

as condições específicas do estudo, como concentração dos agentes degradantes e tempo de exposição, foram baseadas no estudo de Singh e Bakshi (2000) e estão descritas abaixo.

4.5.1 *Eugenia uniflora*

Hidrólise Básica

Para avaliar a sensibilidade do extrato à hidrólise básica, 30 mg do ESA foram pesados para frasco de vidro e foram adicionados 3 mL da solução degradante de Hidróxido de sódio (NaOH) à 0,01 M. Após 24 h de exposição, foram adicionados 3 mL de ácido clorídrico (HCl) à 0,01 M a fim de neutralizar. A amostra foi congelada e liofilizada (L101, Liotop®). O preparo da amostra para análise por CLAE seguiu o item 4.4.1.1.

Hidrólise Ácida

A sensibilidade do extrato à hidrólise ácida foi avaliada através da exposição do ESA a HCl à 0,1M por 24 h. 30 mg do ESA foram pesados para frasco de vidro e foram adicionados 3 mL da solução degradante de HCl à 0,1 M. Após 24 h de exposição, foram adicionados 3 mL de NaOH à 0,1 M a fim de neutralizar. A amostra foi congelada e liofilizada (L101, Liotop®). O preparo da amostra para análise por CLAE seguiu o item 4.4.1.1.

Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi analisado a partir da exposição do ESA a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% por 24 h. Foram pesados 20 mg do ESA para balão volumétrico de 10 mL e foram adicionados 2 mL da solução degradante, após 24 h de exposição, adicionou-se etanol 80% ao balão, e este foi levado à banho de ultrassom por 3 min; após decorrido o tempo, o volume foi aferido com etanol 80%, obtendo-se assim a solução inicial de 2 mg/mL. Foram transferidos 1,75 mL desta solução para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi aferido com água ultrapura, esta solução foi filtrada em membrana filtrante PVDF (0,45 µm) e injetada no cromatógrafo.

Estresse Térmico

Para análise do estresse térmico, foram pesados 30 mg do ESA, que foram espalhados em uma camada fina em cápsula de porcelana, o ESA foi submetido a aquecimento de 75 ± 5 °C por 24 h. A amostra degradada foi preparada e analisada por CLAE conforme item 4.4.1.1.

Estresse Fotolítico

Para análise do estresse fotolítico, o ESA foi submetido à degradação em câmara de fotoestabilidade (Ethik®). Foram pesados 50 mg do ESA, que foram espalhados em uma camada fina em cápsula de porcelana, a amostra foi exposta à 3,6 milhões lux.h (visível) e 600 watt.h/m² (ultravioleta), exposição 3 vezes maior que o preconizado no guia de estudo de fotoestabilidade Q1B do ICH (ICH, 1996). A amostra degradada foi preparada e analisada por CLAE conforme item 4.4.1.1.

4.5.2 Miricitrina

O estudo de degradação forçada no padrão miricitrina foi realizada com o padrão em solução, para isso, pesou-se 2,5 mg do padrão para balão volumétrico de 5 mL, adicionou-se metanol ao balão, que foi levado a banho de ultrassom até completa dissolução. Posteriormente, o volume do balão foi aferido com metanol, obtendo-se uma solução estoque com concentração de 0,5 mg/mL. Esta solução foi utilizada para realização das etapas posteriores do estudo de degradação forçada.

Hidrólise Básica

A sensibilidade do padrão miricitrina à hidrólise básica foi avaliada a partir da adição de 300 µL da solução estoque do padrão a balão volumétrico de 10 mL, onde foram adicionados 0,5 mL da solução degradante de Hidróxido de sódio (NaOH) à 0,01 M. Após 24 h de exposição, foram adicionados 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) à 0,01 M a fim de neutralizar. O volume foi aferido com etanol 50%, a solução foi filtrada em membrana filtrante PVDF (0,45 µm) para vial e injetada no cromatógrafo.

Hidrólise Ácida

Para avaliação da sensibilidade do padrão miricitrina à hidrólise ácida, 300 µL da solução estoque do padrão foi adicionada em balão volumétrico de 10 mL, onde foram acrescentados 0,5 mL da solução de HCl à 0,1 M, a exposição ocorreu durante 24 h. Decorrido o tempo, foram adicionados 0,5 mL de NaOH à 0,1 M a fim de neutralizar. O volume foi aferido com etanol 50%, a solução foi filtrada em membrana filtrante PVDF (0,45 µm) para vial e injetada no cromatógrafo.

Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi analisado a partir da exposição do padrão miricitrina a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% por 24 h. Foram adicionados 300 µL da solução estoque do padrão para balão volumétrico de 10 mL e foram adicionados 0,5 mL da solução degradante, após 24 h de exposição, adicionou-se etanol 50% ao balão, o volume foi aferido e esta solução foi filtrada em membrana filtrante PVDF (0,45 µm) para vial e injetada no cromatógrafo.

Estresse Térmico

Para análise do estresse térmico, foram adicionados 300 µL da solução estoque do padrão em um balão volumétrico de 10 mL, este foi submetido a aquecimento de 75 ± 5 °C por 24 h. O volume do balão foi aferido com etanol 50%, a solução foi filtrada em membrana filtrante PVDF (0,45 µm) para vial e injetada no cromatógrafo.

Estresse Fotolítico

A sensibilidade fotolítica foi avaliada a partir da exposição de 300 µL da solução estoque do padrão em um balão volumétrico de 10mL em câmara de fotoestabilidade (Ethik®). A amostra foi exposta à 3,6 milhões lux.h (visível) e 600 watt.h/m² (ultravioleta), exposição 3 vezes maior que o preconizado no guia de estudo de fotoestabilidade Q1B do ICH (ICH, 1996). Após a exposição, o volume do balão

volumétrico foi aferido com etanol 50%, a solução foi filtrada em membrana filtrante PVDF (0,45 µm) para vial e injetada no cromatógrafo.

4.5.3 *Cinnamomum verum*

Hidrólise Básica

A sensibilidade do extrato à hidrólise básica foi avaliada pesando-se 30 mg do ESA para frasco de vidro onde foram adicionados 3 mL da solução degradante de Hidróxido de sódio (NaOH) à 0,001 M. Após 24 h de exposição, foram adicionados 3 mL de ácido clorídrico (HCl) à 0,001 M a fim de neutralizar. A amostra foi congelada e liofilizada (L101, Liotop®). O preparo da amostra para análise por CLAE seguiu o item 4.4.2.3.

Hidrólise Ácida

Para avaliar a sensibilidade do extrato à hidrólise ácida, 30 mg do ESA foram pesados para frasco de vidro e foram adicionados 3 mL da solução degradante de Ácido clorídrico (HCl) à 0,01 M. Após 24 h de exposição, foram adicionados 3 mL de hidróxido de sódio (NaOH) à 0,01 M a fim de neutralizar. A amostra foi congelada e liofilizada (L101, Liotop®). O preparo da amostra para análise por CLAE seguiu o item 4.4.2.3.

Estresse Oxidativo

Para análise do estresse oxidativo, o ESA foi exposto a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% por 24 h. Foram pesados 20 mg do ESA para balão volumétrico de 10 mL e foram adicionados 2 mL da solução degradante, após 24 h de exposição, adicionou-se água ultrapura ao balão, e este foi levado à banho de ultrassom por 3 min, após decorrido o tempo, o volume foi aferido com água ultrapura, obtendo-se assim a solução inicial de 2 mg/mL. Foram transferidos 1,75 mL desta solução para balão volumétrico de 5 mL e o volume foi aferido com metanol 50%, esta solução foi filtrada em membrana filtrante NYON (0,45 µm) e injetada no cromatógrafo.

Estresse Térmico

A sensibilidade térmica foi analisada pesando-se 30 mg do ESA, que foram espalhados em uma camada fina em cápsula de porcelana, e o submetendo a aquecimento de 75 ± 5 °C por 24 h. A amostra degradada foi preparada e analisada por CLAE conforme item 4.4.2.3.

Estresse Fotolítico

Para análise do estresse fotolítico, o ESA foi submetido à degradação em câmara de fotoestabilidade (Ethik®). Foram pesados 50 mg do ESA, que foram espalhados em uma camada fina em cápsula de porcelana, a amostra foi exposta à 3,6 milhões lux.h (visível) e 600 watt.h/m² (ultravioleta), exposição 3 vezes maior que o preconizado no guia de estudo de fotoestabilidade Q1B do ICH (ICH, 1996). A amostra degradada foi preparada e analisada por CLAE conforme item 4.4.2.3.

4.6 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

4.6.1 *Eugenia uniflora*

A fim de aplicar o método validado por Bezerra *et al.* (2018) na análise do extrato seco de *E. uniflora*, bem como avaliar se o método pode ser utilizado como indicativo de estabilidade do marcador, o flavonoide miricitrina, realizou-se uma validação parcial, de acordo com o preconizado na RDC 166 de 2017 da Anvisa (Anvisa, 2017b).

Curva analítica do padrão miricitrina

Inicialmente foi realizada uma solução estoque a 0,5 mg/mL do padrão miricitrina em metanol, desta solução estoque, alíquotas de 240, 270, 300, 330 e 360 µL, foram transferidas para balões de 10 mL, o volume foi aferido com etanol 50%, obtendo-se assim soluções de 12, 13,5, 15, 16,5 e 18 µg/mL, de acordo com a faixa de concentração de 80, 90, 100, 110 e 120%.

Precisão

A precisão do método foi avaliada a partir da análise da repetibilidade, ou precisão intracorrída, e da precisão intermediária, ou precisão intercorrída.

- a) **Repetibilidade:** Para avaliação da repetibilidade, foram preparadas seis amostras independentes, pelo mesmo operador, no mesmo dia, na concentração de 500 µg/mL, como descrito no item 4.4.1.1. As amostras foram injetadas, em uma única corrida analítica, e o teor de miricitrina foi obtido a partir da curva de calibração obtida para o padrão. Os resultados foram expressos em média, desvio padrão e desvio padrão relativo.
- b) **Precisão intermediária:** A precisão intermediária foi avaliada a partir da análise de três amostras preparadas independentemente por 2 operadores diferentes em 2 dias diferentes, a preparação das amostras seguiu o procedimento descrito no item 4.4.1.1, e os resultados foram expressos em média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir do ensaio de recuperação, onde quantidades conhecidas do padrão miricitrina, correspondentes as concentrações de 80, 100 e 120% da curva analítica, foram adicionadas a soluções amostra (500 µg/mL). As amostras foram preparadas como descrito no item 4.4.1.1, injetadas em triplicata, e o percentual de recuperação foi calculado a partir da equação abaixo:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Seletividade

Para avaliação da seletividade do método, foi verificada a pureza do pico cromatográfico da miricitrina no ESA antes de ser degradado e após as degradações por hidrólise ácida, hidrólise básica, degradação oxidativa, térmica e fotolítica. As

amostras foram preparadas como descrito nos testes de degradação forçada (item 4.5.1). O estudo da seletividade também envolveu a verificação da semelhança dos espectros de absorção na base, meio e ápice do pico cromatográfico da miricitrina nas amostras.

4.6.2 *Cinamomum verum*

Visando verificar a adequabilidade do método desenvolvido na análise dos metabólitos secundários presentes na matéria prima vegetal de *C. verum*, bem como aplicar o método proposto na análise do ESA obtido, realizou-se a validação analítica do método para a MPV e uma validação parcial para o ESA.

4.6.2.1 Validação para matéria-prima vegetal

Linearidade

- a) **Curva analítica do padrão rotina:** Inicialmente foi realizada uma solução do padrão a 1 mg/mL em metanol, desta, uma série de diluição foi realizada, a fim de se obter soluções de concentração 2,40, 3,20, 4,00, 4,80 e 5,60 µg/mL para obtenção a curva analítica.
- b) **Curva analítica da matéria prima de *C. verum*:** A curva analítica para a matéria prima de *C. verum* foi realizada a partir de uma série de diluições da solução extrativa, 2,40, 2,70, 3,00, 3,30 e 3,60 mL para balão volumétrico de 5 mL, de acordo com a faixa de concentração de 80, 90, 100, 110 e 120%.

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada a partir da análise dos espectros de absorção na base, no meio e no ápice do pico cromatográfico da rutina e através da análise da pureza deste pico. A amostra analisada foi preparada de acordo com o descrito no item 4.4.2.2.

Efeito Matriz

A análise do efeito matriz foi realizada através da comparação dos coeficientes angulares da curva analítica do padrão e da curva da amostra fortificada com o padrão. Para isso, soluções contendo 100% da concentração de trabalho da amostra foram fortificadas com quantidades conhecidas de padrão, 2,40, 3,20, 4,00, 4,80 e 5,60 µg/mL, correspondentes as mesmas concentrações utilizadas na sua curva de linearidade. As amostras foram injetadas em triplicata e o paralelismo das retas foi avaliado por meio de análise do teste F de Snedecor e do teste t.

Precisão

A avaliação da precisão do método envolveu a análise da repetibilidade, ou precisão intracorrída, e da precisão intermediária, ou precisão intercorrída.

- a) **Repetibilidade:** O ensaio de repetibilidade foi desenvolvido a partir da análise, em uma única corrida analítica, de seis amostras preparadas individualmente, pelo mesmo operador, no mesmo dia, na concentração de 4,5 mg/mL (100%). As amostras foram preparadas seguindo o que está descrito no item 4.4.2.2, os teores foram calculados de acordo com a curva analítica do padrão rotina, e os resultados foram expressos em média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

- b) **Precisão intermediária:** A precisão intermediária foi realizada através da análise de três amostras, preparadas por dois operadores diferentes, em dois dias diferentes, na concentração de 4,5 mg/mL (100%). As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.4.2.2, os teores foram calculados a partir da curva analítica do padrão rotina e os resultados expressos em média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Exatidão

O ensaio de recuperação foi realizado a fim de avaliar a exatidão do método, para isso, quantidades conhecidas do padrão, 3,20, 4,00 e 4,80 µg/mL, correspondentes aos níveis de concentração de 80, 100 e 120% da faixa de trabalho,

foram adicionadas a soluções amostra. As amostras foram preparadas de acordo com o descrito no item 4.4.2.2, injetadas em triplicata, e a taxa de recuperação foi calculada de acordo com a equação demonstrada no item 4.6.1.

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da equação da curva analítica do padrão rotina, utilizando as equações descritas abaixo:

$$LD = \left(\frac{3,3 \cdot \sigma}{IC} \right)$$

$$LQ = \left(\frac{10 \cdot \sigma}{IC} \right)$$

Onde: σ = desvio padrão do intercepto com o eixo Y e IC = inclinação da curva.

Robustez

A robustez do método foi avaliada através da realização de pequenas e deliberadas alterações, tais como fluxo, temperatura da coluna e fabricante da fase móvel. A solução amostra, preparada de acordo com o descrito no item 4.4.2.2, foi avaliada sob as seguintes condições experimentais: fluxo da fase móvel 0,895 mL/min e 0,905 mL/min; temperatura 26 °C e 29 °C; fabricante da fase móvel orgânica LiChrosolv® e JTBaker®. As amostras foram injetadas em triplicatas e, a partir dos teores obtidos nas análises, avaliou-se o impacto das alterações testadas sobre a resposta analítica. Os resultados foram expressos em média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

4.6.2.2 Validação parcial para o ESA

A fim de aplicar o método validado para a matéria prima na análise do extrato seco de *C. verum*, bem como avaliar se o método pode ser utilizado como indicativo

de estabilidade do flavonoide rutina nesta matriz, realizou-se uma validação parcial, de acordo com o preconizado na RDC 166 de 2017 da Anvisa (Anvisa, 2017b).

Curva analítica do padrão rutina

Inicialmente foi realizada uma solução estoque a 1 mg/mL do padrão rutina em metanol, desta solução estoque, alíquotas de 39, 52, 65, 78 e 91 μL , foram transferidas para balões de 10 mL, o volume foi aferido com metanol 50%, obtendo-se assim soluções de 3,90, 5,20, 6,50, 7,80 e 9,10 $\mu\text{g/mL}$ para obtenção da curva analítica.

Precisão

A precisão do método foi avaliada a partir da análise da repetibilidade, ou precisão intracorrida, e da precisão intermediária, ou precisão intercorrida.

- a) **Repetibilidade:** Na análise da repetibilidade, foram preparadas seis amostras independentes, pelo mesmo operador, no mesmo dia, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, como descrito no item 4.4.2.3. As amostras foram injetadas, em uma única corrida analítica, e o teor de rutina foi obtido a partir da curva analítica obtida para o padrão. Os resultados foram expressos em média, desvio padrão e desvio padrão relativo.
- b) **Precisão intermediária:** A precisão intermediária foi avaliada a partir da análise de três amostras preparadas, de maneira independente, por 2 operadores diferentes em 2 dias diferentes, a preparação das amostras seguiu o procedimento descrito no item 4.4.2.3, e os resultados foram expressos em média, desvio padrão e desvio padrão relativo.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir do ensaio de recuperação, onde quantidades conhecidas do padrão rutina, correspondentes as concentrações de 80, 100 e 120% da curva analítica, foram adicionadas a soluções amostra (1000 $\mu\text{g/mL}$). As amostras foram preparadas como descrito no item 4.4.2.3, foram injetadas em

triplicata, e o percentual de recuperação foi calculado a partir da equação descrita no item 4.6.1.

Seletividade

Para avaliação da seletividade do método, foi verificada a pureza do pico cromatográfico da rutina no ESA antes de ser degradado e após as degradações por hidrólise ácida, hidrólise básica, degradação oxidativa, térmica e fotolítica. As amostras foram preparadas como descrito nos testes de degradação forçada (item 4.5.3). A análise da seletividade também envolveu a verificação da semelhança dos espectros de absorção na base, meio e ápice do pico cromatográfico da rutina nas amostras.

5 RESULTADOS

5.1 MATERIAL VEGETAL

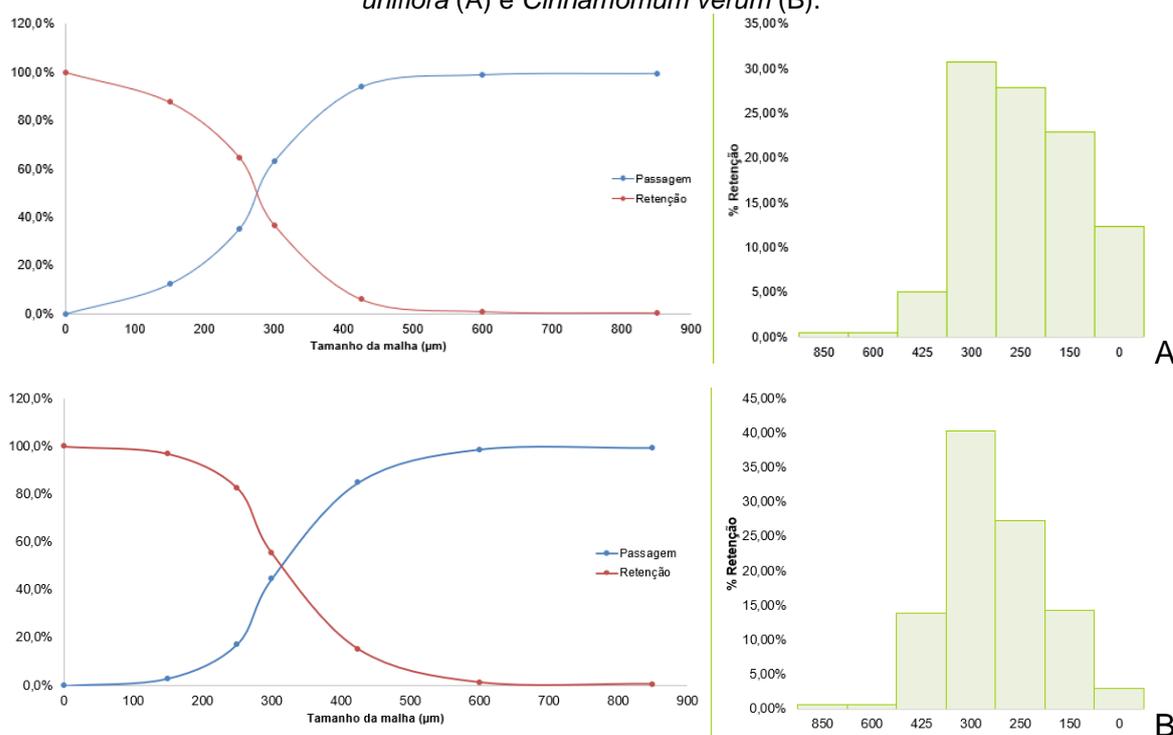
5.1.1 Caracterização do material vegetal

Determinação de granulometria por tamisação

O tamanho médio encontrado para as partículas do material vegetal de *E. uniflora*, determinado pelo ponto interseção das curvas de retenção e passagem (Figura 6A), foi de 270 μm , o que caracteriza o pó como moderadamente grosso aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 μm (Anvisa, 2019b).

O material vegetal de *C. verum* também foi caracterizado como um pó moderadamente grosso, porém, o tamanho médio de partículas foi de 310 μm (Figura 6B).

Figura 6 - Gráfico de retenção e passagem e histograma de distribuição do pó das folhas de *Eugenia uniflora* (A) e *Cinnamomum verum* (B).



Fonte: Autoria própria.

Determinação de perca por dessecação

O controle do teor de umidade de matérias-primas vegetais é importante para a manutenção da sua qualidade, visto que o excesso desta pode favorecer o crescimento microbiano e a hidrólise do material, dessa forma, o processo de secagem para redução da umidade é importante para evitar o comprometimento da sua qualidade (Soares; Farias, 2017).

O valor médio de umidade encontrado para a droga vegetal de *E. uniflora* foi de $8,61 \pm 0,16\%$, estando dentro do valor de até 10%, preconizado na monografia da espécie presente na Farmacopeia Brasileira 6ª ed (Anvisa, 2019a). O valor de umidade encontrado para a droga vegetal de *C. verum* foi de $8,66 \pm 0,26\%$, e, apesar da espécie não possuir monografia própria, o valor se encontrou dentro do valor geral preconizado para as espécies de 8 a 14%, comprovando que o processo de secagem foi eficiente para ambas as espécies.

Determinação de matéria estranha

O resultado médio encontrado na determinação de matéria estranha de *E. uniflora* foi de $0,006 \pm 0,005\%$, encontrando-se dentro do valor máximo de 2% estabelecido pela Farmacopeia Brasileira para a espécie. O valor de matéria estranha determinado em *C. verum* também se mostrou dentro do limite preconizado pela Farmacopeia Brasileira, sendo de $0,027 \pm 0,009\%$. Dessa forma, foi possível comprovar a ausência de contaminação nas drogas vegetais estudadas, visto que a análise da matéria estranha tem o objetivo de atestar que a droga vegetal é isenta de fungos, insetos, de outras contaminações de origem animal ou de origem vegetal, como outras espécies ou partes da planta (Anvisa, 2019b).

Determinação de cinzas totais

O ensaio de cinzas totais permite avaliar o teor de contaminantes inorgânicos no material vegetal de interesse, que podem ser tanto de natureza fisiológica, como de natureza não fisiológica (Anvisa, 2019b; Soares; Farias, 2017). O valor máximo preconizado pela Farmacopeia Brasileira para as cinzas totais de *E. uniflora* é de 11%,

e o valor médio encontrado experimentalmente foi de $6,74 \pm 0,095\%$, encontrando-se dentro do recomendado. O valor médio encontrado para *C. verum* foi de $4,87 \pm 0,031\%$.

5.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO

5.2.1 Avaliação da quantidade de droga vegetal

Os resultados de TFT, resíduo seco e eficiência de extração para cada extrato obtido com as diferentes quantidades de droga vegetal para as espécies *E. uniflora* e *C. verum* estão descritos na tabela 1.

Inicialmente foram calculados os intervalos de confiança para média dos valores de TFT das duas espécies. Os extratos de ambas as espécies, realizados com 5 e 10 g, ficaram acima do limite superior, revelando serem maior, em TFT, que a média populacional de TFT com 95% de confiança. Observando a eficiência de extração, é possível evidenciar que os extratos obtidos com menor quantidade de droga foram mais eficazes em extrair os flavonoides. Dessa forma, avaliando os resultados em conjunto, a quantidade de droga vegetal estabelecida foi de 5,0 g, tanto para *E. uniflora*, quanto para *C. verum*.

Tabela 1 - Teor de flavonoides totais, resíduo seco, eficiência de extração e intervalos de confiança dos extratos obtidos com diferentes quantidades de droga vegetal de *E. uniflora* e *C. verum*.

Quantidade de Droga vegetal (g)	<i>E. uniflora</i>			<i>C. verum</i>		
	TFT (g%)	RS (%)	EE	TFT (g%)	RS (%)	EE
5,0	3,206* ±	2,20 ±	1,45 ±	0,482* ±	1,03 ±	0,466 ±
	0,061	0,120	0,079	0,007	0,063	0,028
7,5	2,904 ±	2,91 ±	0,996 ±	0,436 ±	1,60 ±	0,272 ±
	0,035	0,021	0,007	0,006	0,014	0,002
10,0	3,066* ±	3,79 ±	0,808 ±	0,477* ±	2,05 ±	0,232 ±
	0,033	0,007	0,001	0,008	0,070	0,008
12,5	2,828 ±	4,18 ±	0,676 ±	0,376 ±	2,52 ±	0,149 ±
	0,023	0,056	0,009	0,005	0,077	0,004
15,0	2,839 ±	5,06 ±	0,560 ±	0,445 ±	3,29 ±	0,135 ±
	0,023	0,035	0,003	0,001	0,120	0,004
Intervalo de Confiança do TFT			Intervalo de Confiança do TFT			
2,968 ± 0,0855			0,4438 ± 0,2191			

Onde: TFT – teor de flavonoides totais; RS – resíduo seco; EE – eficiência de extração; * - Acima do intervalo de confiança. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

5.2.2 Extração e secagem por aspersão

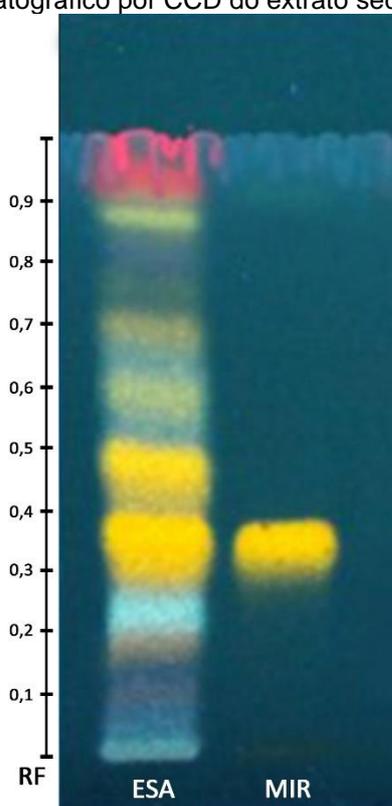
Os extratos de *E. uniflora* e *C. verum* foram obtidos por turbólise, empregando 5 g de droga vegetal para cada 100 mL de etanol 80%. O extrato de *E. uniflora* apresentou 1,66% (m/m) de sólidos em sua constituição e seu processo de secagem apresentou rendimento de 39,23%. Já o extrato de *C. verum*, demonstrou 0,95% (m/m) de sólidos em sua constituição e rendimento de secagem de 42,05%.

5.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A análise qualitativa dos extratos secos obtidos das espécies *E. uniflora* e *C. verum* foi realizada por cromatografia em camada delgada. Esta técnica é simples e rápida e, apesar de prover informações qualitativas e não quantitativas, pode fornecer dados importantes sobre a fitoquímica de matrizes complexas (Souza, J. A. L. *et al.*, 2018).

O *fingerprint* obtido do ESA de *E. uniflora* está apresentado na figura 7, e nele é possível observar a presença de bandas amarelas, que correspondem a flavonoides, e azul esverdeadas, que correspondem a taninos hidrolisáveis, considerando as condições extrativas e cromatográficas. As bandas de flavonoides apresentaram fatores de retenção (Rfs) aproximados de 0,100; 0,175; 0,350; 0,475; 0,575; 0,675; 0,750; 0,850. A banda de Rf 0,350 apresentou o mesmo Rf e coloração do padrão miricitrina, indicando ser essa a substância encontrada na amostra, como já descrito anteriormente na literatura (Bezerra *et al.*, 2018; Sobral-Souza *et al.*, 2020; Souza, L. B. F. C. *et al.*, 2018). As bandas azuladas apresentaram Rfs aproximados de 0,230; 0,520; 0,630; 0,800.

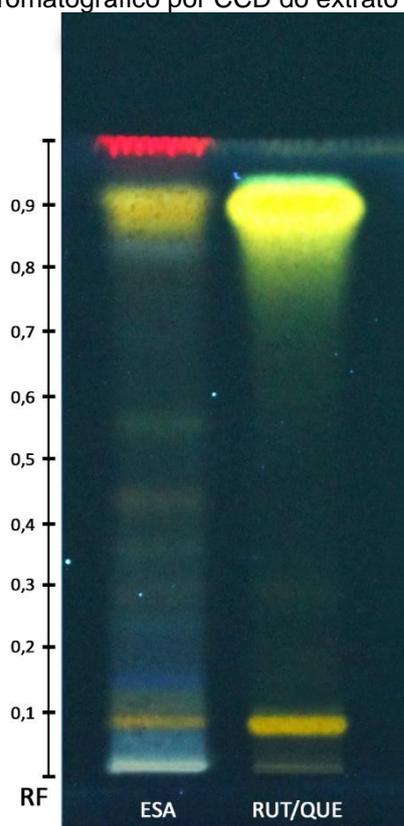
Figura 7 - Perfil cromatográfico por CCD do extrato seco de *Eugenia uniflora*.



Onde: ESA – Extrato seco por aspersão; MIR – Miricitrina.
Fonte: Autoria própria.

O cromatograma obtido do ESA de *C. verum*, apresentado na figura 8, revelou 6 bandas amarelo-alaranjadas, características de flavonoides (Rfs: 0,08; 0,28; 0,35; 0,44; 0,55; 0,90), a amostra demonstrou a presença de rutina, confirmada pela coloração e valor de Rf da banda (Rf = 0,08). Barbosa *et al.* (2020) confirmou a presença de rutina no extrato das folhas de *C. verum*.

Figura 8 - Perfil cromatográfico por CCD do extrato seco de *C. verum*.



Onde: ESA – Extrato seco por aspersão; RUT/QUE – Rutina e quercetina.
Fonte: Autoria própria.

5.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

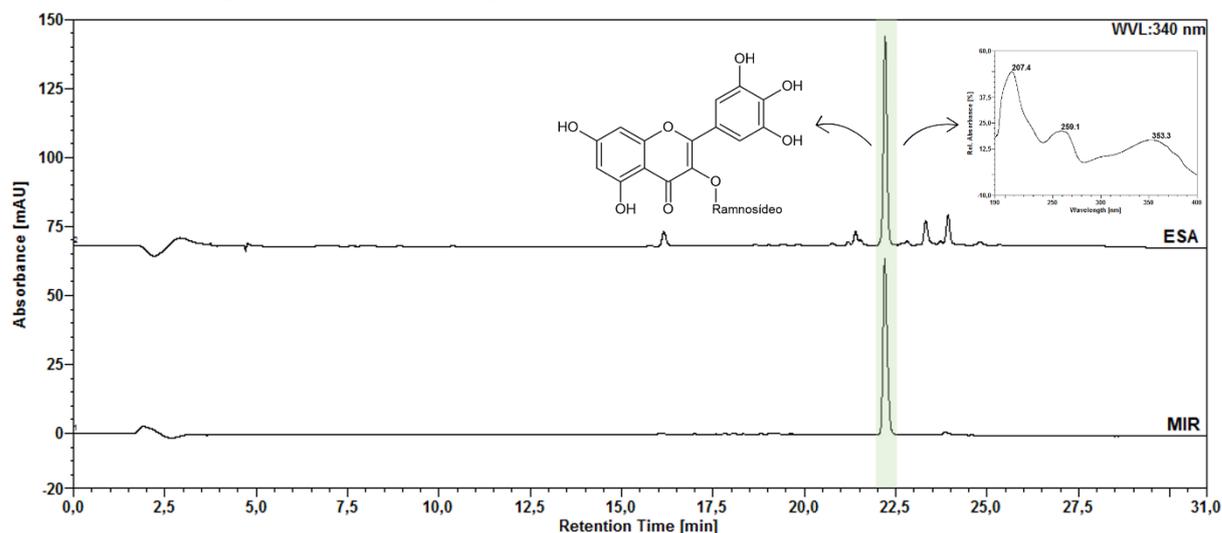
O perfil cromatográfico das espécies também foi obtido por CLAE. Diferente da técnica de CCD, esta técnica é eficaz não só em qualificar, como também em quantificar compostos presentes em matrizes complexas, como as matrizes vegetais. Esta característica faz com que essa seja uma das técnicas mais utilizadas na análise de produtos naturais (Tistaert; Dejaegher; Vander Heyden, 2011).

5.4.1 *Eugenia uniflora*

O perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *E. uniflora* está demonstrado na figura 9. O cromatograma, obtido no comprimento de onda de 340 nm, apresentou 4 picos característicos de flavonoides ($t_R = 21,32$; $22,14$; $23,27$ e $23,86$ min). A miricitrina ($t_R = 22,14$ min), foi descrita também em trabalhos anteriores como

marcador principal da espécie (Bezerra *et al.*, 2018; Souza, L. B. F. C. *et al.*, 2018). A quantificação deste flavonoide no ESA foi de $2,92 \pm 0,02$ g%.

Figura 9 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *Eugenia uniflora*.



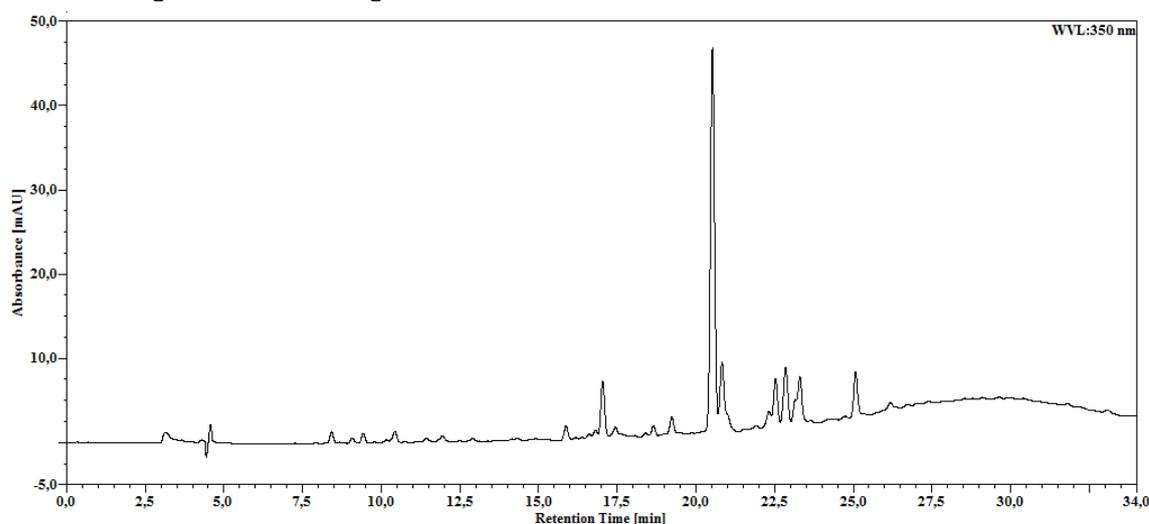
Onde: ESA – Extrato seco por aspersão; MIR – Miricitrina.

Fonte: Autoria própria.

5.4.2 *Cinnamomum verum*

5.4.2.1 Desenvolvimento do método analítico

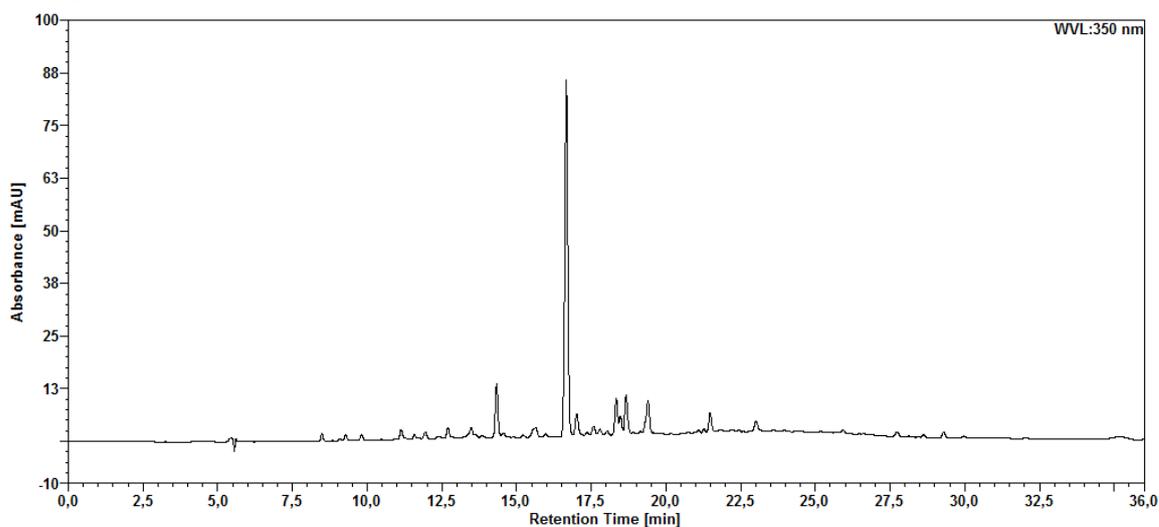
As condições iniciais para o desenvolvimento do método foram baseadas em estudos preliminares. Inicialmente, utilizou-se uma coluna C₁₈ (Supelco® HS C18; 25 cm x 4,60 mm; 5 μm), por se tratar de uma das fases estacionárias mais usadas na separação de compostos naturais como flavonoides (Cavaliere *et al.*, 2018). Como fases móveis foram utilizadas combinações de metanol e água, ambos acidificados com 0,05% de TFA, no modo de eluição gradiente, que é recomendado para matrizes complexas com baixa eficiência de separação no modo de eluição isocrático (Pereira; Beltrame, 2015). O gradiente inicial foi de 0 min: 20% B; 10 min: 40% B; 30 min: 75% B; 31 min: 75% B; 33 min: 20% B; 34 min: 20% B, porém, o cromatograma gerado (Figura 10) demonstrou que o pico correspondente a rutina co-eluiu com outro composto. O tempo de retenção observado para a rutina foi de 20,523 min e a resolução do pico foi de 1,36.

Figura 10 - Cromatograma do ESA de *C. verum* obtido com o método inicial.

Fonte: Autoria própria.

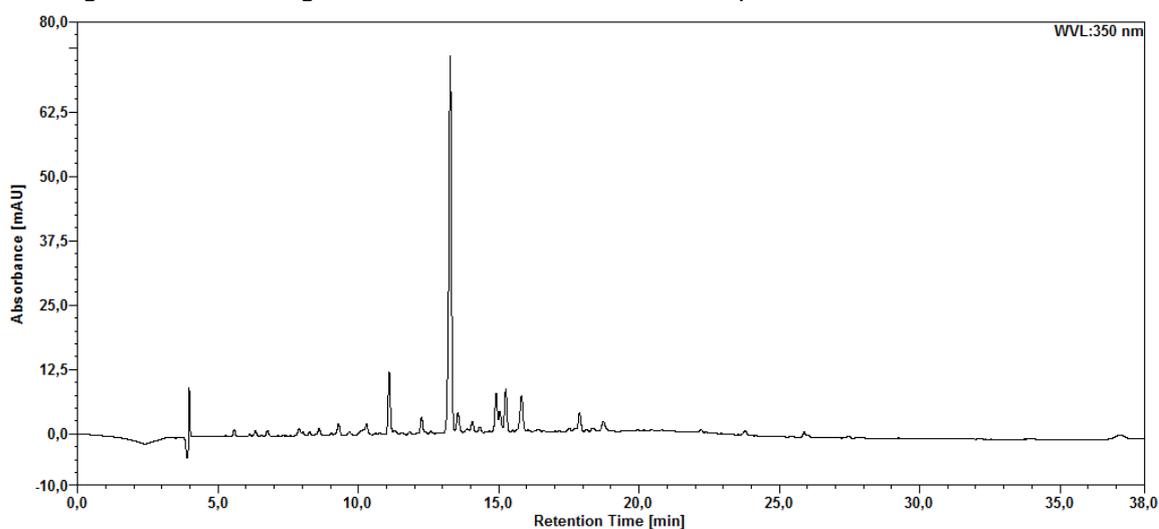
Na tentativa de aumentar a eficiência de separação do pico de interesse, diferentes programas de eluição gradiente foram testados (Quadro 1), porém, nenhum dos gradientes testados foi eficaz em separar a rutina do composto que estava co-eluindo. Assim, testou-se também a modificação do preparo da amostra, que foi preparada com água, etanol 80% e metanol, e diferentes fluxos de eluição, 0,7, 0,8 e 0,9 mL/min. Os resultados demonstraram que a modificação do preparo de amostra e fluxo de eluição não melhoraram a resolução do pico.

Dessa forma, a fase móvel B foi substituída por acetonitrila acidificada com 0,05% de TFA. Empregou-se o gradiente de eluição de 0 min: 10% B; 15 min: 30% B; 20 min: 40% B; 32 min: 75% B; 36 min: 10% B e pôde-se observar no cromatograma obtido um aumento da eficiência de separação do pico da rutina (Figura 11).

Figura 11 - Cromatograma do ESA de *C. verum* obtido utilizando acetonitrila como fase B.

Fonte: Autoria própria.

Nesta etapa, o fluxo de eluição (0,7, 0,8 e 0,9 mL/min) e pequenas variações no gradiente de eluição, foram avaliados. O fluxo de 0,9 mL/min foi escolhido por demonstrar maior eficiência de separação da rotina. O gradiente de eluição foi fixado em: 0 min: 10% B; 15 min: 30% B; 20 min: 40% B; 35 min: 75% B; 38 min: 10% B. O cromatograma obtido utilizando as condições de análise escolhidas está demonstrado na figura 12, neste a rotina apresentou tempo de retenção de 13,247 min e resolução de 1,74, superior a encontrada no método inicial, demonstrando que as modificações resultaram no aumento da eficiência de separação do método.

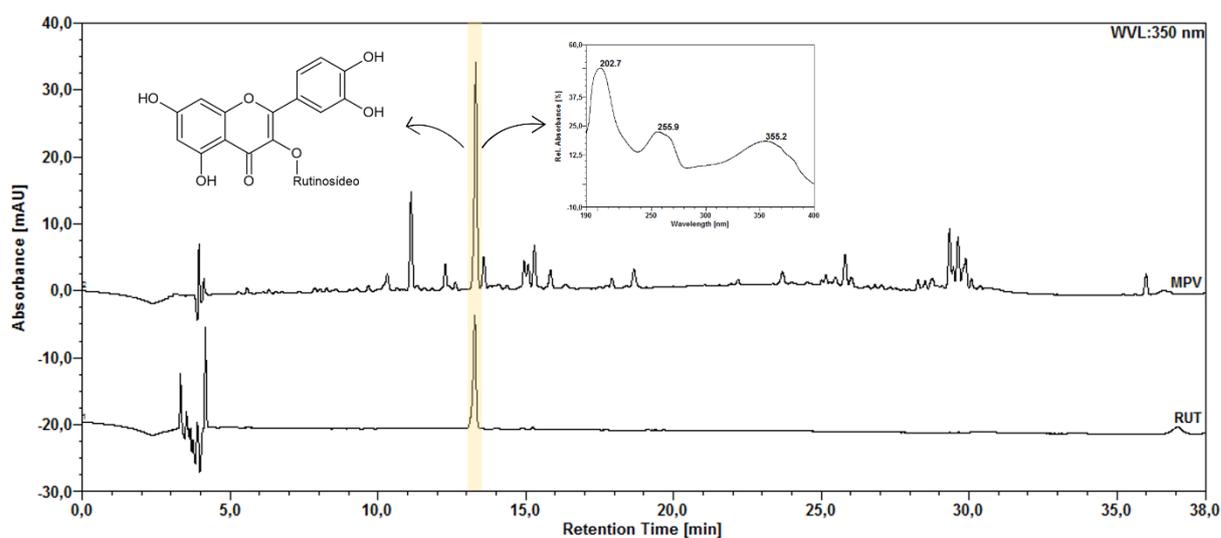
Figura 12 - Cromatograma do ESA de *C. verum* obtido a partir do método desenvolvido.

Fonte: Autoria própria.

5.4.2.2 Análise da matéria prima vegetal

A avaliação da solução extrativa da MPV de *C. verum* por CLAE revelou 3 picos característicos de flavonoides ($t_R = 11,207$; $13,413$ e $15,380$ min) (Figura 13). A quantificação da rutina ($t_R = 13,413$ min) neste extrato foi de $0,070 \pm 0,001$ g% de matéria prima vegetal. A presença da rutina foi atestada a partir da comparação do tempo de retenção e do espectro de absorção com o padrão rutina. Lima *et al.* (2021) também descreve a presença deste composto no extrato das folhas de *C. verum*.

Figura 13 - Perfil cromatográfico por CLAE da MPV de *Cinnamomum verum*.

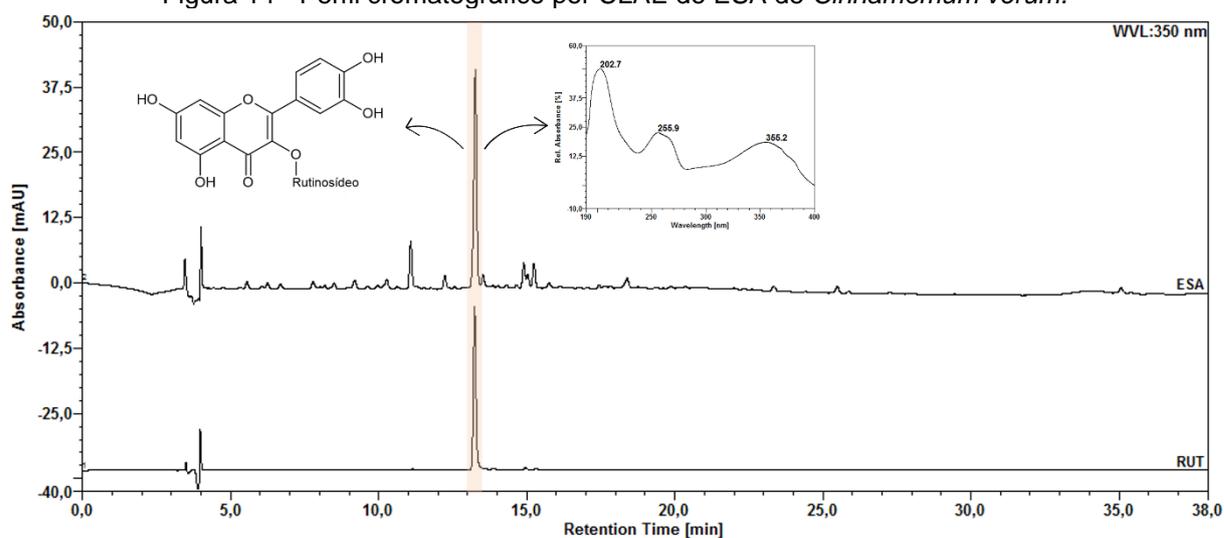


Fonte: Autoria própria.

5.4.2.3 Análise do ESA

O perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *C. verum* revelou a presença de 5 picos característicos de flavonoides ($t_R = 10,290$; $11,100$; $13,273$; $15,250$ e $15,813$ min) (Figura 14). O teor de rutina ($t_R = 13,273$ min) encontrado neste extrato foi de $0,634 \pm 0,001$ g% de ESA.

Figura 14 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *Cinnamomum verum*.



Fonte: Autoria própria.

5.5 VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

5.5.1 *Eugenia uniflora*

O método descrito e validado por Bezerra *et al.* (2018) foi validado parcialmente, e testado quanto ao seu potencial em indicar a estabilidade da miricitrina no ESA de *E. uniflora*. Segundo a RDC 166 de 2017 da Anvisa, a validação parcial é eficaz em demonstrar se um método previamente validado possui as características necessárias para obtenção de resultados com qualidade nas condições em que é praticado. O estudo de validação parcial deve envolver pelo menos os ensaios de precisão, exatidão e seletividade (Anvisa, 2017b).

Curva analítica do padrão miricitrina

A curva analítica obtida para o padrão miricitrina, utilizando cinco níveis de concentração, foi linear na faixa de concentração de 12 a 18 $\mu\text{g/mL}$. Os dados brutos de área dos picos estão dispostos na tabela 2, e a curva analítica da média das áreas pode ser observada na figura 15.

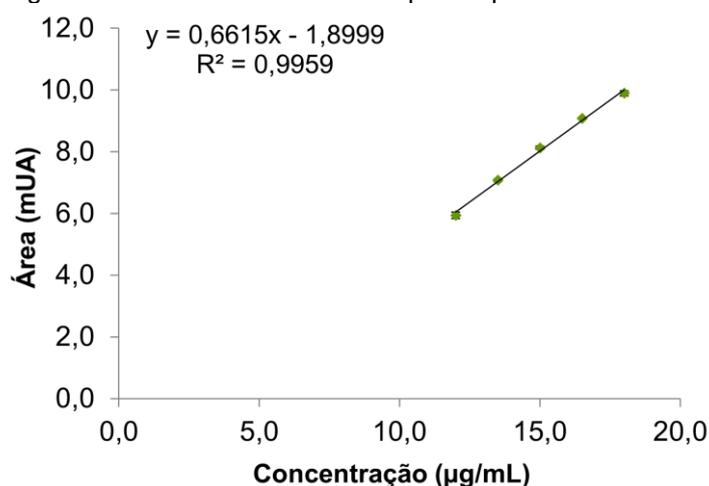
Tabela 2 - Áreas obtidas para os picos da curva analítica de miricitrina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Média \pm DP (DPR%)
12,0	6,051	5,918	5,840	5,936 \pm 0,10 (1,80)
13,5	7,046	7,045	7,127	7,073 \pm 0,04 (0,67)
15,0	8,184	8,133	8,070	8,129 \pm 0,05 (0,70)
16,5	9,071	9,090	9,082	9,081 \pm 0,009 (0,10)
18,0	9,937	9,943	9,800	9,893 \pm 0,08 (0,82)

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

Fonte: Autoria própria.

Figura 15 - Curva analítica média para o padrão miricitrina.



Fonte: Autoria própria.

A avaliação da regressão linear demonstrou um alto coeficiente de determinação, com valor de 0,9959, indicando que quase 100% da variabilidade é explicada pela regressão. Foi realizada uma análise de variância a fim de avaliar a significância da regressão, o resultado indicou que a regressão é altamente significativa, com 95% de confiança ($F = 2261,96$). A normalidade dos resíduos foi avaliada a partir da análise visual do gráfico de distribuição dos resíduos em função da concentração da resposta, os resíduos apresentaram distribuição aleatória ao redor de zero, indicando normalidade na distribuição (Anvisa, 2017a). Para avaliação da homoscedasticidade dos resíduos aplicou-se o teste de Cochran. Inicialmente foi calculada a variância do valor de y em cada nível de concentração, e testou-se a hipótese de que as variâncias são todas iguais. Para isso, calculou-se o valor de C que foi comparado com o valor de $C_{\text{crítico}}$. Como o valor de C foi de 0,485, inferior ao valor de $C_{\text{crítico}}$ (0,684), aceita-se a hipótese, as variâncias de y são iguais e os resíduos são homoscedásticos (Anvisa, 2017a). O coeficiente angular foi

estatisticamente diferente de zero, com confiança de 95% ($p > 0,05$), indicando que a variação da concentração do analito causa uma variação significativa na resposta (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020; Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Precisão

A análise de precisão visa avaliar a proximidade entre os valores obtidos por medições repetidas de uma amostra sob condições especificadas. Várias condições como operadores, reagentes, dia e equipamento, podem ser fontes de variabilidade dos resultados analíticos, esta variabilidade pode ser sistemática, quando o erro é constante e pode ser reduzido ou corrigido, ou aleatória, quando o erro é causado por variáveis incontroladas ou desconhecidas. O erro aleatório produz a dispersão dos resultados, e não pode ser reduzido ou corrigido, este caracteriza a precisão do método (Marson *et al.*, 2020; Raposo; Ibelli-Bianco, 2020).

A precisão pode ser avaliada por meio da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade representa a concordância dos resultados de medições realizadas em amostras preparadas no mesmo dia pelo mesmo analista, esta avalia a contribuição do preparo de amostra para a variabilidade do método. A precisão intermediária expressa a contribuição de fatores como dias, reagentes, analistas e equipamento na variabilidade dos resultados, para isso, avalia-se amostras preparadas por analistas diferentes em dias diferentes. Por fim, a reprodutibilidade expressa a concordância entre resultados obtidos a partir da avaliação de amostras em diferentes laboratórios, apesar deste ensaio fornecer a maior precisão esperada, por variar todos os fatores que podem afetar os resultados, a análise da repetibilidade e precisão intermediária é eficaz em representar a variabilidade intralaboratorial (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020).

Neste contexto, o teor de miricitrina foi avaliado nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados da repetibilidade e da precisão intermediária estão descritos na tabela 3. Para a repetibilidade o desvio padrão relativo indicou uma alta precisão do método, com baixa variabilidade (DPR = 0,96%). Quanto a precisão intermediária, os resultados de ambos os dias, para ambos os analistas apresentaram alta concordância apresentando desvios padrões relativos variando de 0,02 a 0,75%. O resultado geral das 12 determinações em diferentes dias e diferentes analistas foi de $2,922 \pm 0,027$ g%, com desvio padrão relativo de 0,93%.

Tabela 3 - Repetibilidade e precisão intermediária para miricitrina no ESA de *E. uniflora*.

Precisão		
Repetibilidade - Teor (g%) (Média ± DP; DPR%)		
2,916 ± 0,028 (0,96)		
Precisão intermediária - Teor (g%) (Média ± DP; DPR%)		
	Dia 1	Dia 2
Analista 1	2,904 ± 0,021 (0,75)	2,937 ± 0,020 (0,69)
Analista 2	2,951 ± 0,003 (0,12)	2,896 ± 0,0005 (0,02)
Média ± DP (DPR%)	2,927 ± 0,029 (1,00)	2,916 ± 0,025 (0,89)
Resultado Geral	2,922 ± 0,027 (0,93)	

Onde: g%: Grama % de ESA; DP: Desvio padrão; DPR%: Desvio padrão relativo.

Fonte: Autoria própria.

Exatidão

Enquanto o ensaio de precisão busca avaliar a concordância dos resultados entre si, a exatidão expressa a concordância entre os resultados encontrados pelo método analítico e os valores aceitos como verdadeiros (Marson *et al.*, 2020). Neste sentido, a exatidão do método foi avaliada a partir da adição de quantidades conhecidas do padrão miricitrina, concentrações correspondentes a 80, 100 e 120%, na amostra de ESA. As amostras foram analisadas e o percentual de recuperação foi calculado. Os valores de recuperação variaram de 110,32-114,50% (DPR = 2,09%), demonstrando que o método possui exatidão adequada na quantificação da miricitrina.

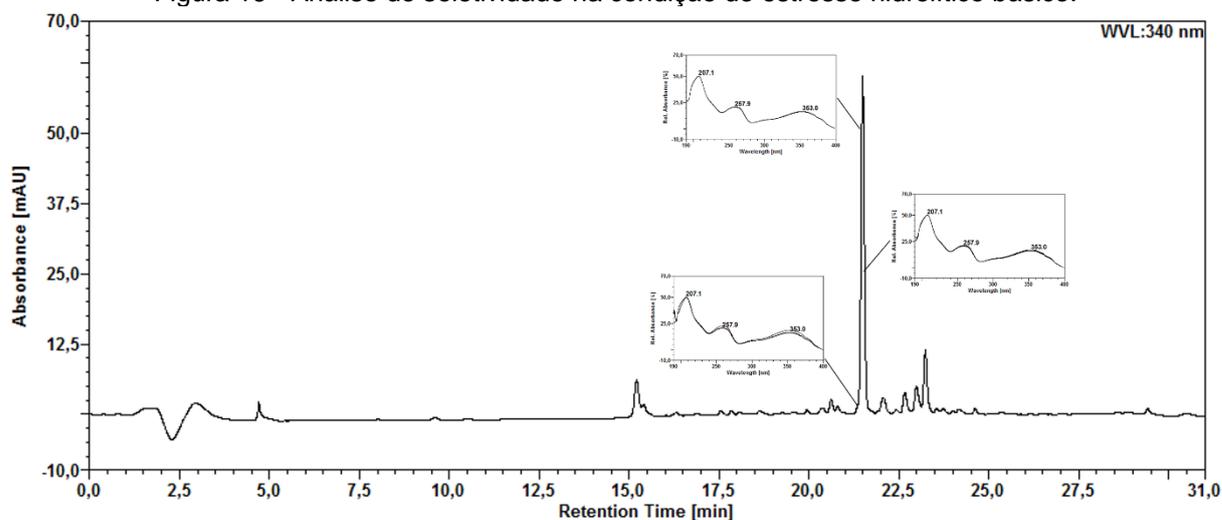
Seletividade

Um método é considerado seletivo quando é capaz de identificar ou quantificar o analito de interesse na presença de outros componentes da amostra, como impurezas e componentes da matriz (Anvisa, 2017b). Este parâmetro é muito importante na avaliação de métodos indicativos de estabilidade, visto que a análise da seletividade nas amostras degradadas mensura se o método é capaz de quantificar

o teor do analito de interesse mesmo na presença de produtos de degradação (Blessy *et al.*, 2014).

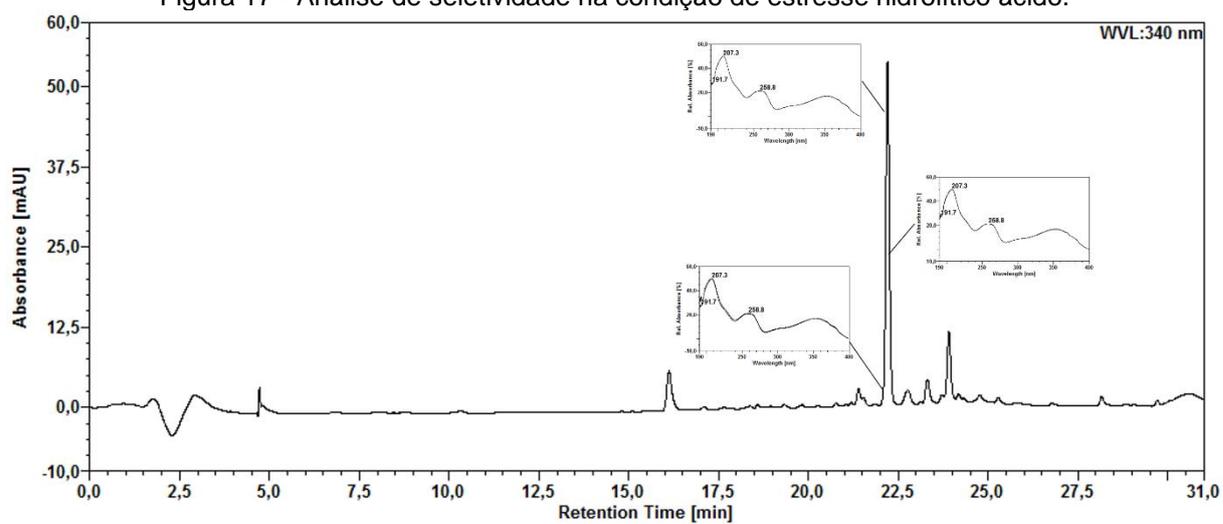
A seletividade de um método pode ser avaliada a partir da análise da pureza do pico cromatográfico do analito de interesse na presença dos possíveis interferentes (Anvisa, 2017b). Dessa forma, a análise da seletividade do método foi realizada avaliando o valor de pureza do pico e comparando-se os espectros de absorção em vários pontos dos picos cromatográficos, base, meio e ápice, das amostras submetidas as condições de estresse. Todos os picos da miricitrina após degradação apresentaram pureza de pico > 99%, e, como pode-se observar nas figuras de 16 a 20, não foram observadas variações nos máximos de absorção dos espectros dos picos da miricitrina, indicando que o método possui seletividade adequada para quantificar o teor de miricitrina mesmo em meio a possíveis produtos de degradação, sendo útil como método indicativo de estabilidade para este composto.

Figura 16 - Análise de seletividade na condição de estresse hidrolítico básico.



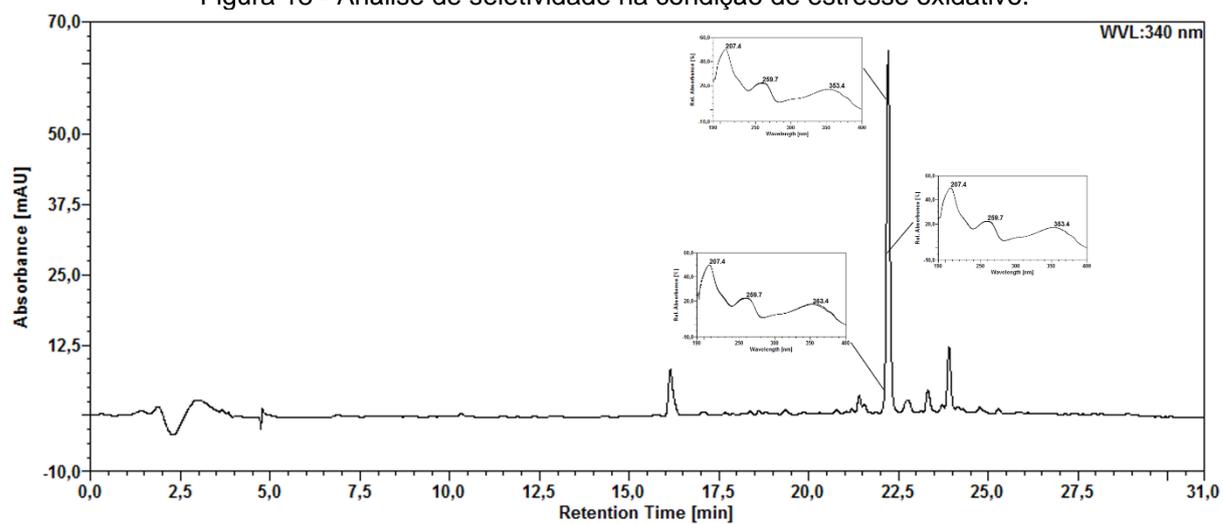
Fonte: Autoria própria.

Figura 17 - Análise de seletividade na condição de estresse hidrolítico ácido.



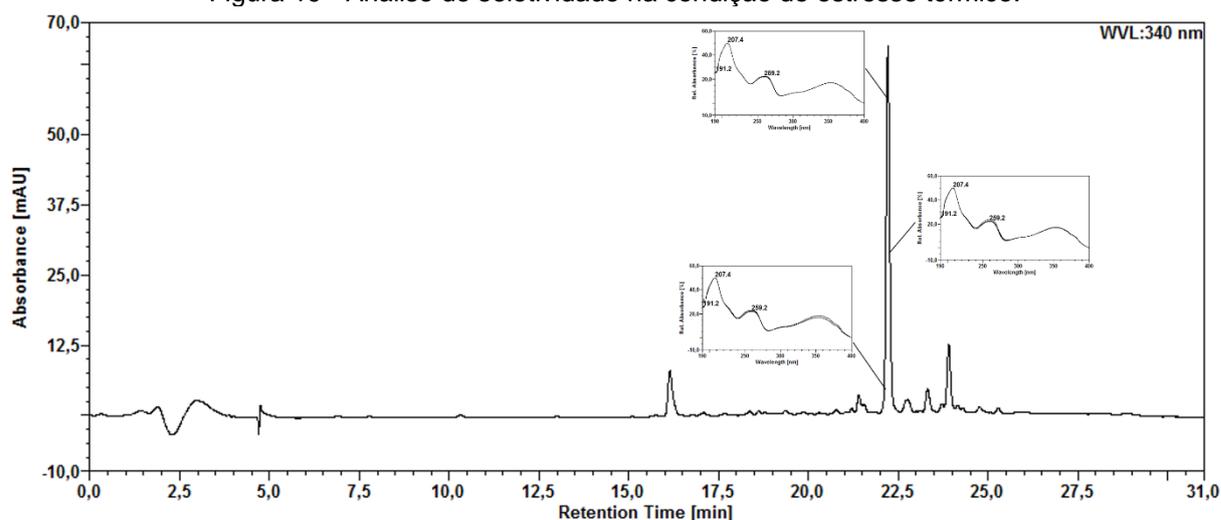
Fonte: Autoria própria.

Figura 18 - Análise de seletividade na condição de estresse oxidativo.



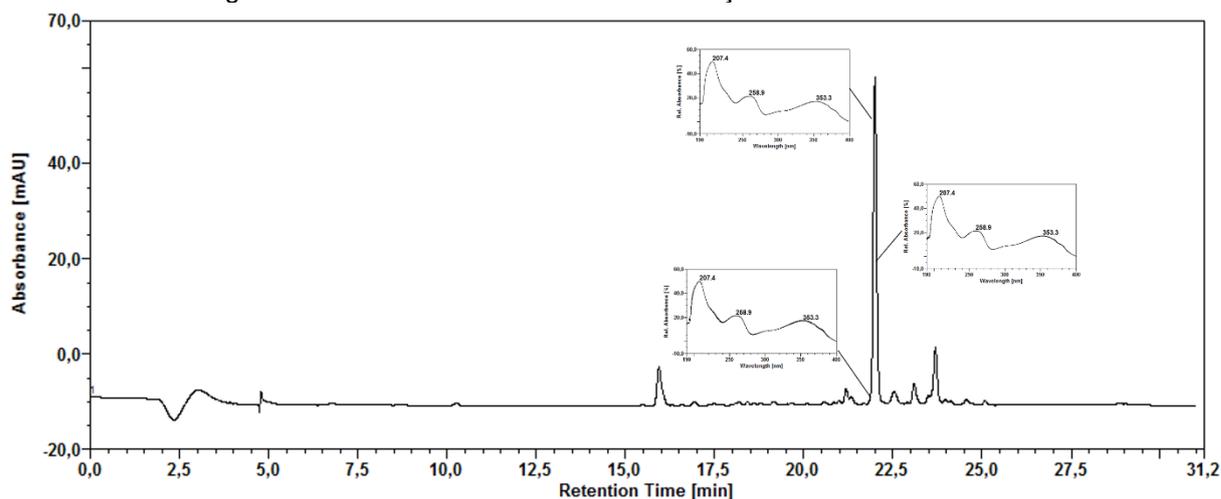
Fonte: Autoria própria.

Figura 19 - Análise de seletividade na condição de estresse térmico.



Fonte: Autoria própria.

Figura 20 - Análise de seletividade na condição de estresse fotolítico.



Fonte: Autoria própria.

5.5.2 *Cinnamomum verum*

O método desenvolvido para análise e quantificação da rutina presente em *C. verum* foi validado para a matéria prima vegetal, a fim de assegurar a acurácia deste método na separação, identificação e quantificação deste composto nesta matriz. Posteriormente, o método foi aplicado e validado parcialmente para análise do ESA, além de ser testado quanto a sua capacidade indicativa de estabilidade da rutina presente neste extrato. Tanto a validação analítica do método para a matéria prima vegetal quanto a validação parcial deste método para o ESA seguiram o preconizado na RDC 166 de 2017 da Anvisa (Anvisa, 2017b), os resultados estão descritos abaixo.

5.5.2.1 Matéria prima vegetal

Linearidade

Foram obtidas as curvas analíticas do padrão rotina e da matéria prima, ambas as curvas foram consideradas lineares, sendo a curva analítica do padrão rotina linear no intervalo de concentração de 2,4 a 5,6 µg/mL e a curva da matéria prima linear no intervalo de 3,6 a 5,4 mg/mL como pode ser observado na figura 21 e na tabela 4.

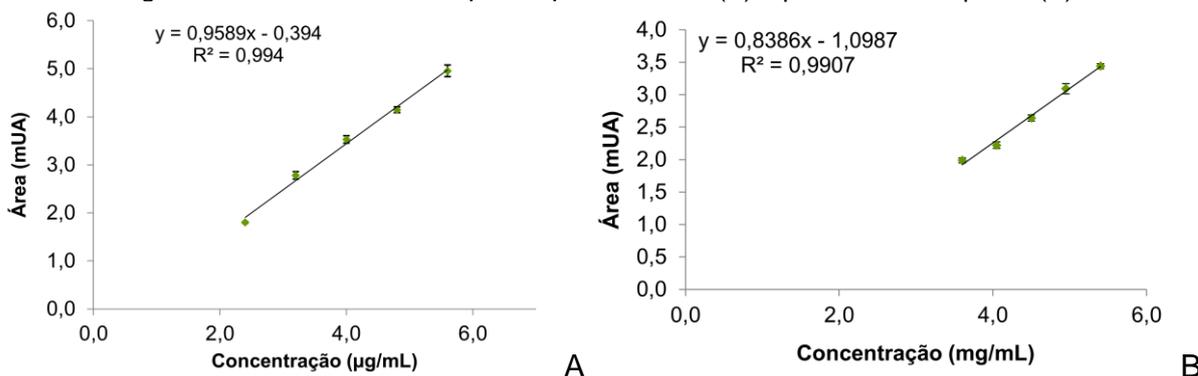
Tabela 4 - Áreas obtidas para os picos da curva analítica do padrão rotina e da matéria prima.

Rutina (mUA)				
Concentração (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média ± DP (DPR%)
2,40	1,789	1,812	1,797	1,799 ± 0,01 (0,65)
3,20	2,725	2,869	2,752	2,782 ± 0,07 (2,76)
4,00	3,472	3,614	3,500	3,529 ± 0,07 (2,13)
4,80	4,091	4,210	4,135	4,145 ± 0,06 (1,45)
5,60	4,875	5,093	4,891	4,953 ± 0,12 (2,46)
Matéria prima (mUA)				
Concentração (mg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Média ± DP (DPR%)
3,60	2,016	2,000	1,944	1,987 ± 0,03 (1,89)
4,05	2,265	2,227	2,166	2,219 ± 0,05 (2,25)
4,50	2,690	2,626	2,600	2,639 ± 0,04 (1,77)
4,95	3,076	3,020	3,090	3,090 ± 0,07 (2,51)
5,40	3,409	3,422	3,438	3,438 ± 0,03 (1,16)

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

Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Curvas analíticas para o padrão rotina (A) e para a matéria prima (B).



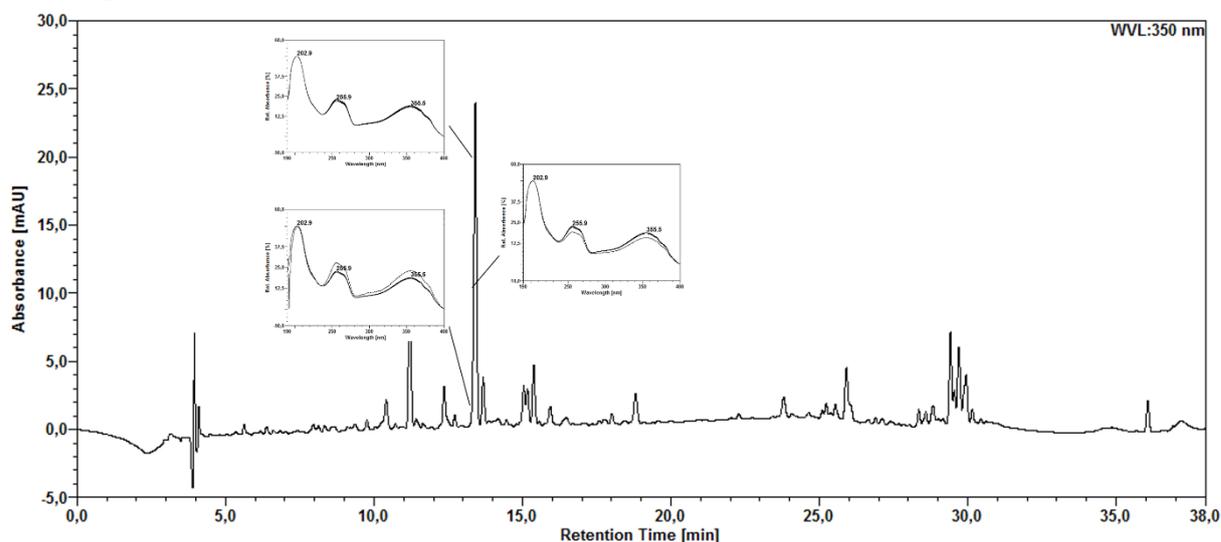
Fonte: Autoria própria.

A avaliação da regressão linear demonstrou um elevado coeficiente de determinação para ambas as curvas, com valor de 0,9940 para a curva do padrão e 0,9907 para a curva da matéria prima. A normalidade dos resíduos foi avaliada a partir da análise visual do gráfico de distribuição dos resíduos em função da concentração da resposta, os resíduos das duas curvas apresentaram distribuição aleatória dos erros ao redor de zero, indicando a normalidade da distribuição (Anvisa, 2017a). A homoscedasticidade dos resíduos foi avaliada a partir do teste de Cochran. Inicialmente foi calculada a variância do valor de y em cada nível de concentração, tanto para a curva do padrão como da amostra, e testou-se a hipótese de que as variâncias são todas iguais. Para isso, calcularam-se os valores de C que foram comparados com o valor de $C_{\text{crítico}}$. O valor de C da curva do padrão foi de 0,492 e o valor de C da curva da amostra foi de 0,441, ambos inferiores ao valor de $C_{\text{crítico}}$ (0,684), assim aceita-se a hipótese, as variâncias de y são iguais e os resíduos de ambas as curvas são homoscedásticos (Anvisa, 2017a). Foi realizada uma análise de variância a fim de avaliar a significância das regressões, os resultados indicaram que tanto a regressão do padrão quanto a regressão da matéria prima foram altamente significativas, com 95% de confiança, apresentando valores de F de 1380,57 e 823,18, respectivamente. Os coeficientes angulares das curvas apresentaram-se estatisticamente diferentes de zero, com confiança de 95%, ($p > 0,05$), indicando que a variação da concentração do analito causa uma variação significativa na resposta (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020; Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada a partir da análise da pureza do pico cromatográfico da rutina, assim como preconiza a RDC 166 de 2017 da Anvisa (Anvisa, 2017b). Também foram comparados os espectros de absorção em vários pontos do pico cromatográfico, base, meio e ápice, da rutina na matéria prima. A pureza do pico da rutina na matéria prima foi >99%, e, como pode-se observar na figura 22, não houve variações nos máximos de absorção dos espectros do pico da rutina, o que pode sugerir que o método possui seletividade adequada para quantificar o teor deste composto na matéria prima de *C. verum*, mesmo em meio a possíveis interferentes.

Figura 22 - Análise de seletividade do método para a rutina na matéria prima de *C. verum*.

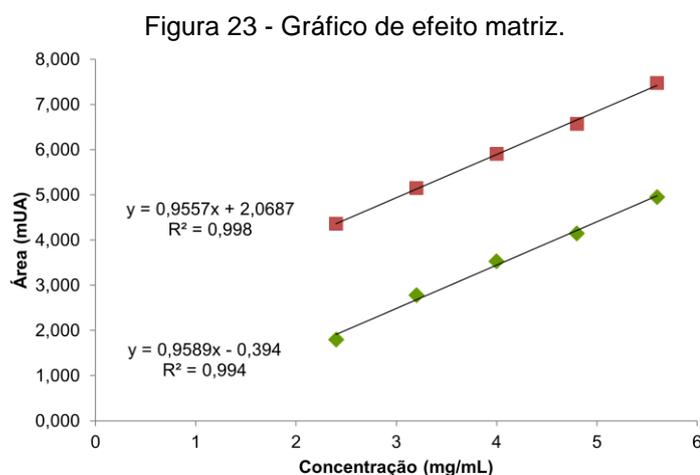


Fonte: Autoria própria.

Efeito Matriz

Além da seletividade, outro parâmetro da validação analítica que avalia a influência dos componentes da matriz na resposta analítica é o efeito matriz, sendo este parâmetro aplicado quando a amostra é uma matriz complexa, como é o caso de extratos vegetais (Anvisa, 2017b). Neste sentido, o efeito matriz do método foi determinado, para isso, quantidades conhecidas do padrão de rutina, nas mesmas concentrações utilizadas na curva analítica, foram adicionadas a amostra, e o paralelismo da reta obtida na linearidade do padrão e da reta obtida com as amostras fortificadas foi avaliado, além da similaridade dos coeficientes angulares destas duas curvas.

Como pode-se observar na figura 23, as retas demonstraram ser paralelas. Para analisar a igualdade dos coeficientes angulares foi realizado um teste F de Snedecor, que demonstrou que as variâncias eram semelhantes estatisticamente. Assim, aplicou-se o teste t para variâncias semelhantes que apresentou t_{cal} de 0,467, sendo menor que o t_{tab} de 4,30, demonstrando a igualdade estatística dos coeficientes angulares, com 95% de confiança, sendo assim não há efeito matriz significativo (Anvisa, 2017a).



Fonte: Autoria própria.

Precisão

O teor de rutina na matéria prima foi avaliado nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária a fim de avaliar a precisão do método analítico. Os resultados estão descritos na tabela 5. O ensaio de repetibilidade resultou em um desvio padrão relativo de 1,05%, indicando uma alta precisão do método, com baixa variabilidade. Quanto a precisão intermediária, os resultados de ambos os dias, para ambos os analistas, apresentaram alta concordância apresentando desvios padrões relativos variando de 0,15 a 1,03%. O resultado geral das 12 determinações em diferentes dias e diferentes analistas foi de $0,078 \pm 0,002$ g%, com desvio padrão relativo de 2,96%.

Tabela 5 - Repetibilidade e precisão intermediária para rotina na matéria prima de *C. verum*.

Precisão		
Repetibilidade - Teor (g%) (Média ± DP; DPR%)		
0,076 ± 0,0008 (1,05)		
Precisão intermediária - Teor (g%) (Média ± DP; DPR%)		
	Dia 1	Dia 2
Analista 1	0,076 ± 0,0008 (1,03)	0,076 ± 0,0002 (0,31)
Analista 2	0,082 ± 0,0001 (0,15)	0,078 ± 0,0003 (0,41)
Média ± DP (DPR%)	0,078 ± 0,002 (3,72)	0,077 ± 0,001 (1,39)
Resultado Geral	0,078 ± 0,0023 (2,96)	

Onde: g%: Grama % de ESA; DP: Desvio padrão; DPR%: Desvio padrão relativo.

Fonte: Autoria própria.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do ensaio de recuperação, onde quantidades conhecidas do padrão rotina, nas concentrações de 3,20, 4,00 e 5,60 µg/mL, foram adicionadas no extrato da matéria prima na concentração de 100%. As amostras foram analisadas e o percentual de recuperação foi calculado. Os valores de recuperação variaram de 102,00-106,30% (DPR = 2,14%), demonstrando que o método possui exatidão adequada na quantificação da rotina na matéria prima vegetal de *C. verum*.

Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A partir dos valores de intercepto com o eixo Y e coeficiente angular, extraídos da curva analítica construída com cinco concentrações da rotina, foi possível calcular os limites de detecção e quantificação do método. O limite de detecção foi de 0,115 µg/mL e o limite de quantificação foi de 0,348 µg/mL.

Robustez

Pequenas e deliberadas variações nos parâmetros experimentais do método foram realizadas a fim de avaliar sua capacidade de manter uma precisão e exatidão

aceitáveis, esta capacidade também é denominada robustez (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020). Foram realizadas variações no fluxo, na temperatura e no fabricante do solvente utilizado na fase móvel, os resultados estão demonstrados na tabela 6. Todas as análises apresentaram desvio padrão relativo <1,65%, e o desvio padrão relativo entre as análises foi de 3,98%, indicando adequada concordância entre os resultados, o que é indicativo que o método é robusto a estas variações.

Tabela 6 - Análise da robustez do método para análise do teor de rutina na matéria prima de *C. verum*.

Fonte de Variação	Parâmetros	Rutina (g%) (Média ± DP; DPR%)
Fluxo (mL/min)	0,895	0,064 ± 0,0006 (1,64)
	0,905	0,065 ± 0,0011 (1,65)
Fabricante do solvente	LiChrosolv [®]	0,068 ± 0,0005 (0,72)
	JTBaker [®]	0,070 ± 0,0011 (1,53)
Temperatura (C°)	26	0,063 ± 0,0004 (0,59)
	29	0,067 ± 0,0008 (1,17)
Resultado geral - Rutina (g%) (Média ± DP; DPR%)		
0,066 ± 0,066 (3,98)		

Onde: g%: Grama % de ESA; DP: Desvio padrão; DPR%: Desvio padrão relativo.
Fonte: Autoria própria.

5.5.2.2 Extrato seco por aspensão

Curva analítica do padrão rutina

A fim de contemplar um novo intervalo de concentração, foi realizada uma nova curva analítica para o padrão rutina, utilizando cinco níveis de concentração. Os resultados indicaram que a curva foi linear na faixa de concentração de 3,9 a 9,1 µg/mL. Os dados brutos de área dos picos estão dispostos na tabela 7, e a curva analítica da média das áreas pode ser observada na figura 24.

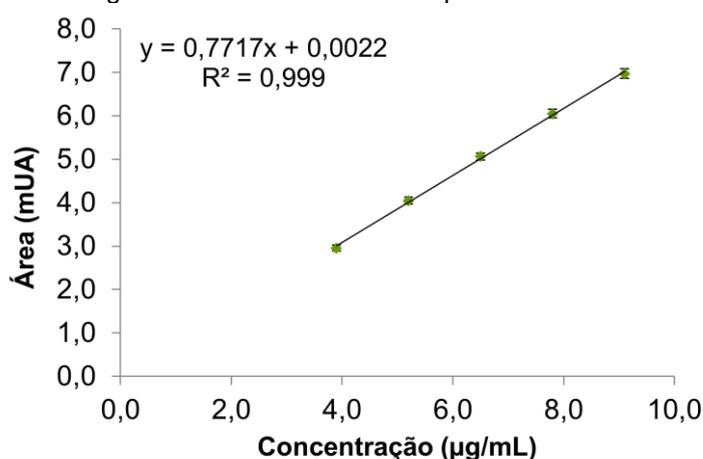
Tabela 7 - Curva analítica do padrão rotina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Média \pm DP (DPR%)
3,9	2,892	3,032	2,948	2,957 \pm 0,07 (2,38)
5,2	3,996	4,142	4,006	4,048 \pm 0,08 (2,01)
6,5	5,007	5,156	5,032	5,065 \pm 0,07 (1,57)
7,8	5,975	6,165	6,006	6,048 \pm 0,10 (1,68)
9,1	6,884	7,096	6,938	6,973 \pm 0,10 (1,57)

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

Fonte: Autoria própria.

Figura 24 - Curva analítica do padrão rotina.



Fonte: Autoria própria.

A avaliação da regressão linear demonstrou um coeficiente de determinação de 0,999 para a curva do padrão rotina, indicando que aproximadamente 100% da variação pode ser explicada pela regressão. A normalidade dos resíduos foi avaliada a partir da análise visual do gráfico de distribuição dos resíduos em função da concentração da resposta, os resíduos apresentaram distribuição aleatória dos erros ao redor de zero, indicando a normalidade da distribuição (Anvisa, 2017a). A homoscedasticidade dos resíduos foi avaliada a partir do teste de Cochran. O valor de C foi de 0,298, inferior ao valor de $C_{\text{crítico}}$ (0,684), assim aceita-se a hipótese, as variâncias de y são iguais e os resíduos são homoscedásticos (Anvisa, 2017a). A análise de variância para a significância da regressão, indicou que a regressão é altamente significativa, com 95% de confiança, apresentando valor de F de 3572,62. O coeficiente angular da curva demonstrou ser estatisticamente diferentes de zero, com confiança de 95% ($p > 0,05$), indicando que a variação da concentração do analito

causa uma variação significativa na resposta (Anvisa, 2017b; Marson *et al.*, 2020; Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

Precisão

A fim de avaliar a precisão do método na quantificação da rotina no ESA, foi avaliada a concordância dos resultados obtido nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, os resultados estão descritos na tabela 8. Para o ensaio de repetibilidade o desvio padrão relativo foi menor que 5%, indicando adequada concordância entre os resultados. Quanto a precisão intermediária, os resultados de ambos os dias, para ambos os analistas apresentaram concordância satisfatória, apresentando desvios padrões relativos variando de 0,21 a 3,42%. O resultado geral das 12 determinações em diferentes dias e diferentes analistas foi de $0,604 \pm 0,025$ g%, com desvio padrão relativo de 4,20%.

Tabela 8 - Repetibilidade e precisão intermediária para rotina no ESA de *C. verum*.

Precisão		
Repetibilidade - Teor (g%) (Média ± DP; DPR%)		
$0,618 \pm 0,018$ (3,04)		
Precisão intermediária - Teor (g%) (Média ± DP; DPR%)		
	Dia 1	Dia 2
Analista 1	$0,586 \pm 0,013$ (0,21)	$0,578 \pm 0,019$ (3,42)
Analista 2	$0,628 \pm 0,001$ (0,17)	$0,628 \pm 0,0009$ (0,14)
Média ± DP (DPR%)	$0,606 \pm 0,022$ (3,74)	$0,602 \pm 0,029$ (4,97)
Resultado Geral	$0,604 \pm 0,025$ (4,20)	

Onde: g%: Grama % de ESA; DP: Desvio padrão; DPR%: Desvio padrão relativo.

Fonte: Autoria própria.

Exatidão

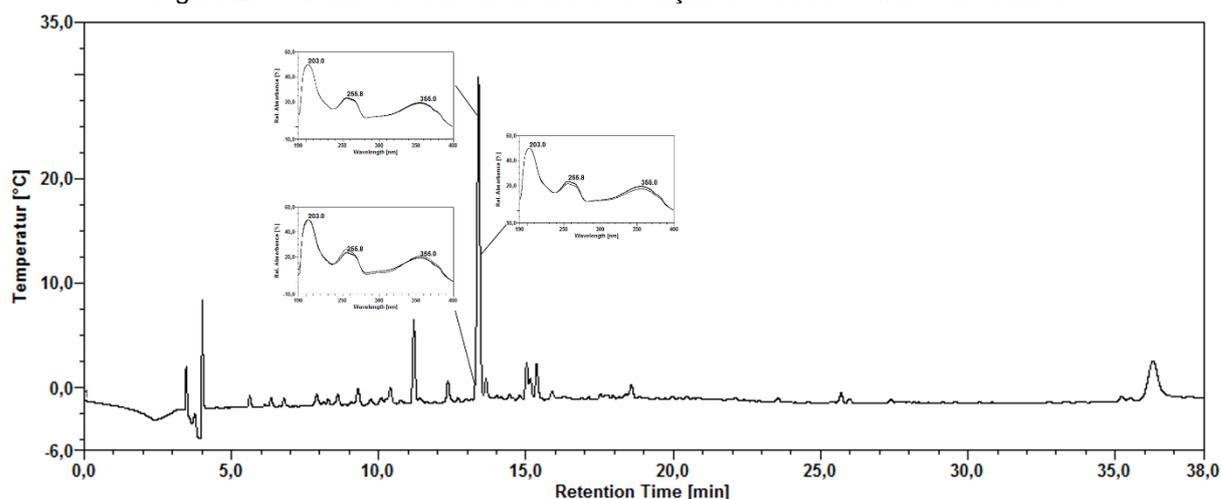
A fim de verificar se os resultados encontrados pelo método analítico possuem concordância com os valores aceitos como verdadeiros, realizou-se o ensaio de exatidão (Marson *et al.*, 2020). Quantidades conhecidas do padrão rotina, nas concentrações de 5,20, 6,50 e 7,80 µg/mL, correspondentes a 80, 100 e 120%, foram

adicionadas na amostra de ESA. As amostras foram analisadas e o percentual de recuperação foi calculado. Os valores de recuperação variaram de 94,59-97,45% (DPR = 1,56%), demonstrando que o método possui exatidão adequada na quantificação da rutina.

Seletividade

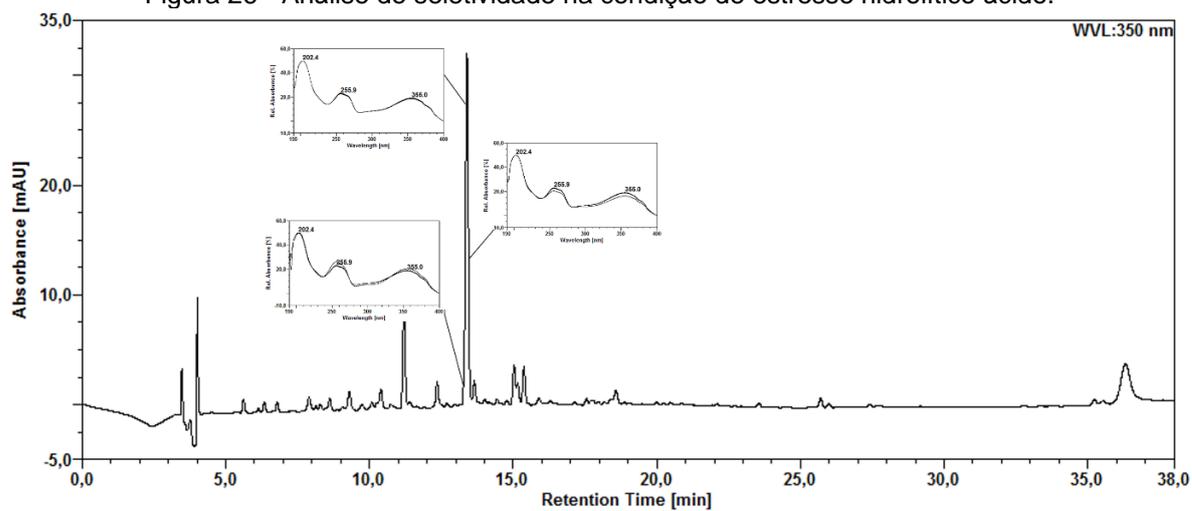
A capacidade do método em quantificar a rutina na presença de outros componentes da amostra, como impurezas, componentes da matriz e possíveis produtos de degradação, foi avaliada no estudo de seletividade. As amostras submetidas as condições de estresse foram utilizadas na análise da seletividade, onde foram avaliadas as purezas dos picos e foram comparados os espectros de absorção de vários pontos dos picos cromatográficos, base, meio e ápice. Os picos cromatográficos da rutina nas amostras degradadas de ESA apresentaram pureza de pico >99%, e, não foram observadas variações nos máximos de absorção dos espectros (Figuras 25 a 29), indicando que o método possui seletividade adequada para quantificar o teor de rutina mesmo em meio a possíveis produtos de degradação, sendo útil como método indicativo de estabilidade para este composto.

Figura 25 - Análise de seletividade na condição de estresse hidrolítico básico.



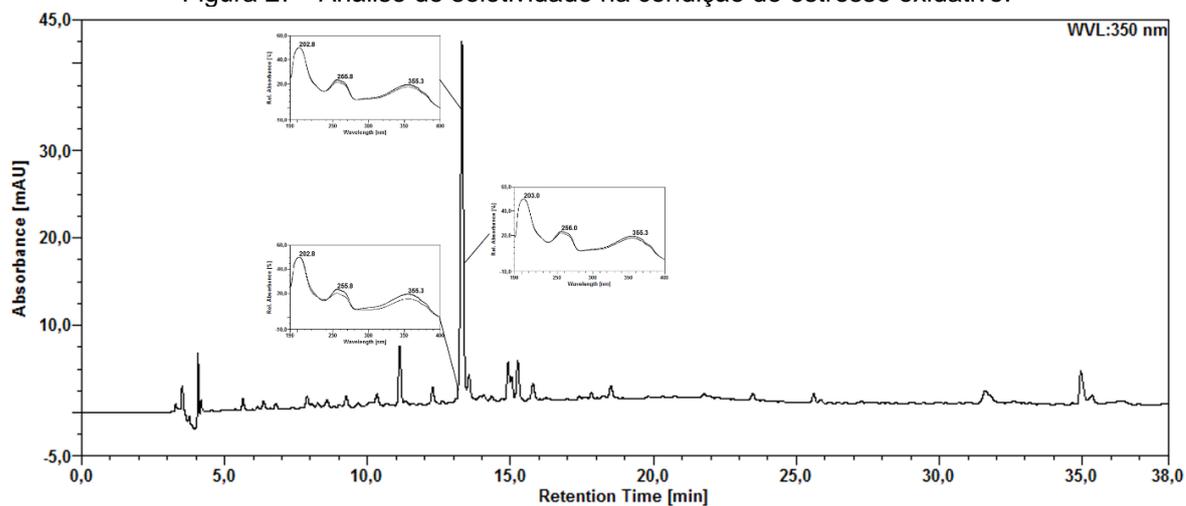
Fonte: Autoria própria.

Figura 26 - Análise de seletividade na condição de estresse hidrolítico ácido.



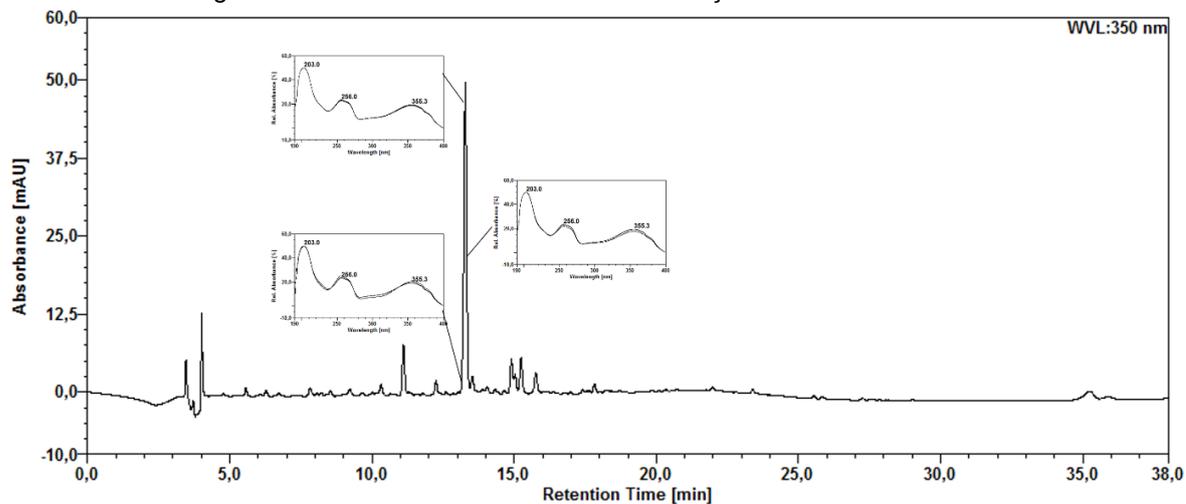
Fonte: Autoria própria.

Figura 27 - Análise de seletividade na condição de estresse oxidativo.



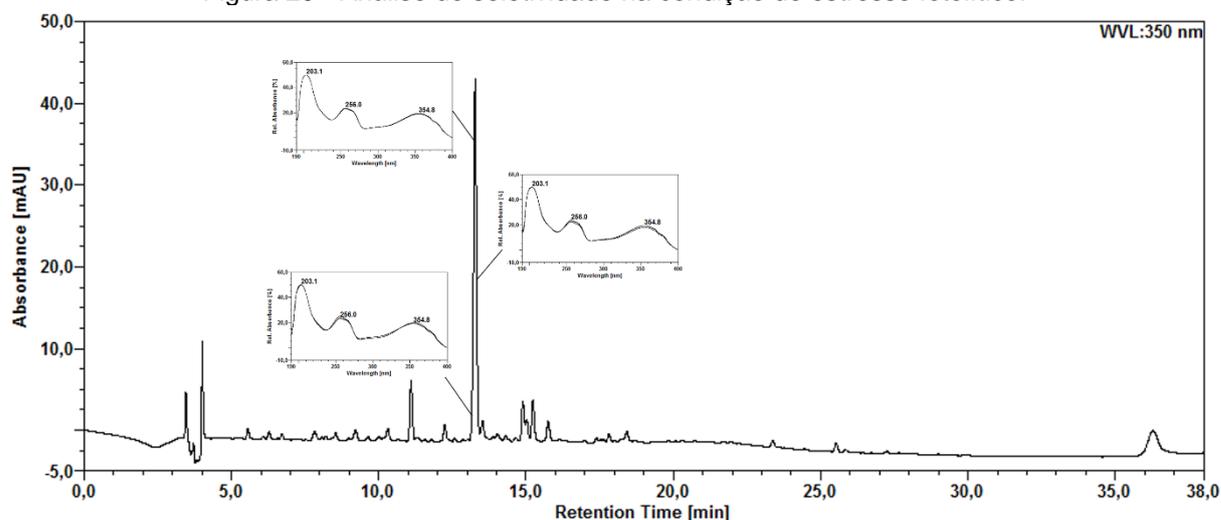
Fonte: Autoria própria.

Figura 28 - Análise de seletividade na condição de estresse térmico.



Fonte: Autoria própria.

Figura 29 - Análise de seletividade na condição de estresse fotolítico.



Fonte: Autoria própria.

5.7 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

A RDC 53 de 2015 (Anvisa, 2015b) determina que o estudo de degradação forçada deve ser realizado considerando algumas condições de estresse, como hidrólise ácida e básica, estresse oxidativo, estresse térmico e estresse fotolítico, além disso, é exigido pela referida legislação no mínimo 10% de degradação da substância de interesse em cada uma das condições. Contudo, a legislação não traz os parâmetros experimentais de concentração de agente degradante e tempo de exposição da amostra para alcance da degradação preconizada.

Dessa forma, seguindo a metodologia proposta por Singh e Bakshi (2000), foram escolhidos os parâmetros experimentais para desenvolvimento do estudo de degradação forçada, a fim de atingir a degradação mínima de 10%, ou até atingir uma condição de estresse extremo, não condizente com situações reais às quais o insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) poderia ser exposto.

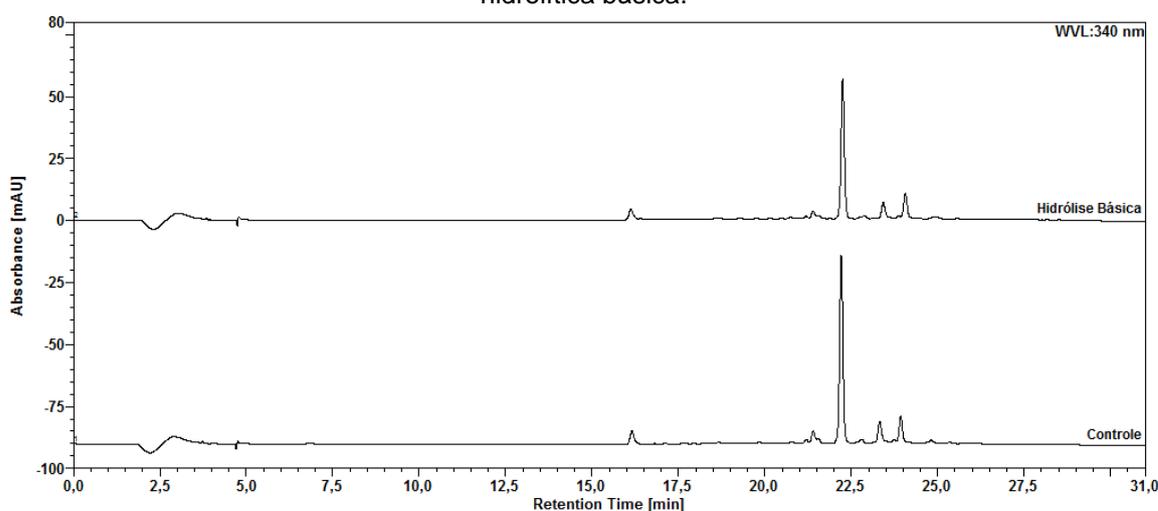
5.7.1 *Eugenia uniflora*

Hidrólise básica

O ESA de *E. uniflora* quando submetido a estresse hidrolítico básico com NaOH à 0,01 M (pH 11,3), à temperatura ambiente por 24 h, apresentou decaimento de cerca

de 12,3% no teor de miricitrina, porém, o cromatograma gerado (Figura 30) não evidenciou o aparecimento de picos de produtos de degradação. Isso pode ocorrer se a degradação gerar produtos de degradação sem cromóforos, ou seja, incapazes de absorver no UV, ou ainda se a decomposição do composto gerar frações de baixo peso molecular (Bakshi; Singh, 2002).

Figura 30 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *E. uniflora* e do ESA após degradação hidrolítica básica.



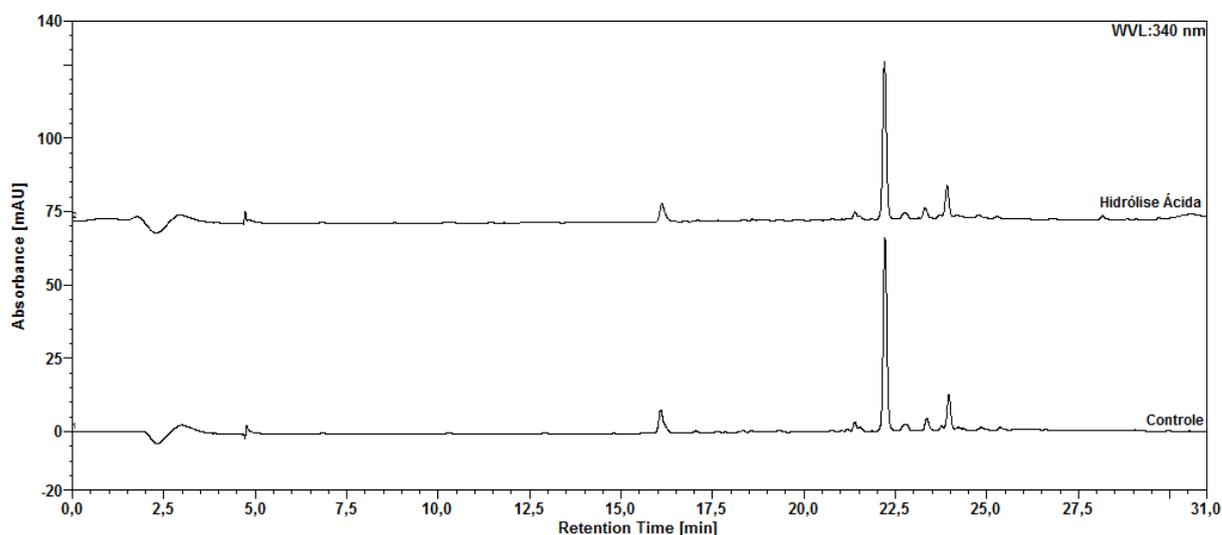
Fonte: Autoria própria.

A miricitrina demonstrou sua sensibilidade à hidrólise básica no estudo realizado por Xiang *et al.* (2017), onde este flavonol foi testado quanto a sua estabilidade em tampões de pH 1 a 8. Em condições de pH mais elevado (7 e 8) este flavonoide foi quase 100% degradado. No geral, flavonoides não são estáveis em pH básico, se mostrando mais estáveis em valores mais baixos de pH (Fuguet *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2014). No caso da miricitrina, esse comportamento é explicado por sua estrutura química, que apresenta cinco hidroxilas fenólicas, o que confere a molécula um caráter ácido, fazendo assim com que esta seja mais estável em condições baixas de pH (Xiang *et al.*, 2017). Desta forma, condições favoráveis a hidrólise básica devem ser evitadas durante as etapas de processamento da *E. uniflora* e seus derivados, a fim de garantir a estabilidade da miricitrina.

Hidrólise ácida

A exposição do ESA de *E. uniflora* a condição de estresse hidrolítico ácido com HCl à 0,1 M (pH 1,3), à temperatura ambiente por 24 h, promoveu uma diminuição de cerca de 13,9% no teor de miricitrina. Assim como foi com o estresse hidrolítico básico, não houve o aparecimento de picos de produtos de degradação (Figura 31). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Xiang *et al.* (2017), que testaram a miricitrina durante 3 h frente a condições extremas de pH ácido, o que resultou em uma degradação de cerca de 15% deste flavonoide. Assim, situações em que podem ocorrer hidrólise ácida devem ser evitadas durante o processamento de *E. uniflora* e seus produtos, para que a miricitrina se mantenha estável.

Figura 31 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *E. uniflora* e do ESA após degradação hidrolítica ácida.

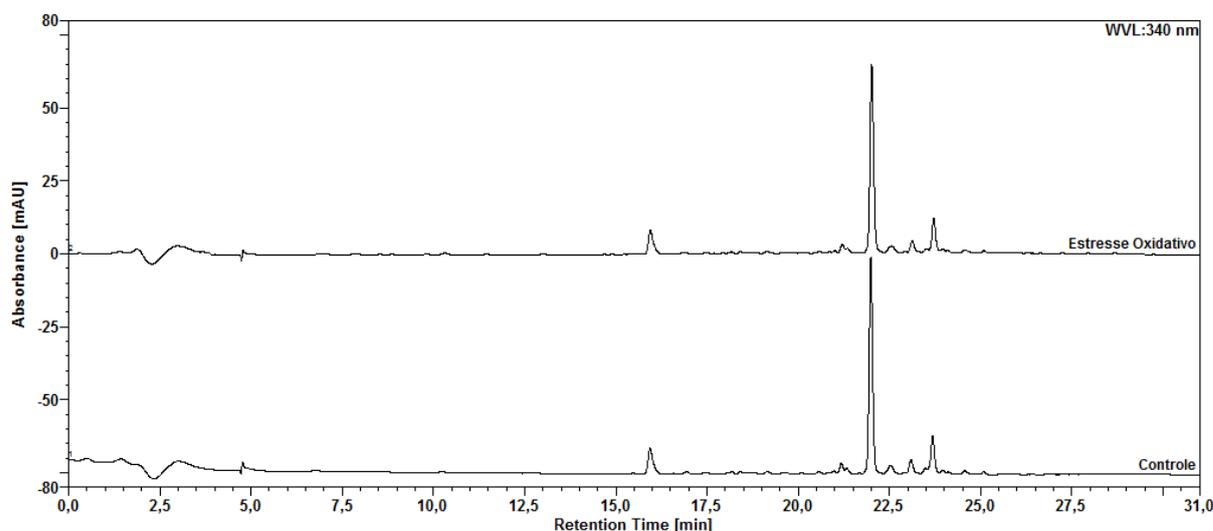


Fonte: Autoria própria.

Estresse oxidativo

A exposição do ESA de *E. uniflora* à H₂O₂ à 3% por 24 h gerou uma degradação menor que a faixa estabelecida (> 10%), nesta condição, o teor de miricitrina decaiu cerca de 3,1%, e, da mesma forma que para as outras condições, não foram evidenciados picos de produtos de degradação (Figura 32).

Figura 32 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *E. uniflora* e do ESA após degradação oxidativa.



Fonte: Autoria própria.

A estabilidade da miricitrina nesta condição de estresse pode ser relacionada a atividade antioxidante relatada para a espécie, atividade esta que está ligada a compostos fenólicos presentes em sua matriz vegetal, dentre os quais a própria miricitrina (Domitrovic *et al.*, 2015; Falcao *et al.*, 2018; Sobeh *et al.*, 2020).

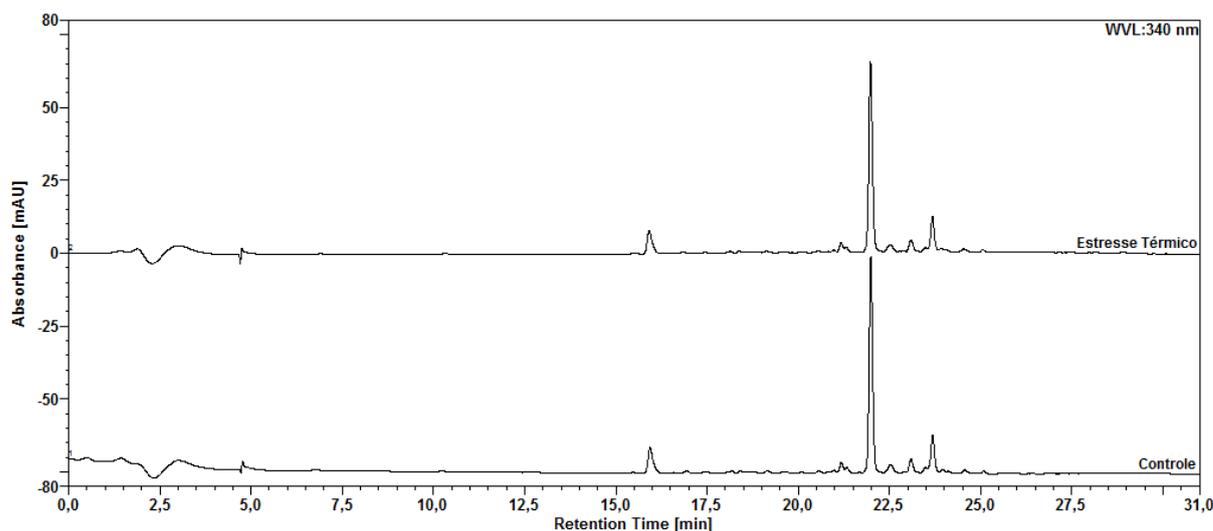
Estresse térmico

O teor de miricitrina diminuiu em cerca de 1,9% quando o ESA foi submetido ao estresse térmico, à 75 °C por 24 h, e, o cromatograma obtido não evidenciou a presença de picos de produtos de degradação (Figura 33).

O estudo desenvolvido por Liu e Zhao (2019), demonstrou que mesmo em temperaturas brandas, a miricetina, aglicona da miricitrina, se mostrou lábil. Porém, apesar da semelhança estrutural, a miricitrina presente no ESA de *E. uniflora* se mostrou estável frente ao estresse térmico sob temperaturas elevadas. A estabilidade térmica de flavonoides está relacionada a vários fatores estruturais como hidroxilação, glicosilação, metilação e acilação. A presença de glicosilação, é relatada como um fator protetor térmico destes compostos, desta forma, a glicosilação da miricitrina pode ser uma das razões para a diferença na estabilidade entre este composto e sua aglicona (Fu; Liu; Soladoye, 2021).

A estabilidade térmica da miricitrina no ESA de *E. uniflora* pode ser considerada uma vantagem por possibilitar a aplicação de procedimentos que envolvam temperatura durante seu processamento.

Figura 33 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *E. uniflora* e do ESA após degradação térmica seca.



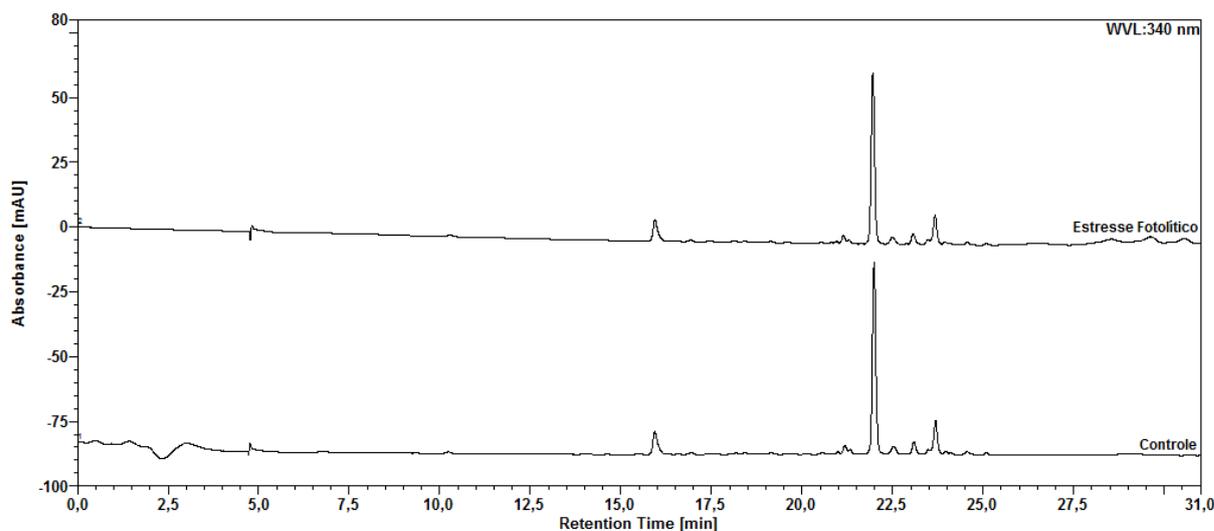
Fonte: Autoria própria.

Estresse fotolítico

A exposição do ESA a condição de estresse de 3,6 milhões lux.h (visível) e 600 watt.h/m² (ultravioleta), gerou uma degradação de cerca de 2,5%, menor do que a degradação mínima de 10%. O cromatograma obtido não evidenciou a formação de produtos de degradação (Figura 34). O comportamento estável da miricitrina a este estresse já era esperado, visto que flavonoides possuem estabilidade frente a radiação UV, podendo ser inclusive utilizados como fotoprotetores (Wang *et al.*, 2022).

A estrutura química dos flavon-3-óis e flavon-5-óis permite que estes compostos possuam esta estabilidade fotoquímica, visto que o excesso de energia absorvido pela molécula é dissipado através de transferência de prótons no estado excitado (Sharif *et al.*, 2022). Dessa forma, a estabilidade da miricitrina, um derivado de flavon-3-ol, pode estar relacionada a essa característica estrutural destes compostos.

Figura 34 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *E. uniflora* e do ESA após degradação fotolítica.



Fonte: Autoria própria

5.7.2 Miricitrina

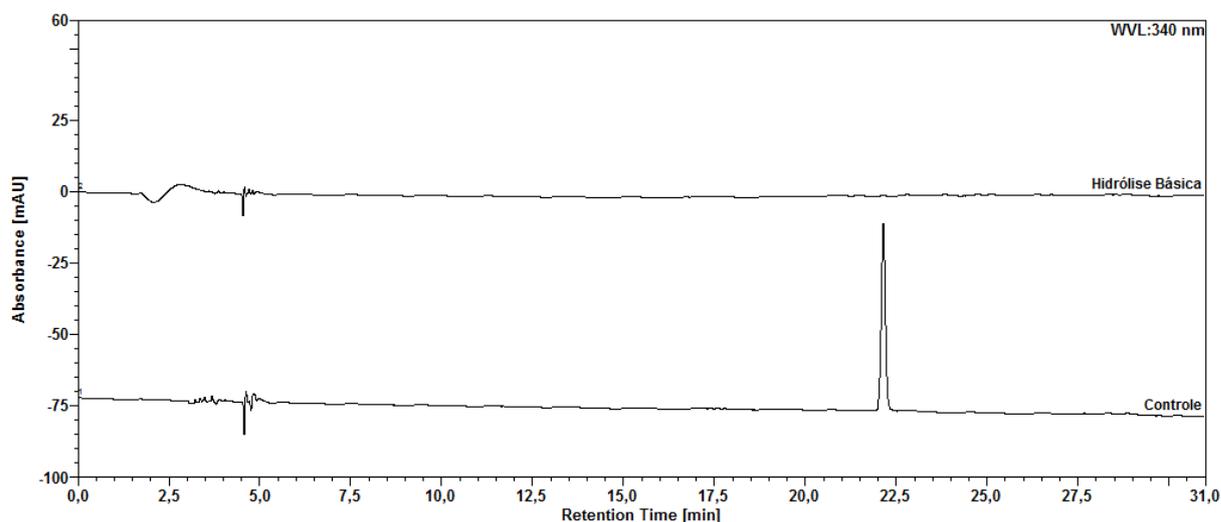
Hidrólise básica

Diferente do que aconteceu quando o ESA foi submetido ao estresse hidrolítico básico, o padrão miricitrina foi completamente degradado ao ser exposto durante 24 h ao NaOH 0,01M. Apesar da extensa degradação, não foram detectados produtos de degradação nesta condição de análise (Figura 35), que pode estar ligado a concentração dos produtos de degradação gerados, ou a suas características de absorção UV, que podem fazer com que eles não sejam detectados em 340 nm.

No estudo de degradação forçada realizado por Balestrin *et al.* (2020), os flavonoides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina também foram mais suscetíveis a condição de estresse quando estavam isolados. Os autores atribuíram este comportamento a uma possível maior estabilidade dos flavonoides quando estão em matrizes vegetais. O mesmo comportamento foi relatado para a catequina e a epicatequina, que, ao serem expostas à condição de estresse hidrolítico básico, foram cerca de duas vezes mais degradadas quando estavam isoladas do que quando estavam no pó do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) (Roggia *et al.*, 2020). Os autores também atribuíram este comportamento a uma possível proteção contra a degradação exercida pela matriz vegetal nos compostos. Dessa forma, esta pode ser uma possível

explicação para a maior sensibilidade do padrão miricitrina ao estresse hidrolítico básico em comparação com a miricitrina no ESA.

Figura 35 - Perfil cromatográfico por CLAE da Miricitrina e da Miricitrina após degradação hidrolítica básica.

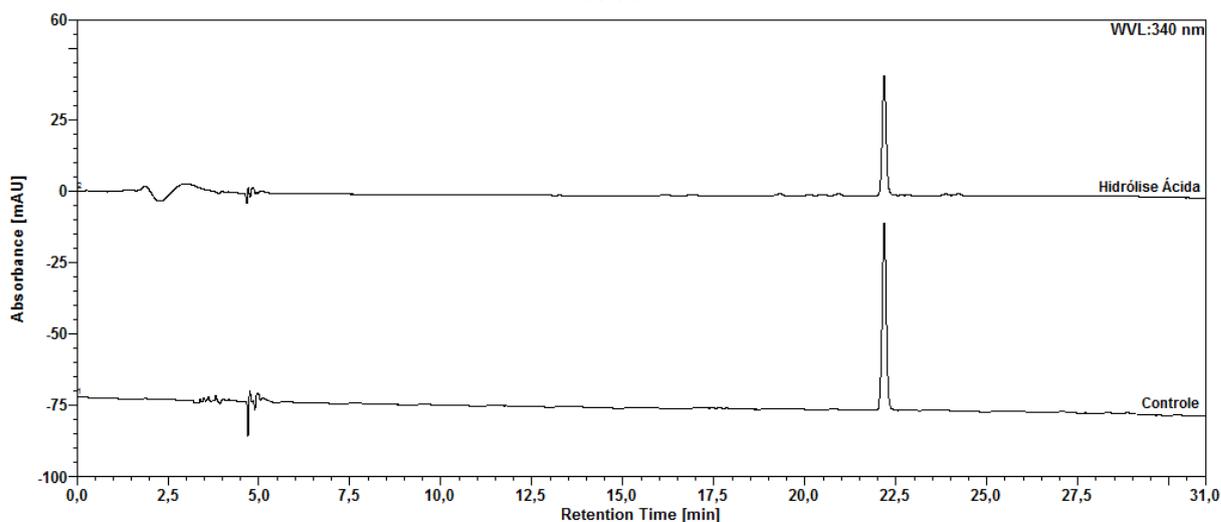


Fonte: Autoria própria.

Hidrólise ácida

Quando submetido a condição de estresse hidrolítico ácido, o padrão de miricitrina apresentou uma redução de cerca de 32,2% na área, cerca de duas vezes maior que a observada no teor de miricitrina no ESA quando submetido a mesma condição de estresse. Da mesma forma que para o estresse anterior, a miricitrina demonstrou ser mais estável no ESA do que isolada, provavelmente devido a um efeito protetor exercido pela matriz vegetal neste flavonoide. Apesar da degradação, não foram observados picos correspondentes a produtos de degradação (Figura 36).

Figura 36 - Perfil cromatográfico por CLAE da Miricitrina e da Miricitrina após degradação hidrolítica ácida.



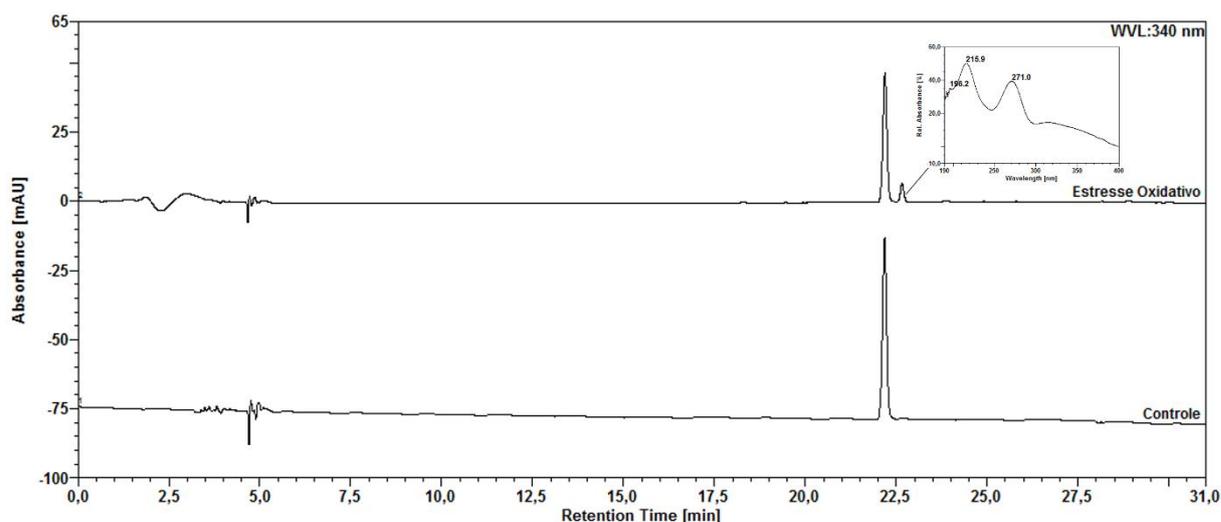
Fonte: Autoria própria.

Estresse oxidativo

A exposição do padrão miricitrina a condição de estresse oxidativo, resultou em uma degradação de cerca de 30,8% na área deste flavonoide, demonstrando que a sensibilidade da miricitrina isolada é cerca de dez vezes superior à sua sensibilidade no ESA. No estudo desenvolvido por Braga; Pianetti e Cesar (2020), os autores observaram que o composto arbutina quando submetido a estresse oxidativo isolado foi mais suscetível a degradação do que quando estava na matriz vegetal, esta diferença na sensibilidade a degradação foi atribuída a presença de compostos antioxidantes na matriz, o que reduz o poder oxidativo do H_2O_2 . Assim como foi com a arbutina, a presença de compostos antioxidantes no ESA de *E. uniflora* pode ter inibido a degradação oxidativa da miricitrina no ESA.

Na figura 37 pode-se observar que o cromatograma obtido demonstrou a presença de um produto de degradação no tR de 22,66 min proveniente da degradação oxidativa da miricitrina. Este produto de degradação apresentou máximos de absorção em 215 e 271 nm, e área de 0,730 mAU, como demonstrado na figura 24.

Figura 37 - Perfil cromatográfico por CLAE da Miricitrina e da Miricitrina após degradação oxidativa.

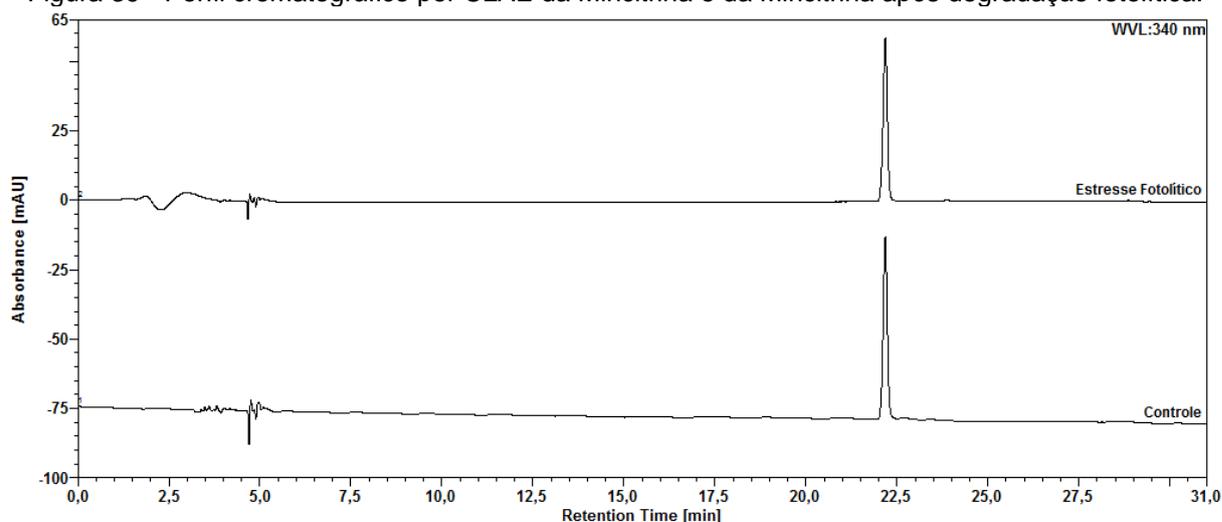


Fonte: Autoria própria.

Estresse térmico

A exposição do padrão de miricitrina ao estresse térmico gerou uma redução de cerca de 16,7% na sua área, redução cerca de oito vezes maior que a observada na miricitrina presente no ESA. Fu; Liu e Soladoye (2021) relacionaram a presença de glicosilação nos flavonoides como um fator que incrementa a estabilidade térmica destas substâncias, porém, a diferença entre a sensibilidade térmica da miricitrina no ESA e isolada é indicativa de que fatores externos a estrutura, como a matriz vegetal, estão ligados a estabilidade deste metabólito. Outros compostos presentes na matriz podem ter funcionado como termoprotetores diminuindo o impacto da temperatura na miricitrina. Um outro fator que pode afetar a sensibilidade térmica da miricitrina é sua estrutura cristalina. O processo de secagem pode comprometer o polimorfismo de muitas substâncias, e diferentes polimorfos apresentam características físico-químicas únicas, afetando assim a sua estabilidade (Hao *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022). Apesar da degradação, não foram observados picos correspondentes a produtos de degradação no cromatograma obtido (Figura 38).

Figura 39 - Perfil cromatográfico por CLAE da Miricitrina e da Miricitrina após degradação fotolítica.



Fonte: Autoria própria.

5.7.3 *Cinnamomum verum*

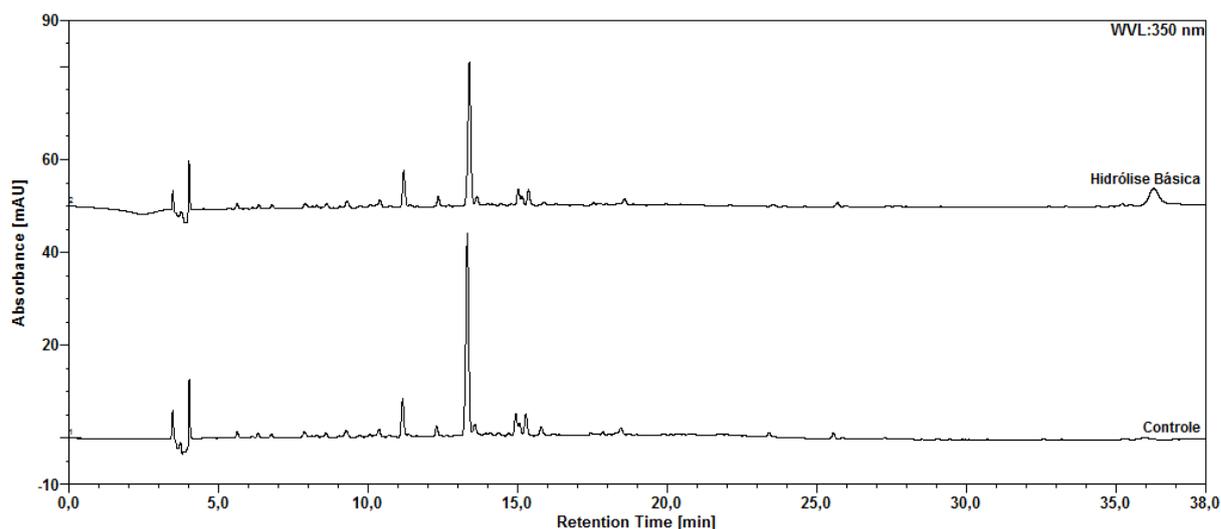
Hidrólise básica

A exposição do ESA de *C. verum* a hidrólise básica resultou numa degradação de cerca de 33,7% no flavonoide rutina, e, como pode-se observar na figura 40, não foram evidenciados produtos de degradação.

Os resultados encontrados corroboram com o estudo desenvolvido por Ma *et al.* (2022), neste, foi observada uma alta degradação do padrão de rutina exposto à NaOH 0,1 M durante 1 h. Da mesma forma, no trabalho desenvolvido por Sengupta *et al.* (2023), a absorvância da rutina decaiu em 14,3% quando esta foi submetida a condições de pH 12 por 30 minutos. Já no estudo desenvolvido por Peng *et al.* (2019), a quercetina, aglicona da rutina, foi completamente degradada após 1 hora em pH 12, esta diferença na degradação da rutina e quercetina pode estar ligada a ocupação da hidroxila da posição 3 do anel C deste flavonoide, já que esta função é essencial para a degradação (Buchner *et al.*, 2006). A instabilidade dos flavonoides em condições básicas de pH já é bem descrita, apresentando processos de degradação mais ou menos intensos (Fuguet *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2019; Sengupta *et al.*, 2023). Como discutido anteriormente, a presença de hidroxilas na estrutura destas moléculas confere a elas um caráter ácido, fazendo com que estas sejam lábeis em altos valores de pH, assim, quanto maior o número de hidroxilas menor a estabilidade destas moléculas em condições básicas (Wang; Zhao, 2016; Xiang *et al.*, 2017). Estes

resultados indicam que, para manter a estabilidade da rutina em produtos derivados de *C. verum*, deve-se evitar a exposição destes a condições básicas de pH.

Figura 40 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *C. verum* e do ESA após degradação hidrolítica básica.



Fonte: Autoria própria.

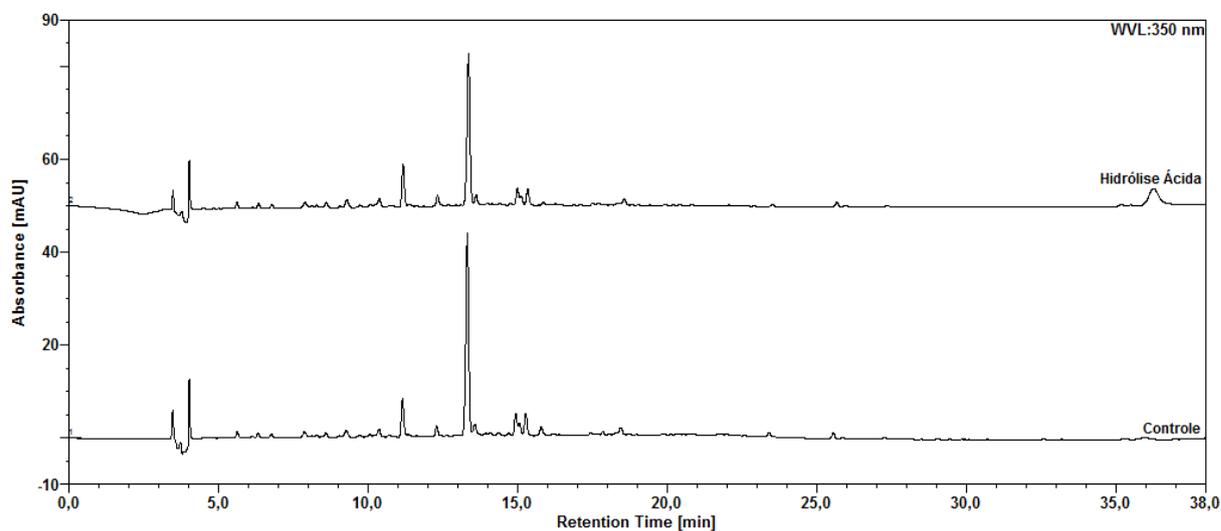
Hidrólise ácida

A rutina degradou cerca de 27% ao ser exposta durante 24 h a HCl 0,01 M, demonstrando que este composto é mais sensível a condição de degradação hidrolítica básica do que a condição de hidrólise ácida. O mesmo foi descrito por Ma *et al.* (2022), neste estudo, o padrão de rutina foi exposto durante 1 h à HCl 1M, e, como descrito anteriormente, durante 1 h à NaOH 0,1 M, que decorreu em uma maior degradação da rutina na condição básica de estresse.

Flavonóis O-glicosilados podem facilmente perder a porção glicosídeo através da quebra da ligação hemiacetal do açúcar por hidrólise ácida, se tornando agliconas (Zuanazzi; Montanha; Zucolotto, 2017). Dessa forma, a hidrólise ácida poderia gerar o aparecimento de um pico correspondente a quercetina, aglicona da rutina, porém, o estudo realizado por Ma *et al.* (2022) demonstrou que a quercetina também é lábil a condição de hidrólise ácida, o que pode justificar o não aparecimento de um pico correspondente a este composto após a hidrólise ácida do ESA de *C. verum*. Também não foram identificados outros picos correspondentes a produtos de degradação no cromatograma obtido a partir do ESA degradado (Figura 41). Considerando a degradação hidrolítica ácida sofrida pelo marcador de *C. verum*, esta é uma condição

a ser evitada durante o processamento desta droga vegetal, a fim de manter sua estabilidade.

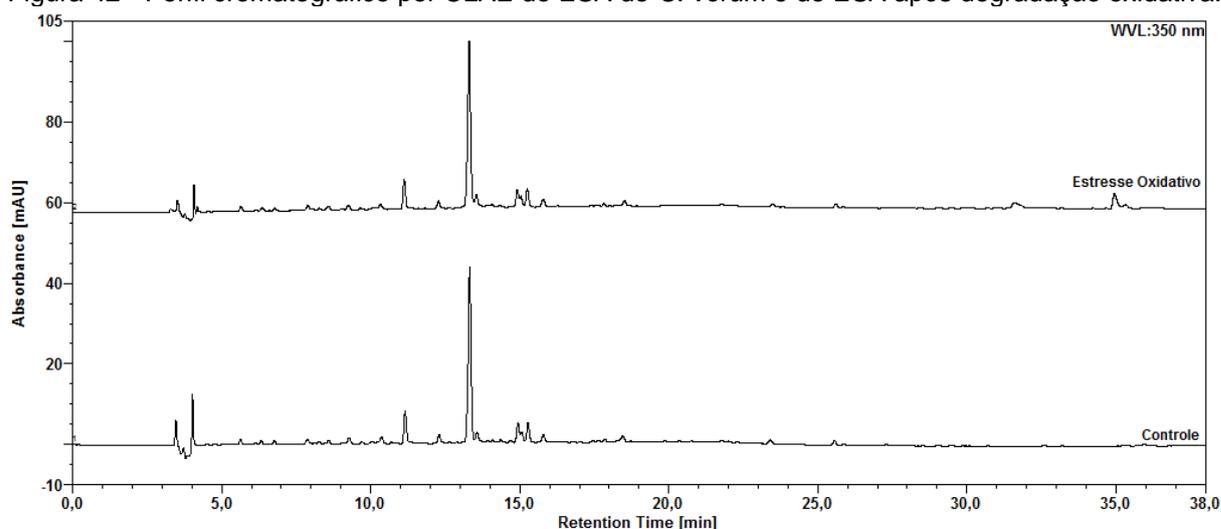
Figura 41 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *C. verum* e do ESA após degradação hidrolítica ácida.



Fonte: Autoria própria.

Estresse oxidativo

A exposição do ESA de *C. verum* à H_2O_2 à 3% por 24 h gerou uma degradação menor que a faixa estabelecida (>10%), nesta condição, o teor de rutina decaiu cerca de 8,4%, e, da mesma forma que para as outras condições, não foram evidenciados picos de produtos de degradação (Figura 42). Esta estabilidade pode estar relacionada a característica antioxidante relatada para este composto (Semwal *et al.*, 2021; Yang; Guo; Yuan, 2008) bem como a atividade antioxidante dos outros flavonoides ou de outros fenólicos presentes na matriz vegetal de *C. verum* (Gulcin *et al.*, 2019; Pandey; Chandra, 2015).

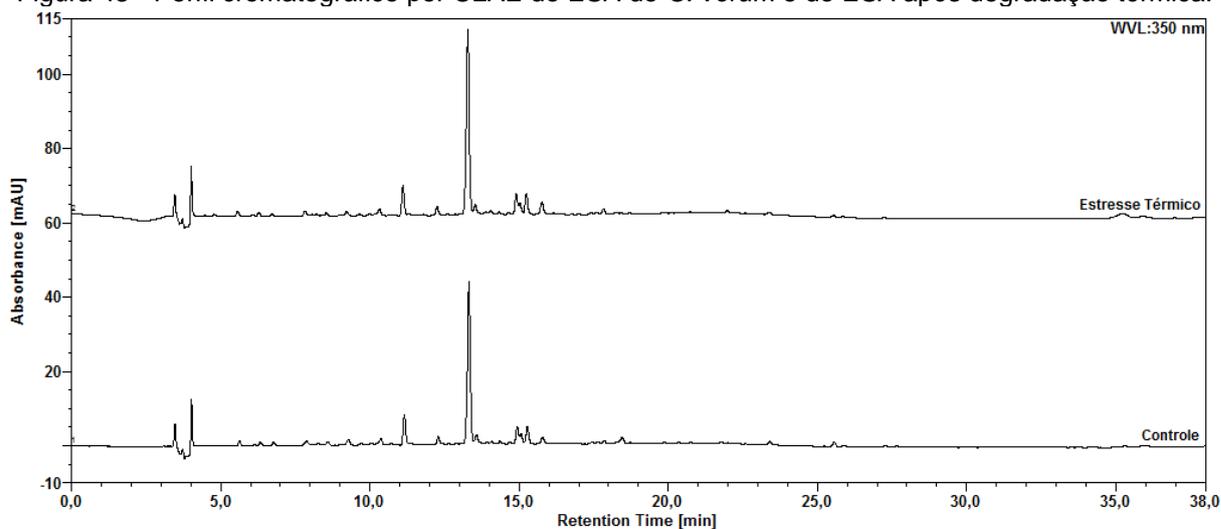
Figura 42 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *C. verum* e do ESA após degradação oxidativa.

Fonte: Autoria própria.

Estresse térmico

A exposição do ESA de *C. verum* a condição de estresse térmico à 75 °C por 24 h não resultou em diferença significativa no teor da rutina, indicando que este composto é estável em condições de estresse térmico (Figura 43). Este resultado corrobora com o resultado descrito no estudo realizado por Ma *et al.* (2022). Neste, o padrão de rutina foi submetido a temperaturas de 60 à 80 C^o durante 12 h e não houve degradação significativa deste composto.

A quercetina, flavonoide do qual a rutina é derivada, é lábil ao estresse térmico, como relata o estudo realizado por Wang *et al.* (2016), dessa forma, a estabilidade da rutina frente a este estresse pode estar relacionada a glicosilação presente na posição 3 do anel C deste composto (Fu; Liu; Soladoye, 2021).

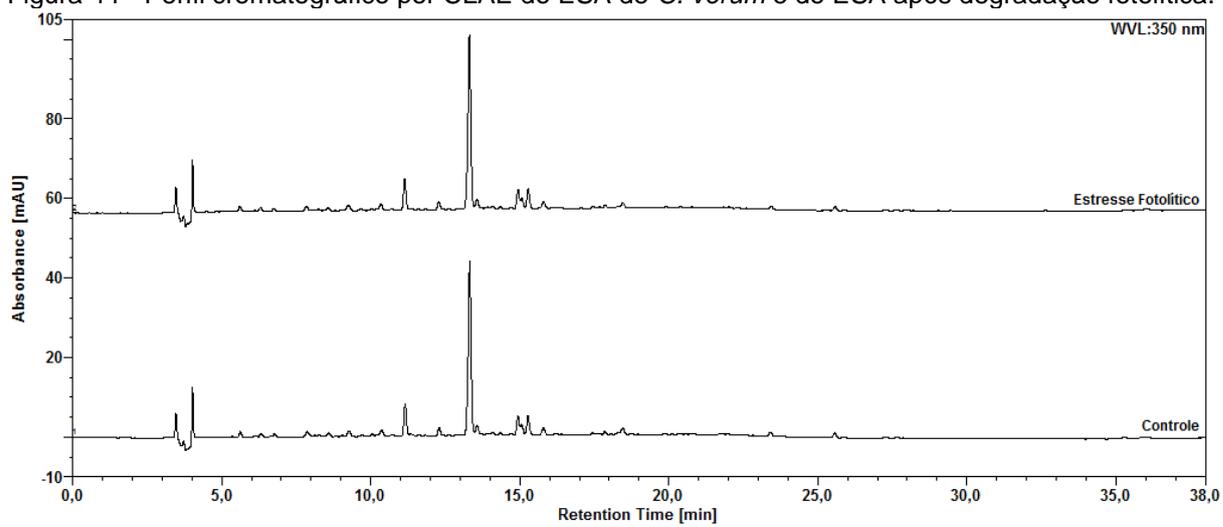
Figura 43 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *C. verum* e do ESA após degradação térmica.

Fonte: Autoria própria.

Estresse fotolítico

Quando o ESA foi submetido a condição de estresse fotolítico, 3,6 milhões lux.h (visível) e 600 watt.h/m² (ultravioleta), foi observado decréscimo de cerca de 3,6% no teor da rutina, indicando a estabilidade deste composto frente a esta condição de estresse. Da mesma forma que nas outras condições de estresse, não foram evidenciados picos correspondentes a produtos de degradação (Figura 44).

Assim como a miricitrina, a rutina é derivada de um flavon-3-ol, compostos que possuem estabilidade fotoquímica decorrente de suas características estruturais (Sharif *et al.*, 2022). Por apresentar este comportamento frente a radiação UV, o emprego da rutina em formulações fotoprotetoras tem sido estudado (Tomazelli *et al.*, 2018).

Figura 44 - Perfil cromatográfico por CLAE do ESA de *C. verum* e do ESA após degradação fotolítica.

Fonte: Autoria própria.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados expostos foi possível concluir que os materiais vegetais utilizados estavam dentro dos parâmetros de qualidade estabelecidos pela farmacopeia, servindo de matéria prima para obtenção de soluções extrativas e extratos secos por aspersão das espécies estudadas. Análises cromatográficas por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência foram eficazes em evidenciar os flavonoides presentes em *E. uniflora* e *C. verum*, mais precisamente os flavonoides miricitrina e rutina, respectivamente.

A validação dos métodos propostos para análise do ESA de *E. uniflora* e para análise da matéria prima vegetal e ESA de *C. verum* demonstrou que os métodos atendem os requisitos preconizados na legislação vigente, sendo adequados para o uso proposto, a análise e quantificação precisa e exata dos marcadores de ambas as espécies. A análise da seletividade dos métodos demonstrou a pureza dos picos cromatográficos da miricitrina e rutina após a degradação dos ESA de *E. uniflora* e *C. verum*, indicando que os métodos podem ser empregados como indicativos de estabilidade destes flavonoides nestas matrizes vegetais.

Através do ensaio de degradação forçada foi possível concluir em que condições os extratos secos de *E. uniflora* e *C. verum*, e o padrão miricitrina são sensíveis. A miricitrina no ESA de *E. uniflora* foi mais sensível em condições de estresse hidrolítico, tanto básico como ácido, se mostrando praticamente estável frente ao estresse oxidativo, térmico e fotolítico. Já o padrão miricitrina se mostrou mais sensível do que a miricitrina no ESA em todas as condições de estresse, levando a conclusão de que a matriz vegetal, além de desempenhar importante papel farmacológico já conhecido, desempenha também um importante papel protetor deste flavonoide frente a estresses, que se ocorrer no trato gastrointestinal pode aumentar a sua biodisponibilidade e conseqüentemente seu potencial farmacológico. O teor da rutina no ESA de *C. verum* também foi mais afetado pelos estresses hidrolíticos, se mostrando também praticamente estável nos estresses oxidativo e fotolítico e estável no estresse térmico. Tais resultados indicaram que as condições em que há a possibilidade de hidrólise devem ser evitadas durante o processamento destas espécies, a fim de preservar suas estabilidades.

O desenvolvimento deste estudo possibilitou a ampliação do conhecimento sobre a estabilidade dos flavonoides miricitrina e rutina, presentes nas matrizes

vegetais de *E. uniflora* e *C. verum*. Os métodos indicativos de estabilidades aqui descritos podem ser aliados no controle da qualidade destas espécies e de produtos derivados delas, contribuindo no estudo de pesquisa e desenvolvimento de novos fitomedicamentos a partir destas espécies vegetais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHEEM, I. T. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 107, n. 3, p. 742-750, Sep 2010.
- ALONSO-CASTRO, A. J.; DOMINGUEZ, F.; GARCIA-CARRANCA, A. Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. **Archives of Medical Research**, 44, n. 5, p. 346-351, Jul 2013.
- ANVISA. RDC N° 26, de 13 de maio de 2014. Brasil: Ministério da Saúde. 26: 34 p. 2014.
- ANVISA. Guia 04 - Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Brasil: Ministério da Saúde: 22 p. 2015a.
- ANVISA. RDC N° 53, de 4 de Dezembro de 2015. Brasil: Ministério da Saúde: 13 p. 2015b.
- ANVISA. Guia 10 - Guia para tratamento estatístico da validação analítica. Brasil: Ministério da Saúde: 19 p. 2017a.
- ANVISA. RDC N° 166, de 24 de Julho de 2017. ANVISA. Brasil: Ministério da Saúde. 166: 21 p. 2017b.
- ANVISA. Farmacopeia Brasileira. Brasília: Ministério da Saúde. 2: 745 p. 2019a.
- ANVISA. Farmacopeia Brasileira. Brasília: Ministério da Saúde. 1: 873 p. 2019b.
- ANVISA. RDC N° 318, de 6 de Novembro de 2019. Brasil: Ministério da Saúde: 17 p. 2019c.
- AZEREDO, C. M. O.; SANTOS, T. G.; MAIA, B. H. L. d. N. S.; SOARES, M. J. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14, 2014.
- BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation**. 2 ed. Londres: Informa Healthcare, 2011.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods - critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 28, p. 1011-1040, 2002.
- BALESTRIN, L. A.; FACHEL, F. N. S.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L. *et al.* A stability-indicating ultra-fast liquid chromatography method for the assay of the main flavonoids of *Achyrocline satureioides* (Marcela) in porcine skin layers and nanoemulsions. **Phytochem Anal**, 31, n. 6, p. 905-914, Nov 2020.

BARBOSA, E. C. G. d. S.; SILVA, W. A. V. d.; MACHADO, J. C. B.; FERREIRA, M. R. A. *et al.* Phytochemical evaluation and method validation for quantification of flavonoids in the leaves of *Cinnamomum verum*. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**, 7, n. 6, p. 1419-1427, 2020.

BELLASSOUED, K.; GHRAB, F.; HAMED, H.; KALLEL, R. *et al.* Protective effect of essential oil of *Cinnamomum verum* bark on hepatic and renal toxicity induced by carbon tetrachloride in rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, 44, n. 6, p. 606-618, Jun 2019.

BEZERRA, I. C. F.; RAMOS, R. T. d. M.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 28, p. 92-101, 2018.

BÍBLIA. Romanos. In: Bíblia Sagrada. Tradução de João Ferreira de Almeida. 1ª edição. São Paulo - SP: Editora Montecristo, 2011. p. 2145.

BLESSY, M.; PATEL, R. D.; PRAJAPATI, P. N.; AGRAWAL, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 4, n. 3, p. 159-165, Jun 2014.

BRAGA, V. C. C.; PIANETTI, G. A.; CESAR, I. C. Comparative stability of arbutin in *Arctostaphylos uva-ursi* by a new comprehensive stability-indicating HPLC method. **Phytochem Anal**, 31, n. 6, p. 884-891, Nov 2020.

BRASIL. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. : Ministério da Saúde 2009.

BUCHNER, N.; KRUMBEIN, A.; ROHN, S.; KROH, L. W. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 20, n. 21, p. 3229-3235, 2006.

CANDEIA, G. L. O. d. M.; COSTA, W. K.; DE OLIVEIRA, A. M.; NAPOLEÃO, T. H. *et al.* Anti-inflammatory, antinociceptive effects and involvement of opioid receptors in the antinociceptive activity of *Eugenia uniflora* leaves obtained with water, ethanol, and propylene glycol mixture. **Journal of Ethnopharmacology**, 296, p. 115508, 2022/10/05/ 2022.

CAVALIERE, C.; CAPRIOTTI, A. L.; LA BARBERA, G.; MONTONE, C. M. *et al.* Liquid Chromatographic Strategies for Separation of Bioactive Compounds in Food Matrices. **Molecules**, 23, n. 12, Nov 27 2018.

CHAKRABORTY, A.; SANKARAN, V.; RAMAR, M.; CHELLAPPAN, D. R. Chemical analysis of leaf essential oil of *Cinnamomum verum* from Palni hills, Tamil Nadu. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, 8, n. 3, 2015.

DA CUNHA, F. A. B.; WACZUK, E. P.; DUARTE, A. E.; BARROS, L. M. *et al.* Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 84, p. 614-621, Dec 2016.

DE SOUZA, C. E. S.; DA SILVA, A. R. P.; ROCHA, J. E.; VEGA GOMEZ, M. C. *et al.* LC–MS characterization, anti-kinetoplastide and cytotoxic activities of natural products from *Eugenia jambolana* Lam. and *Eugenia uniflora*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 7, n. 9, p. 836-841, 2017.

DOMITROVIC, R.; RASHED, K.; CVIJANOVIC, O.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. *et al.* Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. **Chemico-Biological Interactions**, 230, p. 21-29, Mar 25 2015.

DOS SANTOS, J. F. S.; ROCHA, J. E.; BEZERRA, C. F.; SILVA, M. K. N. *et al.* Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, 261, p. 233-239, Sep 30 2018.

ELLOUMI, W.; MAHMOUDI, A.; ORTIZ, S.; BOUTEFNOUCHET, S. *et al.* Wound healing potential of quercetin-3-O-rhamnoside and myricetin-3-O-rhamnoside isolated from *Pistacia lentiscus* distilled leaves in rats model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 146, p. 112574, Feb 2022.

EMA, E. M. A. Guideline on process validation for finished products—information and data to be provided in regulatory submissions. London 2016.

FALCAO, T. R.; DE ARAUJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; DE MORAES RAMOS, R. T. *et al.* Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 18, n. 1, p. 84, Mar 9 2018.

FDA, U. F. D. A. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics Guidance for Industry. 2015.

FIDELIS, E. M.; SAVALL, A. S. P.; PEREIRA, F. d. O.; QUINES, C. B. *et al.* Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, 2022.

FIGUEIREDO, P. L. B.; PINTO, L. C.; DA COSTA, J. S.; DA SILVA, A. R. C. *et al.* Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, 232, p. 30-38, Mar 25 2019.

FIGUEIROA, E. O.; DA SILVA, L. C. N.; DE MELO, C. M.; NEVES, J. K. *et al.* Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: correlation with polyphenol and flavanoid content. **Food and Chemical Toxicology**, 2013, p. 125027, 2013.

FU, Y.; LIU, W.; SOLADOYE, O. P. Towards innovative food processing of flavonoid compounds: Insights into stability and bioactivity. **Lwt**, 150, 2021.

FUGUET, E.; RÀFOLS, C.; MAÑÉ, M.; RUIZ, R. *et al.* Acidity constants of hydroxyl groups placed in several flavonoids: Two flavanones, two flavones and five flavonols. **Talanta**, 253, 2023.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 25, n. 2, p. 149-164, Feb 2017.

GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M. *et al.* Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, 86, p. 4-14, 2014.

GOMES, J. H. d. S.; DA SILVA, G. C.; CÔRTEZ, S. F.; DE PÁDUA, R. M. *et al.* Forced degradation of l-(+)-bornesitol, a bioactive marker of *Hancornia speciosa*: Development and validation of stability indicating UHPLC-MS method and effect of degraded products on ACE inhibition. **Journal of Chromatography B**, 1093-1094, p. 31-38, 2018/09/01/ 2018.

GU, R.; WANG, Y.; LONG, B.; KENNELLY, E. *et al.* Prospecting for Bioactive Constituents from Traditional Medicinal Plants through Ethnobotanical Approaches. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 37, n. 6, p. 903-915, 2014.

GULCIN, I.; KAYA, R.; GOREN, A. C.; AKINCIÖGLU, H. *et al.* Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. **International Journal of Food Properties**, 22, n. 1, p. 1511-1526, 2019.

GULLÓN, B.; LÚ-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M. *et al.* Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, 67, p. 220-235, 2017.

HAMEED, I.; ALTAMEME, H.; MOHAMMED, G. Evaluation of Antifungal and Antibacterial Activity and Analysis of Bioactive Phytochemical Compounds of *Cinnamomum Zeylanicum* (Cinnamon Bark) using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Oriental Journal of Chemistry**, 32, n. 4, p. 1769-1788, 2016.

HAO, C.; JIN, J.; XIONG, J.; YANG, Z. *et al.* Polymorphs of DP-VPA Solid Solutions and Their Physicochemical Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 109, n. 7, p. 2156-2165, Jul 2020.

HE, N.; WANG, P.; NIU, Y.; CHEN, J. *et al.* Evaluation antithrombotic activity and action mechanism of myricitrin. **Industrial Crops and Products**, 129, p. 536-541, 2019.

HOBBS, C. A.; SWARTZ, C.; MARONPOT, R.; DAVIS, J. *et al.* Genotoxicity evaluation of the flavonoid, myricitrin, and its aglycone, myricetin. **Food and Chemical Toxicology**, 83, p. 283-292, Sep 2015.

ICH. Stability testing: photostability testing of new drug substances and products. pp.

ICH. Stability testing of new drug substances and products. pp. 1-24.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology. 1, n. 20, p. 05, 2005.

KARUNAMOORTHY, K.; JEGAJEEVANRAM, K.; VIJAYALAKSHMI, J.; MENGISTIE, E. Traditional Medicinal Plants: A Source of Phytotherapeutic Modality in Resource-Constrained Health Care Settings. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, 18, n. 1, p. 67-74, 2012.

KAUSHAL, N.; SINGH, M.; SINGH SANGWAN, R. Flavonoids: Food associations, therapeutic mechanisms, metabolism and nanoformulations. **Food Research International**, 157, p. 111442, Jul 2022.

KHAN, N. H.; ABDULBAQI, I. M.; DARWIS, Y.; AMINU, N. *et al.* A stability-indicating HPLC-UV method for the quantification of anthocyanin in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) spray-dried extract, oral powder, and lozenges. **Heliyon**, 8, n. 3, p. e09177, Mar 2022.

KHAN, R. A.; KHAN, M. R.; SAHREEN, S. CCl₄-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 12, n. 178, 2012.

Lauraceae. Flora do Brasil 2020, 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB25614>. Acesso em: 29 jan. 2022.

LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, 812, p. 53-70, Dec 5 2004.

LIMA, L. B.; VITURINO DA SILVA, W. A.; SILVA, S. L.; SANTOS, E. C. F. *et al.* Chemical and antibacterial analysis of *Cinnamomum verum* leaves extract and fractions against multidrug resistant bacteria. **Natural Product Research**, p. 1-6, Mar 22 2021.

LIU, W.-N.; ZHAO, X.-H. Changes of the stability and bioactivity of quercetin and myricetin in BGC-823 cells in response to heat treatment and Fe²⁺/Cu²⁺ addition. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 13, n. 4, p. 3285-3297, 2019.

LIU, W. J. H. **Traditional Herbal Medicine Research Methods - Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies**. New Jersey: Wiley, 2011.

MA, X.; WANG, F.; HANG, T.; DRAMOU, P. Degradation study of rutin as template from magnetic composite molecularly imprinted polymer supernatant samples by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1673, p. 463199, Jun 21 2022.

MA, Y.; ZENG, M.; SUN, R.; HU, M. Disposition of Flavonoids Impacts their Efficacy and Safety. **Current Drug Metabolism**, 15, p. 841-864, 2014.

MAHMOOD, H.; ALI, Q.; HAFEEZ, M. M.; MALIK, A. Antioxidant Activity of Syzygium Aromaticum and Cinnamomum Verum Seed Extracts. **Biological and Clinical Sciences Research Journal**, 2021, n. 1, 2021.

MAHOOD, H. E. EFFECT OF MANNITOL AND PEG ON THE ACCUMULATION OF RUTIN IN CELL SUSPENSION CULTURE OF *Ruta graveolens*. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, 22, p. 12-18, 2021.

MAN, N.; WANG, Q.; LI, H.; ADU-FRIMPONG, M. *et al.* Improved oral bioavailability of myricitrin by liquid self-microemulsifying drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 52, p. 597-606, 2019.

MARSON, B. M.; CONCENTINO, V.; JUNKERT, A. M.; FACHI, M. M. *et al.* Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on HPLC methods. **Química Nova**, 43, p. 1190-1203, 2020.

MARTINEZ-CORREA, H. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; PEIXOTO, C. A. *et al.* Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, 55, n. 3, p. 998-1006, 2011.

MAZINE, F. F.; BÜNGER, M.; FARIA, J. E. Q.; FERNANDES, T. *et al.* **Eugenia**. Flora do Brasil 2020, 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10560>. Acesso em: 29 jan 2022.

MEL, M.; GUNATHILAKE, K.; FERNANDO, C. A. N. Formulation of microencapsulated rutin and evaluation of bioactivity and stability upon in vitro digestive and dialysis conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, 159, p. 316-323, Sep 15 2020.

MORAES DO CARMO, A. C.; PEREIRA, R. S.; GRATIERI, T. Brazilian requirements for stability indicating methods. **Trends in Analytical Chemistry**, 98, p. 58-63, 2018/01/01/ 2018.

MOURA, G. S.; OLIVEIRA, I. J. d.; BONOME, L. T. d. S.; FRANZENER, G. *Eugenia uniflora* L.: potential uses as a bioactive plant. **Arquivos do Instituto Biológico**, 85, n. 0, 2018.

NARAYANANKUTTY, A.; KUNNATH, K.; ALFARHAN, A.; RAJAGOPAL, R. *et al.* Chemical Composition of *Cinnamomum verum* Leaf and Flower Essential Oils and Analysis of Their Antibacterial, Insecticidal, and Larvicidal Properties. **Molecules**, 26, n. 20, Oct 19 2021.

NCBI, N. C. f. B. I.-. **PubChem Compound Summary for CID 5281673, Myricitrin.**, 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281673>.

NETO, B. d. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2 ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001.

OMS, O. M. d. S. Guidelines on Validation—Appendix 4—Analytical Method Validation. : OMS 2018.

PANDEY, M.; CHANDRA, D. R. Evaluation of Ethanol and Aqueous extracts of Cinnamomum verum Leaf Galls for Potential Antioxidant and Analgesic activity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2015.

PANDEY, R. K.; SHUKLA, S. S.; VYAS, A.; JAIN, V. *et al.* **Fingerprinting analysis and quality control methods of herbal medicines**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 2019.

PENG, S.; ZOU, L.; ZHOU, W.; LIU, W. *et al.* Encapsulation of Lipophilic Polyphenols into Nanoliposomes Using pH-Driven Method: Advantages and Disadvantages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, n. 26, p. 7506-7511, Jul 3 2019.

PEREIRA, A. V.; BELTRAME, F. L. A importância da cromatografia líquida na qualificação e quantificação de drogas vegetais e seus metabólitos. *In: CASS, Q. e CASSIANO, N. (Ed.). Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações:* Elsevier Brasil, 2015. cap. 12.

PEREIRA, N. L. F.; AQUINO, P. E. A.; JUNIOR, J.; CRISTO, J. S. *et al.* In vitro evaluation of the antibacterial potential and modification of antibiotic activity of the Eugenia uniflora L. essential oil in association with led lights. **Microbial Pathogenesis**, 110, p. 512-518, Sep 2017.

PRASAD, R.; PRASAD, S. B. A review on the chemistry and biological properties of Rutin, a promising nutraceutical agent. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 5, n. S1, p. 1-20, 2019.

QADIR, M. M. F.; BHATTI, A.; ASHRAF, M. U.; SANDHU, M. A. *et al.* Immunomodulatory and therapeutic role of Cinnamomum verum extracts in collagen-induced arthritic BALB/c mice. **Inflammopharmacology**, 26, n. 1, p. 157-170, Feb 2018.

QIN, M.; LUO, Y.; MENG, X. B.; WANG, M. *et al.* Myricitrin attenuates endothelial cell apoptosis to prevent atherosclerosis: An insight into PI3K/Akt activation and STAT3 signaling pathways. **Vascular Pharmacology**, 70, p. 23-34, Jul 2015.

RAMAZANI, E.; YAZDFAZELI, M.; EMAMI, S. A.; MOHTASHAMI, L. *et al.* Protective effects of Cinnamomum verum, Cinnamomum cassia and cinnamaldehyde against 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells. **Mol Biol Rep**, 47, n. 4, p. 2437-2445, Apr 2020.

RAMOS, R. T. M.; BEZERRA, I. C. F.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. Spectrophotometric quantification of flavonoids in herbal material, crude extract, and fractions from leaves of Eugenia uniflora Linn. **Pharmacognosy research**, 9, n. 3, p. 253, 2017.

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 129, p. 115913, 2020/08/01/ 2020.

RATNATILAKA NA BHUKET, P.; WICHITNITHAD, W.; SUDTANON, O.; ROJSITTHISAK, P. A stability-indicating UPLC method for the determination of curcumin diethyl disuccinate, an ester prodrug of curcumin, in raw materials. **Heliyon**, 6, n. 8, p. e04561, Aug 2020.

RATTMANN, Y. D.; DE SOUZA, L. M.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M.; DARTORA, N. *et al.* Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012, p. 623940, 2012.

RAVINDRAN, P. N.; BABU, K. N.; SHYLAJA, M. **Cinnamon and Cassia-The genus Cinnamomum**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

RODRIGUES, K. A.; AMORIM, L. V.; DE OLIVEIRA, J. M.; DIAS, C. N. *et al.* *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013, p. 279726, 2013.

ROGGIA, I.; DALCIN, A. J. F.; DE SOUZA, D.; MACHADO, A. K. *et al.* Guarana: Stability-Indicating RP-HPLC method and safety profile using microglial cells. **Journal of Food Composition and Analysis**, 94, 2020.

SAMMANI, M. S.; CLAVIJO, S.; CERDÀ, V. Recent, advanced sample pretreatments and analytical methods for flavonoids determination in different samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 138, 2021.

SAMY, M. N.; SUGIMOTO, S.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H. *et al.* Bioactive compounds from the leaves of *Eugenia uniflora*. **Journal of Natural Products**, 7, 2014.

SANTOS, K. K.; MATIAS, E. F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. *et al.* Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, 131, n. 1, p. 130-132, May 2012.

SCHUMACHER, N. S.; COLOMEU, T. C.; DE FIGUEIREDO, D.; CARVALHO VDE, C. *et al.* Identification and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia uniflora* Leaves. Characterization of the Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Extract on Diabetes Expression in an Experimental Model of Spontaneous Type 1 Diabetes (NOD Mice). **Antioxidants**, 4, n. 4, p. 662-680, Oct 9 2015.

SCOTTI, R.; STRINGARO, A.; NICOLINI, L.; ZANELLATO, M. *et al.* Effects of Essential Oils from *Cymbopogon* spp. and *Cinnamomum verum* on Biofilm and Virulence Properties of *Escherichia coli* O157:H7. **Antibiotics (Basel)**, 10, n. 2, Jan 25 2021.

SELVARAJ, G.; KALIAMURTHI, S.; THIRUNGNASAMBANDAM, R.; VIVEKANANDAN, L. *et al.* Anti-nociceptive effect in mice of thillai flavonoid rutin. **Biomed Environ Sci**, 27, n. 4, p. 295-299, Apr 2014.

SEMWAL, R.; JOSHI, S. K.; SEMWAL, R. B.; SEMWAL, D. K. Health benefits and limitations of rutin - A natural flavonoid with high nutraceutical value. **Phytochemistry Letters**, 46, p. 119-128, 2021.

SENGUPTA, P.; DAS, D.; BHATTACHARYA, S.; SUR, R. *et al.* A pH-driven method for liposomal encapsulation of dietary flavonoid rutin: Sustained release and enhanced bioefficacy. **Food Bioscience**, 52, 2023.

SHARIF, S.; NABAIS, P.; MELO, M. J.; PINA, F. *et al.* Photoreactivity and stability of flavonoid yellows used in cultural heritage. **Dyes and Pigments**, 199, 2022.

SHARMA, H.; PATHAK, R. A Review on Medicinal Uses of Cinnamomum verum (Cinnamon). **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, 11, n. 6-S, p. 161-166, 2021.

SHARMA, V. K.; PRATEEKSHA; GUPTA, S. C.; SINGH, B. N. *et al.* Cinnamomum verum-derived bioactives-functionalized gold nanoparticles for prevention of obesity through gut microbiota reshaping. **Materials Today Bio**, 13, p. 100204, Jan 2022.

SHEN, N.; WANG, T.; GAN, Q.; LIU, S. *et al.* Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, 383, p. 132531, Jul 30 2022.

SHOYAMA, Y. **Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas**. 1 ed. Croácia: InTech, 2011.

SILVA-ROCHA, W. P.; LEMOS, V. L. B.; FERREIRA, M. R.; SOARES, L. A. *et al.* Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 15, p. 6, Feb 5 2015.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on the Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceutical Technology Asia**, 2000.

SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; SAHU, A. *et al.* A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 69, p. 148-173, Oct 2012.

SOARES, L. A. L.; FARIAS, M. R. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., *et al.* (Ed.). **Farmacognosia – Do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 8.

SOBEH, M.; EL-RAEY, M.; REZQ, S.; ABDELFATTAH, M. A. O. *et al.* Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-

inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 240, p. 111939, Aug 10 2019.

SOBEH, M.; HAMZA, M. S.; ASHOUR, M. L.; ELKHATIEB, M. *et al.* A Polyphenol-Rich Fraction from *Eugenia uniflora* Exhibits Antioxidant and Hepatoprotective Activities In Vivo. **Pharmaceuticals**, 13, n. 5, Apr 29 2020.

SOBRAL-SOUZA, C. E.; SILVA, A. R. P.; LEITE, N. F.; ROCHA, J. E. *et al.* The role of extracts from *Eugenia uniflora* L. against metal stress in eukaryotic and prokaryotic models. **South African Journal of Botany**, 131, p. 360-368, 2020/07/01/ 2020.

SOUZA, J. A. L.; SILVA, W. A. V.; BEZERRA, I. C. F.; FERREIRA, M. R. A. *et al.* Chemical profiles by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography of plant species from Northeast Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, 14, n. 56, 2018.

SOUZA, L. B. F. C.; SILVA-ROCHA, W. P.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *et al.* Influence of *Eugenia uniflora* Extract on Adhesion to Human Buccal Epithelial Cells, Biofilm Formation, and Cell Surface Hydrophobicity of *Candida* spp. from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients. **Molecules**, 23, n. 10, 2018.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; VANDER HEYDEN, Y. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. **Analytica Chimica Acta**, 690, n. 2, p. 148-161, Apr 1 2011.

TOMAZELLI, L. C.; DE ASSIS RAMOS, M. M.; SAUCE, R.; CANDIDO, T. M. *et al.* SPF enhancement provided by rutin in a multifunctional sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, 552, n. 1-2, p. 401-406, Dec 1 2018.

TORRES-REGO, M.; FURTADO, A. A.; BITENCOURT, M. A.; LIMA, M. C. *et al.* Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 16, p. 275, Aug 5 2016.

TULI, H. S. **Current Aspects of Flavonoids: Their Role in Cancer Treatment**. Singapura: Springer, 2019.

VICTORIA, F. N.; LENARDAO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G. *et al.* Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, 50, n. 8, p. 2668-2674, Aug 2012.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. **High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2011.

WANG, J.; SU, B.; JIANG, H.; CUI, N. *et al.* Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae): A review. **Fitoterapia**, 146, p. 104675, Oct 2020.

WANG, J.; ZHAO, X.-H. Degradation kinetics of fisetin and quercetin in solutions affected by medium pH, temperature and co-existed proteins. **Journal of the Serbian Chemical Society**, 81, n. 3, p. 243-253, 2016.

WANG, T.; ZHAO, J.; YANG, Z.; XIONG, L. *et al.* Polyphenolic sunscreens for photoprotection. **Green Chemistry**, 24, n. 9, p. 3605-3622, 2022.

WANG, W.; SUN, C.; MAO, L.; MA, P. *et al.* The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 56, p. 21-38, 2016.

WENG, W.; WANG, Q.; WEI, C.; MAN, N. *et al.* Preparation, characterization, pharmacokinetics and anti-hyperuricemia activity studies of myricitrin-loaded proliposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, 572, p. 118735, Dec 15 2019.

WIJESINGHE, G. K.; MAIA, F. C.; DE OLIVEIRA, T. R.; DE FEIRIA, S. N. B. *et al.* Effect of Cinnamomum verum leaf essential oil on virulence factors of Candida species and determination of the in-vivo toxicity with Galleria mellonella model. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 115, p. e200349, 2020.

WILLIAMS, A. R.; RAMSAY, A.; HANSEN, T. V.; ROPIAK, H. M. *et al.* Anthelmintic activity of trans-cinnamaldehyde and A- and B-type proanthocyanidins derived from cinnamon (Cinnamomum verum). **Scientific Reports**, 5, p. 14791, Sep 30 2015.

XIANG, D.; WANG, C. G.; WANG, W. Q.; SHI, C. Y. *et al.* Gastrointestinal stability of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin: an in vitro investigation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 68, n. 6, p. 704-711, Sep 2017.

XIE, Y.; JIANG, Z. H.; ZHOU, H.; CAI, X. *et al.* Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 43, n. 1, p. 204-212, Jan 4 2007.

YAN, Z.; LIN, Z.; WU, Y.; ZHAN, J. *et al.* The protective effect of myricitrin in osteoarthritis: An in vitro and in vivo study. **International Immunopharmacology**, 84, p. 106511, Jul 2020.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT - Food Science and Technology**, 41, n. 6, p. 1060-1066, 2008.

YAP, P. S.; KRISHNAN, T.; CHAN, K. G.; LIM, S. H. Antibacterial Mode of Action of Cinnamomum verum Bark Essential Oil, Alone and in Combination with Piperacillin, Against a Multi-Drug-Resistant Escherichia coli Strain. **J Microbiol Biotechnol**, 25, n. 8, p. 1299-1306, Aug 2015.

ZHAO, J.; YANG, J.; XIE, Y. Improvement strategies for the oral bioavailability of poorly water-soluble flavonoids: an overview. **International journal of pharmaceutics**, 570, p. 118642, 2019.

ZHOU, L.; WANG, R.; WANG, J.; ZHAO, K. *et al.* Characterization, solubility and stability of amentoflavone polymorphs. **Journal of Molecular Structure**, 1262, 2022.

ZUANAZZI, J. Â. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., *et al* (Ed.). **Farmacognosia – Do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 15.